

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391439 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.03(51) Int. Cl. C07K 7/08 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)
C12N 15/10 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.11.12

(54) БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДЛЯ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА 1 (TfR1)

(31) 2017927.1; 2106903.4; 63/261,820

(72) Изобретатель:

(32) 2020.11.13; 2021.05.14; 2021.09.29

Гоуэнс Эллен, Мадд Джемма, Ригби

(33) GB; GB; US

Майкл, Сет Пунит, Скиннер Майкл,

(86) PCT/GB2021/052927

Стэнвей Стивен, Урбонас Людвикас,

(87) WO 2022/101633 2022.05.19

Ван Ритсотен Катерине (GB)

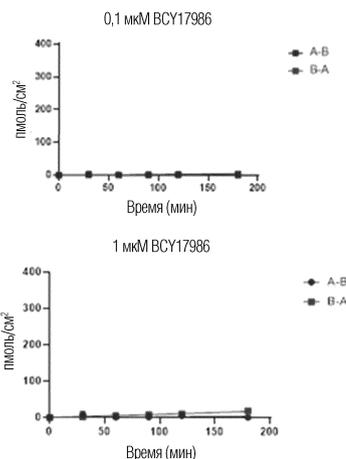
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами таким образом, что две или более пептидных петель уложены между точками присоединения к каркасу. В частности, изобретение относится к пептидам, которые связываются с TfR1. Изобретение также относится к мультимерным связывающим комплексам, которые содержат по меньшей мере два из указанных бициклических пептидных лигандов. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные пептидные лиганды и мультимерные связывающие комплексы, и применению указанных пептидных лигандов и мультимерных связывающих комплексов и фармацевтических композиций для профилактики, подавления или лечения заболевания или расстройства посредством TfR1-опосредованной доставки терапевтического средства.



A1

202391439

202391439

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578059EA/030

БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДЛЯ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА 1 (TfR1)

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами таким образом, что две или более пептидных петель уложены между точками присоединения к каркасу. В частности, изобретение относится к пептидам, которые связываются с TfR1. Изобретение также относится к мультимерным связывающим комплексам, которые содержат, по меньшей мере, два из указанных бициклических пептидных лигандов. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные пептидные лиганды и мультимерные связывающие комплексы, и применению указанных пептидных лигандов и мультимерных связывающих комплексов и фармацевтических композиций в профилактике, подавлении или лечении заболевания или расстройства посредством TfR1-опосредованной доставки терапевтического средства.

Уровень техники

Циклические пептиды способны с высокой аффинностью и специфичностью связываться с белковыми мишенями и, следовательно, являются привлекательной группой молекул для разработки терапевтических средств. Фактически, несколько циклических пептидов уже успешно применяются в клинике, например, как антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противоопухолевый препарат октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7(7), 608-24). Хорошие связывающие свойства являются результатом относительно большой поверхности взаимодействия, образованной между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкости циклических структур. Как правило, макроциклы связываются с поверхностями в несколько сотен квадратных ангстрем, например, как циклический пептид CXCR4 антагонист CVX15 (400 Å²; Wu et al. (2007), *Science* 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, который связывается с интегрином α Vb3 (355 Å²) (Xiong et al. (2002), *Science* 296(5565), 151-5) или циклический пептид ингибитор μ rain-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å²; Zhao et al. и др. (2007), *J. Struct. Biol.*, 160(1), 1-10).

За счет своей циклической конфигурации пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями и к более высокой аффинности связывания. Также пониженная гибкость приводит к замыканию конформаций, специфичных для мишени, что повышает специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Примером такого эффекта является эффективный и селективный ингибитор матриксной металлопротеиназы 8 (ММР-8), который теряет свою селективность по сравнению с другими ММР, когда его кольцо было раскрыто (Cherney et al. (1998), *J. Med. Chem.* 41(11), 1749-51). Благоприятные связывающие свойства, достигаемые за счет макроциклизации, еще более выражены у

мультициклических пептидов, имеющих более одного пептидного цикла, например, как у ванкомицина, низина и актиномицина.

Различные исследовательские группы ранее привязывали полипептиды с цистеиновыми остатками к синтетической молекулярной структуре (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Meloen с сотрудниками использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации многочисленных пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации белковых поверхностей (Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Описаны способы получения кандидатных лекарственных соединений, где указанные соединения получают посредством связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, например, 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (Heinis et al. (2014) *Angewandte Chemie, International Edition*, 53(6) 1602-1606).

Для создания и скрининга крупных библиотек бициклических пептидов к представляющим интерес мишеням разработан фаговый дисплей, основанный на комбинаторных подходах (публикация Heinis et al. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, 5(7), 502-7 и заявка WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три цистеиновых остатка и две области из шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), экспонировали на фаге и циклизовали путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с небольшим молекулярным каркасом.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение относится к пептидному лиганду, специфичному для рецептора трансферрина 1 (TfR1), включающему полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к мультимерному связывающему комплексу, который содержит по меньшей мере два бициклических пептидных лиганда, где указанные пептидные лиганды могут быть одинаковыми или разными, каждый из которых содержит пептидный лиганд, специфичный для рецептора трансферрина 1 (TfR1), содержащий полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, таким образом, что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей пептидный лиганд или мультимерный связывающий комплекс, как определено в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к пептидному лиганду или мультимерному связывающему комплексу, или фармацевтической композиции, как определено в настоящем документе, для применения в профилактике, подавлении или лечении заболевания или расстройства посредством TfR1-опосредованной доставки терапевтического средства.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены результаты анализа трансцитоза с ВСУ17986 на первичных культурах клеток проксимальных извитых канальцев человека.

На фиг. 2 представлены результаты анализа трансцитоза с ВСУ17988 на первичных культурах клеток проксимальных извитых канальцев человека.

На фиг. 3 представлены результаты анализа трансцитоза с ВСУ17989 на первичных культурах клеток проксимальных извитых канальцев человека.

На фиг. 4 представлены результаты анализа трансцитоза с ВСУ17994 на первичных культурах клеток проксимальных извитых канальцев человека.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение относится как к «мономерным» бициклическим пептидам, т.е. к тем, которые содержат один (мономерный) бициклический пептидный лиганд, так и к «мультимерным» бициклическим пептидам, т.е. к тем, которые содержат более одного бициклического пептида (например, 2, 3 или 4), конъюгированным через один или более линкеров.

Мономерные бициклические пептидные лиганды

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение относится к пептидному лиганду, специфичному для рецептора трансферрина 1 (TfR1), включающему полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

В одном варианте осуществления указанные реакционноспособные группы включают остатки цистеина.

Следует понимать, что термин «специфический для TfR1» относится к способности пептидного лиганда связываться с рецептором трансферрина 1 (TfR1). Также следует понимать, что пептидный лиганд будет оказывать различное воздействие на TfR1 в зависимости от конкретного эпитопа связывания. Например, воздействие будет либо ингибиторным (т.е. пептидный лиганд препятствует/ингибирует связывание трансферрина с TfR1), либо неингибиторным (т.е. пептидный лиганд не препятствует/ингибирует связывание трансферрина с TfR1).

Ингибиторные пептидные лиганды

В одном варианте осуществления пептидный лиганд специфичен для TfR1 и связывается с TfR1 таким образом, который препятствует/ингибирует связывание трансферрина с TfR1.

В другом варианте осуществления указанные петлевые последовательности содержат 2, 3, 6, 8 или 9 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, первая из которых состоит из 2 аминокислот, и вторая состоит из 9 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, каждая из которых состоит из 6 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, первая из которых состоит из 3 аминокислот, и вторая состоит из 8 аминокислот.

В одном варианте осуществления пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

C_i ALC_{ii}NDWTLPWHHC_{iii} (SEQ ID NO: 1);

C_i REFFDTC_{ii}GLAFIEC_{iii} (SEQ ID NO: 2); и

C_i LEAC_{ii}YDGVYWYSC_{iii} (SEQ ID NO: 3);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина соответственно, или их фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном варианте молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), и пептидный лиганд содержит N- и/или C-концевые добавления и выбран из:

A-(SEQ ID NO: 1)-A (обозначается здесь как BCY12455);

A-(SEQ ID NO: 1)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY12652);

A-(SEQ ID NO: 2)-A (обозначается здесь как BCY12452);

A-(SEQ ID NO: 2)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY12650);

A-(SEQ ID NO: 3)-A (обозначается здесь как BCY12454); и

A-(SEQ ID NO: 3)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY12651).

где Sar представляет собой саркозин, и FI представляет собой флуоресцеин.

Для целей данного описания полагается, что ингибиторные бициклические пептиды циклизируются с ТАТА, и дают трехзамещенные структуры. Однако, как будет ясно из описания изобретения, представленного здесь, циклизацию можно проводить с любым подходящим молекулярным каркасом, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что образуются по меньшей мере две полипептидные петли. Циклизация происходит на C_i , C_{ii} и C_{iii} .

Неингибиторные пептидные лиганды

В одном варианте осуществления пептидный лиганд специфичен для TfR1 и связывается с TfR1 таким образом, который не ингибирует/препятствует связыванию трансферрина с TfR1.

В другом варианте осуществления указанные петлевые последовательности содержат 3 или 7 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, первая из которых состоит из 7 аминокислот, и вторая состоит из 3 аминокислот.

В одном варианте осуществления пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

- C_iSADDWLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 4);
- C_iSSDAYLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 5);
- C_iPPDAHLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 6);
- C_iPQDAYLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 7);
- C_iPPDSWQGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 8);
- C_iSPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY15935);
- C_iPGDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 10);
- C_iPPDSHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 11);
- C_iSADDWLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 12);
- C_iP[HyP]DAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 13);
- C_iP[HyP]DAYLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 14);
- C_iS[HyP]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 15);
- C_iP[Aib]DAHLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 16);
- C_iPPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 17);
- C_iP[Aib]DAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 18);
- C_iSADAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 19);
- C_iS[Aib]DAHLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 20);
- C_iSPDAHLGC_{ii}[EPA]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 21);
- C_iPPDAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 22);
- C_iS[Aib]DAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 23);
- C_iAPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 24);
- C_iP[Aib]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 25);
- C_iSPDAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 26);
- C_iSPDAHLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 27);
- C_iPNDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 28);
- C_iPIDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 29);
- C_iSPDAYLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 30);
- C_iPPDAYLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 31);
- C_iS[Aib]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 32);
- C_iSPDAHLGC_{ii}[Chg]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 33);
- C_iAPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 34);
- C_iYLPDW[tBuAla]C_{ii}GDEYC_{iii} (SEQ ID NO: 35);
- C_iSPDAHLGC_{ii}IS[2Nal]C_{iii} (SEQ ID NO: 36);
- C_iSPDAHLGC_{ii}IS[3tBuTyr]C_{iii} (SEQ ID NO: 37);
- C_iSPD[Aib]HLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 38);

C_i SPDAHLGC_{ii}IS[1Nal]C_{iii} (SEQ ID NO: 39);
 C_i SPDAH[tBuAla]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 40);
 C_i SPDAH[Cba]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 41);
 C_i SPDAHLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 42);
 C_i SPD[Abu]HLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 43);
 C_i S[Aze]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 44);
 C_i SPDDHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 45);
 C_i SPDSHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 46);
 C_i SPDAH[Abu]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 47);
 C_i SPDAHLGC_{ii}IS[4Pal]C_{iii} (SEQ ID NO: 48);
 C_i P[dA]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 49);
 C_i SPDAYLGC_{ii}[tBuAla]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 50);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[C5g]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 51);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[Cbg]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 52);
 C_i SPDAHL[dA]C_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 53);
 C_i SPDAH[Aib]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 54);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[Cpg]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 55);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[B-Melle]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 56);
 C_i SADAHLC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 57);
 C_i SPAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 58);
 C_i SPDAALGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 59);
 C_i SPDAHAGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 60);
 C_i SPDAHLAC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 61);
 C_i SPDAHLGC_{ii}ASYC_{iii} (SEQ ID NO: 62);
 C_i SPDAHLGC_{ii}IAYC_{iii} (SEQ ID NO: 63);
 C_i SPDAHLGC_{ii}ISAC_{iii} (SEQ ID NO: 64);
 C_i [K(N₃)]PDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 65);
 C_i S[K(N₃)]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 66); и
 C_i SPD[K(N₃)]HLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 67);

где Abu представляет собой аминаomásляную кислоту, Aib представляет собой аминоизомасляную кислоту, Aze представляет собой азетидин, B-Melle представляет собой бета-метилизолейцин, C5g представляет собой циклопентилглицин, Cba представляет собой β-циклобутилаланин, Cbg представляет собой циклобутилглицин, Chg представляет собой циклогексилглицин, Cpg представляет собой циклопроприлглицин, EPA представляет собой 2-амино-3-этилпентановую кислоту, НуР представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин, [K(N₃)] представляет собой 6-азидолизин, 1Nal представляет собой 1-нафтилаланин, 2Nal представляет собой 2-нафтилаланин, 4Pal представляет собой 4-пиридилаланин, tBuAla представляет собой трет-бутилаланин, tBuGly представляет собой трет-бутилглицин, 3tBuTyr представляет собой 3-трет-бутилтирозин, а C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина соответственно, или их

фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном варианте осуществления пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

C_iSADDWLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 4);
 C_iSSDAYLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 5);
 C_iPPDAHLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 6);
 C_iPQDAYLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 7);
 C_iPPDSWQGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 8);
 C_iSPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 9);
 C_iPGDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 10);
 C_iPPDShLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 11); и
 C_iSADDWLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 12);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина соответственно, или их фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиран-1,3,5-триил)трис(2-бромэтанон) (ТАТВ), и пептидный лиганд содержит N- и/или C-концевые добавления и выбран из:

A-(SEQ ID NO: 4)-A (обозначается здесь как BCY13983);
 A-(SEQ ID NO: 4)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14474);
 A-(SEQ ID NO: 5)-A (обозначается здесь как BCY13986);
 A-(SEQ ID NO: 5)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14475);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A (обозначается здесь как BCY15466);
 Ac-(SEQ ID NO: 6) (обозначается здесь как BCY15889);
 A-(SEQ ID NO: 7)-A (обозначается здесь как BCY15467);
 Ac-(SEQ ID NO: 7) (обозначается здесь как BCY15890);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (обозначается здесь как BCY13989);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14476);
 A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15468);
 A-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15768);
 (SEQ ID NO: 9)-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15934);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15937);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15938);
 [FI]G[Sar₅]-A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15940);
 N[1Nal]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18030);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-E[Pip]W (обозначается здесь как BCY18039);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW (обозначается здесь как BCY17994);
 NWN-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18029);
 NWN-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17109);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-E[Aze]W (обозначается здесь как BCY18037);
 Ac-NWN-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY17992);

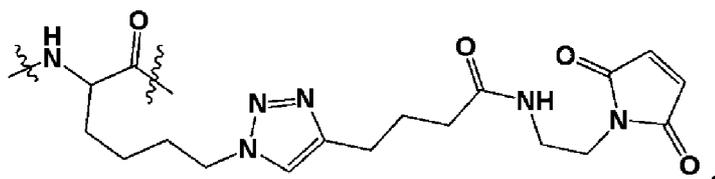
Ac-(SEQ ID NO: 9)-E[dP]W (обозначается здесь как BCY18038);
 Ac-N[1Nal]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18034);
 N[dW]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18031);
 Ac-N[dW]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18035);
 HWM-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17110);
 A-(SEQ ID NO: 9)-PHP (обозначается здесь как BCY17115);
 A-(SEQ ID NO: 9)-EPW (обозначается здесь как BCY17114);
 NEV-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17112);
 A-(SEQ ID NO: 9)-PIVH (обозначается здесь как BCY17120);
 Ac-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY15891);
 HTS-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17111);
 Ac-N[NMeTrp]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18036);
 N[NMeTrp]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18032);
 Ac-A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15939);
 A-(SEQ ID NO: 9)-EHQE (обозначается здесь как BCY17119);
 ESF-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17113);
 NWN-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17870);
 Ac-NWN-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17871);
 [AzPro]-NWN-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY17872);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17873);
 [AzPro]-(SEQ ID NO: 9)-EPW (обозначается здесь как BCY17874);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17868);
 [AzPro]-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY17869);
 Ac-N[dY]N-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17882);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-E-[dP]-W-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17890);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-E-[Aze]-W-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17892);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-E-[Pip]-W-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17894);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)](PYA-maleimide) (обозначается здесь как BCY17906);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW-[Peg₁₀]-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY19405);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW-[Peg₂₄]-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY19406);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPWGGSGGS-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY19407);
 A-(SEQ ID NO: 10)-A (обозначается здесь как BCY15469);
 Ac-(SEQ ID NO: 10) (обозначается здесь как BCY15892);
 A-(SEQ ID NO: 11)-A (обозначается здесь как BCY15470);
 Ac-(SEQ ID NO: 11) (обозначается здесь как BCY15893);
 A-(SEQ ID NO: 12)-A (обозначается здесь как BCY15471);
 Ac-(SEQ ID NO: 12) (обозначается здесь как BCY15894);
 Ac-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY17991);
 Ac-(SEQ ID NO: 13)-EPW (обозначается здесь как BCY17995);
 Ac-NWN-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY17993);

NWN-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY18033);
A-(SEQ ID NO: 13)-A (обозначается здесь как BCY16754);
Ac-(SEQ ID NO: 13)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17896);
Ac-NWN-(SEQ ID NO: 13)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17899);
Ac-(SEQ ID NO: 13)-EPW-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17901);
Ac-(SEQ ID NO: 14) (обозначается здесь как BCY17990);
Ac-(SEQ ID NO: 14)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17875);
[AzPro]-(SEQ ID NO: 14) (обозначается здесь как BCY17876);
Ac-(SEQ ID NO: 15) (обозначается здесь как BCY17989);
A-(SEQ ID NO: 15)-A (обозначается здесь как BCY16047);
Ac-(SEQ ID NO: 15)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17877);
[AzPro]-(SEQ ID NO: 15) (обозначается здесь как BCY17878);
A-(SEQ ID NO: 16)-A (обозначается здесь как BCY16962);
TYMN-(SEQ ID NO: 17)-A (обозначается здесь как BCY17117);
A-(SEQ ID NO: 17)-A (обозначается здесь как BCY16048);
A-(SEQ ID NO: 18)-A (обозначается здесь как BCY16963);
Ac-(SEQ ID NO: 19) (обозначается здесь как BCY17987);
A-(SEQ ID NO: 20)-A (обозначается здесь как BCY16753);
A-(SEQ ID NO: 21)-A (обозначается здесь как BCY16046);
A-(SEQ ID NO: 22)-A (обозначается здесь как BCY16964);
A-(SEQ ID NO: 23)-A (обозначается здесь как BCY16965);
Ac-(SEQ ID NO: 24) (обозначается здесь как BCY17986);
A-(SEQ ID NO: 25)-A (обозначается здесь как BCY16550);
A-(SEQ ID NO: 26)-A (обозначается здесь как BCY16966);
A-(SEQ ID NO: 27)-A (обозначается здесь как BCY16051);
IDSN-(SEQ ID NO: 28)-A (обозначается здесь как BCY17118);
WGKS-(SEQ ID NO: 29)-A (обозначается здесь как BCY17116);
A-(SEQ ID NO: 30)-A (обозначается здесь как BCY16053);
A-(SEQ ID NO: 31)-A (обозначается здесь как BCY16557);
A-(SEQ ID NO: 32)-A (обозначается здесь как BCY16035);
A-(SEQ ID NO: 33)-A (обозначается здесь как BCY16043);
A-(SEQ ID NO: 34)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15769);
A-(SEQ ID NO: 35)-A (обозначается здесь как BCY15648);
A-(SEQ ID NO: 36)-A (обозначается здесь как BCY16031);
A-(SEQ ID NO: 37)-A (обозначается здесь как BCY16079);
A-(SEQ ID NO: 38)-A (обозначается здесь как BCY16036);
A-(SEQ ID NO: 39)-A (обозначается здесь как BCY16029);
A-(SEQ ID NO: 40)-A (обозначается здесь как BCY16089);
A-(SEQ ID NO: 41)-A (обозначается здесь как BCY16088);
A-(SEQ ID NO: 42)-A (обозначается здесь как BCY16052);

A-(SEQ ID NO: 43)-A (обозначается здесь как BCY16033);
 A-(SEQ ID NO: 44)-A (обозначается здесь как BCY16039);
 Ac-(SEQ ID NO: 44) (обозначается здесь как BCY17988);
 Ac-(SEQ ID NO: 44)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17879);
 [AzPro]-(SEQ ID NO: 44) (обозначается здесь как BCY17880);
 A-(SEQ ID NO: 45)-A (обозначается здесь как BCY16038);
 A-(SEQ ID NO: 46)-A (обозначается здесь как BCY16050);
 A-(SEQ ID NO: 47)-A (обозначается здесь как BCY16034);
 A-(SEQ ID NO: 48)-A (обозначается здесь как BCY16032);
 A-(SEQ ID NO: 49)-A (обозначается здесь как BCY16049);
 A-(SEQ ID NO: 50)-A (обозначается здесь как BCY16558);
 A-(SEQ ID NO: 51)-A (обозначается здесь как BCY16041);
 A-(SEQ ID NO: 52)-A (обозначается здесь как BCY16042);
 A-(SEQ ID NO: 53)-A (обозначается здесь как BCY16045);
 A-(SEQ ID NO: 54)-A (обозначается здесь как BCY16037);
 A-(SEQ ID NO: 55)-A (обозначается здесь как BCY16044);
 A-(SEQ ID NO: 56)-A (обозначается здесь как BCY16040);
 A-(SEQ ID NO: 57)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15771);
 A-(SEQ ID NO: 58)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15772);
 A-(SEQ ID NO: 59)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15773);
 A-(SEQ ID NO: 60)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15774);
 A-(SEQ ID NO: 61)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15775);
 A-(SEQ ID NO: 62)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15776);
 A-(SEQ ID NO: 63)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15777);
 A-(SEQ ID NO: 64)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15770);
 Ac-(SEQ ID NO: 65) (обозначается здесь как BCY17903);
 Ac-(SEQ ID NO: 66) (обозначается здесь как BCY17904); и
 Ac-(SEQ ID NO: 67) (обозначается здесь как BCY17905);

где AzPro представляет собой азидопропил, Aze представляет собой азетидин, 1NaI представляет собой 1-нафтилаланин, NMeTrp представляет собой N-метилтриптофан, [K(N₃)] представляет собой 6-азидолизин, Peg представляет собой полиэтиленгликоль, Pip представляет собой пипеколиновую кислоту, Sar представляет собой саркозин,

F1 представляет собой флуоресцеин, и [K(N₃)(PYA-малеимид)] представляет собой модифицированный лизин, имеющий следующую структуру:



В еще одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой

TATB, и пептидный лиганд содержит N- и/или C-концевые присоединения и выбран из:

- A-(SEQ ID NO: 4)-A (обозначается здесь как BCY13983);
- A-(SEQ ID NO: 4)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14474);
- A-(SEQ ID NO: 5)-A (обозначается здесь как BCY13986);
- A-(SEQ ID NO: 5)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14475);
- A-(SEQ ID NO: 6)-A (обозначается здесь как BCY15466);
- A-(SEQ ID NO: 7)-A (обозначается здесь как BCY15467);
- A-(SEQ ID NO: 8)-A (обозначается здесь как BCY13989);
- A-(SEQ ID NO: 8)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14476);
- A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15468);
- A-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15768);
- (SEQ ID NO: 9)-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15934);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15937);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15938);
- [FI]G[Sar₅]-A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15940);
- A-(SEQ ID NO: 10)-A (обозначается здесь как BCY15469);
- A-(SEQ ID NO: 11)-A (обозначается здесь как BCY15470); и
- A-(SEQ ID NO: 12)-A (обозначается здесь как BCY15471);

где Sar представляет собой саркозин, и FI представляет собой флуоресцеин.

В альтернативном варианте молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), и пептидный лиганд содержит N- и/или C-концевые добавления, и представляет собой:

- Ac-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY20546).

Для целей настоящего описания полагается, что неингибиторные бициклические пептиды циклизуются с участием ТАТА или TATB и дают трехзамещенную структуру. Однако, как будет ясно из описания изобретения, представленного здесь, циклизацию можно проводить с любым подходящим молекулярным каркасом, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что образуются, по меньшей мере, две полипептидные петли. Циклизация происходит на C_i, C_{ii} и C_{iii}.

В еще одном варианте осуществления фармацевтически приемлемая соль выбрана из свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция или аммония.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в данной области, например, в области химии пептидов, культивирования клеток и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Используются стандартные протоколы для методов молекулярной биологии, генетики и биохимии (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999), 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.), которые включены в настоящее описание посредством ссылки.

Мультимерные бициклические пептидные лиганды

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к мультимерному связывающему комплексу, который содержит, по меньшей мере, два бициклических пептидных лиганда, где указанные пептидные лиганды могут быть одинаковыми или разными, каждый из которых включает пептидный лиганд, специфичный для рецептора трансферрина 1 (TfR1)), включающий полипептид, содержащий, по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидные петли.

Таким образом, в данном аспекте настоящее изобретение относится к мультимерному связывающему комплексу, который включает, по меньшей мере, два (т.е. 2, 3 или 4) любых мономерных бициклических пептидных лиганда, как определено в настоящем документе.

Данный аспект изобретения описывает ряд мультимеризованных бициклических пептидов с различными химическими линкерами и петлями различной длины и жесткости, использующими различные сайты присоединения в указанном бициклическом пептиде, которые связывают и активируют TfR1 с широким диапазоном активности и эффективности.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что в данном аспекте настоящее изобретение относится к многократно расположенным (мультимерным) бициклическим пептидам, которые обеспечивают синергетический эффект благодаря полученным свойствам указанных мультимерных связывающих комплексов по сравнению с соответствующими мономерными связывающими комплексами, которые содержат один бициклический пептид. Например, мультимерные связывающие комплексы по данному аспекту изобретения обычно обладают более высокими уровнями связывающей активности или авидности (измеряемыми здесь значениями K_d), чем их мономерные аналоги. Кроме того, мультимерные связывающие комплексы по изобретению сконструированы таким образом, чтобы они были достаточно небольшими для выведения почками.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагается, что мультимеризованные бициклические пептиды способны активировать рецепторы посредством гомосшивания более чем одного и того же рецептора. Таким образом, в одном варианте осуществления указанные бициклические пептидные лиганды специфичны для одной и той же мишени в TfR1. В другом варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит, по меньшей мере, два идентичных бициклических пептидных лиганда. Под термином «идентичные» подразумеваются бициклические пептиды, имеющие одинаковую аминокислотную последовательность, наиболее важно, что одинаковая аминокислотная последовательность относится к связывающей части указанного бициклического пептида (например, последовательность может различаться в положении присоединения). В данном варианте осуществления каждый из бициклических

пептидов в мультимерном связывающем комплексе будет связываться с точно таким же эпитопом на одной и той же мишени TfR1, следовательно, полученный комплекс, связанный с мишенью, будет создавать гомодимер (если мультимерный комплекс включает два идентичных бициклических пептида), гомотример (если мультимерный комплекс состоит из трех идентичных бициклических пептидов) или гомотетрамер (если мультимерный комплекс состоит из четырех идентичных бициклических пептидов) и т. д.

В альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит, по меньшей мере, два отличающихся бициклических пептидных лиганда. Под термином «отличающиеся» подразумеваются бициклические пептиды, имеющие разную аминокислотную последовательность. В данном варианте осуществления разные бициклические пептидные лиганды в мультимерном связывающем комплексе будут связываться с разными эпитопами на TfR1, следовательно, полученный комплекс, связанный с мишенью, будет создавать бипаратопный (если мультимерный комплекс содержит два различающихся бициклических пептида), трипаратопный (если мультимерный комплекс включает три различающихся бициклических пептида) или тетрапаратопный (если мультимерный комплекс включает четыре различающихся бициклических пептида) и т. д.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагается, что мультимеризованные бициклические пептиды способны активировать рецепторы посредством гетеросшивания различных мишеней, таких как различные сайты-мишени на TfR1. Таким образом, в одном варианте осуществления указанные бициклические пептидные лиганды специфичны в отношении различных мишеней на TfR1. Следует понимать, что в данном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит, по меньшей мере, два различающихся бициклических пептидных лиганда (т.е. бициклические пептидные лиганды, имеющие разные аминокислотные последовательности). В данном варианте осуществления каждый из бициклических пептидов в мультимерном связывающем комплексе будет связываться с различающимся эпитопом на TfR1, следовательно, полученный связанный с мишенью комплекс будет создавать биспецифический мультимерный связывающий комплекс (если мультимерный комплекс содержит два различающихся бициклических пептида), триспецифический мультимерный связывающий комплекс (если мультимерный комплекс включает три различающихся бициклических пептида), тетраспецифический мультимерный связывающий комплекс (если мультимерный комплекс включает четыре различающихся бициклических пептида) и т. д.

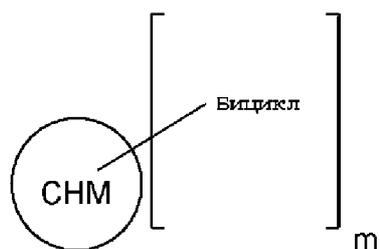
Следует понимать, что мультимерные связывающие комплексы по изобретению могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были способны связываться с рядом различных мишеней на TfR1.

Бициклические пептиды в составе мультимерных связывающих комплексов по изобретению могут быть собраны с помощью ряда различных вариантов. Например, может быть центральная петля или разветвляющаяся часть со спейсерными или плечевыми

элементами, исходящими от указанной петли или точки ветвления, каждая из которых будет содержать бициклический пептид. В качестве альтернативы можно было бы предусмотреть, чтобы циклический опорный элемент мог удерживать ряд выступающих внутрь или наружу бициклических пептидов.

В одном варианте осуществления каждый бициклический пептидный лиганд соединен с центральной петлевой частью спейсерной группой.

Следует понимать, что спейсерная группа может быть линейной и соединять один бициклический пептид с центральной петлевой частью. Таким образом, в одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает соединение формулы (I):



где СНМ представляет собой центральную петлевою фрагмент;

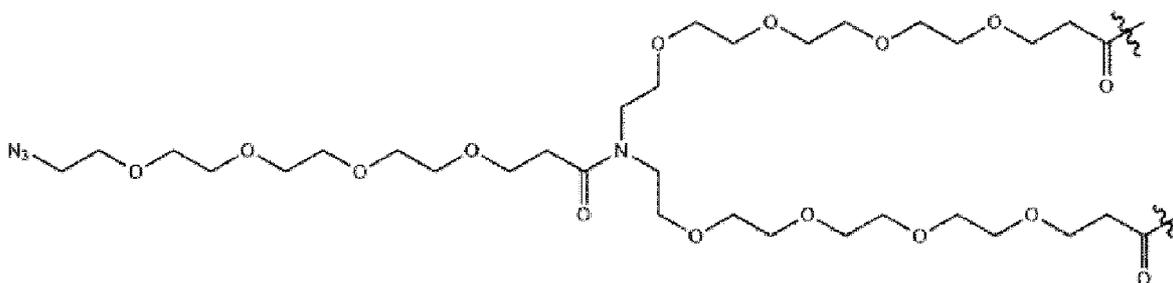
Бицикл представляет собой бициклический пептидный лиганд, как здесь определено; и

m представляет собой целое число от 2 до 10.

В одном варианте осуществления m представляет собой целое число, выбранное из 2, 3 или 4.

В еще одном варианте осуществления m равно 2.

Когда m равно 2, то следует понимать, что для центральной петлевой части требуется 2 точки присоединения. Таким образом, в одном варианте осуществления m представляет собой 2, и СНМ представляет собой мотив формулы (A):



(A).

Димеры

В одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит два идентичных бициклических пептида и содержит димерный связывающий комплекс, показанный в следующей таблице A:

Таблица A

Примеры димерных связывающих комплексов по изобретению

Номер соединения	Соответств	Количество	Центральная	Точка
------------------	------------	------------	-------------	-------

мультимера	ующий мономер	мономеров	петлевая часть	присоединения
BCY19409	BCY17994	2	А	С-конец

Нумерация

При ссылке на положения аминокислотных остатков в пептидах по изобретению, цистеиновые остатки (C_i , C_{ii} и C_{iii}) не включаются в нумерацию, поскольку они являются инвариантными, следовательно, нумерация аминокислотных остатков в пептидах по изобретению обозначается как показано ниже:

- C_1 - A_1 - L_2 - C_{ii} - N_3 - D_4 - W_5 - T_6 - L_7 - P_8 - W_9 - H_{10} - H_{11} - C_{iii} - (SEQ ID NO: 1).

Молекулярный формат

N- или С-концевые удлинения последовательности бициклического ядра добавляются к левой или правой стороне последовательности, разделенные дефисом. Например, N-концевой хвост биотин-G-Sar₅ должен обозначаться как:

[Biot]-G-[Sar₅]-A-(SEQ ID NO: X).

Инвертированные пептидные последовательности

В свете раскрытия в публикации Nair et al. (2003) J. Immunol. 170(3), 1362-1373, полагается, что пептидные последовательности, раскрытые здесь, также найдут применение в их ретро-инверсной форме. Например, последовательность является реверсированной (т. е. N-конец становится С-концом и наоборот), и их стереохимия также меняется на обратную (т. е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Определение пептидного лиганда

Пептидный лиганд, как здесь указано, относится к пептиду, пептидной структуре или пептидомиметику, ковалентно связанными с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды, пептидные структуры или пептидомиметики включают пептид, содержащий природные или неприродные аминокислоты, две или более реакционноспособные группы (т.е. остатки цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, заключенную между указанными реакционноспособными группами, которые называются петлевой последовательностью, поскольку она образует петлю, когда пептид, пептидная структура или пептидомиметик связывается с каркасом. В данном случае пептиды, пептидные структуры или пептидомиметики содержат по меньшей мере три цистеиновых остатка (обозначаемых здесь как C_i , C_{ii} и C_{iii}) и образуют по меньшей мере две петли на каркасе.

Преимущества пептидных лигандов

Некоторые бициклические пептиды по настоящему изобретению обладают рядом преимущественных свойств, которые позволяют рассматривать их в качестве молекул, подобных лекарственным препаратам, подходящим для инъекционного, ингаляционного, назального, интраокулярного, перорального или местного введения. К таким преимущественным свойствам относятся:

- видовая перекрестная реактивность. Это типичное требование для доклинической оценки фармакодинамики и фармакокинетики;

- стабильность к протеазам. Бициклические пептидные лиганды в большинстве случаев должны демонстрировать устойчивость к протеазам плазмы крови, эпителиальным («заякоренным в мембране») протеазам, желудочным и кишечным протеазам, протеазам поверхности легких, внутриклеточным протеазам и тому подобное. Стабильность к протеазам должна иметь место у разных видов, чтобы бициклический пептид-кандидат мог быть разработан на животных моделях, а также с уверенностью вводился людям;

- желаемый профиль растворимости. Это зависит от доли заряженных и гидрофильных остатков относительно гидрофобных и внутри/межмолекулярных Н-связей, что важно для формуляции и всасывания; и

- оптимальный период полувыведения из плазмы крови. В зависимости от клинического показания и схемы лечения может потребоваться разработка бициклического пептида с коротким или длительным временем воздействия *in vivo* для лечения хронических или острых болезненных состояний. Оптимальное время воздействия будет определяться требованием продолжительного воздействия (для максимальной терапевтической эффективности) по сравнению с требованием короткого времени воздействия для сведения к минимуму токсических эффектов, возникающих в результате длительного воздействия агента.

Фармацевтически приемлемые соли

Следует понимать, что солевые формы входят в объем настоящего изобретения, и ссылки на пептидные лиганды включают солевые формы указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, с помощью обычных химических методов, таких как методы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (редактор), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002 г. Как правило, такие соли могут быть получены взаимодействием свободных кислотных или основных форм этих соединений с соответствующим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе или в их смеси.

Кислотно-аддитивные соли (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким спектром кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей включают моно- или дисоли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)камфорной, камфора-сульфоновой, (+)-(1S)-камфора-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, fumarовой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галоидоводородных кислот (например, бромистоводородной, соляной, иодистоводородной), изетионовой, молочной (например,

(+)-L-молочной, (±)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (±)-DL-миндальной, метансульфонокислоты, нафталин-2-сульфонокислоты, нафталин-1,5-дисульфокислоты, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памоевой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфонокислоты, ундециленовой и валериановой кислоты, а также ацилированной аминокислоты и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных с уксусной, соляной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, fumarовой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилатной), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкокуроновой и лактобионовой кислотой. Одной конкретной солью является гидрохлоридная соль. Другой конкретной солью является ацетатная соль.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может быть -COO-), то тогда соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием с образованием подходящего катиона. Примеры подходящих неорганических катионов включают, не ограничиваясь этим, ионы щелочных металлов, такие как Li^+ , Na^+ и K^+ , катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} или Zn^+ . Примеры подходящих органических катионов включают, не ограничиваясь этим, ион аммония (т.е. NH_4^+) и замещенные ионы аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются происходящие из: метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного четвертичного иона аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Когда пептиды по изобретению содержат аминокгруппу, они могут образовывать соли четвертичного аммония, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии с методами, хорошо известными специалистам в данной области. Такие соединения четвертичного аммония входят в объем пептидов по изобретению.

Модифицированные производные

Следует понимать, что модифицированные производные пептидных лигандов, как здесь определено, входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или более модификаций, выбранных из: N-концевых и/или C-концевых модификаций; замену одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками (например, замену одного или более полярных аминокислотных остатков одной или более изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замену одного или более неполярных

аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавление спейсерной группы; замену одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замену одного или более аминокислотных остатков одной или более заместительными аминокислотами, такими как аланин, замену одного или более остатков L-аминокислоты одним или более остатками D-аминокислоты; N-алкилирование одной или более амидных связей внутри бициклического пептидного лиганда; замену одной или более пептидных связей заместительной связью; модификацию длины пептидного остова; замену водорода на альфа-углероде одного или более аминокислотных остатков другой химической группой; модификацию аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящими реагентами, взаимодействующими с амином, тиолом, карбоновой кислотой и фенолом, для функционализации указанных аминокислот; и введение или замену аминокислот, которые придают ортогональные реакционные способности, подходящие для функционализации, например аминокислоты, несущие азидную или алкиновую группу, которые позволяют функционализировать алкиновые или азидсодержащие участки, соответственно.

В одном варианте модифицированное производное содержит N-концевую и/или C-концевую модификацию. В другом варианте осуществления модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящего взаимодействующего с амином реагента и/или C-концевую модификацию с использованием подходящего взаимодействующего с карбоксилем реагента. В еще одном варианте осуществления указанная N-концевая или C-концевая модификация включает добавление эффекторной группы, включая, не ограничиваясь этим, цитотоксический агент, радиохелатор или хромофор.

В еще одном варианте модифицированное производное содержит N-концевую модификацию. В другом варианте осуществления N-концевая модификация содержит N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления N-концевой остаток кэпируется уксусным ангидридом или другими соответствующими реагентами во время синтеза пептида, что приводит к образованию молекулы, которая является ацетилированной на N-конце. Данный вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки узнавания аминопептидазами и позволяет избежать потенциальной деградации бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления N-концевая модификация включает добавление молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгацию эффекторных групп и сохранение активности бициклического пептида в отношении его мишени.

В еще одном варианте осуществления модифицированное производное включает C-концевую модификацию. В другом варианте осуществления C-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления C-концевой остаток синтезируется в виде амида во время пептидного синтеза, что приводит к образованию

молекулы, которая амидирована на С-конце. Данный вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки узнавания карбоксипептидазами и снижает возможность протеолитической дегградации бициклического пептида.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками. В данном варианте осуществления могут быть выбраны неприродные аминокислоты, содержащие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, которые не распознаются деградирующими протеазами и не оказывают какого-либо неблагоприятного воздействия на активность в отношении мишени.

В качестве альтернативы можно использовать неприродные аминокислоты, имеющие ограниченные аминокислотные боковые цепи, так что протеолитический гидролиз соседней пептидной связи является конформационно и стерически затрудненным. В частности, это касается аналогов пролина, объемных боковых цепей, α -дизамещенных производных (например, аминоизомаляновой кислоты, Aib) и циклоаминокислот, простым производным которых является аминоклопропилкарбоновая кислота.

В одном варианте модифицированное производное включает добавление спейсерной группы. В другом варианте осуществления модифицированное производное включает добавление спейсерной группы к N-концевому цистеину (C_i) и/или С-концевому цистеину (C_{iii}).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками. В другом варианте модифицированное производное включает замену остатка триптофана остатком нафтилаланина или аланина. Данный вариант осуществления обеспечивает преимущество улучшения профиля фармацевтической стабильности полученного бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков одним или более гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков одним или более заряженными аминокислотными остатками. Правильный баланс заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания с белками плазмы и, следовательно, на концентрацию свободно доступной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Комбинация этих двух факторов может влиять на период полувыведения, объем распределения и экспозицию пептидного препарата и может быть адаптирована в соответствии с клинической конечной точкой. Кроме того, правильная комбинация и

количество заряженных аминокислотных остатков относительно гидрофобных аминокислотных остатков может уменьшить раздражение в месте инъекции (если пептидный препарат вводится подкожно).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более остатков L-аминокислоты одним или более остатками D-аминокислоты. Полагается, что данный вариант осуществления увеличивает протеолитическую стабильность за счет стерических затруднений и склонности D-аминокислот стабилизировать конформации β -изгиба (Tugyi et al. (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену аланинами, такими как D-аланины. Данный вариант осуществления обеспечивает преимущество идентификации остатков связывания ключевых остатков и удаления потенциального сайта(ов) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из вышеуказанных модификаций служит для намеренного повышения эффективности или стабильности пептида. Дальнейшее повышение эффективности на основе модификаций может быть достигнуто с помощью следующих механизмов:

- включение гидрофобных фрагментов, которые используют гидрофобный эффект и приводят к более низким скоростям диссоциации, так что достигается более высокая аффинность;

- включение заряженных групп, которые используют ионные взаимодействия на большом расстоянии, что приводит к более высоким скоростям ассоциации и более высокому сродству (см., например, Schreiber et al., Rapid, electrostatically mediated Association of белков (1996), Nature Struct. Biol., 3, 427- 31); и

- включение дополнительного ограничения в пептид, например, путем правильного ограничения боковых цепей аминокислот таким образом, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании с мишенью, ограничения торсионных углов каркаса, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании с мишенью, и введения дополнительных циклизаций в молекуле по тем же причинам.

(См. обзоры в Gentilucci et al., Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al., Curr. Medicinal Chem. (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые меченные (радио)изотопами пептидные лиганды по изобретению, в которых один или более атомов заменены атомами, имеющими такой же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличающееся от атомной массы или массового числа, обычно встречающиеся в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены металлохелатирующие группы (называемые «эффекторами»), способные удерживать соответствующие (радио)изотопы, и пептидные лиганды по изобретению, в которых определенные функциональные группы ковалентно заменены соответствующими (радио)изотопами или изотопно-мечеными функциональными группами.

Примеры изотопов, подходящих для включения в пептидные лиганды по изобретению, включают изотопы водорода, такие как ^2H (D) и ^3H (T), углерода, такие как ^{11}C , ^{13}C и ^{14}C , хлора, такие как ^{36}Cl , фтора, такие как ^{18}F , йода, например ^{123}I , ^{125}I и ^{131}I , азота, например ^{13}N и ^{15}N , кислорода, например ^{15}O , ^{17}O и ^{18}O , фосфора, например ^{32}P , серы, например S, меди, например ^{64}Cu , галлия, такие как ^{67}Ga или ^{68}Ga , иттрия, такой как ^{90}Y , и лютеция, такой как ^{177}Lu , и висмута, такой как ^{213}Bi .

Некоторые изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, например лиганды, включающие радиоактивный изотоп, являются пригодными в исследованиях распределения лекарственного препарата и/или субстрата в тканях, а также для клинической оценки присутствия и/или отсутствия мишени в пораженных тканях. Пептидные лиганды по изобретению могут дополнительно обладать ценными диагностическими свойствами, поскольку их можно использовать для обнаружения или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В способах обнаружения или идентификации можно использовать соединения, которые помечены агентами-метками, такими как радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, светящиеся вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и т. д. Радиоактивные изотопы трития, т.е. ^3H (T), и углерода-14, т.е. ^{14}C , особенно пригодны для этой цели за счет простоты их включения и готовых средств детектирования.

Замена более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т.е. ^2H (D), может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, в результате увеличения периода полувыведения *in vivo* или снижения требуемой дозировки, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

Замещение изотопами, испускающими позитроны, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может быть полезной в исследованиях с позитронно-эмиссионной топографией (ПЭТ) для изучения занятости мишени.

Меченые изотопами соединения пептидных лигандов по изобретению, как правило, могут быть получены обычными методами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными тем, которые описаны в сопроводительных примерах, с использованием соответствующего реагента, меченого изотопом, вместо немеченого реагента, ранее используемого.

Молекулярный каркас

В одном варианте молекулярный каркас включает неароматический молекулярный каркас. Ссылки в настоящем документе на «неароматический молекулярный каркас» относятся к любому молекулярному каркасу, определенному в настоящем документе, который не содержит ароматическую (т.е. ненасыщенную) карбоциклическую или гетероциклическую кольцевую систему.

Подходящие примеры неароматических молекулярных каркасов описаны в

публикации Heinis et al. (2014) *Angewandte Chemie, International Edition* 53(6) 1602-1606.

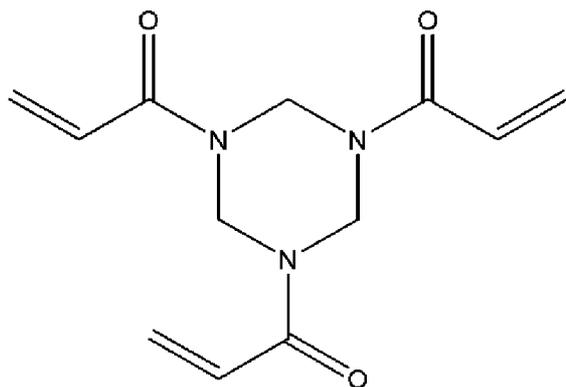
Как отмечено в вышеуказанных документах, молекулярный каркас может представлять собой небольшую молекулу, такую как небольшая органическая молекула.

В одном варианте молекулярный каркас может представлять собой макромолекулу. В одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой макромолекулу, состоящую из аминокислот, нуклеотидов или углеводов.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас содержит реакционноспособные группы, которые способны взаимодействовать с функциональной группой(ами) полипептида с образованием ковалентных связей.

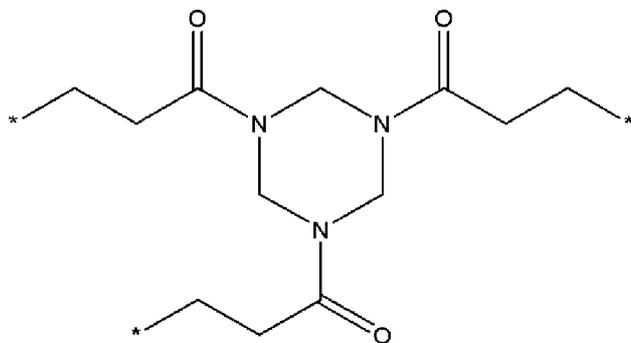
Молекулярный каркас может содержать химические группы, образующие связь с пептидом, такие как амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, азиды, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (также известный как триакрилоилгексагидро-s-триазин (ТАТА):



ТАТА.

Таким образом, после циклизации бициклическими пептидами по изобретению на цистеиновых остатках C_i, C_{ii} и C_{iii} молекулярный каркас образует трехзамещенное производное 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипропан-1-он, ТАТА, имеющее следующую структуру:

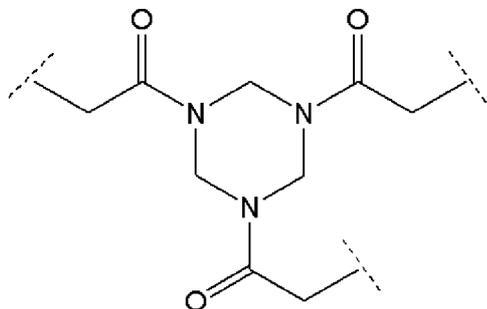


где * обозначает точку присоединения трех остатков цистеина.

В альтернативном варианте молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-

триазиан-1,3,5-триил)трис(2-бромэтанон) (ТАТВ).

Таким образом, после циклизации бициклическими пептидами по изобретению на цистеиновых остатках C_i , C_{ii} и C_{iii} молекулярный каркас образует трехзамещенное производное ТАТВ, имеющее следующую структуру:



ТАТВ.

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению можно получить синтетически стандартными способами с последующим взаимодействием с молекулярным каркасом *in vitro*. Когда это выполняется, то можно использовать стандартную химию. Это обеспечивает быстрое крупномасштабное получение растворимого вещества для дальнейших последующих экспериментов или валидации. Такие способы могут быть осуществлены с использованием обычной химии, такой как раскрытая в Timmerman et al. (выше).

Таким образом, изобретение также относится к получению выбранных полипептидов или конъюгатов, как описано в настоящем документе, где получение включает необязательные дополнительные стадии, как поясняется ниже. В одном варианте осуществления такие стадии осуществляют с конечным продуктом полипептид/конъюгат, полученным химическим синтезом.

Необязательно аминокислотные остатки в представляющем интерес полипептиде могут быть заменены при получении конъюгата или комплекса.

Пептиды также можно удлинить для включения, например, еще одной петлю и, следовательно, введения многочисленных специфичностей.

Для удлинения пептида, его можно просто удлинить химически на его N-конце или C-конце или внутри петель, используя ортогонально защищенные лизины (и аналоги), используя стандартные методы твердофазной химии или методы синтеза в растворе. Для введения активированного или активируемого N- или C-конца можно использовать стандартные методы (био)конъюгации. В качестве альтернативы, могут быть сделаны добавления путем конденсации фрагментов или нативного химического лигирования, т.е. как описано в литературе (Dawson et al. 1994, *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science*, 266:776-779), или с помощью ферментов, например, с использованием субтилигазы, как описано в литературе (Chang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994). Dec 20; 91(26):12544-8 или Hikari et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

Альтернативно, пептиды могут быть удлинены или модифицированы посредством дополнительной конъюгации через дисульфидные связи. Это имеет дополнительное преимущество, позволяя первому и второму пептиду диссоциировать друг от друга при попадании в восстанавливающую среду клетки. В этом случае молекулярный каркас (например, ТАТА или ТАТВ) может быть добавлен во время химического синтеза первого пептида, чтобы подвергнуть взаимодействию с тремя цистеиновыми группами; затем к N- или С-концу первого пептида может быть присоединен дополнительный цистеин или тиол, так что этот цистеин или тиол будет взаимодействовать только со свободным цистеином или тиолом второго пептида, образуя связанный дисульфидной связью бициклический конъюгат пептида-пептида.

Кроме того, добавление других функциональных групп или эффекторных групп может быть выполнено таким же образом, с использованием подходящих химических методов, связывания на N- или С-концах или через боковые цепи. В одном варианте осуществления связывание осуществляется таким образом, что оно не блокирует активность ни одной из молекул.

Фармацевтические композиции

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей пептидный лиганд, как здесь определено, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В общем, пептидные лиганды по настоящему изобретению будут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически подходящими эксципиентами или носителями. Как правило, эти эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и/или буферные среды. Носители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые адъюванты, если необходимо удерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Носители для внутривенного введения включают наполнители жидкости и питательных веществ, а также наполнители электролитов, например, на основе раствора декстрозы Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в виде отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими агентами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические препараты, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин и иммунотоксины. Дополнительные примеры других агентов, которые можно вводить отдельно или в сочетании с пептидными лигандами по изобретению, включают цитокины, лимфокины, другие гемопоэтические факторы, тромболитические и антитромботические факторы. Фармацевтические

композиции могут включать «коктейли» из различных цитотоксических или других агентов в сочетании с белковыми лигандами по настоящему изобретению или даже комбинации выбранных полипептидов по настоящему изобретению, обладающих различной специфичностью, таких как полипептиды, выбранные с использованием разных лигандов-мишеней, независимо от того, объединяются ли они до введения.

Способ введения фармацевтических композиций по изобретению может быть любым из способов, широко известных специалистам в данной области. Для терапии пептидные лиганды по изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными методами. Введение можно осуществить любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, чрескожный, легочный путь или, соответственно, прямой инфузией через катетер. Предпочтительно фармацевтические композиции по изобретению будут вводиться внутривенно. Дозировка и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, одновременного приема других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должен учитывать врач.

Пептидные лиганды по данному изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Было показано, что этот метод эффективен, и можно использовать известные в данной области методы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области должно быть понятно, что лиофилизация и восстановление могут привести к различной степени потери активности и что для компенсации этого уровни должны быть скорректированы в сторону повышения.

Композиции, содержащие пептидные лиганды или их смесь по настоящему изобретению, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В некоторых терапевтических применениях адекватное количество для осуществления по меньшей мере частичного ингибирования, подавления, модуляции, элиминации или какого-либо другого измеримого параметра популяции выбранных клеток определяется как «терапевтически эффективная доза». Количества, необходимые для достижения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания, но обычно находятся в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, при этом чаще используются дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/дозу. Для профилактических применений композиции, содержащие пептидные лиганды или их смеси по настоящему изобретению, также можно вводить в аналогичных или несколько меньших дозировках.

Композицию, содержащую пептидный лиганд по настоящему изобретению, можно использовать в профилактических и терапевтических целях для того, чтобы способствовать изменению, инактивации, элиминации или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, пептидные лиганды, описанные здесь, можно использовать экстракорпорально или *in vitro* для селективного киллинга, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенной популяции клеток. Кровь млекопитающего можно объединить экстракорпорально с выбранными

пептидными лигандами, посредством чего нежелательные клетки подвергаются киллингу или иным образом удаляются из крови с последующим возвращением млекопитающему в соответствии со стандартными методами.

Терапевтические применения

Бициклические пептиды по изобретению имеют специфическое применение в качестве агентов, связывающихся с рецептором трансферрина 1 (TfR1). В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретение относится к пептидному лиганду или фармацевтической композиции, как определено в настоящем документе, для применения в профилактике, подавлении или лечении заболевания или расстройства посредством TfR1-опосредованной доставки терапевтического средства.

Трансферрины представляют собой гликопротеины, обнаруженные у позвоночных, которые связываются и, следовательно, опосредуют транспорт железа (Fe) через плазму крови. Он продуцируется в печени и содержит сайты связывания двух атомов Fe³⁺. Трансферрин человека кодируется геном TF и продуцируется в виде гликопротеина с молекулярной массой 76 кДа.

Гликопротеины трансферрины прочно, но обратимо связывают железо. Хотя железо, связанное с трансферрином, составляет менее 0,1% (4 мг) от общего количества железа в организме, оно образует наиболее важный пул железа с самой высокой скоростью обмена (25 мг/24 ч). Трансферрин имеет молекулярную массу примерно 80 кДа и содержит два специфических высокоаффинных сайта связывания Fe(III). Сродство трансферрина к Fe(III) чрезвычайно велико (константа ассоциации составляет 10^{20} M^{-1} при pH 7,4), но постепенно снижается при снижении pH ниже нейтрального. Трансферрины связываются не только с железом, но и с различными ионами металлов. Эти гликопротеины находятся в различных жидкостях организма позвоночных.

Когда трансферрин не связан с железом, то он известен как «апотрансферрин».

В одном варианте осуществления трансферрин представляет собой трансферрин млекопитающих. В другом варианте осуществления трансферрин млекопитающего представляет собой трансферрин человека. В одном варианте осуществления трансферрин человека представляет собой рецептор 1 трансферрина человека (TfR1; также известный как CD71).

Следует понимать, что пептиды, связывающие TfR1, могут быть пригодными при лечении неврологических расстройств. Примеры таких неврологических расстройств включают, не ограничиваясь ими: нейропатическое расстройство, нейродегенеративное заболевание, рак, глазное заболевание, судорожное расстройство, лизосомная болезнь накопления, амилоидоз, вирусное или микробное заболевание, ишемия, поведенческое расстройство и воспаление ЦНС.

В одном варианте осуществления неврологическое расстройство имеет место у человека. Следует понимать, что величина дозы и/или частота введения модулируются для снижения концентрации пептидного лиганда, воздействию которого подвергаются эритроциты. В другом варианте осуществления лечение дополнительно включает стадию

наблюдения за истощением эритроцитов у субъекта-человека.

Ссылки здесь на термин «профилактика» включают введение протективной композиции до индукции заболевания. «Подавление» относится к введению композиции после индуктивного события, но до клинического проявления заболевания. «Лечение» включает введение протективной композиции после проявления симптомов заболевания.

Доступны модельные системы на животных, которые можно использовать для скрининга эффективности пептидных лигандов в защите от или лечении заболевания. Использование систем животных моделей облегчается настоящим изобретением, которое позволяет разрабатывать полипептидные лиганды, которые могут перекрестно реагировать с мишенями человека и животных, что позволяет использовать модели на животных.

Рецептор трансферрина 1 (TfR1) представляет собой широко изучаемую модель системы рецептор-лиганд, которая позволила получить глубокое представление о клеточных свойствах и механизмах интернализации груза рецепторов питательных веществ/поглощителей и эндоцитарной сортировки (Qian et al (2002) *Pharmacological Reviews* 54(4), 561-587). Известно, что TfR1 подвергается конститутивному эндоцитозу и рециркуляции на плазматической мембране и обладает рН-зависимым связыванием лиганда, что обеспечивает правильную сортировку эндоцитированного груза. Ранее полагалось, что анти-TfR1 антитела являются основными агентами для нацеливания олигонуклеотидных терапевтических средств на TfR1, однако связывающие TfR1 пептидные лиганды по настоящему изобретению обладают потенциалом для демонстрации эффективного и выраженного нокдауна экспрессии генов в скелетной и сердечной мышцах посредством системного введения конъюгатов TfR1-бициклический пептид-миРНК.

Таким образом, в свете этого механизма полагается, что пептидные лиганды по изобретению могут найти применение в качестве комплексов для доставки в ткани, таких как доставка комплекса TfR1-пептид-лиганд-полезная нагрузка (т.е. миРНК) в клетки тканей, в частности мышечные клетки.

Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к комплексу для доставки в ткани, который содержит пептидный лиганд по изобретению, связанный с TfR1, в сочетании с полезной нагрузкой, такой как другой пептид, низкомолекулярный препарат или олигонуклеотид, в частности миРНК.

Таким образом, указанные комплексы для доставки в ткани находят применение при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата. Примеры подходящих заболеваний опорно-двигательного аппарата включают, не ограничиваясь этим:

микроделеционный синдром 12q14

синдром делеции 2q37

синдром 3М

врожденное отсутствие большеберцовой кости

врожденное отсутствие голени с полидактилией

врожденное отсутствие надколенника

ахейроподию

ахондрогенез тип 1А - см. ахондрогенез
 ахондрогенез тип 1В - см. ахондрогенез
 ахондрогенез типа 2 - см. ахондрогенез
 ахондроплазию
 дефект акропекторо-почечного поля
 акрокаллезный синдром типа Шинцеля
 акрокапитофеморальную дисплазию
 акроцефалополидактилию
 акродизостоз
 акродиспластический сколиоз
 акролицевой дизостоз катанского типа
 акролицевой дизостоз типа Палагония
 акролицевой дизостоз типа Родригес
 синдром акролобнолицевоназального дизостоза
 акромелический лобно-носовой дизостоз
 акромезомелическую дисплазию
 акромезомелическую дисплазию типа Хантера-Томпсона
 акромезомелическую дисплазию типа Марото
 акромическую дисплазию
 акроостеолит доминантного типа
 акропекторальный синдром
 акропекторовертебральную дисплазию F форма
 острый фебрильный нейтрофильный дерматоз
 адактилию одностороннюю
 синдром Адамса-Оливера
 дефицит аденозиндезаминазы 2
 синдром ADULT
 болезнь Стилла с началом во взрослом возрасте
 синдром Айкарди-Гутьереса
 синдром Аль Газали-Сабринатана-Наира
 синдром Аллена-Бабена-Демаркеса
 альфа-маннозидоз
 амиотрофию, нейрогенную скапулоперонеальную новоанглийского типа
 анауксетическую дисплазию
 фаланго-эпифизарную дисплазию в форме ангела
 синдром анкилоблефарона-эктодермальных дефектов-расщелины губы/неба
 анкилозирующий спондилоартрит - заболевание не является редким
 анкилозирующий позвоночный гиперостоз с тилозом
 анонихию-ониходистрофию с гипоплазией или врожденным отсутствием
 дистальных фаланг

синдром Англи-Бикслера
синдром Апера
врожденный множественный артрогрипоз
синдром Арта
аспартилглюкозаминурию
ателостеогенез типа 1
ателостеогенез типа 2
ателостеогенез типа 3
ауроцефалосиндактилию
аурикуло-кондиллярный (мышцелковый) синдром
аурикулоостеодисплазию
позднюю аутосомно-доминантную спондилоэпифизарную дисплазию
аутосомно-рецессивное воспалительное заболевание кишечника с ранним началом
дефицит протеина С аутосомно-рецессивного типа
осевую остеомалацию
осевую спондилометафизарную дисплазию
тазовую дисплазию типа детской погремушки
синдром Баллера-Герольда
синдром Банки
синдром Бира-Стивенсона извилистая кожа
болезнь Бехчета
синдром Беналлега-Лачете
миопатию Бетлема
семейную дисплазию тазобедренного сустава типа Бюкеса
синдром Блау
болезнь Блаунта
синдром BOD
костную дисплазию типа Азуза
летальную дисплазию костей типа Холмгрен
дисплазию по типу бумеранга
искривление нижних конечностей с карликовостью
брахицефалофронтоназальную дисплазию
брахидактильную карликовость типа Мселени
синдром брахидактилии-дисплазии локтя и запястья
синдром брахидактилии-длинного большого пальца
брахидактилию типа Мононена
брахидактилию типа A1
брахидактилию типа A2
брахидактилию типа A4
брахидактилию типа A5

брахидактилию типа А6
 брахидактилию типа А7
 брахидактилию типа В
 брахидактилию типа С
 брахидактилию типа Е
 брахидактилию типов В и Е комбинированную
 брахиолмию типа 3
 Х-сцепленный синдром бронхиальной дуги
 миопатию Броди
 синдром Брука 1
 синдром Бушке-Оллендорфа
 синдром С
 болезнь Каффи
 кампомелию типа Камминга
 кампомелическую дисплазию
 камптобрахидактилию
 синдром камптодактилии-артропатии-варусной деформации шейки бедра-
 перикардита
 синдром камптодактилии типа Гвадалахара 2
 синдром камптодактилии-высокий рост-потери слуха
 болезнь Камурати-Энгельмана
 синдром Канту
 синдром Карпентера
 запястно-плюсневый остеохондроматоз
 хрящево-волосяную гипоплазию
 синдром Кателя-Манцке
 синдром эндостального склероза-мозжечковой гипоплазии
 церебро-реберно-нижнечелюстной синдром
 цервикальную дистонию
 синдром Чарли М
 херувизм
 синдром CHILD
 гипофосфатазию у детей
 хондрокальциноз типа 2
 хондродисплазию типа Бломстранда
 Х-сцепленную рецессивную хондродисплазию точечную 1
 точечную хондродисплазию типа Шеффилда
 хондродисплазию с вывихом суставов типа GRAPP
 хондродисплазию типа Гребе
 хондросаркому

хордому

хронический атипичный нейтрофильный дерматоз с липодистрофией и повышением температуры

хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит

расщелину кости руки с отсутствием большеберцовой кости

ключично-черепную дисплазию

рецессивную форму ключично-черепной дисплазии

ключично-ризомелический синдром

синдром CLOVES

кокцигодению

синдром CODAS

синдром Коффина-Сириса

врожденное нарушение гликозилирования COG1-CDG (CDG-IIg)

синдром Кола-Карпентера

коллагенопатию типа 2 альфа 1

конденсирующий остеоит ключицы

врожденную гиперплазию надпочечников за счет недостаточности оксидоредуктазы цитохрома P450

врожденную контрактурную арахнодактилию

врожденный дефект бедренной кости

врожденную первичную афакию

врожденный радиоульнарный синостоз

синдром Корнелии де Ланге

синдром Cousin

краниодиафизарную дисплазию

краниоэктодермальную дисплазию

черепно-лицевой дизостоз с диафизарной гиперплазией

черепно-лицевой диссиностоз

краниофронтоназальную дисплазию

краниометафизарную дисплазию аутосомно-доминантного типа

краниометафизарную дисплазию аутосомно-рецессивного типа

синдром краниосинтозоа-анальных аномалий-порокератоза

краниотеленцефальную дисплазию

синдром Крузона

синдром Каллера-Джонса

триаду Куррарино

синдром Карри-Джонса

чешскую дисплазию плюсневого типа

синдром аномалии Денди-Уокера-постаксиальной полидактилии

синдром краниосинтозоа-аномалии Денди-Уокера-гидроцефалии

дефицит антагониста рецептора интерлейкина-1
отсроченное мембранозное окостенение черепа
дентаторубро-паллидолюнгову атрофию
синдром Desbuquois
десмогестероз
диафизарный медуллярный стеноз со злокачественной фиброзной гистиоцитомой
диастрофическую дисплазию
дефицит дигидропиримидиндегидрогеназы - заболевание не является редким
болезнь Диггве-Мельхиора-Клаузена
синдром дисхондростеоза-нефрита
дисферлинопатию
дизостеосклероз
гемимелическую эпифизарную дисплазию
диссегментарную дисплазию типа Роллана-Дебюкуа
диссегментарную дисплазию типа Сильвермана-Хандмакера
DYT-GNAL
синдром ЕЕС
синдром ЕЕМ
синдром Эллиса-Ван Кревельда
энтезит-ассоциированный ювенильный идиопатический артрит
простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией
множественную эпифизарную дисплазию с ранним началом сахарного диабета
болезнь Эрдгейма-Честера
саркому Юинга
семейный аваскулярный некроз головки бедренной кости
семейный холодовой аутовоспалительный синдром
семейную гипокальциурическую гиперкальциемию типа 1
семейную гипокальциурическую гиперкальциемию типа 2
семейную гипокальциурическую гиперкальциемию типа 3
семейную средиземноморскую лихорадку
семейный рассекающий остеохондрит
семейный опухолевый кальциноз
анемию Фанкони
синдром Фейнгольда
синдром Фелти
феморально-лицевой синдром
раздвоение бедренной кости с монодактильной эктродактилией
синдром малоберцовой кости и локтевой кости
фетальный талидомидный синдром
фиброхондрогенез

прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию
 синдром аплазии малоберцовой кости-эктродактилии
 синдром малоберцовой аплазии-большеберцовой кампомелии-олигосиндактилии
 фибулярную гемимелию
 фибулярную гипоплазию и сложную брахидактилию
 синдром Филиппи
 синдром Фитцсиммонса-Гильберта
 фокально-сегментарный гломерулосклероз
 синдром Франка-Тер Хаара
 болезнь Фрайберга
 фронтофационазальную дисплазию
 фронтометафизарную дисплазию
 лобно-носовую дисплазию
 лобно-носовую дисплазию с алопецией и генитальными аномалиями - см. лобно-
 носовую дисплазию
 синдром фронтоназальной дисплазии-тяжелого микрофтальма-тяжелой расщелины
 лица - см. лобно-носовую дисплазию
 фронторинию - см. лобно-носовую дисплазию
 синдром Фринса-Хофкенса-Фабри
 фукозидоз
 синдром Фурманна
 галактосиалидоз
 болезнь Гоше типа 1
 болезнь Гоше типа 3
 гелеофизическую карликовость
 генитопателлярный синдром
 генуэзский синдром
 генохондроматоз
 остеодиспластическую геродермию
 синдром гематодиафизарной дисплазии Госаля
 гигантоклеточную опухоль кости
 GM1 ганглиозидоз типа 1
 GM1 ганглиозидоз типа 2
 GM1 ганглиозидоз типа 3
 болезнь Гольденхара
 болезнь Горхема
 изящную костную дисплазию
 синдром Гранта
 дисплазию Гринберга
 синдром цефалополисиндактилии Грейга

синдром Гурлера
синдром Халлермана-Штрейфа
кистиво-ножно-генитальный синдром
синдром Ханхарта
синдром рука-сердце словенского типа
синдром сердце-рука испанского типа
гемифациальную микросомию
гемифациальную миогиперплазию
наследственную недостаточность антитромбина
наследственные множественные остеохондромы
синдром Холта-Орама
синдром Хантера-Макальпина
синдром Херлера
синдром Гурлера-Шейе
синдром гиалинового фиброматоза
гипер-IgD синдром
генерализованный кортикальный гиперостоз
семейный гиперфосфатемический опухолевый кальциноз
гипохондроплазию
гипофосфатазию
гипофосфатемический рахит
I-клеточную болезнь
синдром IMAGe
синдром неперфорированной ротоглотки-реберно-позвоночных аномалий
миопатию с тельцами включения 3
миопатию с тельцами включения с ранним началом болезни Педжета и лобно-височной деменцией
миозит с тельцами включения
синдром-умственной отсталости-спастичности-эктродактилии
иридогониодисгенез типа 1
синдром IVIC
синдром Джексона-Вейсса
метафизарную хондродисплазию типа Янсена
синдром Жена
синдром Джонсона-Мансона
ювенильный дерматомиозит
ювенильный остеопороз
ювенильную болезнь Педжета
синдром Каплана Плаучу Фитча
синдром Кенни-Каффи типа 1

синдром Кенни-Каффи типа 2
синдром Кейтеля
болезнь Кинбока
синдром Клейнера Холмса
синдром Клиппеля-Фейля
синдром Клиппеля-Треноне
дисплазию Книста
летальную Книст-подобную дисплазию
болезнь Кохлера
кифомелическую дисплазию
лакримо-ауриколо-денто-дигитальный синдром
ламбдовидный синостоз
миастенический синдром Ламберта-Итона
мезомелическую дисплазию Лангера
синдром Ларсена
синдром латерального менингоцеле
синдром Лорина-Сандрова
болезнь Легга-Кальве-Пертеса
гиперостотическую карликовость Ленца-Маевского
плеоностеоз Лери
дисхондростеоз Лери-Вейля
летальную хондродисплазию типа Моэрмана
летальную хондродисплазию типа Селлера
синдром леватора
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 1А
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2А
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2Е
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2F
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2Н
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2С
поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2D
синдром конечностей и молочной железы
синдром Лойса-Дитца
синдром Лори-Маклина
синдром Лори-Вуда
макрофагальный миофасциит
синдром Маффуччи
синдром MAGIC
синдром Маджида

мандибулоакральную дисплазию с липодистрофией типа А
 мандибулоакральную дисплазию с липодистрофией типа В
 нижнечелюстно-лицевой дизостоз с микроцефалией
 маннозидоз, бета-А, лизосомальный
 синдром Маршалла
 синдром Маршалла-Смита
 синдром Маккьюна-Олбрайта
 синдром Меккеля
 срединную расщелину верхней губы с полипами кожи лица и слизистой оболочки

носа

синдром Мейера-Горлина
 синдром Мельника-Нидлса
 мелореостоз
 мелореостоз с остеопойкилозом
 синдром мезомелии-синостоза
 синдром мезомелической карликовости-расщелины неба-камптодактилии
 мезомелическую дисплазию типа Кантапутра
 мезомелическую дисплазию типа Саварирьяна
 сращение 4 и 5 пястных костей
 метахондроматоз
 метафизарную акроскифодисплазию
 метафизарную хондродисплазию типа Шмида
 метафизарную хондродисплазию типа Спара
 синдром метафизарного дизостоза-умственной отсталости-кондуктивной глухоты
 синдром метафизарной дисплазии-гипоплазии верхней челюсти-брахидактилии
 метафизарную дисплазию без гипотрихоза
 метатропную дисплазию
 мевалоновую ацидурию
 микроцефалическую остеодиспластическую примордиальную карликовость 1 типа
 микроцефалическую остеодиспластическую примордиальную карликовость 2 типа
 микроцефалическую примордиальную карликовость типа Ториелло
 гемифациальную микросомию с радиальными дефектами
 синдром Миллера
 многоядерную миопатию с внешней офтальмоплегией
 мономелическую амиотрофию
 синдром Макла-Уэльса
 муколипидоз III альфа/бета
 муколипидоз типа 4
 мукополисахаридоз типа III
 мукополисахаридоз типа IIIA

мукополисахаридоз типа ШВ
мукополисахаридоз типа ШС
мукополисахаридоз типа ШD
мукополисахаридоз типа IV
мукополисахаридоз типа IVA
мукополисахаридоз типа VII
синдром Мюнке
синдром мультицентрического карпотарзального остеолиза
множественную эпифизарную дисплазию
множественную эпифизарную дисплазию 2
множественную сульфатазную недостаточность
синдром множественных синостозов 1
множественную системную атрофию
мышечную дистрофию
врожденную мышечную дистрофию мегакониального типа
МУН7-ассоциированную скапулоперонеальную мышечную дистрофию
синдром Майре
миозинопатии
миостатин-ассоциированную гипертрофию мышц
миотоническую дистрофию
миотоническую дистрофию 2 типа
acrofacial дизостоз Нагера
синдром ногтя-надколенника
синдром Накайо-Нишимура
мультисистемное воспалительное заболевание с началом в неонатальном возрасте
неонатальный тяжелый гиперпаратиреоз
синдром прогерии Нестора-Гильермо
нейрофиброматоз типа 1
синдром Нивергельта
семейный нормофосфатемический опухолевый кальциноз
синдром затылочного рога
окулоаурикулофронтоназальный синдром
окулодентодигитальную дисплазию
окуломаксиллофациальный дизостоз
окулофарингеальную мышечную дистрофию
синдром Оливера
болезнь Олье
омодисплазию 1
омодисплазию 2
опсисмодисплазию

орофациодигитальный синдром 1
 орофациодигитальный синдром 10
 орофациодигитальный синдром 11
 орофациодигитальный синдром 2
 орофациодигитальный синдром 3
 орофациодигитальный синдром 4
 орофациодигитальный синдром 5
 орофациодигитальный синдром 6
 орофациодигитальный синдром 8
 орофациодигитальный синдром 9

OSLAM синдром

отоспондиломегаэпифизарную дисплазию

оссификацию задней продольной связки позвоночника - заболевание не является

редким

семейную остеоартропатию пальцев

рассекающий остеохондрит

семейную остеодисплазию типа Андерсона

раннюю остеодиспластику Данкса, Мейна, Козловского

остеофиброзную дисплазию

несовершенный остеогенез типа I

несовершенный остеогенез типа II

несовершенный остеогенез типа III

несовершенный остеогенез типа IV

несовершенный остеогенез типа V

несовершенный остеогенез типа VI

остеоглофоническую дисплазию

остеомезопикноз

синдром полосатой остеопатии-краниального склероза

остеопению и редкие волосы

аутосомно-доминантный остеопетроз типа 1

аутосомно-доминантный остеопетроз типа 2

аутосомно-рецессивный остеопетроз типа 3

аутосомно-рецессивный остеопетроз типа 4

аутосомно-рецессивный остеопетроз типа 7

остеопойкилоз и дакриоцистит

синдром остеопороза-глазокожной гипопигментации

синдром остеопороза-псевдоглиомы

остеосаркому

ото-палато-дигитальный синдром типа 1

ото-палато-дигитальный синдром типа 2

пахидермопериостоз
 дисплазию Пакман
 синдром Паллистера-Холла
 врожденную парамиотонию
 парастремматическую карликовость
 синдром PARC
 синдром Паркса-Вебера
 синдром Паттерсона-Стивенсона-Фонтэна
 синдром тазовой дисплазии-артрогрипоза нижних конечностей
 периодическую лихорадку, афтозный стоматит, фарингит и аденит
 кардиокраниальный синдром типа Пфайффера
 фокомелию, эктродактилию, глухоту, синусовую аритмию
 пигментный виллонодулярный синовит
 синдром грушевидной мышцы
 платиспондильную летальную скелетную дисплазию типа Торранса
 плеокониальную миопатию с выраженной потребностью в соли
 синдром Поланда
 поликистозную болезнь костей
 поликистозную липомембранозную остеодисплазию со склерозирующей
 лейкоэнцефалопатией
 синдром полидактилии-близорукости
 наследственную экспансивную полиосточную фиброзную дисплазию
 миотонию, обостряющуюся калием
 преаксиальную недостаточность, постаксиальную полидактилию и гипоспадию
 преаксиальную полидактилию типа 1
 преаксиальную полидактилию типа 2
 преаксиальную полидактилию типа 3
 преаксиальную полидактилию типа 4
 прогерия
 прогрессирующую костную гетероплазию
 прогрессирующую псевдоревматоидную дисплазию
 дефицит протеина С - заболевание не является редким
 синдром Протея
 проксимальный симфалангизм
 псевдоахондроплазию
 псевдоаминоптериновый синдром
 псевдодиастрофическую дисплазию
 псевдогипопаратиреоз типа 1А
 псевдогипопаратиреоз типа 1С
 псевдопсевдогипопаратиреоз

псориатический ювенильный идиопатический артрит
пикнодизостоз
пикноахондрогенез
болезнь Пайла
гангренозную пиодермию
синдром пиогенный артрит, гангренозная пиодермия и акне
радиоульнарный синостоз типа 1 - см. врожденный радиоульнарный синостоз
радиоульнарный синостоз типа 2 - см. врожденный радиоульнарный синостоз
синдром радиоульнарного синостоза-микроцефалии-сколиоза
синдром Рейна
синдром Рамона
синдром Рападилино
реактивный артрит
почечную дисплазию, пигментную дистрофию сетчатки, мозжечковую атаксию и
скелетную дисплазию
васкулопатию сетчатки с церебральной лейкодистрофией с системными
проявлениями
ризомелическую точечную хондродисплазию типа 1
ризомелическую дисплазию типа Паттерсона-Лоури
ризомелический синдром
синдром Риччери Коста-да Сильвы
синдром ригидного позвоночника
синдром Робертса
синдром Сетре-Чотзена
болезнь Салла - см. болезнь накопления свободной сиаловой кислоты
синдром SAPHO
саркоидоз - заболевание не является редким
синдром Сэя-Мейера
синдром Сэя-Филда-Колдуэлла
синдром дефектов скальпа-постаксиальной полидактилии
синдром SCARF
синдром Шейе
болезнь Шейермана
иммунокостную дисплазию Шимке
синдром Шинцеля-Гедиона
фокомелию типа Шинцеля
дисплазию Шнекенбекена
синдром Шницлера
синдром Шварца-Джампеля
склеростеоз

синдром Секкеля
недостаточность сепиаптеринредуктазы
синдром коротких ребер-полидактилии типа 3
синдром коротких ребер-полидактилии типа 1
синдром коротких ребер-полидактилии типа 4
синдром коротких ребер-полидактилии типа Маевского
низкорослость брюссельского типа
синдром краниосиностоза Шпрингцена-Гольдберга
синдром Швахмана-Даймонда
серповидную бета-талассемию
серповидноклеточную анемию
синдром Силленса
синдром Синглтона-Мертена
соскальзывание эпифиза головки бедренной кости - заболевание не является редким
синдром малого надколенника
дисплазию Смита-МакКорта
синдром Смита-Лемли-Опица
синдром Сотоса
миопатию сфероидного тела
спинальную мышечную атрофию типа Рюкюань
спинальную мышечную атрофию типа 1 с врожденными переломами костей
спинальную мышечную атрофию типа 3
спинальную мышечную атрофию типа 4
спинальную мышечную атрофию с респираторным дистресс-синдромом 1 типа
синдром спленогонадного слияния-дефектов конечностей-микрогнатии
расщепленную мальформацию кисти и стопы
синдром раздвоенной кисти, раздвоенной стопы, нистагма
синдром спондилокамптодактилии
синдром спондилокарпотарзального синостоза
спондилокостанальный дизостоз 1 - см. спондило-реберный дизостоз
спондилокостанальный дизостоз 2 - см. спондило-реберный дизостоз.
спондилокостанальный дизостоз 3 - см. спондило-реберный дизостоз.
спондилокостанальный дизостоз 4 - см. Спондило-реберный дизостоз.
спондилокостанальный дизостоз 5 - см. спондило-реберный дизостоз.
спондилокостанальный дизостоз 6 - см. спондило-реберный дизостоз.
спондилодиспластический синдром Элерса-Данлоса
спондилоэнхондродисплазию с иммунной дисрегуляцией
спондилометафизальную дисплазию типа Женевьев
спондилоэпиметафизарную дисплазию с разболтанностью суставов
спондилоэпиметафизарную дисплазию типа матрилин-3

спондилоэпиметафизарную дисплазию типа Миссури
спондилоэпиметафизарную дисплазию типа Шохата
спондилоэпиметафизарную дисплазию типа SPONASTRIME
спондилоэпиметафизарную дисплазию типа Штрудвика
спондилоэпиметафизарную дисплазию с гипотрихозом
спондилоэпиметафизарную дисплазию с множественными вывихами
X-сцепленную спондилоэпиметафизарную дисплазию
спондилоэпиметафизарную дисплазию агреканового типа
врожденную спондилоэпифизарную дисплазию
спондилоэпифизарную дисплазию типа Марото
X-сцепленную позднюю спондилоэпифизарную дисплазию
спондилоэпифизарную дисплазию-брахидактилию и различной речью
спондилометаэпифизарную дисплазию по типу коротких конечностей-кистей
спондилометафизарную дисплазию алжирского типа
спондилометафизарную дисплазию типа углового перелома
спондилометафизарную дисплазию типа Седагатьяна
спондилометафизарную дисплазию типа А4
спондилометафизарную дисплазию с колбочковой дистрофией
спондилометафизарную дисплазию с несовершенным дентиногенезом
X-сцепленную спондилометафизарную дисплазию
спондилометафизарную дисплазию типа Козловского
спондилопериферическую дисплазию
спондилоторакальный дизостоз
деформацию Шпренгеля
синдром STAR
синдром ригидного человека
синдром Стува-Видеманна
симфалангизм с множественными аномалиями рук и ног
синдактилию типа Сенани-Ленца
синдактилию типа 3
синдактилию типа 5
синдактилию типа 9
синдактилию-полидактилию-ушной мочки синдром
множественные аномалии сингнатия
синовиальный хондроматоз
ювенильный идиопатический артрит с системным началом
TAP-синдром
TARP-синдром
синдром предплюсне-запястной коалиции
синдром тарзального канала

синдром тетраамелии

синдром тетраамелии-множественных пороков развития

тетрамелическую монодактилию

танатофорную дисплазию типа 1

танатофорную дисплазию типа 2

синдром торакальной дисплазии-гидроцефалии

торакоасфиктическую дистрофию

синдром отсутствующей большеберцовой кости-полидактилии-арахноидальной

кисты

синдром Титце

ТМЕМ 165-CDG (CDG-IIIк)

синдром Таунса-Брокса

синдром Тричера-Коллинза

трихо-денто-костный синдром

трихогепатозентеральный синдром

трихоринофаланговый синдром типа 1

трихоринофаланговый синдром типа 2

трихоринофаланговый синдром типа 3

тригонобрахицефалия, луковичный раздвоенный нос, микрогнатия и аномалии

кистей и стоп

синдром трехфаланговых больших пальцев-брахиэктодактилия

аплазию плечевого блока

трохлеарную дисплазию

синдром Тройера

тубулярную агрегатную миопатию

периодический синдром, ассоциированный с рецептором 1 фактора некроза опухоли

гипоплазию локтевой и малоберцовой кости

гипоплазию локтевой кости - синдром умственной отсталости

синдром метафизарной дисплазии локтевой кости

гипоплазию локтевой кости с деформацией ступней в виде клешней лобстера

ульнарно-маммарный синдром

недифференцированную плеоморфную саркому

болезнь Апингтона

синдром Верлоеса-Бургиньона

синдром Вилджоена-Каллиса-Фогеса

синдром Уормана-Малликена-Хейворда

синдром Уивера

синдром Вейля-Маркезани

синдром Вейсенбахера-Цвеймюллера

acrofacial дизостоз Вейера

синдром Вильдерванка

остеосклероз аутосомно-доминантного типа Ворта

синдром морщинистой кожи

X-сцепленную доминантную точечную хондродисплазию 2

X-сцепленную доминантную лопаточно-перонеальную миопатию

X-сцепленную гипофосфатемию

X-сцепленный синдром умственной отсталости-плагиоцефалии

X-сцепленную скелетную дисплазию-синдром умственной отсталости

синдром Юниса-Варона

Изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на следующие примеры.

Примеры

Материалы и методы

Получение бициклических пептидных лигандов (общий способ)

Бициклические пептиды синтезировали на Rink амидной смоле с использованием стандартного твердофазного пептидного синтеза- Fmoc (9-флуоренилметилоксикарбонил), либо путем ручного сочетания (для больших объемов), либо с использованием автоматического пептидного синтезатора Biotage SyroII (для малых объемов). После отщепления от смолы с использованием ТФУ пептиды осаждали диэтиловым эфиром и растворяли в смеси ацетонитрила/воды 50:50. Затем неочищенные пептиды (в концентрации примерно 1 мМ) циклизовали с 1,3 экв каркаса с использованием бикарбоната аммония (100 мМ) в качестве основания. Завершение циклизации определяли времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) или ЖХ-МС. После завершения реакцию циклизации гасили, используя N-ацетилцистеин (10 экв по отношению к пептиду), и растворы лиофилизировали. Остаток растворяли в подходящем растворителе и очищали ОФ-ВЭЖХ. Пептидные фракции достаточной чистоты и правильной молекулярной массы (подтвержденной MALDI-TOF и ВЭЖХ или ЖХ-МС) объединяли и лиофилизировали. Концентрации определяли по УФ-поглощению с использованием коэффициента экстинкции при 280 нм, основанного на содержании Trp/Туг.

Все аминокислоты, если не указано иное, использовали в L-конфигурациях.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

1. Анализ прямого связывания TfR1

Аффинность пептидов по изобретению для TfR1 (Kd) человека или яванского макака определяли с использованием анализа поляризации флуоресценции в соответствии со следующим методом. Пептиды по изобретению метили флуоресцентной меткой (флуоресцеин) и разбавляли до 2,5 нМ в 25 мМ HEPES из 100 мМ NaCl, 4 мМ CaCl₂ и 0,005% P₂O, pH 7,4. Белок TfR1 (Human: R&D Systems, 2474-TR или Acro Biosystems, CD1-H5243; Сyno: Acro Biosystems, TFR-C524a) титровали, начиная с 1-5 мкМ, в том же буфере для анализа, что и пептид, для анализа 1 нМ пептида в общем объеме 25 мкл в 384-луночных черных плоскодонных планшетах с низким связыванием. Анализ обычно

проводили добавлением 5 мкл буфера для анализа, 10 мкл белка TfR1, и затем 10 мкл флуоресцентного пептида. Концентрации белка TfR1 составляли 1 в 2 последовательных разведениях с получением 12 различных концентраций, начиная с 1-5 мкМ. Измерения проводили на приборе BMG PHERAstar FS с оптическим модулем FP 485 520 520 при 25°C с 200 вспышками на лунку и задержкой позиционирования 0,1 с. Каждую лунку анализировали каждые 5 мин в течение 60 мин. Прирост, используемый для анализа, определяли для каждого индикатора в конце 60 мин, когда в лунке не было белка. mP соответствовали стандартной модели связывания 1:1 с помощью квадратного уравнения для получения значения Kd. Выбранные пептиды по изобретению тестировали в вышеуказанном анализе, и результаты представлены в таблице 1:

Таблица 1

Прямое связывание в анализе FP выбранных пептидных лигандов по изобретению

Пептидный лиганд	Среднее геометрическое значение Kd (мкМ) TfR1 человека	Стандартное отклонение (SD)	Среднее геометрическое значение Kd (мкМ) TfR1 яванского макака	Стандартное отклонение (SD)
BCY12652	0,298	0,215 (n=9)	0,098	0,035 (n=3)
BCY12650	0,862	0,118 (n=3)	не определяли	не определяли
BCY12651	0,971	0,633 (n=5)	не определяли	не определяли
BCY14474	0,751	2,1419 (n= 2)	не определяли	не определяли
BCY14475	0,078	0,0664 (n= 2)	2,617	0 (n=1)
BCY14476	0,087	0,0327 (n= 8)	3,6549	0 (n=1)
BCY15768	0,047	0,0171 (n= 6)	0,70684	0 (n=1)
BCY15934	0,064	0,0067 (n= 2)	не определяли	не определяли
BCY15937	0,034	0,0000 (n= 1)	не определяли	не определяли
BCY15938	0,060	0,0014 (n= 2)	не определяли	не определяли
BCY15940	0,054	0,0002 (n= 2)	не определяли	не определяли

nd=не определяли

2. Анализ связывания TfR1 SPR

Эксперименты Biacore проводили для определения значений k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) различных пептидов, связывающихся с TfR1.

Рекомбинантный TfR1 человека и яванского макака получали от Bicycle в виде His₆-меченого TfR1 (a.a. 89-760) (ACRO Biosystems, CD1-H5243 и TFR-C524a).

Для анализа связывания пептида с TfR1 использовали прибор Biacore T200 или S200 с использованием подхода захвата/связывания с чипом Cytiva NTA при 25°C с 25 мМ HEPES, 0,1 М NaCl, 0,05% Твина 20, pH 7,4, в качестве подвижного буфера. Иммуобилизацию проводили следующим образом. Чип предварительно уравнивали инжектированием 500 мМ ЭДТА (pH 8) перед активацией 5 мМ NiSO₄. Затем поверхность активировали, используя стандартную химию сочетания аминов. Вкратце, карбоксиметилдекстрановую поверхность активировали с помощью 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорида (EDC)/0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) в соотношении 1:1. Затем белок TfR1 (человека или яванского макака) захватывали

на активированную поверхность после разведения в подвижном буфере до 200 нМ и 250 нМ соответственно. Остаточные активированные группы блокировали 7-мин инжектированием 1 М этаноламина (рН 8,5):HBS-N (1:1). Референтные поверхности активировали и блокировали, как описано выше, без захвата белка TfR1. Уровни захвата находились в диапазоне 1500-5000 условных единиц в зависимости от отдельного исследования. Буфер меняли на 25 мМ HEPES, 0,1 М NaCl, 0,05% Твина 20, рН 7,4, 1% ДМСО.

На данном буфере готовили серию разведений тестируемых пептидов с максимальной концентрацией пептида 5 мкМ и еще 6 2-кратных разведений. SPR-анализ проводили при 25°C со скоростью потока 30 мкл/мин с 160-сек ассоциацией и 700-800-сек диссоциацией. Данные были скорректированы с учетом ДМСО для исключения объемных эффектов. Все данные были дважды соотнесены для контрольных инжектирований и референтной поверхности с использованием стандартных процедур обработки, и обработку данных и аппроксимацию кинетических кривых выполняли с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 2.0с (программное обеспечение BioLogic). Данные были подогнаны с использованием простой модели связывания 1:1 с учетом эффектов массового переноса, где это подходит.

Выбранные пептиды по изобретению тестировали в вышеуказанном анализе, и результаты представлены в таблице 2:

Таблица 2

Результаты SPR анализа связывания выбранных пептидных лигандов по изобретению

Пептидный лиганд	Среднее геометрическое значение Kd (мкМ) TfR1 человека	Стандартное отклонение (SD)	Среднее геометрическое значение Kd (мкМ) TfR1 яванского макака	Стандартное отклонение (SD)
BCY12455	65,600	72,8	42,384	34,0
BCY13983	450,0	0 (n=1)	4580	0 (n=1)
BCY13986	132,0	148 (n=4)	2590	0 (n=1)
BCY15466	32,1	6,7 (n=4)	1394,3	465,6 (n=4)
BCY15467	29,5	29,5 (n=5)	1580,8	516,6 (n=3)
BCY13989	376,3	44,5 (n=4)	3440,5	2347,6 (n=2)
BCY15468	37,8	28,4 (n=5)	1717,6	2143,6 (n=4)
BCY15469	54,3	29,9 (n=4)	2117,7	1347,0 (n=4)
BCY15470	36,4	16,1 (n=4)	1615,1	1036,7 (n=4)
BCY15471	262,9	109,8 (n=5)	4660	0 (n=1)

Другие выбранные пептиды по изобретению тестировали в вышеуказанном анализе, и результаты представлены в таблице 3:

Таблица 3

Результаты SPR анализа связывания выбранных пептидных лигандов по изобретению

Пептидный лиганд	Kd TfR1 человека	Kd TfR1 яванского макака
------------------	------------------	--------------------------

	(нМ)	(нМ)
BCY13989	не определяли	□11000
BCY 15768	не определяли	3800
BCY 15769	70	2200
BCY 15771	65	4000
BCY 15772	nd	99000
BCY 15773	178	2600
BCY 15774	не определяли	41000
BCY 15775	не определяли	отсутствие связывания
BCY 15776	не определяли	отсутствие связывания
BCY 15777	не определяли	отсутствие связывания
BCY 15770	не определяли	>100000
BCY 15891	46	3990
BCY 17992	42	535
BCY 17993	9	235
BCY 18033	не определяли	589
BCY 18034	25	2080
BCY 18035	77	10300
BCY 18036	422	7310
BCY 17994	6,6, 22	688
BCY 17995	3,4	не определяли
BCY 18037	11	1080
BCY 18038	9,7	1650
BCY 18039	8,6	819
BCY 17109	3,2	281*/535
BCY 17114	48	845
BCY 17110	15	232
BCY 17111	8,3	907
BCY 17112	4,6	2604
BCY 17113	308	1664
BCY 17115	60	1242
BCY 17116	1	474
BCY 17117	4,2	805
BCY 17118	120	1959

BCY 17119	212	5653
BCY 17120	32	1257
BCY 15468	29	4015
BCY 16048	28	1280
BCY 16049	175	28000
BCY 16035	37	4600
BCY 16047	49	4828
BCY 16039	89	10234
BCY 16036	83	5902
BCY 16033	82	6664
BCY 16038	210	~10000
BCY 16050	210	25800
BCY 16053	33	3120
BCY 16089	63	7466
BCY 16088	67	5878
BCY 16034	238	25000
BCY 16045	nd	10000
BCY 16046	32	2089
BCY 16051	25	1820
BCY 16031	68	6481
BCY 16079	60	5665
BCY 16029	47	5483
BCY 16052	73	7478
BCY 16032	305	30000
BCY 16550	18	682
BCY 16753	12	1700
BCY 16962	6,1	599
BCY 16963	не определяли	501
BCY 16964	6,6	514
BCY 16966	11	1900
BCY 16557	20	1180
BCY 16558	20000	50000
BCY 17986	52	4660
BCY 17987	50	5140

BCY 17988	649	не определяли
BCY 17991	3,4	35
BCY 20546	1660	не определяли
BCY 17986	52	4660
BCY 17988	649	не определяли
BCY 17994	6,6, 22	688

nd=не определяли

NB=отсутствие связывания

3. Анализ ингибирования TfR1

Ингибиторную активность пептидов для TfR1 по изобретению (IC₅₀) определяли с использованием альфа-анализа в соответствии со следующим методом. Белки, пептиды и альфа-реагенты готовили до концентрации 5×, и 5 мкл каждого реагента добавляли к общему объему 25 мкл в белый 384-луночный планшет Optiplate для получения конечной концентрации 1X. Флуоресцентно меченный трансферрин человека (Invitrogen, T2871) разбавляли до 2,5 нМ в 25 мМ HEPES из 100 мМ NaCl, 4 мМ CaCl₂, 0,5% BSA и 0,05% P₂O, pH 7,4. Белок TfR1 человека или яванского макака разводили до 50 нМ, и немеченый трансферрин человека (R&D Systems, 2914-HT) разводили до 500 нМ в том же буфере для анализа. Немеченые пептиды из стокового раствора в ДМСО разводили в 20 раз тем же буфером для анализа с последующим серийным разведением 1 к 3 в буфере для анализа, содержащем 5% ДМСО, с получением 11 различных концентраций. 5 мкл флуоресцентно меченного трансферрина, 5 мкл TfR1 человека или яванского макака, 5 мкл немеченого пептида или немеченого трансферрина человека (R&D Systems, 2914-HT) добавляли в белый 384-луночный планшет Optiplate и инкубировали в течение 30 мин. Акцепторное анти-FITC антитело (PerkinElmer, AL127) разводили в 50 раз буфером для анализа, добавляли 5 мкл в аналитический планшет и инкубировали в течение 30 мин. Донор-хелат никеля (PerkinElmer, AS101) разводили в 50 раз буфером для анализа, добавляли 5 мкл в аналитический планшет и инкубировали в течение 180 мин. Измерения люминесценции проводили на BMG PHERAstar FS или FSX, оснащенном модулем AlphaScreen 520-620, при 25°C после возбуждения на длине волны 680 нм. Необработанные данные нормализовали к 100 нМ немеченому трансферрину и буферу. Данные стандартизировали по 100 нМ немеченого трансферрина и контрольных буферов и строили стандартную 4-параметрическую кривую для получения значения IC₅₀.

Выбранные пептиды по изобретению тестировали в вышеуказанном анализе, и результаты приведены в таблице 4:

Таблица 4

Результаты анализа ингибирования трансферрина для выбранных пептидных лигандов по изобретению

Пептидный лиганд	Среднее геометрическое значение IC₅₀	Стандартное отклонение (SD)	Среднее геометрическое значение IC₅₀	Стандартное отклонение (SD)
-------------------------	--	------------------------------------	--	------------------------------------

	мкМ) TfR1 человека		(мкМ) TfR1 яванского макака	
BCY12455	0,673	0,147 (n=4)	не определяли	не определяли
BCY12452	1,215	0,564 (n=2)	не определяли	не определяли
BCY12454	0,893	0,356 (n=2)	не определяли	не определяли

nd=не определяли

4. Анализ конкурентного связывания TfR1

Пептиды без флуоресцентной метки тестировали в сравнении с 1 нМ пептида с флуоресцентной меткой и известным значением K_d (BCY15768). Сначала пептиды разбавляли 100% ДМСО, затем разбавляли до соответствующей концентрации в буфере для анализа, как описано в анализе прямого связывания с максимальным содержанием ДМСО 2,5%, затем готовили серийные разведения 1 к 2. 10 мкл разбавленного пептида добавляли в планшет, с последующим добавлением 10 мкл человеческого TfR1, как описано для анализа прямого связывания при фиксированной концентрации (200 нМ). Затем добавляли 5 мкл флуоресцентного пептида. Измерения проводили аналогично тому, как описано для анализа прямого связывания, однако прирост определяли до первого измерения. Анализ данных проводили в Dotmatics, где уравнение соответствовало Ченгу-Пруссоффу.

Выбранные пептиды по изобретению тестировали в вышеуказанном анализе, и результаты приведены в таблице 5:

Таблица 5

Результаты анализа конкурентного связывания TfR1 для выбранных пептидных лигандов по изобретению

Пептидный лиганд	Среднее геометрическое значение K_i (мкМ)	Стандартное отклонение (SD)
BCY17991	0,002	0,001
BCY17995	0,002	0,003
BCY17993	0,003	0,002
BCY18033	0,004	0,002
BCY18030	0,005	0,003
BCY18039	0,008	n=1
BCY17994	0,008	0,010
BCY18029	0,008	0,004
BCY17109	0,009	0,006
BCY18037	0,011	0,000
BCY17990	0,011	0,010
BCY17992	0,012	0,007
BCY18038	0,012	0,001
BCY18034	0,014	0,006
BCY18031	0,020	0,006
BCY18035	0,020	0,005
BCY17110	0,022	0,005
BCY17115	0,030	0,012
BCY17989	0,030	0,019
BCY16962	0,036	0,025
BCY17117	0,037	0,003
BCY16963	0,039	0,030
BCY15889	0,040	0,005
BCY17114	0,041	0,012
BCY17987	0,042	0,015
BCY15893	0,044	0,006
BCY16754	0,044	0,024
BCY17112	0,047	n=1
BCY15890	0,047	0,014
BCY16753	0,048	0,021

BCY16046	0,049	0,008
BCY15466	0,050	0,013
BCY17120	0,052	0,002
BCY16964	0,052	0,008
BCY16965	0,052	0,018
BCY17986	0,054	0,021
BCY15470	0,055	0,007
BCY16550	0,056	0,029
BCY16966	0,063	0,017
BCY15892	0,063	0,005
BCY16051	0,066	0,018
BCY15891	0,067	0,027
BCY17118	0,070	0,017
BCY16048	0,071	0,016
BCY17116	0,075	0,016
BCY16053	0,075	0,021
BCY16557	0,078	0,058
BCY17111	0,086	0,010
BCY18036	0,090	0,012
BCY16035	0,091	0,007
BCY17113	0,103	0,028
BCY18032	0,105	0,046
BCY15648	0,107	0,028
BCY15469	0,119	0,032
BCY16031	0,119	0,014
BCY16079	0,123	0,012
BCY15939	0,125	0,028
BCY16036	0,127	0,031
BCY16029	0,131	0,009
BCY16047	0,133	0,039
BCY15467	0,133	0,036
BCY16089	0,136	0,018
BCY17119	0,160	0,012
BCY16088	0,161	0,026

BCY16052	0,169	0,034
BCY16033	0,180	0,010
BCY16039	0,219	0,021
BCY16038	0,221	0,030
BCY17988	0,272	0,099
BCY15935	0,300	0,333
BCY15894	0,392	0,202
BCY15471	0,434	0,124
BCY16050	0,473	0,091
BCY16034	0,510	0,202
BCY13989	0,565	0,550
BCY16032	0,654	0,042
BCY16049	0,805	0,728
BCY16558	1,623	n=1
BCY16041	2,189	0,629
BCY16042	3,451	0,783
BCY16045	6,866	7,594
BCY16037	9,220	8,922
BCY16044	13,900	0,000
BCY16040	20,000	0,000
BCY16043	23,600	0,000

Выбранные пептиды по изобретению тестировали в вышеуказанном анализе с использованием TfR1 человека и/или яванского макака, и результаты приведены в таблице 6:

Таблица 6

Результаты анализа конкурентного связывания TfR1 для выбранных пептидных лигандов по изобретению

Пептидный лиганд	Значение Ki TfR1 человека (нМ)	Значение Ki TfR1 яванского макака (нМ)
BCY 13989	565	3440
BCY 14476	79	не определяли
BCY 15469	119	2117
BCY 15892	63	не определяли
BCY 15470	55	1615
BCY 15893	44	не определяли

BCY 15471	434	4660
BCY 15894	392	не определяли
BCY 15468	103	1230
BCY 15768	44	1075
BCY 15769	32	1120
BCY 15771	32	1065
BCY 15772	926	7084
BCY 15773	83	2301
BCY 15774	269	3471
BCY 15775	6342	>250 мкМ
BCY 15776	1334	>90 мкМ
BCY 15777	2652	2910
BCY 15770	651	4042
BCY 15935	300	не определяли
BCY 15891	94	не определяли
BCY 15939	125	не определяли
BCY 15934	63	не определяли
BCY 15938	60	не определяли
BCY 15937	34	не определяли
BCY 15940	54	не определяли
BCY 17870	9	не определяли
BCY 17871	9	не определяли
BCY 17872	14	не определяли
BCY 17992	11	не определяли
BCY 17993	5	не определяли
BCY 18029	6	не определяли
BCY 18030	7	не определяли
BCY 18031	17	не определяли
BCY 18032	77	не определяли
BCY 18033	6	не определяли
BCY 18034	10	не определяли
BCY 18035	17	не определяли
BCY 18036	82	не определяли
BCY 17873	13	не определяли

BCY 17874	13	не определяли
BCY 17994	8	не определяли
BCY 17995	5	не определяли
BCY 18037	11	не определяли
BCY 18038	11	не определяли
BCY 18039	8	не определяли
BCY 17868	23	не определяли
BCY 17869	30	не определяли
BCY 17875	13	не определяли
BCY 17876	16	не определяли
BCY 17877	29	не определяли
BCY 17878	28	не определяли
BCY 17879	32	не определяли
BCY 17880	29	не определяли
BCY 17109	11	не определяли
BCY 17114	32	не определяли
BCY 17110	22	не определяли
BCY 17111	86	не определяли
BCY 17112	47	не определяли
BCY 17113	103	не определяли
BCY 17115	30	не определяли
BCY 17116	75	не определяли
BCY 17117	37	не определяли
BCY 17118	70	не определяли
BCY 17119	160	не определяли
BCY 17120	52	не определяли
BCY 16048	71	621
BCY 16049	805	не определяли
BCY 16035	91	не определяли
BCY 16047	42	не определяли
BCY 16039	72	не определяли
BCY 16036	127	не определяли
BCY 16033	180	не определяли
BCY 16038	221	не определяли

BCY 16050	473	не определяли
BCY 16053	75	не определяли
BCY 16089	136	не определяли
BCY 16088	161	не определяли
BCY 16034	510	не определяли
BCY 16037	9220	не определяли
BCY 16045	6866	не определяли
BCY 16046	49	746
BCY 16051	66	482
BCY 16041	2189	не определяли
BCY 16042	3451	не определяли
BCY 16031	119	не определяли
BCY 16079	123	не определяли
BCY 16029	131	не определяли
BCY 16052	169	не определяли
BCY 16032	654	не определяли
BCY 16550	56	не определяли
BCY 16753	48	не определяли
BCY 16754	18	не определяли
BCY 16962	36	не определяли
BCY 16963	39	не определяли
BCY 16964	52	не определяли
BCY 16965	52	не определяли
BCY 16966	63	не определяли
BCY 16557	37	не определяли
BCY 16558	1623	не определяли
BCY 17986	33	не определяли
BCY 17987	383 (n=2)	не определяли
BCY 17988	213	не определяли
BCY 17989	24	не определяли
BCY 17990	8	не определяли
BCY 17991	3	не определяли
BCY 17986	33	не определяли
BCY 17988	213	не определяли

BCY 17989	24	не определяли
BCY 17994	8	не определяли

nd=не определяли

5. Анализ трансцитоза с бициклическими пептидами, связывающими с TfR1, в первичных культурах клеток проксимальных извитых канальцев человека

Для того, чтобы понять, как обращаться с бициклическими пептидами, связывающимися с TfR1, трансэпителиальные потоки измеряли через поляризованные монослои клеток проксимальных канальцев человека. Два потока JAB (поток в абсорбционном направлении) и JBA (поток в секреторном направлении) измеряли в течение 180-мин проточного периода. По этим потокам определяли суммарное направление (поглощение или секреция) и величину потока ТА. Детали эксперимента описаны ниже:

- адсорбционный поток (JAB) и секреторный поток (JBA) ТА определяли путем нанесения соединения либо на апикальную, либо на базолатеральную сторону конфлюэнтного монослоя и проводили наблюдение за распределением субстрата между двумя компартментами во времени. По прлученным данным рассчитывали суммарный поток (Jnet). Бициклические пептиды тестировали в трех концентрациях: 0,1, 1 и 10 мкМ;

- конфлюэнтные монослои объединяли в пары таким образом, чтобы монослои, используемые для измерения абсорбционного потока (JAB) и секреторного потока (JBA), имели сходные значения TEER;

- культуральную среду аспирировали из лунок со вставками перед последовательным переносом вставок в три стакана емкостью примерно 100 мл с теплым модифицированным буфером Кребса;

- вставки с монослоями клеток проксимальных канальцев человека помещали в новые 24-луночные планшеты, где каждая лунка содержала 800 мкл теплого модифицированного буфера Кребса с рН 7,4, и добавляли 200 мкл модифицированного буфера Кребса с рН 7,4 в верхнюю часть вставки камеры (апикальная камера). Температуру в эксперименте поддерживали на уровне 37°C;

- перед инициированием потока тестируемых соединений монослои предварительно инкубировали только с буфером Кребса или с буфером Кребса и носителем. Монослои инкубировали с буфером Кребса при рН 7,4 либо на апикальной, либо на базолатеральной мембране, в зависимости что было подходящим;

- поток инициировали, когда модифицированный буфер Кребса аспирировали из апикальной или базолатеральной камеры и заменяли равным объемом необходимой тестируемой концентрации бициклического пептида при соответствующем рН;

- эта камера называется донорной камерой. В дополнение к бициклическим пептидам для определения парацеллюлярного потока также совместно вводили люцифер желтый в концентрации, аналогичной для бициклического пептида;

- затем отбирали 50 мкл из противоположной камеры (называемой приемной камерой) на заранее определенные временные точки после начала эксперимента. Образцы

собирали после осторожного пипетирования дважды для смешивания буфера;

- после каждого отбора образцов вносили равное количество свежего раствора Кребса с соответствующим рН и субстратом. При последнем отборе образцов реакцию останавливали последовательным переносом вставок в три стакана с охлажденным на льду буфером Кребса и оставляли для высушивания;

- образцы объемом 50 мкл хранили в 96-луночных планшетах для ПЦР и добавляли 5,6 мкл 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) до конечной концентрации 0,01% ТФУ, и затем быстро замораживали в сухом льду для хранения;

- монослои лизировали 50 мкл 0,01% ТФУ для определения внутриклеточного количества бициклических пептидов и мгновенно замораживали, как описано выше;

- все образцы хранили при температуре -80°C . Образцы подвергали определению концентрации бициклического пептида методом ЖХ-МС/МС.

6. Детектирование бициклических пептидов методом ЖХ-МС/МС

В целом для анализа ЖХ-МС/МС было получено 648 образцов.

BCY17986, BCY17988, BCY17989 и BCY17994 поставлялись по отдельности в виде растворов с концентрацией 1 мг/мл в ДМСО. Затем их разбавляли смесью ацетонитрил/ДМСО (50/50, об./об.) с получением рабочих растворов.

Массовые калибровочные стандарты для BCY17986, BCY17988, BCY17989 и BCY17994 в транспортной среде (модифицированный буфер Кребса) с концентрацией матрицы в диапазоне от 1,00 до 1000 нмоль/л готовили обогащением транспортной среды соответствующими количествами рабочего раствора BCY17986, BCY17988, BCY17989 и BCY17994.

Донорная камера, приемная камера и образцы лизированных почечных клеток количественно оценивали с использованием массовых калибровочных стандартов и образцов контроля качества, приготовленных в транспортной среде. Любые образцы, концентрация которых, как предполагалось, превышала ULOQ при первоначальном анализе, перед повторным анализом разбавляли в 20 раз. BCY17986, BCY17988, BCY17989 и BCY17994 были детектированы в транспортной среде и образцах лизированных почечных клеток из всех монослоев почек, дозированных *in vitro*, после введения дозы.

Общее содержание бициклического пептида для каждой камеры рассчитывали на основе анализированных концентраций и корректировали на парацеллюлярную утечку, используя процентную утечку люциферного желтого, для получения истинного суммарного потока в каждом направлении при каждой концентрации бициклического пептида. Суммарные потоки выражали в пмоль/см² и строили график зависимости от времени для направлений от апикального к базолатеральному (А-В) и от базолатерального к апикальному (В-А).

Результаты анализа в разделах 5 и 6, приведенных выше, показаны на фигурах 1-4, откуда следует, что все четыре тестируемых бициклических пептида показали транцитоз, зависящий от концентрации и времени, как в направлении А-В, так и в направлении В-А. Это согласуется с параллельными исследованиями, результаты которых

показали связывание FITC трансферрина с TfR1, локализованным на обеих мембранах. Обычно поток в направлении от базолатерального к апикальному был больше, чем от апикального к базолатеральному. Предыдущие исследования показали интернализацию этих бициклических пептидов. Полученные данные показывают наличие трансцитоза бициклических пептидов, связывающих с TfR1, в первичной культуре человека, экспрессирующей TfR1, с прохождением через поляризованную клетку, что свидетельствует о вероятном транспорте через эндотелиальные клетки периферических и церебральных сосудов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный лиганд, специфичный для рецептора трансферрина 1 (TfR1), включающий полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что, по меньшей мере, на молекулярном каркасе образуются две полипептидные петли.

2. Пептидный лиганд по п. 1, где указанные реакционноспособные группы содержат остатки цистеина.

3. Пептидный лиганд по п.1 или 2, где пептидный лиганд ингибирует связывание трансферрина с TfR1.

4. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные петлевые последовательности содержат 2, 3, 6, 8 или 9 аминокислот.

5. Пептидный лиганд по п.4, где указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, первая из которых состоит из 2 аминокислот, и вторая состоит из 9 аминокислот.

6. Пептидный лиганд по п.4, где указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, каждая из которых состоит из 6 аминокислот.

7. Пептидный лиганд по п.4, где указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, первая из которых состоит из 3 аминокислот, и вторая состоит из 8 аминокислот.

8. Пептидный лиганд по п.4, где указанный пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

$C_i\text{ALC}_{ii}\text{NDWTLPW}\text{HNC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1);

$C_i\text{REFFDTC}_{ii}\text{GLAFIEC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2); и

$C_i\text{LEAC}_{ii}\text{YDGVYWYSC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 3);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина соответственно, или

его фармацевтически приемлемая соль, где молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), и пептидный лиганд включает N-и/или C-концевые добавления и выбран из:

A-(SEQ ID NO: 1)-A (обозначается здесь как BCY12455);

A-(SEQ ID NO: 1)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY12652);

A-(SEQ ID NO: 2)-A (обозначается здесь как BCY12452);

A-(SEQ ID NO: 2)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY12650);

A-(SEQ ID NO: 3)-A (обозначается здесь как BCY12454); и

A-(SEQ ID NO: 3)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY12651).

где Sar представляет собой саркозин, и F1 представляет собой флуоресцеин.

9. Пептидный лиганд по п.1 или 2, где пептидный лиганд не ингибирует связывание

трансферрина с TfR1.

10. Пептидный лиганд по п.9, где указанные петлевые последовательности содержат 3 или 7 аминокислот.

11. Пептидный лиганд по п.10, где указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, первая из которых состоит из 7 аминокислот, и вторая состоит из 3 аминокислот.

12. Пептидный лиганд по любому из пп. 9-11, где указанный пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

- C_iSADDWLG_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 4);
- C_iSSDAYLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 5);
- C_iPPDAHLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 6);
- C_iPQDAYLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 7);
- C_iPPDSWQGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 8);
- C_iSPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY15935);
- C_iPGDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 10);
- C_iPPDShLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 11);
- C_iSADDWLG_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 12);
- C_iP[HyP]DAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 13);
- C_iP[HyP]DAYLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 14);
- C_iS[HyP]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 15);
- C_iP[Aib]DAHLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 16);
- C_iPPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 17);
- C_iP[Aib]DAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 18);
- C_iSADAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 19);
- C_iS[Aib]DAHLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 20);
- C_iSPDAHLGC_{ii}[EPA]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 21);
- C_iPPDAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 22);
- C_iS[Aib]DAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 23);
- C_iAPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 24);
- C_iP[Aib]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 25);
- C_iSPDAYLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 26);
- C_iSPDAHLGC_{ii}[tBuGly]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 27);
- C_iPND AHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 28);
- C_iPIDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 29);
- C_iSPDAYLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 30);
- C_iPPDAYLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 31);
- C_iS[Aib]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 32);
- C_iSPDAHLGC_{ii}[Chg]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 33);
- C_iAPDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 34);
- C_iYLPDW[tBuAla]C_{ii}GDEYC_{iii} (SEQ ID NO: 35);

C_i SPDAHLGC_{ii}IS[2Nal]C_{iii} (SEQ ID NO: 36);
 C_i SPDAHLGC_{ii}IS[3tBuTyr]C_{iii} (SEQ ID NO: 37);
 C_i SPD[Aib]HLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 38);
 C_i SPDAHLGC_{ii}IS[1Nal]C_{iii} (SEQ ID NO: 39);
 C_i SPDAH[tBuAla]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 40);
 C_i SPDAH[Cba]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 41);
 C_i SPDAHLGC_{ii}ISWC_{iii} (SEQ ID NO: 42);
 C_i SPD[Abu]HLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 43);
 C_i S[Aze]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 44);
 C_i SPDDHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 45);
 C_i SPDShLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 46);
 C_i SPDAH[Abu]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 47);
 C_i SPDAHLGC_{ii}IS[4Pal]C_{iii} (SEQ ID NO: 48);
 C_i P[dA]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 49);
 C_i SPDAYLGC_{ii}[tBuAla]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 50);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[C5g]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 51);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[Cbg]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 52);
 C_i SPDAHL[dA]C_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 53);
 C_i SPDAH[Aib]GC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 54);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[Cpg]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 55);
 C_i SPDAHLGC_{ii}[B-Melle]SYC_{iii} (SEQ ID NO: 56);
 C_i SADAHLC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 57);
 C_i SPAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 58);
 C_i SPDAALGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 59);
 C_i SPDAHAGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 60);
 C_i SPDAHLAC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 61);
 C_i SPDAHLGC_{ii}ASYC_{iii} (SEQ ID NO: 62);
 C_i SPDAHLGC_{ii}IAYC_{iii} (SEQ ID NO: 63);
 C_i SPDAHLGC_{ii}ISAC_{iii} (SEQ ID NO: 64);
 C_i [K(N₃)]PDAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 65);
 C_i S[K(N₃)]DAHLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 66); и
 C_i SPD[K(N₃)]HLGC_{ii}ISYC_{iii} (SEQ ID NO: 67);

где Abu представляет собой аминокислоту, Aib представляет собой аминокислоту, Aze представляет собой азетидин, B-Melle представляет собой бета-метилизолейцин, C5g представляет собой циклопентилглицин, Cba представляет собой β-циклобутилаланин, Cbg представляет собой циклобутилглицин, Chg представляет собой циклогексилглицин, Cpg представляет собой циклопропилглицин, EPA представляет собой 2-амино-3-этилпентановую кислоту, НуР представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин, [K(N₃)] представляет собой 6-азидолизин, 1Nal представляет собой 1-нафтилаланин, 2Nal представляет собой 2-нафтилаланин, 4Pal представляет собой 4-

пиридилаланин, tBuAla представляет собой трет-бутилаланин, tBuGly представляет собой трет-бутилглицин, 3tBuTyr представляет собой 3-трет-бутилтирозин, и C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль,

где, например, молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трис(2-бромэтанон) (ТАТВ), и пептидный лиганд включает N- и /или C-концевые добавления и выбран из:

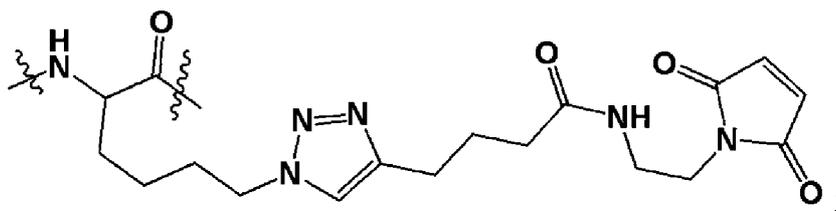
- A-(SEQ ID NO: 4)-A (обозначается здесь как BCY13983);
- A-(SEQ ID NO: 4)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14474);
- A-(SEQ ID NO: 5)-A (обозначается здесь как BCY13986);
- A-(SEQ ID NO: 5)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14475);
- A-(SEQ ID NO: 6)-A (обозначается здесь как BCY15466);
- Ac-(SEQ ID NO: 6) (обозначается здесь как BCY15889);
- A-(SEQ ID NO: 7)-A (обозначается здесь как BCY15467);
- Ac-(SEQ ID NO: 7) (обозначается здесь как BCY15890);
- A-(SEQ ID NO: 8)-A (обозначается здесь как BCY13989);
- A-(SEQ ID NO: 8)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY14476);
- A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15468);
- A-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15768);
- (SEQ ID NO: 9)-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15934);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15937);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15938);
- [FI]G[Sar₅]-A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15940);
- N[1Nal]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18030);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-E[Pip]W (обозначается здесь как BCY18039);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW (обозначается здесь как BCY17994);
- NWN-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18029);
- NWN-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17109);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-E[Aze]W (обозначается здесь как BCY18037);
- Ac-NWN-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY17992);
- Ac-(SEQ ID NO: 9)-E[dP]W (обозначается здесь как BCY18038);
- Ac-N[1Nal]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18034);
- N[dW]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18031);
- Ac-N[dW]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18035);
- HWM-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17110);
- A-(SEQ ID NO: 9)-PHP (обозначается здесь как BCY17115);
- A-(SEQ ID NO: 9)-EPW (обозначается здесь как BCY17114);
- NEV-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17112);
- A-(SEQ ID NO: 9)-PIVH (обозначается здесь как BCY17120);
- Ac-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY15891);

HTS-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17111);
Ac-N[NMeTrp]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18036);
N[NMeTrp]N-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY18032);
Ac-A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY15939);
A-(SEQ ID NO: 9)-EHQE (обозначается здесь как BCY17119);
ESF-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначается здесь как BCY17113);
NWN-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17870);
Ac-NWN-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17871);
[AzPro]-NWN-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY17872);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17873);
[AzPro]-(SEQ ID NO: 9)-EPW (обозначается здесь как BCY17874);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17868);
[AzPro]-(SEQ ID NO: 9) (обозначается здесь как BCY17869);
Ac-N[dY]N-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17882);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-E-[dP]-W-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17890);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-E-[Aze]-W-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17892);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-E-[Pip]-W-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17894);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-[K(N₃)(PYA-maleimide)] (обозначается здесь как BCY17906);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW-[Peg₁₀]-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY19405);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPW-[Peg₂₄]-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY19406);
Ac-(SEQ ID NO: 9)-EPWGGSGGS-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY19407);
A-(SEQ ID NO: 10)-A (обозначается здесь как BCY15469);
Ac-(SEQ ID NO: 10) (обозначается здесь как BCY15892);
A-(SEQ ID NO: 11)-A (обозначается здесь как BCY15470);
Ac-(SEQ ID NO: 11) (обозначается здесь как BCY15893);
A-(SEQ ID NO: 12)-A (обозначается здесь как BCY15471);
Ac-(SEQ ID NO: 12) (обозначается здесь как BCY15894);
Ac-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY17991);
Ac-(SEQ ID NO: 13)-EPW (обозначается здесь как BCY17995);
Ac-NWN-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY17993);
NWN-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY18033);
A-(SEQ ID NO: 13)-A (обозначается здесь как BCY16754);
Ac-(SEQ ID NO: 13)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17896);
Ac-NWN-(SEQ ID NO: 13)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17899);
Ac-(SEQ ID NO: 13)-EPW-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17901);
Ac-(SEQ ID NO: 14) (обозначается здесь как BCY17990);
Ac-(SEQ ID NO: 14)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17875);
[AzPro]-(SEQ ID NO: 14) (обозначается здесь как BCY17876);
Ac-(SEQ ID NO: 15) (обозначается здесь как BCY17989);
A-(SEQ ID NO: 15)-A (обозначается здесь как BCY16047);

Ac-(SEQ ID NO: 15)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17877);
[AzPro]-(SEQ ID NO: 15) (обозначается здесь как BCY17878);
A-(SEQ ID NO: 16)-A (обозначается здесь как BCY16962);
TYMN-(SEQ ID NO: 17)-A (обозначается здесь как BCY17117);
A-(SEQ ID NO: 17)-A (обозначается здесь как BCY16048);
A-(SEQ ID NO: 18)-A (обозначается здесь как BCY16963);
Ac-(SEQ ID NO: 19) (обозначается здесь как BCY17987);
A-(SEQ ID NO: 20)-A (обозначается здесь как BCY16753);
A-(SEQ ID NO: 21)-A (обозначается здесь как BCY16046);
A-(SEQ ID NO: 22)-A (обозначается здесь как BCY16964);
A-(SEQ ID NO: 23)-A (обозначается здесь как BCY16965);
Ac-(SEQ ID NO: 24) (обозначается здесь как BCY17986);
A-(SEQ ID NO: 25)-A (обозначается здесь как BCY16550);
A-(SEQ ID NO: 26)-A (обозначается здесь как BCY16966);
A-(SEQ ID NO: 27)-A (обозначается здесь как BCY16051);
IDSN-(SEQ ID NO: 28)-A (обозначается здесь как BCY17118);
WGKS-(SEQ ID NO: 29)-A (обозначается здесь как BCY17116);
A-(SEQ ID NO: 30)-A (обозначается здесь как BCY16053);
A-(SEQ ID NO: 31)-A (обозначается здесь как BCY16557);
A-(SEQ ID NO: 32)-A (обозначается здесь как BCY16035);
A-(SEQ ID NO: 33)-A (обозначается здесь как BCY16043);
A-(SEQ ID NO: 34)-A-[Sar₆]-[K-FI] (обозначается здесь как BCY15769);
A-(SEQ ID NO: 35)-A (обозначается здесь как BCY15648);
A-(SEQ ID NO: 36)-A (обозначается здесь как BCY16031);
A-(SEQ ID NO: 37)-A (обозначается здесь как BCY16079);
A-(SEQ ID NO: 38)-A (обозначается здесь как BCY16036);
A-(SEQ ID NO: 39)-A (обозначается здесь как BCY16029);
A-(SEQ ID NO: 40)-A (обозначается здесь как BCY16089);
A-(SEQ ID NO: 41)-A (обозначается здесь как BCY16088);
A-(SEQ ID NO: 42)-A (обозначается здесь как BCY16052);
A-(SEQ ID NO: 43)-A (обозначается здесь как BCY16033);
A-(SEQ ID NO: 44)-A (обозначается здесь как BCY16039);
Ac-(SEQ ID NO: 44) (обозначается здесь как BCY17988);
Ac-(SEQ ID NO: 44)-[K(N₃)] (обозначается здесь как BCY17879);
[AzPro]-(SEQ ID NO: 44) (обозначается здесь как BCY17880);
A-(SEQ ID NO: 45)-A (обозначается здесь как BCY16038);
A-(SEQ ID NO: 46)-A (обозначается здесь как BCY16050);
A-(SEQ ID NO: 47)-A (обозначается здесь как BCY16034);
A-(SEQ ID NO: 48)-A (обозначается здесь как BCY16032);
A-(SEQ ID NO: 49)-A (обозначается здесь как BCY16049);

A-(SEQ ID NO: 50)-A (обозначается здесь как BCY16558);
 A-(SEQ ID NO: 51)-A (обозначается здесь как BCY16041);
 A-(SEQ ID NO: 52)-A (обозначается здесь как BCY16042);
 A-(SEQ ID NO: 53)-A (обозначается здесь как BCY16045);
 A-(SEQ ID NO: 54)-A (обозначается здесь как BCY16037);
 A-(SEQ ID NO: 55)-A (обозначается здесь как BCY16044);
 A-(SEQ ID NO: 56)-A (обозначается здесь как BCY16040);
 A-(SEQ ID NO: 57)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15771);
 A-(SEQ ID NO: 58)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15772);
 A-(SEQ ID NO: 59)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15773);
 A-(SEQ ID NO: 60)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15774);
 A-(SEQ ID NO: 61)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15775);
 A-(SEQ ID NO: 62)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15776);
 A-(SEQ ID NO: 63)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15777);
 A-(SEQ ID NO: 64)-A-[Sar₆]-[K-F1] (обозначается здесь как BCY15770);
 Ac-(SEQ ID NO: 65) (обозначается здесь как BCY17903);
 Ac-(SEQ ID NO: 66) (обозначается здесь как BCY17904); и
 Ac-(SEQ ID NO: 67) (обозначается здесь как BCY17905);

где AzPro представляет собой азидопропил, Aze представляет собой азетидин, 1Nal представляет собой 1-нафтилаланин, NMeTrp представляет собой N-метилтриптофан, [K(N₃)] представляет собой 6-азидолизин, Peg представляет собой полиэтиленгликоль, Pip представляет собой пипеколиновую кислоту, Sar представляет собой саркозин, F1 представляет собой флуоресцеин, и [K(N₃)(PYA-малеимид)] представляет собой модифицированный лизин, имеющий следующую структуру:



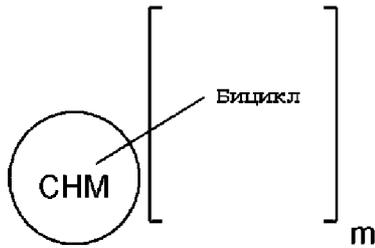
или где молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), и пептидный лиганд содержит N- и/или C-концевые добавления и представляет собой:

Ac-(SEQ ID NO: 13) (обозначается здесь как BCY20546).

13. Пептидный лиганд по любому из пп.1-12, где фармацевтически приемлемая соль выбрана из свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция или аммония.

14. Мультимерный связывающий комплекс, содержащий по меньшей мере два пептидных лиганда по любому из пп.1-13.

15. Мультимерный связывающий комплекс по п.14, который содержит соединение формулы (I):

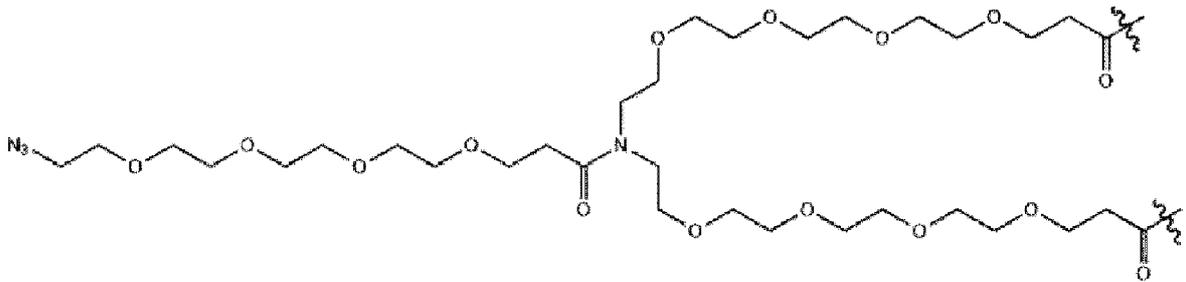


(1)

где СНМ представляет собой центральный петлевой фрагмент,
бицикл представляет собой бициклический пептидный лиганд по любому из пп.1-13; и

m представляет собой целое число, выбранное из диапазона от 2 до 10, например 2, 3 или 4.

16. Мультимерный связывающий комплекс по п.15, где m представляет собой 2, и СНМ представляет собой мотив формулы (А):



(А),

например ВСУ19409.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая пептидный лиганд по любому из пп.1-13 или мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.14-16 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

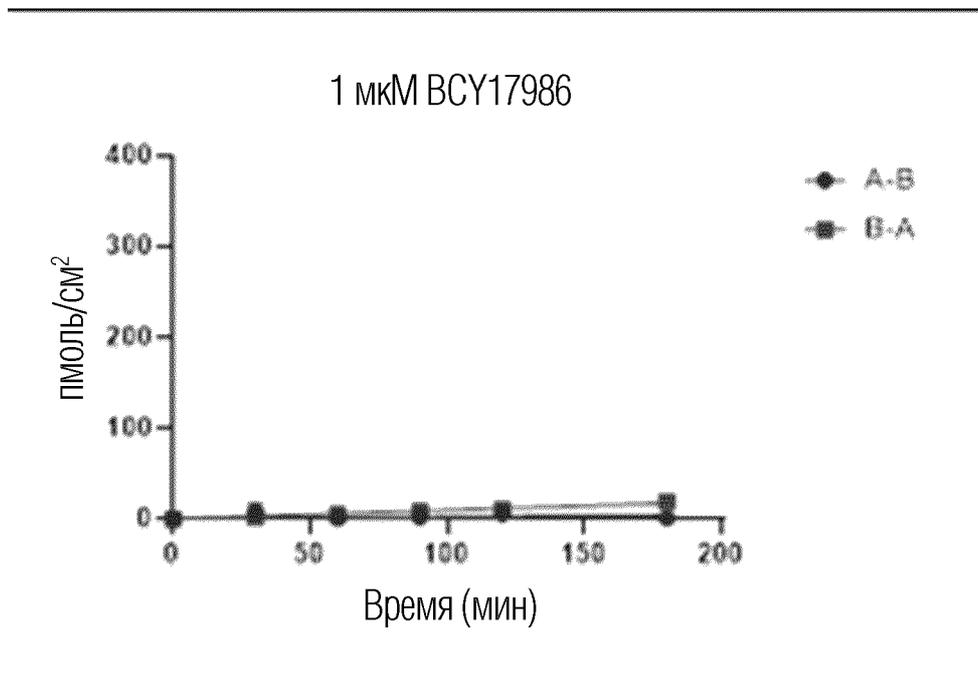
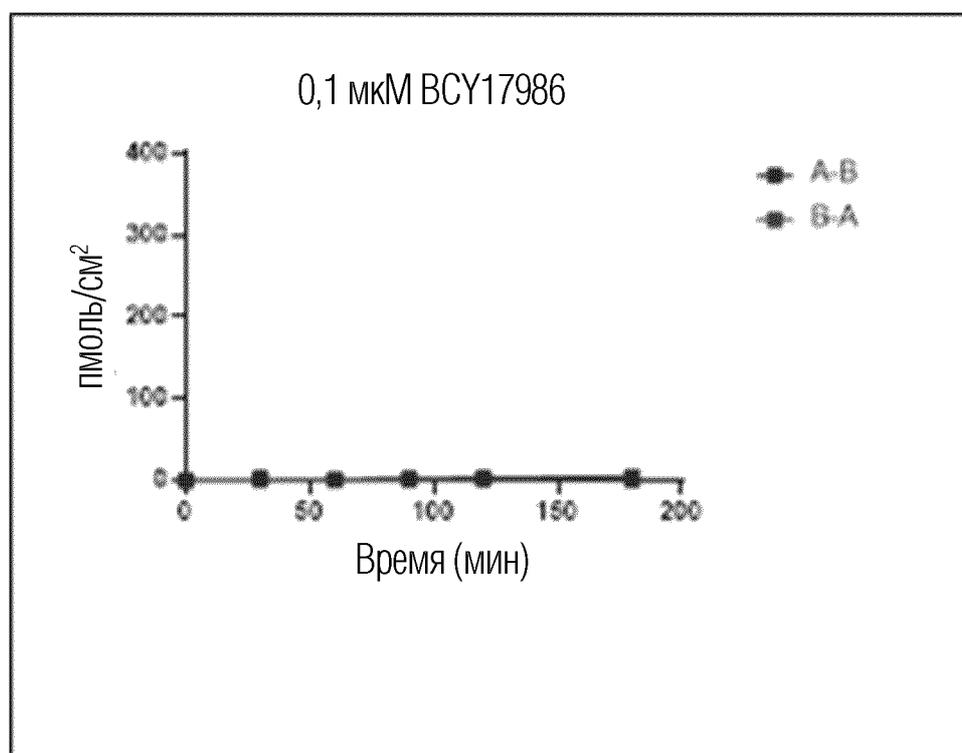
18. Пептидный лиганд по любому из пп.1-13, или мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.14-16, или фармацевтическая композиция по п.17 для применения в профилактике, подавлении или лечении заболевания или расстройства посредством TfR1-опосредованной доставки терапевтического средства.

19. Комплекс для доставки в ткани, который содержит пептидный лиганд по любому из пп.1-13 или мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.14-16, связанный с TfR1 в сочетании с полезной нагрузкой, такой как олигонуклеотид, в частности, миРНК.

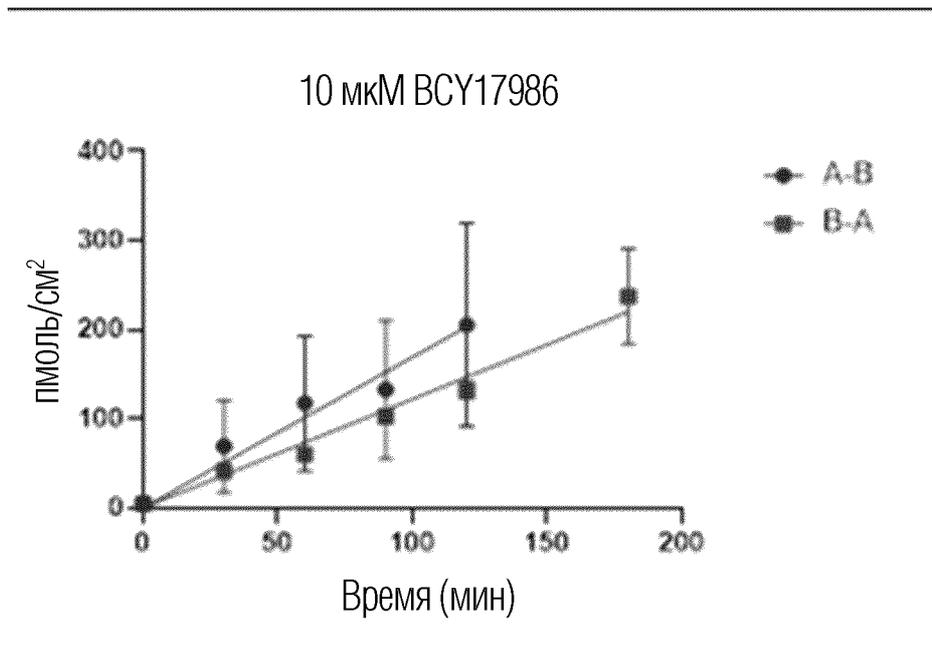
20. Комплекс для доставки в ткани по п.19, который представляет собой комплекс для доставки в мышечную ткань.

21. Комплекс для доставки в ткани по п.19 или 20 для применения в лечении заболевания опорно-двигательного аппарата.

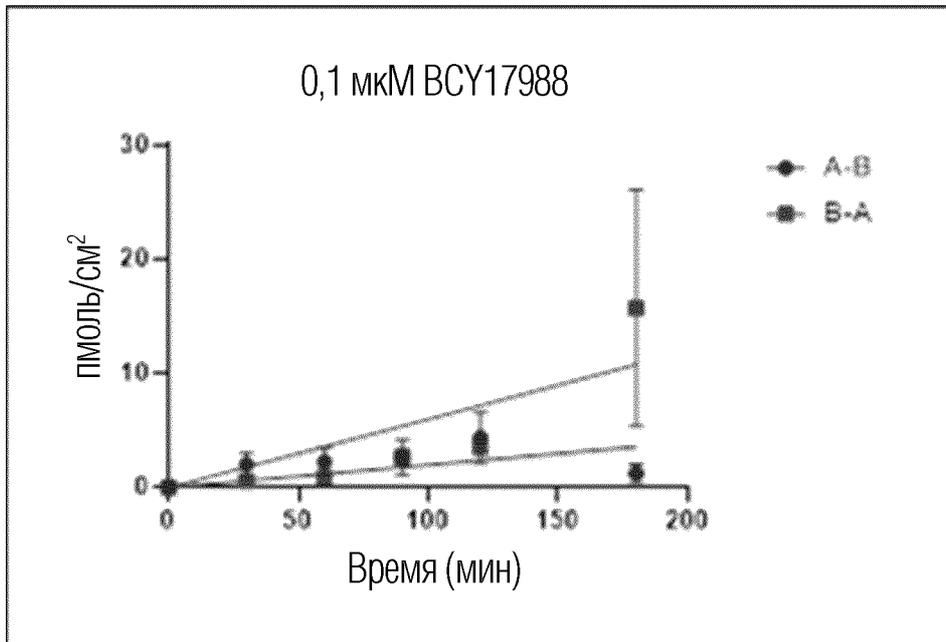
1/6



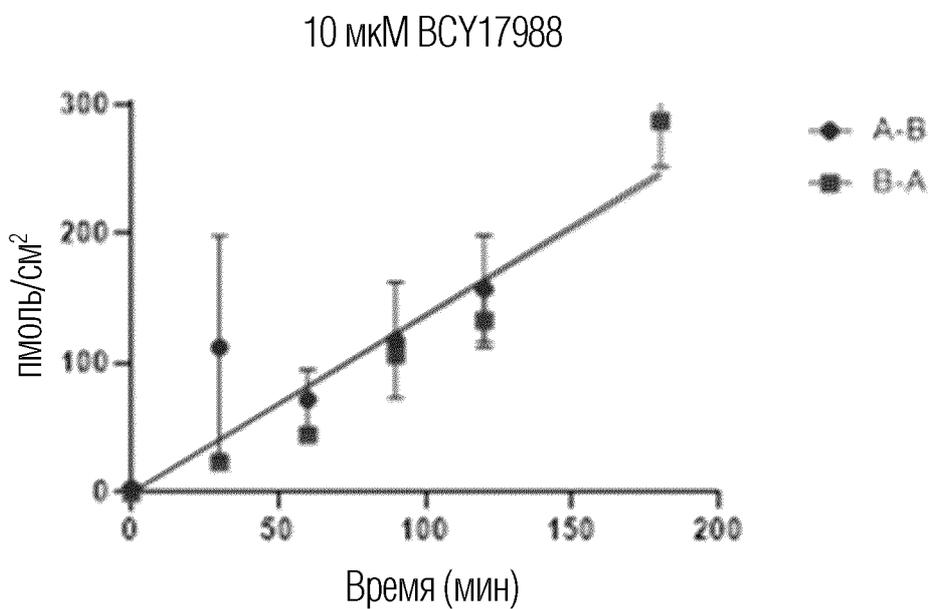
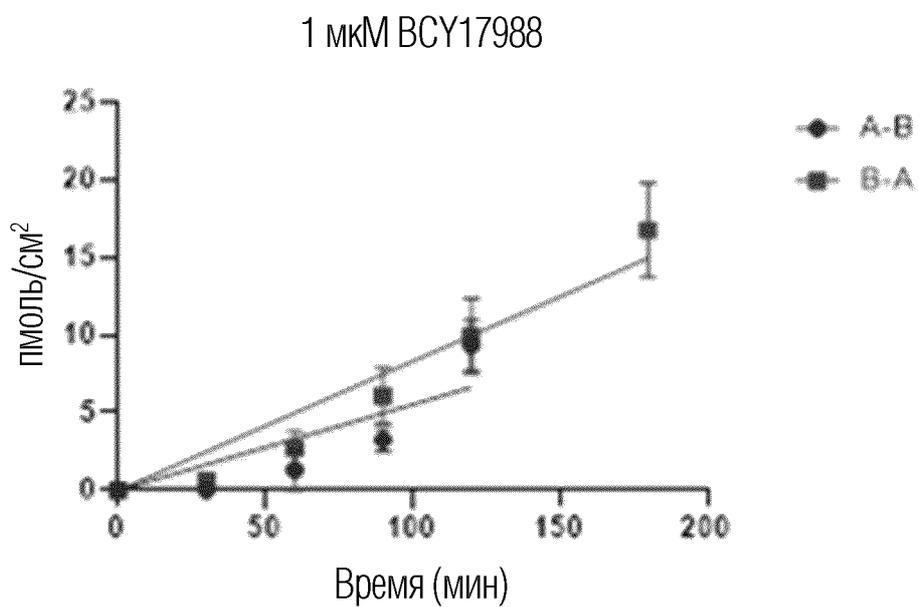
ФИГ. 1



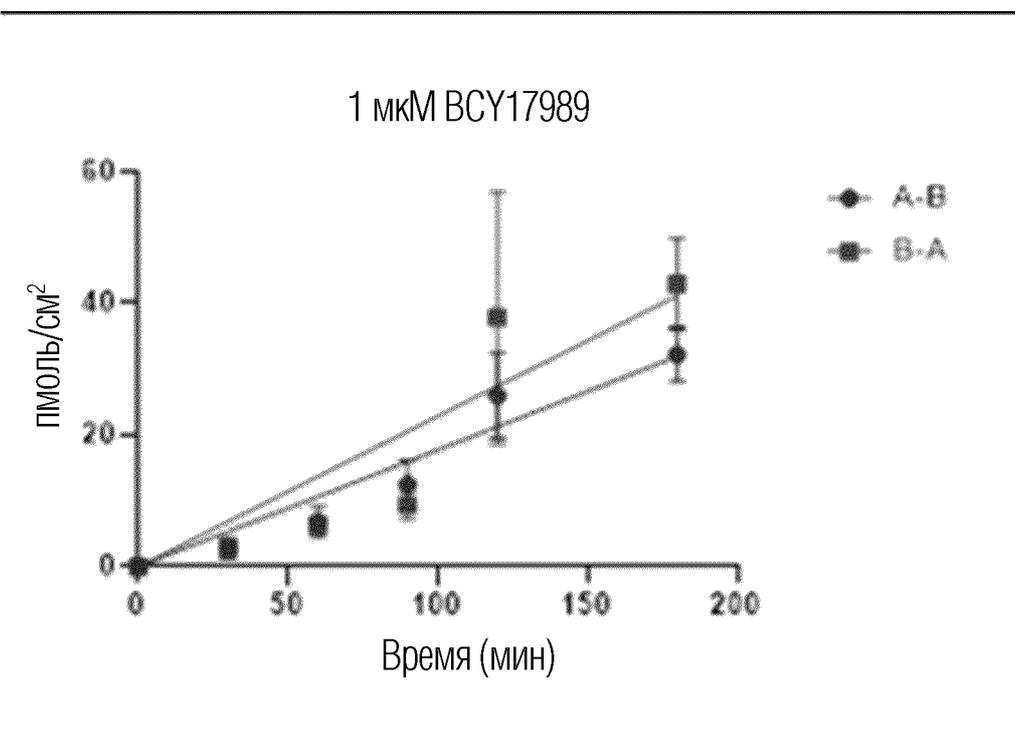
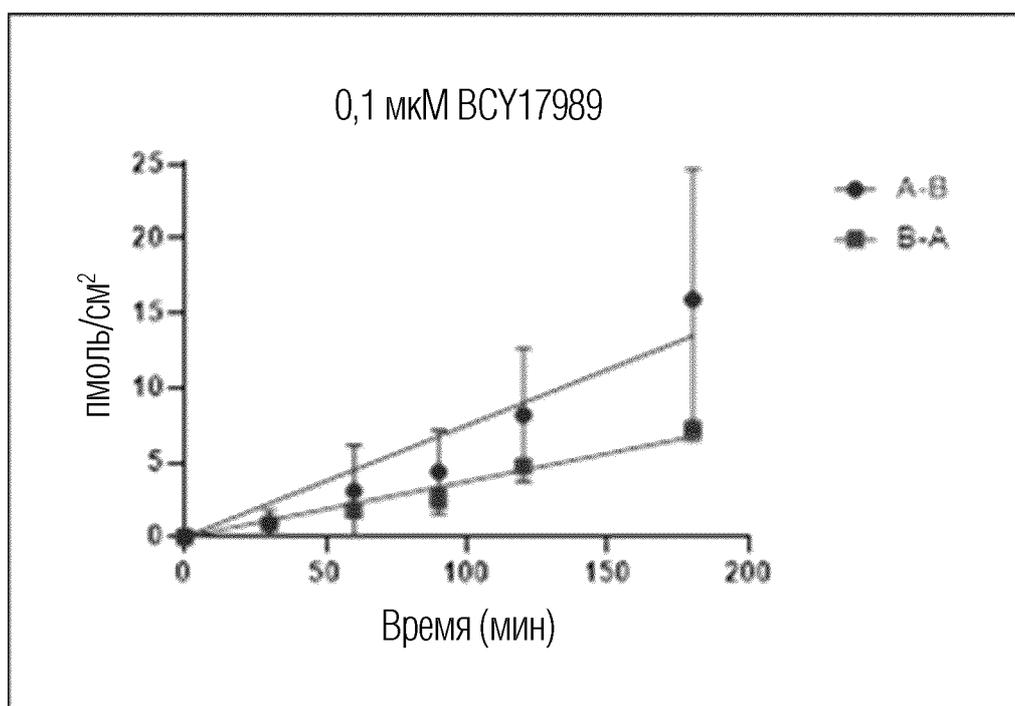
ФИГ. 1 (продолжение)



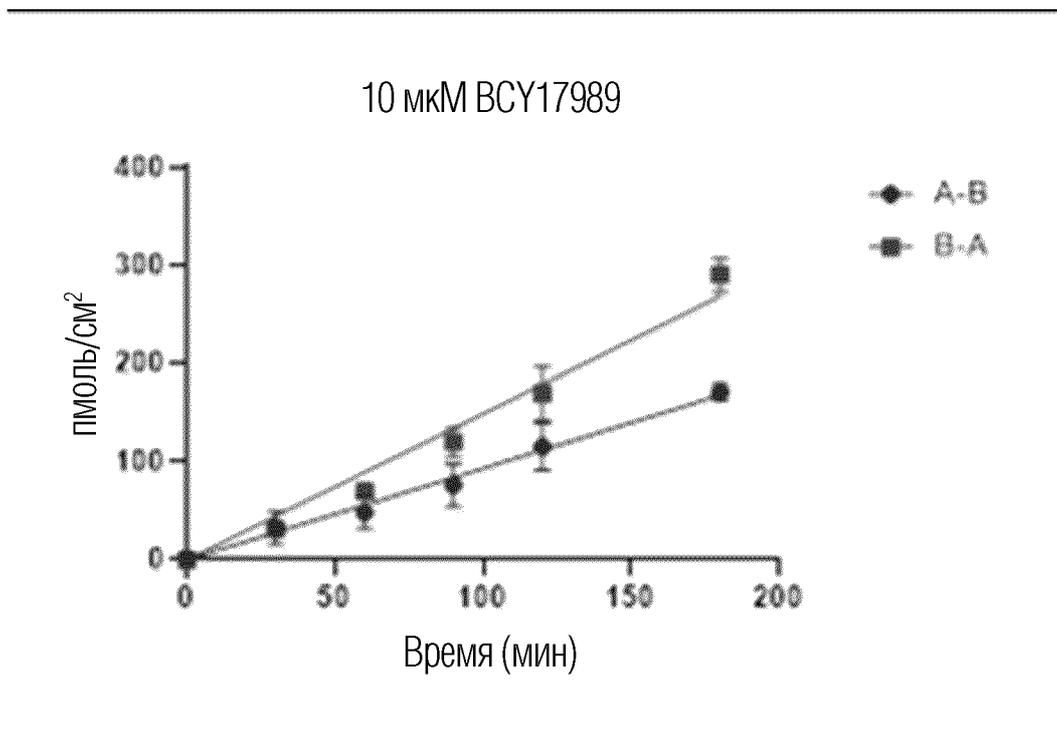
ФИГ. 2



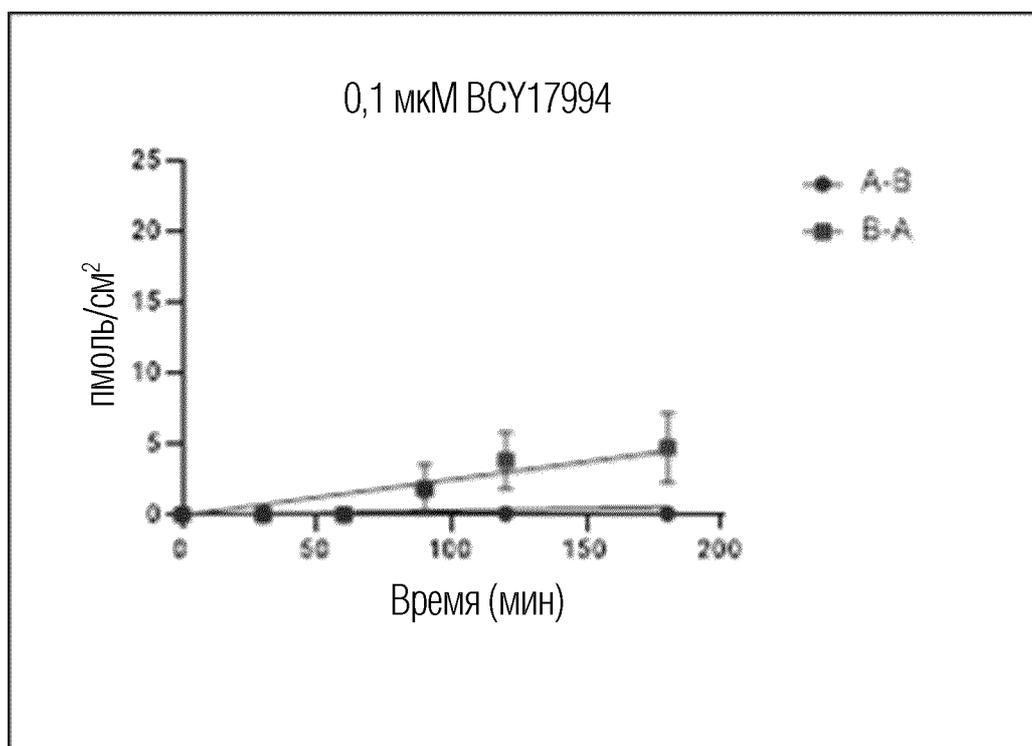
ФИГ. 2 (продолжение)



ФИГ. 3

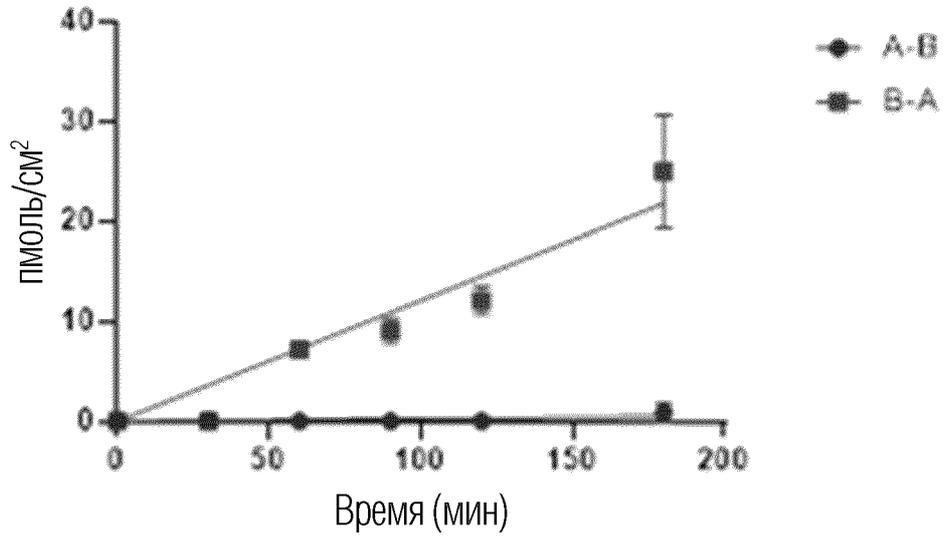


ФИГ. 3 (продолжение)

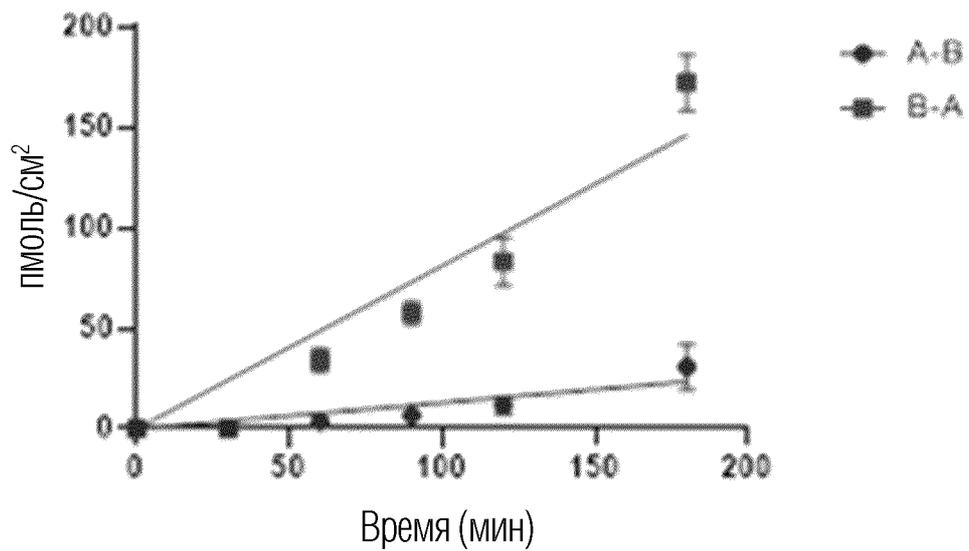


ФИГ. 4

1 мкМ ВСУ17994



10 мкМ ВСУ17994



ФИГ. 4 (продолжение)