

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038314**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.09

(21) Номер заявки
201890045

(22) Дата подачи заявки
2016.06.13

(51) Int. Cl. **A61K 38/17** (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩЕГО

(31) 14/738,551

(32) 2015.06.12

(33) US

(43) 2018.05.31

(86) PCT/IB2016/053483

(87) WO 2016/199112 2016.12.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НАЙМОКС КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Эвербэк Пол (BS)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) WO-A2-03008444
WO-A1-2007098588
EP-A2-1714979

N. SHORE ET AL.: "The potential for NX-1207 in benign prostatic hyperplasia: an update for clinicians", THERAPEUTIC ADVANCES IN CHRONIC DISEASE 2011 SAGE PUBLICATIONS LTDGBR, vol. 2, no. 6, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 377-383, XP055300011, ISSN: 2040-6223, DOI: 10.1177/2040622311423128 the whole document

Herbert Lepor: "Alpha Blockers for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia Key words: Benign prostatic hyperplasia @BULLET Lower urinary tract symptoms @BULLET Quality of life @BULLET Alpha blockers @BULLET Terazosin @BULLET Doxazosin @BULLET Tamsulosin @BULLET Alfuzosin", 1 January 2007 (2007-01-01), XP055300018, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213889/pdf/RIU009004_0181.pdf [retrieved on 2016-09-06] the whole document

(57) Изобретение относится к способу лечения состояния, при котором требуется устранение или разрушение нежелательных клеточных пролифератов, а именно, к лечению доброкачественной гиперплазии предстательной железы у млекопитающего с применением соединений на основе малых пептидов в комбинации с дополнительным активным средством (средствами). Способ включает внутривидовую инъекцию композиции, содержащей пептид аминокислотной последовательности Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu, в терапевтически эффективном количестве и пероральное введение по меньшей мере одного альфа-1-адреноблокатора, выбранного из тамсулозина, terazолина, доксазолина, празозина, альфузолина и силлодозина.

038314 B1

038314 B1

Согласно настоящей заявке заявляется приоритет в соответствии с обычной заявкой на патент США № 14/738551, поданной 12 июня 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки к созданию изобретения

1. Область техники.

В вариантах осуществления включены композиции и способы лечения состояний, при которых требуется устранение или разрушение клеточных элементов, таких как доброкачественные или злокачественные опухоли у человека, путем применения композиций, содержащих соединения на основе малых пептидов, в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным активным средством и фармацевтически приемлемым носителем. В способах предусмотрено без ограничения введение композиции внутримышечно, перорально, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, интрацеребрально (внутрипаренхиматозно), интрацеребровентрикулярно, внутривнутриочагово, интраокулярно, внутриартериально, интратекально, интратуморально, интраназально, местно, трансдермально, подкожно или внутрикожно.

2. Описание предшествующего уровня техники.

Суть многих видов лечения и медицинских процедур заключается в устранении или разрушении вредной или нежелательной ткани. Примеры таких видов лечения включают удаление злокачественных или предраковых новообразований хирургическим путем, разрушение метастатических опухолей посредством химиотерапии и уменьшение железистой (например, предстательной железы) гиперплазии. Другие примеры включают удаление нежелательных волос на лице, удаление бородавок и удаление нежелательной жировой ткани.

Существует необходимость в эффективной композиции, с помощью которой будут разрушать и тем самым либо облегчать устранение, либо подавлять дальнейший рост вредных или нежелательных клеток и ткани, но при этом она будет проявлять главным образом местные эффекты и минимальную системную токсичность или отсутствие таковой.

Некоторые средства, которые, как известно, оказывают такое влияние, раскрыты в публикациях заявки на патент США №№ 2007/0237780 (в настоящее время аннулирована); 2003/0054990 (в настоящее время патент США №7172893); 2003/0096350 (в настоящее время патент США №6924266); 2003/0096756 (в настоящее время патент США №7192929); 2003/0109437 (в настоящее время патент США №7241738); 2003/0166569 (в настоящее время патент США №7317077) и 2005/0032704 (в настоящее время патент США №7408021), раскрытия каждой из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Злокачественная опухоль представляет собой нарушение внутренних регуляторных механизмов клетки, которое приводит к неконтролируемому росту и размножению клетки. Нормальные клетки образуют ткани и в случае, когда эти клетки утрачивают свою способность выступать в качестве определенной, контролируемой и координированной единицы (дедифференцировка), это нарушение приводит к дезорганизации в популяции клеток. Если это происходит, образуется опухоль.

Доброкачественный избыточный рост ткани представляет собой нарушения, при которых требуется удаление клеток из организма. Доброкачественные опухоли являются результатом клеточной пролиферации, которые не метастазируют в организме, однако вызывают симптомы заболевания. Такие опухоли могут быть летальными, если они расположены в недоступных участках в органах, таких как головной мозг. Встречаются доброкачественные опухоли органов, в том числе легких, головного мозга, кожи, гипофиза, щитовидной железы, коркового и мозгового слоя надпочечников, яичников, матки, семенников, соединительной ткани, мышц, кишечника, уха, носа, горла, миндалин, рта, печени, желчного пузыря, поджелудочной железы, предстательной железы, сердца и других органов.

Хирургическое вмешательство часто является первой стадией в лечении рака. Цель хирургического вмешательства варьирует. Иногда его используют для удаления как можно большей части видимой опухоли или по меньшей мере для ее "частичного удаления" (удаления основного(основных) объема(объемов) опухоли с тем, чтобы уменьшилась необходимость в ее лечении другими средствами). В зависимости от типа и расположения злокачественной рака, в результате хирургического вмешательства можно обеспечить некоторое симптоматическое облегчение пациенту. Например, если хирург может удалить большую часть растущей опухоли мозга, то давление внутри черепа будет снижаться, приводя к улучшению симптомов пациента.

Не все опухоли поддаются хирургическому лечению. Некоторые могут располагаться в частях тела, что делает невозможным их полное удаление. Примеры таких будут включать опухоли в стволе мозга (части мозга, которая контролирует дыхание) или опухоль, которая разрослась внутри и около основного кровеносного сосуда. В этих случаях роль хирургического вмешательства является ограниченной вследствие высокого риска, связанного с удалением опухоли.

В некоторых случаях хирургическое вмешательство не используют для частичного удаления опухолевой ткани, поскольку в этом просто нет необходимости. Примером является лимфома Ходжкина, злокачественная опухоль лимфатических узлов, которая хорошо отвечает на комбинации химиотерапии и лучевой терапии. При лимфоме Ходжкина хирургическое вмешательство редко бывает необходимым для достижения излечения, однако почти всегда используется для установления диагноза.

Химиотерапия представляет собой другую распространенную разновидность лечения рака. Фактически она предусматривает применение лекарственных препаратов (обычно вводимых перорально или путем инъекции), которые специфически поражают быстро делящиеся клетки (те, которые встречаются в опухолях) по всему организму. Это делает химиотерапию полезной в лечении видов рака, которые уже метастазировали, а также опухолей, которые обладают высокой вероятностью к распространению за счет кровеносной и лимфатической систем, однако не выявляются за пределами первичной опухоли. Химиотерапию также можно использовать для усиления ответа локализованных опухолей на хирургическое вмешательство и лучевую терапию. Например, это справедливо в случае ряда видов рака головы и шеи.

К сожалению, другие клетки в организме человека, которые также в норме быстро делятся (такие как клетки, выстилающие желудок и волосные фолликулы) также поражаются в результате химиотерапии. По этой причине многие химиотерапевтические средства вызывают нежелательные побочные эффекты, такие как тошнота, рвота, анемия, потеря волос или другие симптомы. Такие побочные эффекты являются временными и существуют лекарственные препараты, которые могут облегчить многие из таких побочных эффектов. По мере расширения знаний исследователи разработали более новые химиотерапевтические средства, которые являются не только более эффективными в уничтожении опухолевых клеток, но и также характеризуются меньшим количеством побочных эффектов для пациента.

Химиотерапевтическое средство вводят пациентам несколькими путями. Некоторые включают пилюли, а другие вводят посредством внутривенной или инъекции другого типа. В случае инъекционного химиотерапевтического препарата пациент прибывает в кабинет врача или больницу для лечения. Для других химиотерапевтических средств требуется непрерывная инфузия в кровяное русло в течение 24 часов. В случае таких типов химиотерапии проводят незначительную хирургическую процедуру с целью имплантации небольшого насоса, который носит пациент. С помощью насоса медленно вводится лекарственный препарат. Во многих случаях порт для постоянного введения помещают в вену пациента для устранения необходимости использования многоразовых игл.

Доброкачественные опухоли и пороки развития также можно лечить с помощью множества способов, в том числе хирургического вмешательства, лучевой терапии, медикаментозной терапии, термической или электрической абляции, криотерапии и т. д. Несмотря на то, что доброкачественные опухоли не метастазируют, они могут достигать больших размеров и рецидивировать. Хирургическая экстирпация доброкачественных опухолей характеризуется обладает всеми сложностями и побочными эффектами хирургического вмешательства в целом и часто ее необходимо выполнять повторно в случае некоторых доброкачественных опухолей, таких как аденомы гипофиза, менингиомы головного мозга, гиперплазия предстательной железы и т. д.

Роль андрогенов в развитии доброкачественной гиперплазии предстательной железы хорошо описана (Wilson, N. Engl. J. Med. 317: 628-629, 1987). В действительности, доброкачественная гиперплазия предстательной железы не развивается в отсутствие семенников (ссылка содержится у Wendel et al., J. Urol. 108: 116-119, 1972).

Блокада секреции андрогенов семенниками в результате хирургической или медикаментозной (агонист LHRH) кастрации, как известно, уменьшает размер предстательной железы (Auclair et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 855-862, 1977; Auclair et al., Endocrinology 101: 1890-1893, 1977; Labrie et al., Int. J. Andrology, suppl. 2 (V. Hansson, ed.), Scriptor Publisher APR, pp. 303-318, 1978; Labrie et al., J. Andrology 1: 209-228, 1980; Tremblay and Belanger, Contraception 30: 483-497, 1984; Tremblay et al., Contraception 30: 585-598, 1984; Dube et al., Acta Endocrinol. (Copenh) 116: 413-417, 1987; Lacoste et al., Mol. Cell. Endocrinol. 56: 141-147, 1988; White, Ann. Surg. 22: 1-80, 1895; Faure et al., Fertil. Steril. 37: 416-424, 1982; Labrie et al., Endocrine Reviews 7: 67-74, 1986; Huggins and Stevens, J. Urol. 43: 705-714, 1940; Wendel et al., J. Urol. 108: 116-119, 1972; Peters and Walsh, N. Engl. J. Med. 317: 599-604, 1987; Gabrilove et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 64: 1331-1333, 1987).

Несколько исследований показали, что лечение антиандрогеном также уменьшает размер предстательной железы (Neri et al., Endocrinology, 82: 311-317, 1968; Neri et al., Investigative Urology, 10: 123-130, 1972; Tunn et al., Acta Endocrinol. (Copenh.) 91: 373-384, 1979; Seguin et al., Mol. Cell. Endocrinol., 21: 37-41, 1981; Lefebvre et al., The Prostate 3: 569-578, 1982; Marchetti and Labrie, J. Steroid Biochem, 29: 691-698, 1988; Lacoste et al., Mol. Cell. Endocrinol. 56: 141-147, 1988; Tunn et al., Invest. Urol. 18: 289-292, 1980; Scott and Wade, J. Urol. 101: 81-85, 1969; Caine et al., J. Urol. 114: 564-568, 1975; Stone et al., J. Urol. 141: 240A, 1989; Clejan et al., J. Urol. 141: 534A, 1989).

В патенте США №3423507 раскрыто применение антиандрогена ципротерона ацетата (1 α ,2 β -метил-6-хлор-17- α -ацетокси-6-дегидропрогестерон) для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Чистые антиандрогены (патент США № 4329364) вызывают повышение секреции тестостерона, которое приводит к более высокой степени его ароматизации в эстрогены, ситуация, которая, как предполагается, исходя из современного уровня знаний, оказывает отрицательные эффекты на гиперплазию предстательной железы (Jacobi et al., Endocrinology 102: 1748-1755, 1978).

В нескольких исследованиях было показано, что лечение комбинацией химической кастрации (агонистом LHRH) и антиандрогеном вызывает более выраженное подавление размера предстательной желе-

зы, чем каждая терапия, используемая в отдельности (Seguin et al., *Mol. Cell. Endocrinol.* 21: 37-41, 1981; Lefebvre et al., *The Prostate* 3: 569-578, 1982; Marchetti and Labrie, *J. Steroid Biochem.* 29:691-698, 1988.

В предстательной железе, как и во многих других тканях, тестостерон необратимо превращается с помощью 5 α -редуктазы в высокоактивный андроген дигидротестостерон (Bruchovsky and Wilson, *J. Biol. Chem.* 243: 2012-2021, 1968; Wilson, *Handbook of Physiology* 5 (section 7), pp. 491-508, 1975). Было показано, что ингибиторы 5 α -редуктазы подавляют рост предстательной железы (Brooks et al., *Endocrinology* 109: 830, 1981; Brooks et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169: 67, 1982; Brooks et al., *Prostate* 3: 35, 1982; Wenderoth et al., *Endocrinology* 113,569-573, 1983; McConnell et al., *J. Urol.* 141: 239A, 1989; Stoner, E., *Lecture on the role of 5.alpha.-reductase inhibitor in benign prostatic hypertrophy*, 84th AUA Annual Meeting, Dallas, May 8, 1989.)

Ингибирующий эффект ингибитора 5 α -редуктазы Merck L 652931 в отношении развития предстательной железы и семенных пузырьков у крыс препубертатного возраста был описано в *Proc. 71st Annual Meeting of Endocr. Soc. abst. #1165*, p. 314, 1989. Ингибирующий эффект МК-906 в отношении образования дигидротестостерона у мужчин был описан Gormley et al., in *Proc. 71st Annual Meeting of Endocr. Soc. abst. #1225*, p. 329, 1989; Imperato-McGinley et al., in *Proc. 71st Annual Meeting of Endocr. Soc. abst. #1639*, p. 432, 1989; Geller and Franson, in *Proc. 71st Annual Meeting of Endocr. Soc. abst. #1640*, p. 432, 1989 and Tenover et al., in *Proc. 71st Annual Meeting of Endocr. Soc. abst. #583*, p. 169, 1989. Активность ингибиторов 5 α -редуктазы N,N-диэтил-4-метил-3-оксо-4-аза-5.альфа.-андростан-17.бета.-карбоксамид (4-МА) и 6-метилен-4-прегнен-3,20-диола (LY 207320) была описана в Toomey et al., *Proc. 71st Annual Meeting of Endocr. Soc. abst. #1226*, p. 329, 1989.

Помимо хорошо известного влияния андрогенов на рост предстательной железы, существует много исследований, в которых показано, что эстрогены также играют роль в пролиферации предстательной железы (Walsh and Wilson, *J. Clin. Invest.* 57: 1093-1097, 1976; Robinette et al., *Invest. Urol.* 15: 425-432, 1978; Moore et al., *J. Clin. Invest.* 63: 351-257, 1979). Более того, было показано, что эстрогены усиливают индуцируемый андрогенами рост предстательной железы у собаки (Walsh and Wilson, *J. Clin. Invest.* 57: 1093-1097, 1976; Jacobi et al., *Endocrinology* 102: 1748-1755, 1978; Tunn et al., *Urol. Int.* 35: 125-140, 1980). Возможным объяснением такого усиливающего эффекта эстрогена в отношении индуцируемого андрогенами роста предстательной железы является наблюдение того, что 17 β -эстрадиол, как было показано, повышает связывание андрогенов в предстательной железе собаки (Moore et al., *J. Clin. Invest.* 63: 351-357, 1979).

Было показано, что антиэстроген тамоксифен нормализует индуцируемую стероидами доброкачественную гиперплазию предстательной железы у собаки (Funke et al., *Acta Endocrinol.* 100: 462-472, 1982). Введение антиэстрогена тамоксифена в сочетании со стероидным антиандрогеном ципротероном ацетатом у пациентов, страдающих доброкачественной гиперплазией предстательной железы, оказывало благоприятные эффекты в отношении симптомов заболевания (Di Silverio et al., в *Ipertrfia Prostatica Benigna* (F. Di Silverio, F. Neumann and M. Tannenbaum, eds), *Excerpta Medica*, pp. 117-125, 1986). В патенте США № 4310523 представлено, что комбинация антиандрогена и антиэстрогена является эффективной для профилактики и/или терапии доброкачественной гиперплазии предстательной железы. В то же время тамоксифен характеризуется внутренней эстрогенной активностью, что ограничивает его эффективность.

Образование эстрогена в результате ароматизации андрогенов происходит в нескольких местах. У мужчин ароматизация андрогенов была показана в семеннике, жировой и мышечной ткани, коже, печени, головном мозге и предстательной железе (Schweikert et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40: 413-417, 1975; Folker and James, *J. Steroid Biochem.* 49: 687-690, 1983; Longcope et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46: 146-152, 1978; Lacoste and Labrie, unpublished data; Stone et al., *The Prostate* 9: 311-318, 1986; Stone et al., *Urol. Res.* 15: 165-167, 1987). Существуют данные о повышенной выработке эстрогенов в ткани предстательной железы пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (Stone et al., *The Prostate* 9: 311-318, 1986). Такие данные указывают на то, что местное образование эстрогенов может играть решающую роль в стимуляции роста предстательной железы при избытке активности, прогнозируемой по циркулирующим эстрогенам.

В патенте США №4472382 раскрыто лечение ВРН антиандрогеном и определенными пептидами, которые выступают в роли агонистов LH-RH. В патенте США № 4596797 раскрыты ингибиторы ароматазы в качестве способа профилактики и/или лечения гиперплазии предстательной железы. В патенте США № 4760053 описано лечение определенных видов рака, в котором сочетают агонист LHRH с антиандрогеном, и/или антиэстрогеном, и/или по меньшей мере одним ингибитором биосинтеза половых стероидных гормонов. В патенте США № 4775660 раскрыт способ лечения рака молочной железы с помощью комбинированной терапии, которая может включать хирургическое или химическое предупреждение секреции яичниками и введение антиандрогена и антиэстрогена.

В патенте США №4659695 раскрыт способ лечения рака предстательной железы у восприимчивых самцов животных, в том числе у человека, у которых секреция гормонов семенниками блокирована хирургическими или химическими средствами, например с помощью использования агониста LHRH, который предусматривает введение антиандрогена, например флутамида, в сочетании по меньшей мере с од-

ним ингибитором биосинтеза половых стероидных гормонов, например аминоклутетимидом и/или кетоконазолом. Раскрытия каждого из вышеупомянутых патентов (США 4472382, 4596797, 4760053, 4775660 и 4659695) включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ВРН вызвана повышенной активностью как андрогенов, так и эстрогенов. В связи с такой двойственной этиологией ВРН предложенные виды гормональной терапии были менее чем удовлетворительными, также все они были непрогнозируемыми, вызывая при этом часто недопустимые побочные эффекты. Кроме того, лечение согласно предшествующему уровню техники редко приводило к уменьшению размера предстательной железы на более чем приблизительно 20-30% при несогласованных результатах в отношении совокупности симптомов (Scott and Wade, J. Urol. 101: 81-85, 1969; Caine et al., J. Urol. 114: 564-568, 1975; Peters and Walsh, New Engl. J. Med. 317: 599-604, 1987; Gabrilove et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 64: 1331-1333, 1987; Stone et al., J. Urol. 141: 240A, 1989; Clejan et al., J. Urol. 141: 534A, 1989; Stoner, E., Lecture on the role of 5 α -reductase inhibitor in benign prostatic hypertrophy, 84th AUA Annual Meeting, Dallas, May 8, 1989.

Результатом раскрытия механизма, вкратце изложенного выше, является недавняя разработка эффективных средств для контроля и во многих случаях обращения запущенной формы ВРН. Среди этих средств препаратом первой линии является продукт компании Merck & Co., Inc.s PROSCAR® (финастегид). Эффект данного соединения заключается в подавлении фермента тестостерон-5 α -редуктазы, который превращает тестостерон в 5 α -дигидротестостерон, приводя к сниженной скорости увеличения предстательной железы и часто к уменьшению массы предстательной железы.

Разработка таких средств, как PROSCAR®, является благоприятной в плане долговременного контроля ВРН. Однако, исходя из длительного развития синдрома, можно понять, что его обращение также не является немедленным. Между тем, мужчины, страдающие ВРН, продолжают испытывать боль и могут в действительности утрачивать надежду на то, что эти средства работают достаточно быстро.

Для решения этой проблемы одним из решений проблемы является поиск фармацевтически активных соединений, которые дополняют лекарственные препараты более медленного действия, обеспечивая быстрое облегчение. Средства, которые вызывают расслабление ткани нижних мочевыводящих путей за счет связывания с альфа-1-адренергическими рецепторами, снижая таким образом повышенный из-за заболевания адренергический тонус, будут подходящими кандидатами для такого рода активности. Таким образом, одним таким средством является альфузозин, который, как сообщается в EP 0204597, вызывает нормальное мочеиспускание в случаях гиперплазии предстательной железы. Аналогично этому в WO 92/00073 сообщалось об избирательной способности R(+)-энантиомера теразозина связываться с адренергическими рецепторами альфа 1-подтипа. Кроме того, в WO 92/16213 раскрыты комбинации S- α -редуктазы и блокаторов альфа-1-адренергических рецепторов (теразозина, доксазозина, празозина, буназозина, индорамина, альфузозина). Однако отсутствовала информация о специфичности альфа-1d-, альфа-1b- или альфа-1a-подтипа этих соединений, поскольку эта информация и ее отношение к лечению ВРН была неизвестна. В современной терапии ВРН используют существующие неселективные альфа-1-антагонисты, такие как празозин (Minipress, Pfizer), теразозин (Hytrin, Abbott) или доксазозина мезилат (Cardura, Pfizer). Эти неселективные антагонисты характеризуются побочными эффектами, связанными с антагонизмом альфа-1d- и альфа-1b-рецепторов в периферическом сосудистом русле, например гипотензией и обмороком.

Клонирование альфа-1a адренергического рецептора человека (ATCC CRL 11140) и использование скринингового анализа, в котором задействован клонированный альфа-1a-рецептор человека, способствует выявлению соединений, которые специфически взаимодействуют с альфа-1a адренергическим рецептором человека. Публикация международных заявок PCT WO94/08040, опубликованной 14 апреля 1994 года, и WO94/10989, опубликованной 26 мая 1994 года]

В WO96/14846, опубликованной 23 мая 1996 года, раскрыто большое семейство дигидропиримидиновых соединений и предложено их использование в качестве селективных антагонистов альфа-1a-рецепторов человека. Соединения анализировали с использованием клонированных альфа-адренергических рецепторов человека, и, как было раскрыто, определенные соединения, анализируемые таким образом, являются селективными альфа-1a-антагонистами.

Встречаются другие состояния, в которые вовлечены нежелательные клеточные элементы, при которых требуется избирательное удаление клеток. Например, заболевания сердца и инсульты часто вызываются атеросклерозом, который представляет собой пролиферативное поражение фиброзно-жировых и измененных гладкомышечных элементов, которые деформируют стенку кровеносных сосудов, сужают просвет, ограничивают кровоток, создают условия для образования очаговых тромбов и в конце концов приводят к закупорке и инфаркту. Существуют различные виды лечения атеросклероза, такие как обходные сосудистые шунты; искусственные трансплантаты; ангиопластика с восстановлением просвета, кюртаж, радиационное, лазерное или иное удаление; фармакотерапия с подавлением атеросклероза посредством снижения уровня липидов; применение антикоагулянтов и общие мероприятия, связанные с диетой, физической нагрузкой и образом жизни. Требуется способ устранения атеросклеротических повреждений без риска и побочных эффектов хирургических процедур.

Другие примеры нежелательных клеточных элементов, где требуется избирательное удаление клеток, включают индуцированные вирусами новообразования, такие как бородавки. Другим примером являются гипертрофические воспалительные массы, встречающиеся при воспалительных состояниях, и гипертрофические шрамы или келоиды. Также другие примеры встречаются в контекстах косметологии, таких как удаление нежелательных волос, например волос на лице, или уменьшение площади нежелательных участков ткани в косметических целях, таких как дерма и соединительные ткани лица, или в дерме и соединительных тканях конечностей.

Другие примеры нежелательных клеточных элементов, где требуется избирательное удаление клеток или подавление клеточной пролиферации, включают стеноз и рестеноз любой артерии, клапана или канала в кровеносной системе, в том числе без ограничения клапанов (например, стеноз аорты, который включает сужение отверстия клапана аорты), коронарных артерий (например, стеноз устья коронарной артерии, который включает сужение устья коронарных артерий), сонных артерий и почечных артерий. Другой пример включает подавление или устранение нежелательного роста или скопления клеток, вызывающего частичную или полную закупорку медицинских устройств, таких как стенты, расположенные или имплантированные в кровеносном сосуде, для лечения стеноза, стриктур или аневризм в них, или в мочевыводящих путях и в желчных протоках.

Также другие примеры будут очевидны специалистам в данной области. Во всех или в большинстве этих примеров существует необходимость в видах лечения, при которых можно удалять или разрушать нежелательные клеточные элементы без рисков и побочных эффектов, присущих традиционным видам терапии, или удалять нежелательные клеточные элементы с большей точностью.

Во всем настоящем описании, в том числе вышеизложенном описании предшествующего уровня техники, любой и все общедоступные документы, описанные в данном документе, в том числе любой и все патенты и опубликованные заявки на патент США, особым образом включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вышеизложенное описание предшествующего уровня техники не предполагает никоим образом признания любого из документов, описанных в данном документе, в том числе заявок на патент США, находящихся на рассмотрении, предшествующим уровнем в отношении настоящего раскрытия. Более того, описание в данном документе любых преимуществ, связанных с описанными продуктами, способами и/или оборудованием, не предполагает ограничения вариантов осуществления. Фактически аспекты вариантов осуществления могут включать определенные характеристики описанных продуктов, способов и/или оборудования без ущерба от их описанных недостатков.

Краткое раскрытие вариантов осуществления

В данной области сохраняется необходимость в новых, менее токсичных видах лечения нежелательных клеточных элементов. Варианты осуществления удовлетворяют эти потребности.

Настоящее раскрытие отчасти основано на обнаружении того, что определенные NTP-пептиды, в том числе конкретный пептид, описанный аминокислотной последовательностью Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu, способны обеспечивать лечение и/или уничтожение нежелательных клеточных пролифератов у млекопитающих в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным активным средством, которое способно обеспечивать лечение симптомов, уменьшение, блокирование, подавление, лечение и/или уничтожение нежелательных клеточных пролифератов у млекопитающих. Эти нежелательные клеточные пролифераты включают, в числе прочих, доброкачественные и злокачественные опухоли, железистую (например, предстательной железы) гиперплазию, нежелательный рост волос на лице, бородавки и нежелательную жировую ткань.

Настоящее раскрытие также отчасти основано на обнаружении того, что определенные NTP-пептиды, в том числе конкретный пептид, описанный аминокислотной последовательностью Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu, либо в отдельности, либо в комбинации способны обеспечивать лечение симптомов, уменьшение, блокирование, подавление, лечение и/или уничтожение нежелательных клеточных пролифератов у млекопитающих, обеспечивать предполагаемое улучшение у пациентов, которые в дальнейшем подвергаются хирургическому лечению.

Некоторые варианты осуществления направлены на композиции и способы лечения нежелательных пролифератов (доброкачественных и злокачественных опухолей, железистой (например, предстательной железы) гиперплазии, нежелательных волос на лице, бородавок и нежелательной жировой ткани), предусматривающие введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества композиции, содержащей NTP-пептид, в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным активным средством, которое способно обеспечивать лечение и/или уничтожение клеточных пролифератов у млекопитающих.

Композиции можно вводить внутримышечно, перорально, внутривенно, внутривнутрино, интрацеребрально (внутрипаренхиматозно), интрацеребровентрикулярно, интратуморально, внутриочагово, внутрикожно, интратекально, интраназально, интраокулярно, внутриартериально, местно, трансдермальное, с помощью аэрозоля, инфузии, болюсной инъекции, имплантируемого устройства, системы с замедленным высвобождением и т. д. Альтернативно NTP-пептиды можно экспрессировать *in vivo* путем введения гена, который экспрессирует NTP-пептиды, путем введения вакцины, которая индуцирует такую

продукцию, или путем введения клеток, бактерий или вирусов, которые экспрессируют пептид *in vivo* в результате генетической модификации или иным образом. В этом альтернативном варианте осуществления и в вариантах осуществления, описанных ранее, дополнительное активное средство можно вводить совместно с NTP-пептидом или средством, которое экспрессирует NTP-пептид *in vivo*, или отдельно от них.

Некоторые варианты осуществления предусматривают способы лечения нежелательных пролифератов (доброкачественных и злокачественных опухолей, железистой (например, предстательной железы) гиперплазии, нежелательных волос на лице, бородавок и нежелательной жировой ткани), предусматривающие введение нуждающемуся в этом млекопитающему, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей NTP-пептид, в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным активным средством, которое способно обеспечивать лечение и/или уничтожение клеточных пролифератов у млекопитающих, с последующим хирургическим лечением нежелательных клеточных пролифератов.

Как вышеизложенное общее описание, так и следующее подробное описание, являются иллюстративными и пояснительными, и они предусмотрены обеспечить дополнительное объяснение заявляемых вариантов осуществления. Другие цели, преимущества и характеристики будут очевидны специалистам в данной области, исходя из следующего подробного описания вариантов осуществления.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Перед тем, как будут описаны белки, нуклеотиды, нуклеотидные последовательности, пептиды, композиции, активные средства и т. д. и способы по настоящему изобретению, необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретной описанной методикой, протоколами, клеточными линиями, векторами и реагентами, поскольку они могут варьироваться. Также необходимо понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена лишь в описательных целях конкретных вариантов осуществления, и она не предполагает ограничивать объем вариантов осуществления настоящего изобретения, который будет ограничиваться лишь прилагаемой формулой изобретения.

Термины и фразы, используемые в данном документе, определяют, как изложено ниже, если не указано иное. Во всем настоящем описании формы существительного в единственном числе включают ссылку на формы множественного числа, если в контексте четко не определено иное. Так, например, ссылка на "клетку-хозяина" включает множество таких клеток-хозяев, а ссылка на "антитело" включает ссылку на одно или более антител или их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д.

Аминокислоты и аминокислотные остатки, описанные в данном документе, могут называться в соответствии с принятым одно- или трехбуквенным кодом, представленным в таблице ниже.

Таблица 1

Трехбуквенная аминокислота	Однобуквенный символ	Символ
Аланин	A	Ala
Аргинин	R	Arg
Аспарагин	N	Asn
Аспарагиновая кислота	D	Asp
Цистеин	C	Cys
Глутамин	Q	Gln
Глутаминовая кислота	E	Glu
Глицин	G	Gly
Гистидин	H	His
Изолейцин	I	Ile
Лейцин	L	Leu
Лизин	K	Lys
Метионин	M	Met
Фенилаланин	F	Phe
Пролин	P	Pro
Серин	S	Ser
Треонин	T	Thr
Триптофан	W	Trp
Тирозин	Y	Tyr
Валин	V	Val

Выражение "NTP-пептид" относится к пептидам, содержащим аминокислотные последовательности, соответствующие по меньшей мере части аминокислотной последовательности нитевидных белков нейронов или фрагментам нитевидных белков нейронов, и включает гомологи, производные, варианты, слитые белки и пептидомиметики таких пептидов, если в контексте не указано иное. Выражение "NTP-пептид" также относится к пептидной или другой композиции, заявляемой в одной или более из следующих публикаций заявок на патент США №№2007/0237780 (в настоящее время аннулирована); 2003/0054990 (в настоящее время патент США №7172893); 2003/0096350 (в настоящее время патент США № 6924266); 2003/0096756 (в настоящее время патент США №7192929); 2003/0109437 (в настоящее время патент США №7241738); 2003/0166569 (в настоящее время патент США №7317077) и 2005/0032704 (в настоящее время патент США №7408021). Раскрытия каждой из этих заявок включены посредством ссылки во всей своей полноте. Конкретные пептиды приведены ниже.

- 1) SEQ ID NO. 1: MEFSLLLPRLECNGA или Met-Glu-Phe-Ser-Leu-Leu-Leu-Pro-Arg-Leu-Glu-Cys-Asn-Gly-Ala,
- 2) SEQ ID NO. 2: GAISAHNRNLRPLGSS или Gly-Ala-Ile-Ser-Ala-His-Arg-Asn-Leu-Arg-Leu-Pro- Gly-Ser-Ser,
- 3) SEQ ID NO. 3: DSPASASPVAGITGMCT или Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Met-Cys-Thr,
- 4) SEQ ID NO.4: MCTHARLILYFFLVEM или Met-Cys-Thr-His-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-Glu-Met,
- 5) SEQ ID NO.5: YFFLVEMEFLH или Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Glu-Phe-Leu-His,
- 6) SEQ ID NO.6: VGQAGLELPTS или Val-Gly-Gln-Ala-Gly-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-Ser,
- 7) SEQ ID NO.7: DDPSVSASQSARYRTGH или Asp-Asp-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Arg-Tyr-Arg-Thr-Gly-His,
- 8) SEQ ID NO.8: TGHARLCLANFCG или Thr-Gly-His-His-Ala-Arg-Leu-Cys-Leu-Ala-Asn-Phe-Cys-Gly,
- 9) SEQ ID NO.9: ANFCGRNRVSLMCPSWS или Ala-Asn-Phe-Cys-Gly-Arg-Asn-Arg-Val-Ser-Leu-Met-Cys-Pro-Ser-Trp-Ser,
- 10) SEQ ID NO.10: PELKQSTCLSLPKCWDYRR или Pro-Glu-Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 11) SEQ ID NO.11: LKQSTCLSLPKCWDYRR или Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 12) SEQ ID NO.12: STCLSLPKCWDYRR или Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 13) SEQ ID NO.13: LSLPKCWDYRR или Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 14) SEQ ID NO.14: KCWDYRRAAVPGL или Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu,
- 15) SEQ ID NO. 15: KCWDYRRAAVPGLFILFFL или Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu,
- 16) SEQ ID NO.16: KCWDYRRAAVPGLFILFFLRHRCP или Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro,

- 17) SEQ ID NO.17: KCWDYRRAAVPGLFILFFLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS или Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser,
- 18) SEQ ID NO.18: WDYRR или Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 19) SEQ ID NO.19: FILFFLRHRCPTL или Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu,
- 20) SEQ ID NO.20: FILFFLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS или Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser,
- 21) SEQ ID NO.21: HRCPTLTQDEVQWCDHSSLQPSTPEIKHP или His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser-Leu-Gln-Pro-Ser-Thr-Pro-Glu-Ile-Lys-His-Pro,
- 22) SEQ ID NO.22: PASASQVAGTKDMH или Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met-His,
- 23) SEQ ID NO.23: DMHHYTWLIFIFIFNFLR или Asp-Met-His-His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-Arg,
- 24) SEQ ID NO.24: HYTWLIFIFIFNFLRQSLN или His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-Arg-Gln-Ser-Leu-Asn,
- 25) SEQ ID NO.25: SVTQAGVQWRNLGSLQPLPPGFKLFSCPSLLSSWDYRRPPRLANF или Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Arg-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe,
- 26) SEQ ID NO.26: PGFKLFSCPSLLSSWDYRR или Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,

- 27) SEQ ID NO.27: FKLFSCLSSWDYRRPPRLANF или Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe,
- 28) SEQ ID NO.28: FSCPSLLSSWDYRR или Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 29) SEQ ID NO.29: SLLSSWDYRR или Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 30) SEQ ID NO.30: SSWDY или Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr,
- 31) SEQ ID NO.31: SSWDYRR или Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 32) SEQ ID NO.32: SSWDYRRPPRLANFFVFLVEMGFTM или Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Phe-Val-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met,
- 33) SEQ ID NO.33: FVFLVEMGFTM или Phe-Val-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met,
- 34) SEQ ID NO.34: MGFTMFARLILISGPCDLPASAS или Met-Gly-Phe-Thr-Met-Phe-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Ile-Ser-Gly-Pro-Cys-Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser,
- 35) SEQ ID NO.35: ISGPC или Ile-Ser-Gly-Pro-Cys,
- 36) SEQ ID NO.36: DLPASASQSAGITGVSH или Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His,
- 37) SEQ ID NO.37: GVSHHARLIFNFCLEFEM или Gly-Val-Ser-His-His-Ala-Arg-Leu-Ile-Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met,
- 38) SEQ ID NO.38: NFCLFEMESH или Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met-Glu-Ser-His,
- 39) SEQ ID NO.39: SVTQAGVQWPNLGSLQPLPPGLKRFSCSLPSSWDYGHLPHPANF или Ser-

Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Pro-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe,

- 40) SEQ ID NO.40: PPGLKRFSCSLPSSWDYG или Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly,
- 41) SEQ ID NO.41: FSCLSLPSSWDYGH или Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His,
- 42) SEQ ID NO.42: LSLPSSWDY или Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr,
- 43) SEQ ID NO.43: SSWDYGHLPHPANFCIFIRGGVSPYLSGWSQTPDLR или Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe-Cys-Ile-Phe-Ile-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Pro-Tyr-Leu-Ser-Gly-Trp-Ser-Gln-Thr-Pro-Asp-Leu-Arg,
- 44) SEQ ID NO.44: PGFFKLFSCPSLLSSWDYRR или Pro-Gly-Phe-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 45) SEQ ID NO.45: PELKQSTCLSLPKCWDYRR или Pro-Glu-Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 46) SEQ ID NO.46: PPGLKRFSCSLPSSWDYG или Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly,
- 47) SEQ ID NO.47: FSCLSLPSSWDYGH или Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His,
- 48) SEQ ID NO.48: STCLSLPKCWDYRR или Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 49) SEQ ID NO.49: FSCPSLLSSWDYRR или Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 50) SEQ ID NO.50: LSLPSSWDY или Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr,

- 51) SEQ ID NO.51: LSLPKCWDYRR или Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 52) SEQ ID NO.52: SLLSSWDYRR или Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 53) SEQ ID NO.53: LPSSWDYRR или Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 54) SEQ ID NO.54: SSWDYRR или Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg,
- 55) SEQ ID NO.55: SSWDY или Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr,
- 56) SEQ ID NO.56: SSWDYRRFILFFL или Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu,
- 57) SEQ ID NO.57: WDYRRFIFNFL или Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu,
- 58) SEQ ID NO.58: FNFCLF или Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-Phe,
- 59) SEQ ID NO.59: FIFNFL или Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu,
- 60) SEQ ID NO.60: PASASPVAGITGM или Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Met,
- 61) SEQ ID NO.61: PASASQVAGTKDM или Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met,
- 62) SEQ ID NO.62: PASASQSAGITGV или Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Val,
- 63) SEQ ID NO.63: PASASPVAG или Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly,
- 64) SEQ ID NO.64: FFLVEM или Phe-Phe-Leu-Val-Glu-Met,
- 65) SEQ ID NO.65: SVTQAGVQW или Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp,

- 66) SEQ ID NO.66: IDQQVLSRIKLEIKRCL или Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu- Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu,
- 67) SEQ ID NO.67: LSRIKLEIK или Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys,
- 68) SEQ ID NO.68: GDHGRPNLSRLKLAIKYEVKKM или Gly-Asp-His-Gly-Arg-Pro-Asn-Leu-Ser-Arg-Leu-Lys-Leu-Ala-Ile-Lys-Tyr-Glu-Val-Lys-Lys-Met,
- 69) SEQ ID NO.69: QQSIQVFLAVFGVSI или Gln-Gln-Ser-Ile-Ala-Val-Lys-Phe-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-Val-Ser-Ile,
- 70) SEQ ID NO.70: GLLFPVFSVCYLIAPKSPLGL или Gly-Leu-Leu-Phe-Pro-Val-Phe-Ser-Val-Cys-Tyr-Leu-Ile-Ala-Pro-Lys-Ser-Pro-Leu-Gly-Leu,
- 71) SEQ ID NO. 71: MMVCWNRFGKWVYFI или Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-Trp-Val-Tyr-Phe-Ile,
- 72) SEQ ID NO. 72: SAIFNFGPRYLHGV или Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val,
- 73) SEQ ID NO. 73: PFYFLILVRIISFLI или Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-Ile-Ser-Phe-Leu-Ile,
- 74) SEQ ID NO. 74: GDMEDVLLNCTLLKR или Gly-Asp-Met-Glu-Asp-Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg,
- 75) SEQ ID NO. 75: SSRFRFWGALVCSMD или Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-Val-Cys-Ser-Met-Asp,
- 76) SEQ ID NO. 76: SCRFSRVAVTYRFIT или Ser-Cys-Arg-Phe-Ser-Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr- Arg-Phe-Ile-Thr,
- 77) SEQ ID NO. 77: LLNIPSPAVWMARNT или Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-Met-Ala-Arg-Asn-Thr,
- 78) SEQ ID NO. 78: MAQSRLTATSASRVQ или Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-Thr-Ser-Ala-Ser-Arg-Val-Gln,

- 79) SEQ ID NO. 79: AILLSQPPKQLGLRA или Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala,
- 80) SEQ ID NO. 80: PANTPLIFVFSLEAG или Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-Ser-Leu- Glu-Ala-Gly,
- 81) SEQ ID NO. 81: FHHICQAGLKLLTSG или Phe-His-His-Ile-Cys-Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly,
- 82) SEQ ID NO. 82: DPPASAFQSAGITGV или Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-Gly- Ile-Thr-Gly-Val,
- 83) SEQ ID NO. 83: SHLTQPANLDKKICS или Ser-His-Leu-Thr-Gln-Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser,
- 84) SEQ ID NO. 84: NGGSCYVAQAGLKLLASCNPSK или Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-Ser-Lys,
- 85) SEQ ID NO. 85: MWTLKSSLVLLCLT или Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Leu-Cys-Leu-Thr,
- 86) SEQ ID NO. 86: CSYAFMFSSLRQKTS или Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser,
- 87) SEQ ID NO. 87: EPQGKVPCGENFRIR или Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-His-Phe-Arg-Ile-Arg,
- 88) SEQ ID NO. 88: QNLPEHTQGWLGSKW или Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp,
- 89) SEQ ID NO. 89: LWLLFAVVPFVILKC или Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-Val-Ile-Leu-Lys-Cys,
- 90) SEQ ID NO. 90: QRDSEKNKVRMAPFF или Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe,

- 91) SEQ ID NO. 91: LHHIDSISGVSGKRMF или Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe,
- 92) SEQ ID NO. 92: EAYYTMLHLPTTNRP или Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-Thr-Thr-Asn-Arg-Pro,
- 93) SEQ ID NO. 93: KIAHCILFNQPHSPR или Lys-Ile-Ala-His-Cys-Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg,
- 94) SEQ ID NO. 94: SNSHSHPNPLKLHRR или Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-Lys-Leu-His-Arg-Arg,
- 95) SEQ ID NO. 95: SHSHNRPRAYILITI или Ser-His-Ser-His-Asn-Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile,
- 96) SEQ ID NO. 96: LPSKCLKLRTHSQSHH или Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-Ser-Gln-Ser-His-His,
- 97) SEQ ID NO. 97: NPLSRTSNSTPTNSFLMTSSKPR или Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg,
- 98) SEQ ID NO. 98: SSSLGLPKCWDYRHE или Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-His-Glu,
- 99) SEQ ID NO. 99: LLSLALMINFRVMAC или Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys,
- 100) SEQ ID NO. 100: TFKQHIELRQKISIV или Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-Lys-Ile-Ser-Ile-Val,
- 101) SEQ ID NO. 101: PRKLCCMGVPCPVKI или Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile,
- 102) SEQ ID NO. 102: ALLTINGHCTWLPAS или Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-Trp-Leu-Pro-Ala-Ser,

- 103) SEQ ID NO. 103: MFVFCLILNREKIKG или Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-Glu-Lys-Ile-Lys-Gly,
- 104) SEQ ID NO. 104: GNSSFLLSFFFSFQ или Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln,
- 105) SEQ ID NO. 105: NCCQCFQCRTTEGYA или Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala,
- 106) SEQ ID NO. 106: VECFYCLVDKAAFECWWFYFSDT или Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr,
- 107) SEQ ID NO. 107: MEPHTVAQAGVPQHD или Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-Val-Pro-Gln-His-Asp,
- 108) SEQ ID NO. 108: LGSLQSLPRFKRFS или Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser,
- 109) SEQ ID NO. 109: CLILPKIWDYRNMNT или Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-Arg-Asn-Met-Asn-Thr,
- 110) SEQ ID NO. 110: ALIKRNRYPETGRKS или Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-Ser,
- 111) SEQ ID NO. 111: IDQQVLSRI или Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile,
- 112) SEQ ID NO. 112: KLEIKRCL или Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu,
- 113) SEQ ID NO. 113: VLSRIK или Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys,
- 114) SEQ ID NO. 114: RIKLEIK или Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys,
- 115) SEQ ID NO. 115: VLSRIKLEIKRCL или Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu и
- 116) SEQ ID NO. 116: IDQQVLSRIKLEI или Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile.

Выражение "NTP-пептид" также предпочтительно включает (без ограничения) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1-116.

Термин "фрагмент" относится к белку или полипептиду, который состоит из непрерывной подпоследовательности аминокислотной последовательности белка или пептида, и включает встречающиеся в природе фрагменты, такие как сплайс-варианты и фрагменты, образующиеся в результате встречающейся в природе *in vivo* протеазной активности. Такой фрагмент может быть усечен на аминоконце, карбоксиконце и/или внутри (например, с помощью природного сплайсинга). Такие фрагменты могут быть получены с аминоконцевым метионином или без него. Термин "фрагмент" включает фрагменты, независимо от того, являются ли они одинаковыми или разными, из одного и того же белка или пептида, с непрерывной аминокислотной последовательностью в целом или без такой, соединенные вместе, либо непосредственно, либо с помощью линкера. Специалист в данной области сможет выбрать подходящий фрагмент для применения в вариантах осуществления без лишних экспериментиров с помощью руководств и способов, изложенных в данном документе.

Термин "вариант" относится к белку или полипептиду, в котором присутствуют одна или более

аминокислотных замен, делеций и/или вставок по сравнению с аминокислотной последовательностью белка или пептида, и в него включены встречающиеся в природе аллельные варианты или альтернативные сплайс-варианты белка или пептида. Термин "вариант" включает замену одной или более аминокислот в пептидной последовательности на сходную(сходные) или гомологичную(гомологичные) аминокислоту(аминокислоты) или отличающуюся(отличающиеся) аминокислоту (аминокислоты). Существует много шкал, по которым аминокислоты могут быть ранжированы как сходные или гомологичные. (Gunnar von Heijne, Sequence Analysis in Molecular Biology, p. 123-39 (Academic Press, New York, N.Y. 1987.) Предпочтительные варианты включают аланиновые замены в одном или более из положений аминокислот. Другие предпочтительные замены включают консервативные замены, которые оказывают незначительный эффект или не оказывают никакого эффекта на суммарный заряд, полярность или гидрофобность белка. Консервативные замены изложены в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Консервативные аминокислотные замены

Основные:	аргинин лизин гистидин
Кислые:	глутаминовая кислота аспарагиновая кислота
Незаряженные полярные:	глутамин аспарагин серин треонин тирозин
Неполярные:	фенилаланин триптофан цистеин глицин аланин валин пролин метионин лейцин изолейцин

В табл. 3 изложена другая схема аминокислотных замен.

Таблица 3

Исходный остаток	Замены
Ala	gly;ser
Arg	lys
Asn	gln;his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	ala;pro
His	asn;gln
Ile	eu;val
Leu	ile;val
Lys	arg;gln;glu
Met	leu;tyr;ile
Phe	met;leu;tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp;phe
Val	ile;leu

Другие варианты могут состоять из менее консервативных аминокислотных замен, таких как определенные остатки, которые более значительно различаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замены, например в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) объемной боковой цепи. Замены, которые, как ожидается, в целом оказывают более значительное влияние на функцию, представляют собой такие, в которых (а) глицин и/или пролин заменен другой аминокислотой или удален или вставлен; (b) гидрофильный остаток, например серил или треонил, заменен на гидрофобный остаток(или гидрофобным остатком), например, лейцилом, изолейцилом, фенилаланином, валином или аланином; (c) цистеиновый остаток заменен на другой остаток(или другим остатком); (d) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например, лизил, аргинил или гистидил, заменен на остаток (или остатком), имеющий(имеющим) электроотрицательный заряд, например глутамил или аспартил; или (e) остаток,

имеющий объемную боковую цепь, например фенилаланин, заменен на такой(или таким), не имеющий(не имеющим) такую боковую цепь, например глицин. Другие варианты включают такие, которые либо разработаны с целью образования нового(новых) сайта(сайтов) гликозилирования и/или фосфорилирования, либо такие, которые разработаны с целью удаления существующего(существующих) сайта(сайтов) гликозилирования и/или фосфорилирования. Варианты включают по меньшей одну аминокислотную замену в сайте гликозилирования, сайте протеолитического расщепления и/или в цистеиновом остатке. Варианты также включают белки и пептиды с дополнительными аминокислотными остатками до или после аминокислотной последовательности белка или пептида на линкерных пептидах. Например, цистеиновый остаток можно добавить как на амино-, так и на карбоксиконцы NTP-пептида с целью обеспечения возможности циклизации пептида за счет образования дисульфидной связи. Термин "вариант" также охватывает полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность NTP-пептида, при этом от по меньшей мере одной и до 25 или больше аминокислот фланкируют либо 3'-, либо 5'-конец пептида.

Термин "производное" относится к химически модифицированному белку или полипептиду, который был химически модифицирован либо в результате природных процессов, таких как процессинг, либо других посттрансляционных модификаций, но также с помощью методик химической модификации, например, путем добавления одной или более молекул полиэтиленгликоля, Сахаров, фосфатов и/или других таких молекул, где молекула или молекулы в природе не присоединены к белкам дикого типа или NTP-пептидам. Производные включают соли. Такие химические модификации хорошо описаны в основной документации и более подробных монографиях, а также в многочисленной научной литературе, и хорошо известны специалистам в данной области. Должно быть понятно, что одинаковый тип модификации может присутствовать в одинаковой или различной степени в нескольких сайтах в определенном белке или полипептиде. Кроме того, определенный белок или полипептид могут содержать типы модификаций. Модификации могут происходить в любом месте в белке или полипептиде, в том числе в пептидном остове, боковых цепях аминокислот и амино- или карбоксильных концах. Модификации включают, например: ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентно присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентного присоединения липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидрокселирование, йодирование, метилирование, ацилирование с остатком мистриновой кислоты, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, гликозилирование, присоединение липида, сульфатизацию, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидрокселирование и ADP-рибозилирование, селеноилирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, как, например, аргинилирование и убиквитинилирование. См., например, *Proteins-Structure And Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) and Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects," pgs. 1-12 in *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990), и Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992). Термин "производные" включает химические модификации, приводящие в результате к тому, что белок или полипептид становятся разветвленными или циклическими, с разветвлением или без него. Циклические, разветвленные или разветвленные кольцевые белки или полипептиды могут образовываться в результате посттрансляционных природных процессов и также могут быть получены в результате полностью синтетических способов.

Термин "гомолог" относится к белку, который по меньшей мере на 60 процентов идентичен аминокислотной последовательности NTP-пептида, что определяют с помощью стандартных способов, которые широко используются для сравнения сходства положения аминокислот в двух полипептидах. Степень сходства или идентичности между двумя белками можно легко рассчитать с помощью известных способов, в том числе без ограничения тех способов, которые описаны в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; и Carillo H. and Lipman, D., *SIAM, J. Applied Math.*, 48:1073 (1988). Предпочтительные способы определения идентичности разработаны для получения наибольшего сходства между исследуемыми последовательностями.

Способы определения идентичности и сходства систематизированы в общедоступных компьютерных программах.

Предпочтительные способы на основе компьютерных программ, полезных для определения идентичности и сходства между двумя последовательностями, включают в себя без ограничения программ-

ный пакет GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA, Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410 (1990). Программа BLAST X является общедоступной в NCBI и других источниках (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)). В качестве примера с помощью компьютерного алгоритма, такого как GAP (Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Мадисон, Висконсин), два белка или полипептида, для которых необходимо определить процент идентичности последовательности, выравнивают с целью оптимального совпадения их соответствующих аминокислот ("длины совпадения", определяемой с помощью алгоритма).

Штраф за открытие гэпа (который рассчитывается как 3, умноженное на среднее диагонали; "среднее диагонали" представляет собой среднее из диагонали используемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, присвоенное каждому идеальному совпадению аминокислот с помощью матрицы сравнения) и штраф за продление гэпа (который обычно представляет собой {долю (1/10)}, умноженную на штраф за открытие гэпа), а также матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62, используют в сочетании с алгоритмом. Стандартную матрицу сравнения (см. Dayhoff et al. в: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supp.3 в случае матрицы сравнения PAM250; см. Henikoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:10915-10919 в случае матрицы сравнения BLOSUM 62) также можно использовать в алгоритме. Затем с помощью алгоритма рассчитывают процент идентичности. Гомологи, как правило, будут иметь одну или более аминокислотных замен, делеций и/или вставок по сравнению с белком или пептидом, в зависимости от варианта.

Термин "слитый белок" относится к белку, в котором один или более пептидов рекомбинантно слиты или химически конъюгированы (в том числе ковалентно или нековалентно) с белком, таким как (без ограничения) антитело или фрагмент антитела, например фрагмент F.sub.ab или Fv короткой цепи. Термин "слитый белок" также относится к мультимерам (например, димерам, тримерам, тетрамерам и мультимерам более высокого порядка) пептидов. Такие мультимеры содержат гомомерные мультимеры, содержащие один пептид, гетеромерные мультимеры, содержащие более одного пептида, и гетеромерные мультимеры, содержащие по меньшей мере один пептид и по меньшей мере один другой белок. Такие мультимеры могут быть результатом гидрофобных, гидрофильных, ионных и/или ковалентных ассоциаций, связей или соединений, могут быть образованы в результате перекрестного сшивания с помощью линкерных молекул, или могут быть связаны непосредственно, например, с помощью образования липосом.

Термин "пептидомиметик" или "миметик" относится к биологически активным соединениям, которые имитируют биологическую активность пептида или белка, но которые больше не являются пептидами по химической структуре, т.е., они больше не содержат каких-либо пептидных связей (т.е., амидных связей между аминокислотами). В данном документе термин пептидомиметик используется в более широком смысле с включением молекул, которые больше не являются полностью пептидными по своей природе, таких как псевдопептиды, полупептиды и пептоиды. Примеры пептидомиметиков в этом более широком смысле (где часть пептида замещена структурой, у которой отсутствуют пептидные связи) описаны ниже. Вне зависимости от того, являются ли полностью или частично непептидными, пептидомиметики в соответствии с вариантами осуществления обеспечивают пространственную организацию реакционно-способных химических фрагментов, которая в значительной степени аналогична трехмерной организации активных групп в пептиде, являющемся основой для пептидомиметика. В результате такой похожей геометрии активных сайтов, пептидомиметик оказывает воздействия на биологические системы, которые аналогичны биологической активности пептида.

Пептидомиметики вариантов осуществления по настоящему изобретению являются предпочтительно практически аналогичными как по трехмерной структуре, так и по биологической активности пептидам, описанным в данном документе. Примеры способов структурной модификации пептида, известные в данной области, для получения пептидомиметика, включают инверсию хиральных центров остова, приводящую к образованию структур D-аминокислотных остатков, которые могут, в частности на N-конце, приводить к повышенной стабильности в отношении протеолитического расщепления без нежелательного влияния на активность. Пример приведен в публикации "Tritiated D-ala.sup.l-Peptide T Binding", Smith C. S. et al., *Drug Development Res.*, 15, pp. 371-379 (1988). Вторым способом является изменение циклической структуры с целью обеспечения стабильности, например N на C внутри цепей имидов и лактамов (Ede et al. in Smith and Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). Пример этого представлен в конформационно ограниченных тимопентин-подобных соединениях, таких как соединения, раскрытые в патенте США №4457489 (1985), Goldstein, G. et al., раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей его полноте. Третий способ заключается в замещении пептидных связей в пептиде псевдопептидными связями, которые придают устойчивость к протеолиту.

Был описан ряд псевдопептидных связей, которые, как правило, не нарушают пептидную структуру и биологическую активность. Одним примером такого подхода является замена ретроинвертированных псевдопептидных связей ("Biologically active retroinverso analogues of thymopentin", Sisto A. et al in Rivier, J. E. and Marshall, G. R. (eds) "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", Escom, Leiden (1990), pp. 722-

773), и Dalpozzo, et al. (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:561-566, включенные в данный документ посредством ссылки). В соответствии с данной модификацией, аминокислотные последовательности пептидов могут быть идентичными последовательностям NTP-пептида, описанным выше, помимо того, что одна или более пептидных связей замещены ретроинвертированной псевдопептидной связью. Предпочтительно наиболее близко расположенная к N-концу пептидная связь является замененной, поскольку такая замена будет придавать устойчивость к протеолизу экзопептидазами, действующими на N-конце. Также можно провести дополнительные модификации путем замещения химических групп аминокислот другими химическими группами аналогичной структуры. Другой подходящей псевдопептидной связью, которая, как известно, повышает стабильность к ферментативному расщеплению, без потери или с незначительной потерей биологической активности, является восстановленная изостерическая псевдопептидная связь (Couder, et al. (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:181-184, включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Таким образом, аминокислотные последовательности этих пептидов могут быть идентичными последовательностям NTP-пептида, помимо того, что одна или более пептидных связей замещены изостерической псевдопептидной связью. Предпочтительно наиболее близко расположенная к N-концу пептидная связь является замененной, поскольку такая замена будет придавать устойчивость к протеолизу экзопептидазами, действующими на N-конце. Синтез пептидов с одной или более изостерическими псевдопептидными связями является известным в данной области (Couder, et al. (1993), цитируется выше). Другие примеры включают введение кетометиленовых или метилсульфидных связей с целью замещения пептидных связей.

Пептоидные производные пептидов представляют другой класс пептидомиметиков, которые сохраняют важные структурные детерминанты в отношении биологической активности, при этом у них удаляются пептидные связи, что тем самым придает устойчивость к протеолизу (Simon, et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371, включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Пептоиды представляют собой олигомеры N-замещенных глицинов. Был описан ряд N-алкильных групп, при этом каждая соответствовала боковой цепи природных аминокислот (Simon, et al. (1992), цитируется выше). Некоторые или все из аминокислот пептидов могут быть замещены N-замещенным глицином, соответствующим замещенной аминокислоте.

Термин "пептидомиметик" или "миметик" также включает обратные D-пептиды и энантиомеры, как определено выше.

Термин "обратный D-пептид" относится к биологически активному белку или пептиду, состоящему из D-аминокислот, упорядоченных в обратном порядке по сравнению с L-аминокислотной последовательностью пептида. Таким образом, карбоксиконцевой остаток L-аминокислотного пептида становится аминоконцевым для D-аминокислотного пептида и т.д. Например, пептид ETESH становится HdSdEdTdEd, где Ed, Hd, Sd и Td представляют собой D-аминокислоты, соответствующие L-аминокислотам, E, H, S и T соответственно.

Термин "энантиомер" относится к биологически активному белку или пептиду, в которых один или более L-аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности пептида замещены соответствующим(соответствующими) D-аминокислотным(D-аминокислотными) остатком(остатками).

Термин "композиция", используемый в данном документе, относится в широком смысле к любой композиции, содержащей упомянутую пептидную или аминокислотную последовательность и необязательно активное средство. Композиция может содержать сухой состав, водный раствор или стерильную композицию. Композиции, содержащие пептиды, можно использовать в качестве гибридационных зондов. Зонды можно сохранять в лиофилизированной форме и можно связывать со стабилизирующим средством, таким как углевод. При гибридизациях зонд можно использовать в водном растворе, содержащем соли, например NaCl, детергенты, например натрия додецилсульфат (SDS), и другие компоненты, например, раствор Денхардта, сухое молоко, ДНК из молока лососевых и т.д.

Выражение "активное средство" используется в данном документе для обозначения любого средства, способного уменьшать размер и/или устранять нежелательные клеточные пролифераты и/или тканевой рост. Подходящие активные средства могут включать без ограничения: (i) антагонисты/агонисты (альфа-блокаторы) гладких мышц, которые облегчают сокращения мочевого пузыря и уретральную двигательную активность, но не обязательно уничтожают или удаляют клетки; (ii) ингибиторы 5- α -редуктазы (например, финастерид и/или дутастерид), которые приводят к уменьшению размера предстательной железы в результате уменьшения размера клеток; (iii) противоопухолевые активные средства (такие как алкилирующие средства, ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы изомеразы II, антимиетаболиты РНК/ДНК и антимиотические средства); (iv) активные средства для лечения доброкачественных новообразований, такие как активные средства против акне и против бородавок; (v) антиандрогенные соединения (ципротерона ацетат (1 α ,2 β -метил-6-хлор-17- α -ацетокси-6-дегидропрогестерон), тамоксифен, ингибиторы ароматазы); (vi) блокаторы альфа-1-адренергических рецепторов (тамсулозин, теразозин, доксазозин, празозин, буназозин, индорамин, альфузозин, силодозин); (vii) ингибиторы фосфодиэстеразы 5-го типа (PDE5) (тадалафил) и их комбинации.

Варианты осуществления направлены на способы лечения млекопитающего, нуждающегося в устранении или разрушении нежелательных клеточных пролифератов, предусматривающие введение композиции, содержащей определенные выше NTP-пептиды, в сочетании с дополнительным активным средством. Дополнительное активное средство можно вводить вместе с (или в одном составе с) композицией, содержащей NTP-пептид, либо дополнительное средство можно вводить отдельно. Например, композицию, содержащую NTP-пептид, можно вводить посредством инъекции, причем дополнительное активное средство можно принимать в различный(различные) момент(моменты) времени в виде препарата для перорального введения (в форме таблетки, желатиновой капсулы и т.д.).

Другие пептидные последовательности, полученные из NTP-пептида, являющегося эффективным средством для индуцирования гибели клеток, также могут быть эффективными средствами, вызывающими гибель клеток. Специалист в данной области с помощью руководств, представленных в данном документе, может синтезировать без неоправданного проведения экспериментов фрагменты эффективного пептида, охватывающие полную аминокислотную последовательность, с целью выявления других эффективных пептидных последовательностей.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что использование NTP-пептидов в лечении млекопитающих, нуждающихся в устранении или разрушении нежелательных клеточных элементов, приводило к неожиданно превосходному клиническому преимуществу при комбинировании с дополнительными активными средствами по сравнению с млекопитающими, которых лечили лишь дополнительными активными средствами. Например, эффективность лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы можно оценить симптоматически. Симптоматическую оценку можно измерить с помощью Международной шкалы суммарной оценки симптомов при заболеваниях предстательной железы (IPSS), которая представляет собой количественную шкалу, используемую для оценки улучшения или ухудшения симптомов при заболеваниях предстательной железы. С помощью IPSS количественно оценивают следующее: 1) неполное опорожнение мочевого пузыря после мочеиспускания; 2) частое мочеиспускание; 3) прерывистость процесса мочеиспускания; 4) срочный позыв помочиться; 5) слабость струи при мочеиспускании; 6) необходимость проталкивания мочи и напряжения во время мочеиспускания; 7) необходимость мочиться после отхождения ко сну ночью (ноктурия). Авторы настоящего изобретения выявили, что введение NTP-пептида в комбинации с дополнительным активным средством приводило к улучшению IPSS на от приблизительно 15 до 150% более, чем улучшение IPSS у пациентов, получающих лишь дополнительное активное средство. В некоторых вариантах осуществления улучшение находится в диапазоне от приблизительно 25 до приблизительно 125%, или от приблизительно 30% до приблизительно 115%, или от приблизительно 40% до приблизительно 110%.

Авторы настоящего изобретения выявили, что улучшение является даже более выраженным у пациентов, которые ранее не принимали дополнительное активное средство (или которые ранее не проходили лечения такого состояния), и которых лечили NTP-пептидом, а затем в дальнейшем вводили дополнительное активное средство. Улучшение IPSS в случае пациентов, которые получали NTP-пептид, и которым в дальнейшем вводили дополнительное активное средство, составляло на от 50 до 400% более, чем улучшение IPSS у пациентов, которые получали плацебо и которым в дальнейшем вводили дополнительное активное средство. В некоторых вариантах осуществления улучшение находится в диапазоне от приблизительно 75 до приблизительно 300%, или от приблизительно 150% до приблизительно 250%, или от приблизительно 200% до приблизительно 225%.

Варианты осуществления включают способ лечения млекопитающего, страдающего от состояния, при котором требуется устранение или разрушение нежелательных клеточных пролифератов, при этом млекопитающее ранее получало или не получало лечения относительно такого состояния, предусматривающий введение NTP-пептида млекопитающему в комбинации с дополнительным активным средством. В способе предусмотрено без ограничения введение NTP-пептидов внутримышечно, перорально, внутривенно, внутривнутрино, интрацеребрально (внутрипаренхиматозно), интрацеребровентрикулярно, внутриочагово, интраокулярно, внутриартериально, интратекально, интратуморально, интраназально, местно, трансдермально, подкожно или внутривожно либо отдельно, либо в виде конъюгата с носителем. Нежелательные клеточные пролифераты включают, в числе прочих, доброкачественные и злокачественные опухоли, железистую (например, предстательной железы) гиперплазию, нежелательный рост волос на лице, бородавки и нежелательную жировую ткань. Предпочтительные NTP-пептиды включают один или более из следующего:

SEQ ID NO. 66	IDQQVLSRIKLEIKRCL	Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu
SEQ ID NO. 111	IDQQVLSRI	Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile
SEQ ID NO. 115	VLSRIKLEIKRCL	Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu
SEQ ID NO. 116	IDQQVLSRIKLEI	Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile.

Любое млекопитающее может получить пользу от использования настоящего изобретения, в том числе человек, мыши, кролики, собаки, овцы и другой домашний скот, которых лечили или они подлежат лечению ветеринарным врачом, работником зоопарка или сотрудником заповедника. Предпочтительными млекопитающими являются люди, овцы и собаки.

Специалисту в данной области будет очевидно, что более мелкие фрагменты вышеуказанных NTP-пептидов можно выбрать таким образом, что эти пептиды будут характеризоваться такой же или аналогичной биологической активностью. Специалисту в данной области можно выбрать другие фрагменты таким образом, что эти пептиды будут характеризоваться такой же или аналогичной биологической активностью. Пептиды из вариантов осуществления охватывают эти другие фрагменты. Как правило, пептиды вариантов осуществления имеют по меньшей мере 4 аминокислоты, предпочтительно 5 аминокислот и более предпочтительно по меньшей мере 6 аминокислот.

Варианты осуществления также охватывают лечение млекопитающих (или пациентов), нуждающихся в устранении или разрушении нежелательных клеточных пролифератов, предусматривающее введение композиции, содержащей NTP-пептиды, содержащей два или более NTP-пептидов, соединенных вместе, соединенных вместе с дополнительным активным средством. Поскольку NTP-пептид характеризуется требуемой биологической активностью, из этого следует, что два таких пептида также будут характеризоваться требуемой биологической активностью.

NTP-пептиды и их фрагменты, варианты, производные, гомологи, слитые белки и миметики, охваченные данным вариантом осуществления, можно получить с помощью способов, известных специалистам в данной области, таких как технология с использованием рекомбинантной ДНК, синтез белка и выделение встречающихся в природе пептидов, NTP-белка и его фрагментов, вариантов, производных и гомологов.

NTP-пептиды и их фрагменты, варианты, производные, гомологи, слитые белки и миметики можно получить из других пептидов, белков и их фрагментов, вариантов, производных и гомологов с использованием способов, известных специалистам в данной области. Такие способы предусматривают (без ограничения) использование протеаз для расщепления пептида или белка на требуемые NTP-пептиды.

NTP-пептид можно получить с помощью хорошо известных методик технологии с использованием рекомбинантной ДНК, как, например, изложенные в Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. и/или Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, N.Y.

Ген или кДНК, кодирующие NTP-пептид, можно получить, например, с помощью скрининга геномной библиотеки или библиотеки кДНК, или с помощью ПЦР-амплификации. Зонды или праймеры, применимые для скрининга библиотеки, можно получить на основе информации о последовательностях для других известных генов или фрагментов генов из того же или родственного семейства генов, таких как, например, консервативные мотивы, встречающиеся в других пептидах или белках. Кроме того, если ген, кодирующий NTP-пептид, был идентифицирован, то весь этот ген или его часть можно использовать в качестве зонда для идентификации гомологичных генов.

Зонды или праймеры можно использовать для скрининга библиотек кДНК из различных источников тканей, которые, как предполагается, экспрессируют ген NTP-пептида. Как правило, для скрининга используют условия высокой жесткости с целью сведения к минимуму ложно-положительных результатов, полученных в результате скрининга.

Другим средством получения гена, кодирующего NTP-пептид, является использование способов химического синтеза, хорошо известного специалисту в данной области, как, например, описанные в Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716-734. Эти способы включают, в числе прочих, фосфотриэфирный, фосфорамидитный и N-фосфонатный способы синтеза нуклеиновых кислот. Предпочтительным способом такого химического синтеза является синтез на полимерной подложке с использованием стандартной фосфорамидитной реакции. Как правило, ДНК, кодирующая пептид или белок, будет составлять несколько сот нуклеотидов в длину. Нуклеиновые кислоты, которые составляют более приблизительно 100 нуклеотидов в длину, можно синтезировать в виде нескольких фрагментов с помощью этих способов. Затем фрагменты можно лигировать вместе с получением полноразмерного пептида или белка. Как правило, фрагмент ДНК, кодирующий аминоконец белка, будет иметь ATG, который кодирует метиониновый остаток. Этот метионин может присутствовать или может не присутствовать в зрелой форме белка или пептида, в зависимости от того, сконструирован ли белок, продуцируемый в клетке-хозяине, для секреции из этой клетки.

Ген, его кДНК или фрагмент, кодирующие NTP-пептид, можно встроить в соответствующий вектор экспрессии или вектор для амплификации с использованием стандартных методик лигирования. Векторы обычно выбирают так, чтобы они были функциональными в определенной используемой клетке-хозяине (т. е. вектор является совместимыми с аппаратом клетки-хозяина настолько, чтобы могла происходить амплификация гена и/или экспрессия гена). Ген, его кДНК или фрагмент, кодирующие NTP-пептид, можно амплифицировать/экспрессировать в прокариотических клетках-хозяевах, клетках-хозяевах дрожжей, насекомых (бакуловирусные системы) и/или эукариотических клетках-хозяевах. Выбор клетки-хозяина будет зависеть отчасти от того, является ли NTP-пептид гликозилированными и/или фосфо-

рированными. В этом случае клетки дрожжей, насекомых или млекопитающих являются предпочтительными.

Как правило, векторы, используемые в любой из клеток-хозяев, будут содержать по меньшей мере 5'-фланкирующую последовательность (также обозначаемую как промотор), а также другие регуляторные элементы, такие как энхансер(энхансеры), элемент, представленный точкой начала репликации, элемент, представленный точкой терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайт сплайсинга, последовательность сигнального пептида, элемент, представленный сайтом связывания рибосом, последовательность полиаденилирования, полилинкерный участок для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подлежащий экспрессии, и элемент, представленный селективируемым маркером. Каждый из этих элементов описан ниже. Необязательно вектор может содержать последовательность метки, например олигонуклеотидную молекулу, расположенную на 5'- или 3'-конце последовательности, кодирующей белок или пептид; при этом олигонуклеотидная молекула кодирует polyHis (такой как hexaHis) или другую метку, такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Эта метка, как правило, слита с полипептидом при экспрессии полипептида, и может выступать в качестве средства для аффинного выделения белка или пептида из клетки-хозяина. Аффинное выделение можно проводить, например, с помощью колоночной хроматографии с использованием антител к метке в качестве аффинной матрицы. Необязательно в дальнейшем метка может быть удалена из очищенного белка или пептида с помощью различных способов, например, с использованием определенных пептидаз.

Шарнирный и Fc-участок иммуноглобулина человека может быть повергнут слиянию либо с N-концом, либо с C-концом NTP-пептида специалистом в данной области. Полученный Fc-слитый белок может быть очищен с помощью колонки для аффинной хроматографии с белком А. Известно, что Fc характеризуется длительным фармакокинетическим временем полужизни *in vivo*, и было выявлено, что белки, слитые с Fc, характеризуются значительно более длительным временем полужизни *in vivo*, чем неслитый аналог. Кроме того, слияние с Fc-участком обеспечивает возможность димеризации/мультимеризации молекулы, что может быть полезным в плане биоактивности некоторых молекул.

5'-Фланкирующая последовательность может быть гомологичной (например, от одного и того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичной (например, от вида, отличного от вида или штамма клетки-хозяина), гибридной (например, комбинация 5'-фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетической, или она может представлять собой 5'-фланкирующую последовательность гена нативного белка или пептида. В связи с этим источник 5'-фланкирующей последовательности может представлять собой одноклеточный прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм, или любое растение, при условии, что 5'-фланкирующая последовательность является функциональной в аппарате клетки-хозяина и может им активироваться.

5'-Фланкирующие последовательности, применимые в векторах данного варианта осуществления, могут быть получены с помощью любого из нескольких способов, хорошо известных в данной области. Как правило, 5'-фланкирующие последовательности, применимые в данном документе, отличные от фланкирующей последовательности гена белка или пептида, были ранее определены с помощью картирования и/или с помощью расщепления рестрикционными эндонуклеазами и таким образом могут быть выделены из соответствующего источника ткани с помощью соответствующих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующей последовательности. В данном документе 5'-фланкирующую последовательность можно синтезировать с помощью способов, описанных выше для синтеза или клонирования нуклеиновых кислот.

Если известна вся 5'-фланкирующая последовательность или лишь ее часть, то ее можно получить с помощью ПЦР и/или с помощью скрининга геномной библиотеки с использованием фрагментов подходящих олигонуклеотидных и/или 5'-фланкирующих последовательностей от одного и того же или разных видов.

Если 5'-фланкирующая последовательность неизвестна, то фрагмент ДНК, содержащий 5'-фланкирующую последовательность, можно выделить из более крупного участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательности или даже другой ген или гены. Выделение можно выполнить путем расщепления рестрикционными эндонуклеазами с использованием одного или более тщательно выбранных ферментов для выделения соответствующего фрагмента ДНК. После расщепления требуемый фрагмент можно выделить с помощью очистки в агарозном геле, колонки Qiagen® или других способов, известных специалисту в данной области. Выбор подходящих ферментов для осуществления этой цели будет полностью очевиден специалисту в данной области.

Элемент, представленный точкой начала репликации, как правило, представляет собой часть прокариотических векторов экспрессии, коммерчески приобретаемых, и способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Амплификация вектора до определенного числа копий в некоторых случаях может быть важной для оптимальной экспрессии белка или пептида. Если предпочтительный вектор не содер-

жит сайта начала репликации, то его можно химически синтезировать на основе известной последовательности и лигировать в вектор. Элемент терминации транскрипции, как правило, расположен на 3'-конце кодирующей последовательности белка или пептида и служит для терминации транскрипции белка или пептида. Как правило, элемент терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой фрагмент с высоким содержанием G-C после последовательности поли-Т. Несмотря на то, что этот элемент можно клонировать из библиотеки или приобрести коммерчески в виде части вектора, его также можно легко синтезировать с помощью способов синтеза нуклеиновых кислот, таких как описанные выше.

Элемент, представленный геном селективируемого маркера, кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина в селективной среде для культивирования. Типичные гены селективируемого маркера кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, тетрациклину или канамицину, в случае прокариотических клеток, (б) дополняют ауксотрофные дефекты клетки; или (с) обеспечивают важные нутриенты, недоступные из сложных сред. Предпочтительными селективируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину.

Элемент, представленный сайтом связывания рибосом, более известный как последовательность Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательность Козак (эукариоты), как правило, необходим для инициации трансляции мРНК. Этот элемент, как правило, расположен в направлении от 3' к промотору и от 5' к кодирующей последовательности белка или пептида, подлежащего синтезу. Последовательность Шайна-Дальгарно варьирует, однако, как правило, представляет собой полипуриин (т. е. характеризуется высоким содержанием А-G). Были определены многие последовательности Шайна-Дальгарно, каждую из которых можно легко синтезировать с помощью изложенных выше способов и используемых в прокариотическом векторе.

В тех случаях, когда требуется, чтобы NTP-пептид секретировался из клетки-хозяина, можно использовать сигнальную последовательность для прямого выхода пептида из клетки-хозяина, в которой он синтезируется, и карбоксиконцевую часть белка можно удалить с целью предупреждения мембранного закоривания. Как правило, сигнальная последовательность расположена в кодирующем участке гена или кДНК NTP-пептида, или непосредственно на 5'-конце кодирующего участка гена пептида. Были определены многие сигнальные последовательности, и любую из них, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине, можно использовать в сочетании с геном или кДНК пептида. Таким образом, сигнальная последовательность может быть гомологичной или гетерологичной по отношению к гену или кДНК пептида, и может не быть гомологичной или гетерологичной по отношению к гену или кДНК пептида. Кроме того, сигнальную последовательность можно химически синтезировать с помощью изложенных выше способов. В большинстве случаев секрета полипептида из клетки-хозяина за счет присутствия сигнального пептида будет приводить к удалению аминоконцевого метионина из полипептида.

Во многих случаях транскрипция гена или кДНК NTP-пептида повышается в присутствии одного или более интронов в векторе; это особенно верно в том случае, если пептид образуется в эукариотических клетках-хозяевах, в частности клетках-хозяевах млекопитающих. Используемые интроны могут встречаться в природе в гене пептида, особенно в случае, если используемый ген представляет собой полноразмерную геномную последовательность или ее фрагмент. Если интрон не встречается в природе в гене (как в случае большинства кДНК), то интрон(интроны) можно получить из другого источника. Положение интрона по отношению к фланкирующей последовательности и гену пептида, как правило, является важным, поскольку интрон должен транскрибироваться таким образом, чтобы он был эффективным. В связи с этим, если ген, кодирующий пептид, встроенный в вектор экспрессии, представляет собой молекулу кДНК, то предпочтительным положением интрона является направление от 3' до сайта инициации транскрипции, и от 5' до последовательности терминации транскрипции поли-А. Предпочтительно в случае кДНК пептида, чтобы интрон или интроны были расположены на одной или другой стороне (т. е. 5' или 3') от кДНК, с тем, чтобы он не прерывал данную кодирующую последовательность. Любой интрон из любого источника, в том числе любого вирусного, прокариотического и эукариотического (растительного или животного) организмов, можно использовать для практической реализации данного варианта осуществления, при условии, что он является совместимым с клеткой-хозяином(клетками-хозяевами), в которую (которые) он вставлен. Также в данный документ включены синтетические интроны. Необязательно в векторе можно использовать более одного интрона.

Если один или более из элементов, изложенных в данном документе, еще не присутствуют в векторе, подлежащем использованию, то их можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы, используемые для получения каждого из таких элементов, хорошо известны специалисту в данной области и совместимы с изложенными выше способами (например, синтез ДНК, скрининг библиотек и т.д.).

Конечные векторы, используемые для практической реализации данного варианта осуществления, можно сконструировать из исходных векторов, таких как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать или могут не содержать некоторые из элементов, подлежащих включению в полный вектор. Если ни один из требуемых элементов не присутствует в исходном векторе, то каждый элемент можно отдельно лигировать в вектор путем разрезания вектора с помощью подходящей(подходящими)

рестрикционной(рестрикционными) лигазой(лизагами) таким образом, чтобы концы элемента, подлежащего лигированию, и концы вектора были совместимы для лигирования. В некоторых случаях может быть необходимым притуплять концы, подлежащие лигированию друг с другом, с целью достижения надлежащего лигирования. Притупление выполняют сначала путем заполнения "липких концов" с использованием ДНК-полимеразы Кленова или ДНК-полимеразы Т4 в присутствии всех четырех нуклеотидов. Эта процедура хорошо известна в данной области и описана, например, в Sambrook et al., выше. Альтернативно два или более из элементов, подлежащих вставке в вектор, сначала можно лигировать друг с другом (если их необходимо расположить смежно друг с другом), а затем лигировать в вектор.

Дополнительным способом конструирования вектора является проведение всех лигируваний различных элементов одновременно в одной реакционной смеси. В данном случае многие несмысловые или нефункциональные векторы будут получать в результате ненадлежащего лигирования или вставки элементов, однако функциональный вектор можно определить и выбрать путем расщепления рестрикционными нуклеазами.

Предпочтительными векторами для практической реализации данного варианта осуществления являются такие векторы, которые совместимы с бактериальными клетками-хозяевами, клетками-хозяевами насекомых и клетками-хозяевами млекопитающих. Такие векторы включают, в числе прочих, pCRII, pCR3 и pCDNA3.1 (Invitrogen Company, Сан-Диего, Калифорния), pBSII (Stratagene Company, Ла-Хойя, Калифорния), pET15b (Novagen, Мадисон, Висконсин), PGEX (Pharmacia Biotech, Пискатауэй, Нью-Джерси), pEGFP-N2 (Clontech, Пало-Альто, Калифорния), pETL (BlueBachl; Invitrogen) и pFastBacDual (Gibco/BRL, Гранд-Айленд, Нью-Йорк).

После того, как вектор сконструирован и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полноразмерный или усеченный белок или пептид, была встроена в соответствующий сайт вектора, полный вектор можно встраивать в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептидов. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки-хозяева (такие как *E. coli*) или эукариотические клетки-хозяева (такие как клетка дрожжей, клетка насекомого или клетка позвоночного). Клетка-хозяин при культивировании в подходящих условиях может синтезировать белок или пептид, который затем будет собран из среды для культивирования (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из продуцирующей его клетки-хозяина (если он не секретируется).

После сбора NTP-пептид можно очистить с использованием способов, таких как хроматография на молекулярных ситах, аффинная хроматография и т. д. Выбор клетки-хозяина для получения белка или пептида будет зависеть отчасти от того, подлежит ли пептид гликозилированию или фосфорилированию (в случае чего эукариотические клетки-хозяева являются предпочтительными), и способа, при котором в клетке-хозяине пептид может укладываться в его нативную третичную структуру (например, соответствующая ориентация дисульфидных мостиков и т. д.) с тем, чтобы биологически активный белок получить с помощью пептида, который характеризуется биологической активностью, причем пептид может укладываться после синтеза при использовании соответствующих химических условий, как описано ниже. Подходящие клетки или линии клеток могут представлять собой клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), эмбриональные клетки почки человека (HEK) 293, клетки 293T или клетки 3T3. Выбор подходящих клеток-хозяев млекопитающих и способы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и получения и очистки продуктов известны в данной области. Другие подходящие клеточные линии млекопитающих представляют собой линии клеток COS-1 и COS-7 и линии клеток CV-1 обезьян. Дополнительные иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих включают линии клеток приматов и линии клеток грызунов, в том числе трансформированные линии клеток. Также подходящими являются нормальные диплоидные клетки, штаммы клеток, полученные в результате *in vitro* культивирования первичной ткани, а также первичные эксплантаты. Кандидатные клетки могут характеризоваться генетической дефектом по селектируемому гену или могут содержать доминантно действующий селектируемый ген. Другие подходящие линии клеток млекопитающих включают без ограничения клетки нейробластомы мыши N2A, HeLa, клетки мыши L-929, линии 3T3, полученных от мышей Swiss, Balb-c или NIH, линии клеток хомячка ВНК или HaK.

Аналогично применимыми в качестве клеток-хозяев, подходящих для вариантов осуществления настоящего изобретения, являются бактериальные клетки. Например, в качестве клеток-хозяев в области биотехнологии хорошо известны различные штаммы *E. coli* (например, HB101, DH5.alpha., DH10 и MC1061). Различные штаммы *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., другие *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. и т. п. также можно использовать в данном способе. Многие штаммы дрожжевых клеток, известные специалистам в данной области, также доступны в качестве клеток-хозяев для экспрессии полипептидов согласно вариантам осуществления настоящего изобретения.

Кроме того, если это необходимо, системы клеток насекомых можно использовать в способах согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Такие системы описаны, например, у Kitts et al. (Biotechniques, 14:810-817), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4:564-572) и Lucklow et al. (J. Virol, 67:4566-4579). Предпочтительными клетками насекомых являются Sf-9 и Hi5 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния).

Вставку (также обозначаемую как трансформация или трансфекция) вектора в выбранные клетки-

хозяева можно проводить с помощью таких способов, как осаждение хлоридом кальция, электропорация, микроинъекция, липофекция или способ на основе использования DEAE-декстрана. Выбранный способ будет отчасти зависеть от типа используемой клетки-хозяина. Эти способы и другие подходящие способы хорошо известны специалисту в данной области и изложены в данном документе, например, выше у Sambrook et al.

Клетки-хозяева, содержащие вектор (т.е. трансформированные или трансфицированные), можно культивировать с использованием стандартных сред, хорошо известных специалистам в данной области. Среды также могут содержать все нутриенты, необходимые для роста и выживания клеток. Подходящими средами для культивирования клеток *E. coli*, например, являются бульон Луриа (LB) и/или среда ТВ (TB). Подходящими средами для культивирования эукариотических клеток являются RPMI 1640, MEM, DMEM, все из которых могут быть обогащены сывороточными факторами и/или факторами роста, требующиеся для определенной культивируемой линии клеток. Подходящей средой для культивирования клеток насекомых является среда Грейса, обогащенная дрожжевым экстрактом, гидролизатом лактальбумина и/или фетальной бычьей сывороткой, если это необходимо. Как правило, антибиотик или другое соединение, применяемое для селективного роста трансформированных клеток, вносят в качестве добавки в среды. Используемое соединение будет обусловлено элементом, представленным селективируемым маркером, присутствующим в плазмиде, которой трансформируют клетку-хозяина. Например, если элемент, представленный селективируемым маркером, кодирует устойчивость к канамицину, то добавляемым в среду для культивирования соединением является канамицин.

Количество NTP-пептида, образовавшегося в клетке-хозяине, можно оценить с помощью стандартных способов, известных в данной области. Такие способы включают без ограничения вестерн-блоттинг, SDS-полиакриламидный гель-электрофорез, гель-электрофорез в неденатурирующих условиях разделение с помощью ВЭЖХ, масс-спектрометрия, иммунопреципитация и/или анализы активности, такие как анализы связывания ДНК на основе задержки электрофоретического сдвига геле.

Если белок или пептид сконструирован таким образом, что он подлежит секретированию из клеток-хозяев, то основную часть белка или пептида можно выявить в среде для культивирования. Полученные таким образом белки, как правило, не содержат аминоконцевого метионина, поскольку он удаляется во время секреции из клетки. Однако если белок или пептид не секретирован из клеток-хозяев, тогда он будет присутствовать в цитоплазме и/или ядре (в случае эукариотических клеток-хозяев) или в цитозоле (в случае грамотрицательных бактериальных клеток-хозяев), и он может содержать аминоконцевой метионин.

В случае NTP-пептида, расположенного в цитоплазме и/или ядре клетки-хозяина, клетки-хозяева, как правило, сначала разрушают механически или с помощью детергента с высвобождением внутриклеточного содержимого в буферный раствор. Пептид может быть выделен из данного раствора.

Выделение NTP-пептидов из раствора можно проводить с помощью ряда методик. Если NTP-пептид был синтезирован таким образом, что он содержит метку, такую как гексагистидин (например, пептид/hexaHis), или другой малый пептид, такой как FLAG (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), или кальмодулин-связывающий пептид (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния) на любом из своих карбокси- или аминоконцов, то его можно фактически очистить с помощью одностадийного способа путем пропускания раствора через колонку для аффинной хроматографии, где матрица колонки характеризуется высокой аффинностью в отношении метки или в отношении непосредственно белка (т.е. моноклональное антитело специфически распознает пептид). Например, полигистидин связывается с высокой аффинностью и специфичностью с никелем, цинком и кобальтом; таким образом, для очистки пептида/polyHis можно использовать аффинную хроматографию с иммобилизованными ионами металла, в которой используется смола для анализа аффинности на основе никеля (как используется в системе QIAexpress Qiagen или системе Xpress Invitrogen) или смола для анализа аффинности на основе кобальта (как используется в системе Talon BD Biosciences-CLONTECH) (см., например, Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York).

Если NTP-пептид получают без присоединенной метки и отсутствуют доступные антитела, то для очистки можно использовать другие хорошо известные способы. Такие способы включают без ограничения ионообменную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, хроматографию на молекулярных ситах, ВЭЖХ, нативный гель-электрофорез в комбинации с элюированием через гель и препаративное изоэлектрическое фокусирование (Isoprime machine/technique, Hoefer Scientific). В некоторых случаях для достижения повышенной чистоты можно комбинировать две или более из данных методик.

Если предполагается, что NTP-пептид будет находиться преимущественно внутриклеточно, то внутриклеточный материал (в том числе тельца включения в случае грамотрицательных бактерий) можно экстрагировать из клетки-хозяина с использованием стандартной методики, известной специалисту в данной области. Например, клетку-хозяина можно лизировать с высвобождением содержимого периплазмы/цитоплазмы с помощью пресса Френча, гомогенизации и/или обработки ультразвуком с последующим центрифугированием. Если пептид образовывал тельца включения в цитозоле, то тельца включения могут часто связываться с внутренней и/или наружной клеточными мембранами и таким образом

будут находиться преимущественно в осадочном материале после центрифугирования. Затем осадочный материал можно обрабатывать при крайних значениях pH или с помощью хаотропного средства, такого как детергент, гуанидин, производные гуанидина, мочевины или производные мочевины, в присутствии восстанавливающего средства, такого как дитиотреитол при щелочном показателе pH, или трискарбокситилфосфин при кислом значении pH, с высвобождением, разъединением и растворением телец включения. Затем пептид в своей в настоящей растворимой форме можно анализировать с использованием гель-электрофореза, иммунопреципитации и т. д. Если требуется выделить пептид, то выделение можно провести с использованием стандартных способов, таких как изложенные ниже и в Marston et al. *Meth. Enz.*, 182:264-275.

В некоторых случаях при выделении NTP-пептид может быть биологически неактивным. Различные способы рефолдинга или преобразования полипептида в его третичную структуру и образования дисульфидных связей можно использовать для восстановления биологической активности. Такие способы включают воздействие на растворимый полипептид средой с показателем pH, составляющим, как правило, выше 7, и присутствие хаотропного средства в определенной концентрации. Выбор хаотропного средства подобен выбору, осуществляемому для растворения телец включений, но, как правило, при более низкой концентрации и необязательно с использованием того же хаотропного средства, которое используется для растворения. В большинстве случаев раствор для рефолдинга/окисления будет также содержать восстанавливающее средство или восстанавливающее средство с его окисленной формой при определенном соотношении для получения определенного окислительно-восстановительного потенциала, обеспечивающего возможность перестановки дисульфидных связей, что приводит к образованию цистеинового(цистеиновых) мостика(мостиков) в белке. Некоторые из широко используемых окислительно-восстановительных пар включают цистеин/цистамина, глутатион (GSH)/дителибис GSH, хлорид меди, дитиотреитол (DTT)/дителиан DTT, 2-меркаптоэтанол (bME)/дителио-b(ME). Во многих случаях соразтворитель необходим для повышения эффективности рефолдинга, и наиболее типичные реагенты, используемые для этой цели, включают глицерин, полиэтиленгликоль с различной молекулярной массой и аргинин.

Если тельца включения NTP-пептида не образовались в достаточной степени в клетке-хозяине, то NTP-пептид будет находиться преимущественно в надосадочной жидкости после центрифугирования клеточного гомогената, при этом NTP-пептид можно выделить из супернатанта с использованием таких способов, которые изложены ниже.

В тех ситуациях, где предпочтительно частично или полностью выделить NTP-пептид, очистку можно выполнить с использованием стандартных способов, хорошо известных специалисту в данной области. Такие способы включают без ограничения разделение с помощью электрофореза с последующим электроэлюированием, различные типы хроматографии (иммуноаффинная, на молекулярных ситах и/или ионообменная) и/или жидкостную хроматографию высокого давления. В некоторых случаях для полной очистки может быть предпочтительным использованием одного из этих способов.

Кроме получения и очистки NTP-пептидов с помощью методик с использованием рекомбинантной ДНК, NTP-пептиды и их фрагменты, варианты, гомологи, слитые белки, пептидомиметики и производные можно получать с помощью способов химического синтеза (таких как твердофазный синтез пептидов) с использованием методик, известных из уровня техники, таких как изложенные в Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149, Houghten et al. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 82:5132, и Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. Такие пептиды можно синтезировать с метионином на аминоконце или без него. Химически синтезированные NTP-пептиды можно окислять с использованием способов, изложенных в данных цитируемых материалах, с образованием дисульфидных мостиков. Предполагают, что NTP-пептиды характеризуются биологической активностью, сопоставимой с пептидами, полученными рекомбинантным путем или выделенными из природных источников, и таким образом их можно использовать взаимозаменяемо с рекомбинантными или природными пептидами.

Композиции на основе химически модифицированного NTP-пептида, в которых пептид связан с полимером, включены в объем вариантов осуществления настоящего изобретения. Выбранный полимер, как правило, является водорастворимым, поэтому белок, к которому он присоединен, не осаждается в такой водной среде, как физиологическая среда. Выбранный полимер, как правило, модифицируют с получением одной реакционноспособной группы, такой как активный сложный эфир в случае ацилирования, или альдегид в случае алкилирования, таким образом, чтобы степень полимеризации можно было контролировать, что предусмотрено в способах настоящего изобретения. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. В объем пептидных полимеров включена смесь полимеров.

В некоторых случаях может быть желательным получение вариантов нуклеиновых кислот и/или аминокислот встречающихся в природе NTP-пептидов. Варианты нуклеиновой кислоты можно получать с помощью сайт-направленного мутагенеза, ПЦР-амплификации или других подходящих способов, где праймер(праймеры) имеет(имеют) точковые мутации (см. Sambrook et al. выше, и Ausubel et al. выше, в отношении описаний методик мутагенеза). Химический синтез с использованием способов, описанных Engels et al. выше, можно также использовать для получения таких вариантов. Также можно использо-

вать другие способы, известные специалистам в данной области.

Предпочтительными вариантами нуклеиновых кислот являются такие варианты, которые содержат нуклеотидные замены, обуславливающие предпочтительное использование кодонов в клетке-хозяина, которая подлежит использованию с целью получения NTP-пептидов. Такую оптимизацию кодонов можно определять с помощью компьютерных алгоритмов, в которые включены таблицы частоты использования кодонов, как, например, Ecohigh. Cod для предпочтительного использования кодонов высокоэкспрессируемых бактериальных генов предусмотрен в Wisconsin Package Version 9.0, университета Висконсина, Genetics Computer Group, Мадисон, Висконсин. Другие полезные таблицы частоты использования кодонов включают Celegans_high.cod, Celegans_low.cod, Drosophila_high.cod, Human_high.cod, Maize_high.cod и Yeast_high.cod. Другими предпочтительными вариантами являются такие варианты, которые кодируют консервативные аминокислотные замены, описанные выше (например, в которых заряд или полярность встречающейся в природе аминокислотной боковой цепи существенно не изменены в результате замены другой аминокислотой), по сравнению с диким типом, и/или такие, которые разработаны или с целью получения нового(новых) сайта(сайтов) гликозилирования, и/или фосфорилирования, или такие, которые разработаны для удаления существующего(существующих) сайта(сайтов) гликозилирования и/или фосфорилирования.

NTP-пептиды и их фрагменты, гомологи, варианты, слитые белки, пептидомиметики, производные и соли можно получить с использованием стандартных методик синтеза пептидов, известных специалистам в данной области. Эти методики включают способы химического сопряжения (см. Wunsch, E: "Methoden der organischen Chemie", Volume 15, Band 1+2, Synthese von Peptiden, thime Verlag, Stuttgart (1974), и Barrany, G.; Marrifield, R. B.: "The Peptides," eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volume 2, Chapter 1, pp. 1-284, Academic Press (1980)), методы ферментативного сопряжения (см. Widmer, F. Johansen, J. T., Carlsberg Res. Commun., Vol. 44, pp. 37-46 (1979); Kullmann, W.: "Enzymatic Peptide Synthesis", CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. (1987); и Widmer, F., Johansen, J. T. in "Synthetic Peptides in Biology and Medicines," eds. Alitalo, K., Partanen, P., Väterli, A., pp.79-86, Elsevier, Amsterdam (1985)), или комбинацию химических и ферментативных способов, если это является преимущественным для разработки и удешевления процесса. С помощью руководств, представленных в данном документе, специалисты в данной области способны варьировать пептидную последовательность NTP-пептида для получения гомолога, характеризующегося такой же или аналогичной биологической активностью (биоактивностью), как и исходный или нативный NTP-пептид.

Существуют предпочтения в использовании миметика определенного NTP-пептида, а не самого пептида. Как правило, пептидомиметики, являющиеся в большей степени биологически доступными, характеризуются длительным действием и могут быть дешевле, чем нативные белки и пептиды.

Пептидомиметики NTP-пептидов можно разработать с использованием методик комбинаторной химии и других методик, известных из уровня техники (см., например, Proceedings of the 20th European Peptide Symposium, ed. G. Jung, E. Bayer, pp. 289-336, и ссылки в этом документе). Примеры способов, известных из уровня техники, для структурной модификации пептида с целью получения пептидомиметика, включают инверсию хиральных центров остова, приводящую к образованию структур в виде D-аминокислотных остатков, которые могут, в частности на N-конце, приводить к повышенной стабильности в отношении протеолитического расщепления без нежелательного влияния на активность. Пример приведен в публикации "Tritiated D-ala.sup.l-Peptide T Binding", Smith C. S. et al., Drug Development Res. 15, pp. 371-379 (1988).

Вторым способом является изменение циклической структуры с целью обеспечения стабильности, например N на C внутри цепей имидов и лактамов (Ede et al. in Smith and Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). Пример этого представлен в конформационно ограниченных тимопентин-подобных соединениях, таких как соединения, раскрытые в патенте США №4457489 (1985), Goldstein, G. et al., раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей его полноте.

Третий способ заключается в замене пептидных связей в NTP-пептиде псевдопептидными связями, которые придают устойчивость к протеолизу. Был описан ряд псевдопептидных связей, которые, как правило, не нарушают пептидную структуру и биологическую активность. Одним примером такого подхода является замена ретроинвертированных псевдопептидных связей ("Biologically active retroinverso analogues of thymopentin", Sisto A. et al in Rivier, J. E. and Marshall, G. R. (eds) "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", Escom, Leiden (1990), pp. 722-773), и Dalpozzo, et al. (1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41:561-566, включенные в данный документ посредством ссылки). В соответствии с данной модификацией аминокислотные последовательности пептидов могут быть идентичными последовательностям пептидов, описанным выше, за исключением того, что одна или более пептидных связей замещены ретроинвертированной псевдопептидной связью. Предпочтительно наиболее близко расположенная к N-концу пептидная связь является замененной, поскольку такая замена будет придавать устойчивость к протеолизу экзопептидазами, действующими на N-конце.

Синтез пептидов с одной или более восстановленными ретроинвертированными псевдопептидными связями является известным в данной области (Sisto (1990) and Dalpozzo, et al. (1993), цитируется выше).

Таким образом, пептидные связи могут быть замещены непептидными связями, которые облегчают замещение аналогичной структуры, и, соответственно, биологической активности пептидомиметиком по отношению к исходному пептиду. Также можно провести дополнительные модификации путем замещения химических группы аминокислот другими химическими группами с аналогичной структурой. Другой подходящей псевдопептидной связью, которая, как известно, повышает стабильность к ферментативному расщеплению, без потери или с незначительной потерей биологической активности, является восстановленная изостерическая псевдопептидная связь (Couder, et al. (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:181-184, включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Таким образом, аминокислотные последовательности этих пептидов могут быть идентичными последовательностям пептида, за исключением того, что одна или более пептидных связей замещены изостерической псевдопептидной связью. Предпочтительно наиболее близко расположенная к N-концу пептидная связь является замененной, поскольку такая замена будет придавать устойчивость к протеолизу экзопептидазами, действующими на N-конце. Синтез пептидов с одной или более изостерическими псевдопептидными связями является известным в данной области (Couder, et al. (1993), цитируется выше). Другие примеры включают введение кетометиленовых или метилсульфидных связей с целью замещения пептидных связей.

Пептоидные производные NTP-пептидов представляют собой другой класс пептидомиметиков, которые сохраняют важные структурные детерминанты в отношении биологической активности, при этом у них удалены пептидные связи, что тем самым придает устойчивость к протеолизу (Simon, et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371, включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Пептоиды представляют собой олигомеры N-замещенных глицинов. Был описан ряд N-алкильных групп, при этом каждая соответствовала боковой цепи природных аминокислот (Simon, et al. (1992), цитируется выше и включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Некоторые или все из аминокислот пептида замещены N-замещенным глицином, соответствующим замещенной аминокислоте.

Разработке пептидомиметиков может способствовать определение третичной структуры исходного пептида с помощью ЯМР-спектроскопии, кристаллографии и/или компьютерного молекулярного моделирования. Такие методики способствуют разработке новых композиций с повышенной активностью, и/или повышенной биологической доступностью, и/или повышенной стабильностью по сравнению с исходным пептидом (Dean (1994), *BioEssays*, 16: 683-687; Cohen and Shatzmiller (1993), *J. Mol. Graph.*, 11: 166-173; Wiley and Rich (1993), *Med. Res. Rev.*, 13: 327-384; Moore (1994), *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 124-129; Hruby (1993), *Biopolymers*, 33: 1073-1082; Bugg et al. (1993), *Sci. Am.*, 269: 92-98, все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Непосредственно после определения потенциального пептидомиметика его можно синтезировать и анализировать с помощью изложенных в примерах ниже способов для определения его активности. Соединения пептидомиметиков, полученные с помощью вышеизложенных способов, характеризующиеся биологической активностью пептидов и аналогичной пространственной структурой, охвачены данным вариантом осуществления. Специалисту в данной области будет совершенно очевидным, что пептидомиметик можно получать из любых пептидов, имеющих одну или более модификаций, описанных выше. Кроме того, будет очевидно, что пептидомиметики данного варианта осуществления можно дополнительно применять для разработки еще более активных непептидных соединений, помимо их использования в качестве терапевтических соединений.

В настоящее время существует ряд организаций, которые способны синтезировать пептиды, описанные в данном документе. Например, с учетом последовательности NTP-пептида, организация может синтезировать пептид, отправлять синтезированный пептид с сопроводительной документацией и подтверждать идентичность пептида.

Варианты осуществления по настоящему изобретению направлены на способы лечения млекопитающих с состояниями, требующими удаления клеток, такими как доброкачественные и злокачественные опухоли, железистая (например, предстательной железы) гиперплазия, нежелательный рост волос на лице, бородавки и нежелательная жировая ткань, или подавление или предупреждение возникновения нежелательного клеточного пролиферата, такого как стеноз стента. Такой способ предусматривает введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества NTP-пептида в комбинации с дополнительным активным средством, или покрытие им устройства, такого как стент.

Дополнительное активное средство может представлять собой одно или более средств, выбранных из (i) противоопухолевых активных средств (как например: алкилирующих средств, ингибиторов топоизомеразы I, ингибиторов топоизомеразы II, антиметаболитов РНК/ДНК и антимитотических средств); (ii) активных средств для лечения доброкачественных новообразований, таких как активные средства против акне и против бородавок (салициловая кислота); (iii) антиандрогенных соединений (ципротерона ацетата (1 α ,2 β -метил-6-хлор-17- α -ацетокси-6-дегидропрогестерона), тамоксифена, ингибиторов ароматазы); (iv) блокаторов альфа-1-адренергических рецепторов (тамсулозина, теразозина, доксазозина, празозина, буназозина, индорамина, альфузозина, силодозина); (v) ингибиторов 5- α -редуктазы (финастерид, дутастерид); (vi) ингибиторов фосфодиэстеразы 5-го типа (PDE5) (тадалафил) и их комбинаций. Предпочти-

тельно активное средство выбрано из группы, состоящей из тамсулозина, финастерида, теразолина, доксазозина, празозина, тадалафила, альфузозина, силодозина, дутастерида, комбинаций дутастерида и тамсулозина и их смесей и комбинаций.

Состояние может представлять собой опухоли легкого, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, кости, яичника, кожи, почки, придаточной пазухи носа, толстого отдела кишечника, тонкого отдела кишечника, желудка, прямой кишки, пищевода, крови, головного мозга и его оболочек, спинного мозга и его оболочек, мышечной, соединительной ткани, надпочечника, паразитовидной железы, щитовидной железы, матки, семенника, гипофиза, органов размножения, печени, желчного пузыря, глаза, уха, носа, горла, миндалин, рта, лимфатических узлов и лимфоидной системы и других органов.

Предполагается, что используемый в данном документе термин "злокачественная опухоль" охватывает все формы карцином, сарком и меланом человека, которые возникают при низкодифференцированных, умереннодифференцированных и высокодифференцированных формах.

Данный вариант осуществления удовлетворяет потребность в данной области в видах лечения, с помощью которых можно удалять доброкачественные опухоли с меньшим риском и меньшим количеством нежелательных побочных эффектов хирургического вмешательства. Способ удаления доброкачественных опухолей в сложных для хирургического вмешательства участках, например расположенных в глубине тела (например, головном мозге, сердце, легких и других), является особенно необходимым.

Способ лечения состояний, при которых клетки должны быть удалены, можно использовать в сочетании со стандартными способами лечения таких состояний, с такими как удаление хирургическим путем, химиотерапия и лучевая терапия. В одном варианте осуществления предусмотрен способ введения композиции, содержащей NTP-пептид (либо отдельно, либо в комбинации с дополнительным активным средством), с последующим хирургическим вмешательством. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что у пациентов, которые получали NTP-пептид и впоследствии подвергнутых лечению с помощью хирургического вмешательства, улучшение IPSS составляло на приблизительно 15-150% больше, чем улучшение IPSS у пациентов, получающих плацебо и впоследствии подвергнутых лечению с помощью хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления улучшение находится в диапазоне от приблизительно 25 до приблизительно 100%, или от приблизительно 30% до приблизительно 75%, или от приблизительно 40% до приблизительно 65%.

Состояние, подлежащее лечению, может также представляет собой гиперплазию, гипертрофию или избыточный рост ткани, выбранной из группы, состоящей из легкого, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, кости, яичника, кожи, почки, придаточной пазухи носа, толстого отдела кишечника, тонкого отдела кишечника, желудка, прямой кишки, пищевода, крови, головного мозга и его оболочек, спинного мозга и его оболочек, мышечной, соединительной ткани, надпочечника, паразитовидной железы, щитовидной железы, матки, семенника, гипофиза, органов размножения, печени, желчного пузыря, глаза, уха, носа, горла, миндалин, рта, и лимфатических узлов, и лимфоидной системы.

Другие состояния, которые можно лечить с использованием способа согласно вариантам осуществления, представляют собой измененную в результате воздействия вирусов, бактерий или паразитов ткань, выбранную из группы, состоящей из легкого, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, кости, яичника, кожи, почки, придаточной пазухи носа, толстого отдела кишечника, тонкого отдела кишечника, желудка, прямой кишки, пищевода, крови, головного мозга и его оболочек, спинного мозга и его оболочек, мышечной, соединительной ткани, надпочечника, паразитовидной железы, щитовидной железы, матки, семенника, гипофиза, органов размножения, печени, желчного пузыря, глаза, уха, носа, горла, миндалин, рта, и лимфатических узлов, и лимфоидной системы.

Состояние, подлежащее лечению, может также представлять собой порок развития или нарушение ткани, выбранной из группы, состоящей из легкого, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, кости, яичника, кожи, почки, придаточной пазухи носа, толстого отдела кишечника, тонкого отдела кишечника, желудка, прямой кишки, пищевода, крови, головного мозга и его оболочек, спинного мозга и его оболочек, мышечной, соединительной ткани, надпочечника, паразитовидной железы, щитовидной железы, матки, семенника, гипофиза, органов размножения, печени, желчного пузыря, глаза, уха, носа, горла, миндалин, рта, и лимфатических узлов, и лимфоидной системы.

В частности, состояние, подлежащее лечению, может представлять собой гипертрофию миндалин, гиперплазию предстательной железы, псориаз, экзему, виды дерматоза или виды геморроя. Состояние, подлежащее лечению, может представлять собой сосудистое заболевание, такое как атеросклероз или артериосклероз, или сосудистое нарушение, такое как варикозное расширение вен, стеноз или рестеноз артерии или стента. Состояние, подлежащее лечению, может также представлять собой косметическое изменение ткани, такой как кожа, ткань глаза, уха, носа, горла, рта, мышечной, соединительной ткани, волос или ткани молочной железы.

Терапевтические композиции на основе NTP-пептидов могут содержать терапевтически эффектив-

ное количество NTP-пептида в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления дополнительное активное средство можно вводить в той же композиции, что и NTP-пептид, а в другом варианте осуществления композицию, содержащую NTP-пептид, вводят путем инъекции, причем дополнительное активное средство составлено в виде лекарственного препарата для перорального введения (геля, капсулы, таблетки, жидкости и т. д.). Вещество-носитель может представлять собой воду для инъекций, предпочтительно, обогащенную другими веществами, типичными для растворов для введения млекопитающим. Как правило, NTP-пептид для терапевтического применения будут вводить в виде композиции, содержащей очищенный пептид в сочетании с одним или более физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или разбавителями. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой иллюстративные подходящие носители. Предпочтительно препарат составлен в виде лиофилизата с использованием подходящих наполнителей (например, сахарозы). Другие стандартные носители, разбавители и наполнители можно включать при необходимости. Композиции согласно вариантам осуществления также могут содержать буферы, известные специалистам в данной области, с диапазоном подходящих показателей pH, в том числе трис-буфер с показателем pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер с показателем pH, составляющим приблизительно 4,0-5,5, которые могут дополнительно включать сорбит или его подходящий заменитель.

Применение NTP-пептидов, конъюгированных, или связанных, или соединенных с антителом, фрагментом антитела, антителоподобной молекулой или молекулой с высокой аффинностью к специфичному опухолевому маркеру,

такому как клеточный рецептор, сигнальный пептид или сверхэкспрессируемый фермент, для целенаправленного воздействия на нежелательные клеточные элементы у не подвергавшегося воздействию млекопитающего также охвачено объемом вариантов осуществления. Антитело, фрагмент антитела, антителоподобная молекула или молекула с высокой аффинностью к конкретному опухолевому маркеру используется для нацеливания конъюгата пептида на специфичную клетку-мишень или ткань-мишень. Например, опухоль с отличающимся поверхностным антигеном или экспрессируемым антигеном может быть подвергнута нацеливанию антителом, фрагментом антитела или антителоподобной связывающей молекулы, а опухолевые клетки могут быть уничтожены пептидом. Такой подход с использованием нацеливающего антитела имеет прогнозируемые преимущества, заключающиеся в снижении дозы, повышении вероятности связывания с целевыми клетками и захвата ими и повышенной применимости для целенаправленного воздействия на метастатические опухоли и опухоли микроскопического размера и их лечения.

Данный вариант осуществления также охватывает использование NTP-пептидов, конъюгированных, связанных или соединенных с белком или другой молекулой с образованием композиции, которая при расщеплении в участке(участках) опухоли или других нежелательных клеток или рядом с ним(ними) с помощью опухолеспецифичного или сайт-специфичного фермента или протеазы или с помощью конъюгата антитела, который целенаправленно воздействует на опухолевые или другие нежелательные клетки, высвобождает пептид в участке(участках) опухоли или других нежелательных клеток или рядом с ним(ними).

Данный вариант осуществления также охватывает применение NTP-пептидов, конъюгированных, связанных или соединенных с белком или другой молекулой с образованием композиции, которая высвобождает пептид или какой-либо биологически активный фрагмент пептида при воздействии на ткань, подлежащую обработке световым излучением (как при лазерной терапии или другой фотодинамической или фотоактивируемой терапии), другими формами электромагнитного излучения, как например: инфракрасное излучение, ультрафиолетовое излучение, рентгеновское излучение или гамма-излучение, местное тепловое, альфа- или бета-излучение, ультразвуковое излучение или другие источники локальной воздействующей энергии.

Варианты осуществления также охватывают терапевтические композиции на основе NTP-пептидов, в которых используют дендримеры, фуллерены и другие синтетические молекулы, полимеры и макромолекулы, в которых пептид и/или его соответствующая молекула ДНК конъюгированы с молекулой, полимером или макромолекулой, присоединены к ним или входят в их состав, либо отдельно, либо в сочетании с другими видами молекул, такими как опухолеспецифичный маркер. Например, в патенте США №5714166 "Биологически активные и/или целенаправленно воздействующие дендримерные конъюгаты" предусмотрен способ получения и применения, в числе прочего, дендритных полимерных конъюгатов, состоящих по меньшей мере из одного дендримера с целенаправленно воздействующим (целенаправленно воздействующими) направляющим средством (направляющими средствами) и по меньшей мере одного биоактивного средства, конъюгированного с ними. Раскрытие патента США №5714166 включено в данный документ посредством ссылки во всей его полноте.

Данный вариант осуществления также охватывает способы лечения млекопитающих с помощью терапевтических композиций на основе NTP-пептидов и/или генов и носителей для доставки лекарственных средств, таких как липидные эмульсии, мицеллярные полимеры, полимерные микросферы, электроактивные полимеры, гидрогели и липосомы, в комбинации с дополнительным активным средством.

Применение NTP-пептидов или родственных генов или эквивалентов генов, переносимых к нежелательным клеткам в млекопитающем, также охвачено вариантами осуществления. Сверхэкспрессия NTP-пептида в опухоли может быть использована для того, чтобы индуцировать гибель клеток в опухоли и таким образом уменьшить популяцию опухолевых клеток. Предполагается, что перенос гена или эквивалента гена NTP-пептида для лечения от нежелательных клеточных элементов имеет преимущество, заключающееся в требовании меньшей дозы и передаче потомству клеток целевых клеточных элементов, в результате чего возникает необходимость в менее частом проведении терапии и в меньшей суммарной терапии. Данный вариант осуществления также охватывает перенос генов, которые кодируют слитый белок, содержащий NTP-пептид, к нежелательным клеткам или соседним клеткам, в которых после экспрессии гена и продуцирования и/или секреции слитого белка слитый белок расщепляется либо нативными ферментами или протеазами, либо пролекарством с высвобождением NTP-пептида в нежелательных клетках или рядом с ними.

Применение клонированных рекомбинантных конъюгатов пептид-антитела; клонированных рекомбинантных конъюгатов пептид-фрагмент антитела и клонированных рекомбинантных конъюгатов пептид-антителоподобный белок для введения в целях лечения не подвергнутых обработке млекопитающих также охвачено объемом вариантов осуществления. Преимущества клонированного NTP-пептида в сочетании с нацеливающим конъюгатом (таким как антитело, фрагмент антитела, антителоподобная молекула или молекула с высокой аффинностью к опухолеспецифичному рецептору или другому опухолевому маркеру) заключаются в том, что в такой молекуле объединены преимущества нацеливания, описанные выше, в дополнение к преимуществам в получении и стандартизированном производстве клонированной конъюгированной молекулы.

Данный вариант осуществления также охватывает использованием терапевтических композиций на основе NTP-пептидов, генов или эквивалентов генов в качестве компонента покрытия медицинского устройства, такого как стент, с целью удаления, подавления или предупреждения образования нежелательного клеточного пролиферата или скопления клеток, в комбинации с дополнительным активным средством.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают без ограничения капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах дополнительное активное средство и/или NTP-пептид можно смешивать по меньшей мере с одним из следующих: (a) с одним или более инертными наполнителями (или носителем), такими как цитрат натрия или дикальция фосфат; (b) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота; (c) связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидин, сахароза и аравийская камедь; (d) увлажнители, такие как глицерин; (e) разрыхляющие средства, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные комплексные силикаты и карбонат натрия; (f) замедлители для растворов, такие как парафин; (g) ускорители абсорбции, такие как четвертичные соединения аммония; (h) смачивающие средства, такие как цетиловый спирт и глицеролмоностеарат; (i) адсорбенты, такие как каолин и бентонит; и (j) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы могут также содержать буферные средства.

Жидкие лекарственные формы для перорального применения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активных соединений, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы. Иллюстративные эмульгаторы представляют собой этиловый спирт, изопропиловый спирт, простой этиловый эфир угольной кислоты, простой этиловый эфир уксусной кислоты, бензиновый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, такие как хлопковое масло, арахисовое масло, масло зародышей кукурузы, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло, глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли, сложные эфиры жирных кислот и сорбитана или смеси этих веществ и им подобные.

Помимо таких инертных разбавителей, композиция может также включать вспомогательные средства, такие как смачивающие средства, эмульгирующие средства и суспендирующие средства, подсластители, вкусовые добавки и ароматизирующие средства.

Фактические уровни доз активных компонентов в композициях согласно вариантам осуществления можно варьировать с целью получения количества NTP-пептида и дополнительного активного средства, которое является эффективным для получения требуемого терапевтического ответа в случае определенных композиций и способа введения. Выбранный уровень доз, таким образом, зависит от требуемого терапевтического ответа, пути введения, требуемой продолжительности лечения и других факторов.

В случае млекопитающих, включая человека, эффективные количества можно вводить, исходя из площади поверхности тела. Взаимосвязь доз для животных разных размеров, видов и человека (исходя из мг/м² поверхности тела) описана E. J. Freireich et al., *Cancer Chemother. Rep.*, 50 (4):219 (1966). Площадь поверхности тела можно примерно определить, исходя из роста и веса индивидуума (см., например, Sci-

entific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y. pp. 537-538 (1970)).

Суммарная суточная доза NTP-пептида и дополнительного активного средства, вводимых хозяину, может быть в разовой и разделенных дозах. Композиции дозированных лекарственных форм могут содержать такие количества их своих дольных единиц, которые можно использовать для получения суточной дозы. Следует понимать, однако, что конкретный уровень дозы для любого определенного пациента будет зависеть от ряда факторов, в том числе веса тела, общего состояния здоровья, пола, питания, времени и пути введения, активности вводимого лекарственного средства, скоростей абсорбции и экскреции, комбинации с другими лекарственными средствами и тяжести определенного заболевания, подлежащего лечению.

Способ введения композиции на основе NTP-пептида в соответствии с вариантами осуществления включает без ограничения введение соединений внутримышечно, перорально, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, интрацеребрально (внутрипаренхиматозно), интрацеребровентрикулярно, интратуморально, внутриочагово, внутрикожно, интратекально, интраназально, интраокулярно, внутриартериально, местно, трансдермально, посредством аэрозоля, инфузии, болюсной инъекции, имплантируемого устройства, системы с замедленным высвобождением и т. д. Способ введения дополнительного активного средства предусматривает введение дополнительного активного средства вместе с NTP-пептидом или в отдельности, предпочтительно в виде препарата для перорального применения.

Другой способ введения NTP-пептида согласно вариантам осуществления представляет собой трансдермальный или чрескожный путь. Дополнительное активное средство можно использовать вместе с NTP-пептидом или можно вводить в отдельности, как описано выше. Одним примером такого варианта осуществления является использованием пластыря. В частности, пластырь можно изготовить с тонкодисперсной суспензией пептида, например в диметилсульфоксиде (DMSO) или смеси DMSO с хлопковым маслом, и приводить в контакт с кожей млекопитающих, несущих опухоль, вдали от участка расположения опухоли внутри кожного кармана. Другие среды и их смеси с растворителями и твердыми носителями будут в равной степени хорошо функционировать. Пластырь может содержать соединение пептида в форме раствора или суспензии. Затем пластырь можно поместить на кожу пациента, например с помощью вставки в кожный карман пациента, образованный посредством захватывания кожи в складку и удерживания ее вместе с помощью швов, зажимов или других удерживающих устройств. Этот карман необходимо использовать таким образом, чтобы был обеспечен непрерывный контакт с кожей без вмешательства со стороны млекопитающего. Помимо применения кожного кармана, можно использовать любое устройство, с помощью которого обеспечивается прочное приведение пластыря в контакт с кожей. Например, для удерживания пластыря на месте на коже можно использовать адгезивную повязку.

NTP-пептиды в комбинации с дополнительным активным средством можно вводить в составе или препарате с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые полимерные матрицы в виде изделий определенной формы, например пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением включают сложные полиэфир, гидрогели, полилактиды (патент США №3773919, EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556), поли(2-гидроксипропилиметакрилат) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277, и Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988). Композиции с замедленным высвобождением также могут включать липосомы, которые можно получить посредством любого из нескольких способов, известных из уровня техники (например, Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692; EP 36,676; EP 88,046; и EP 143,949).

Другой способ введения NTP-пептида согласно вариантам осуществления заключается в прямой или не прямой инфузии NTP-пептида в опухолевую или другую ткань, подлежащую лечению. В данном варианте осуществления дополнительное активное средство, как правило, будут вводить посредством пути введения, отличного от пути введения для NTP-пептида. Одним примером такого варианта осуществления является инъекция NTP-пептида непосредственно в опухолевую или другую ткань, подлежащую лечению. Лечение может состоять из одной инъекции, нескольких однократных инъекций или ряда инъекций в течение периода времени, составляющего часы, дни или месяцы, при этом регрессию или разрушение опухолевой или другой ткани, подлежащей лечению, контролируют с помощью биопсии, визуализации или других способов контроля тканевого роста. Инъекцию в опухолевую или другую ткань, подлежащую лечению, можно осуществлять с помощью устройства, вводимого в отверстие, такое как нос, рот, ухо, влагалище, прямая кишка или мочеиспускательный канал, для достижения опухоли или ткани *in vivo*, и можно выполнять в сочетании с системой визуализации или оптической системой, такой как ультразвуковой или оптоволоконный эндоскоп, для выявления подходящего участка для инъекции(инъекций). Другим примером такого варианта осуществления является использование устройства, которое может обеспечить постоянную инфузию NTP-пептида в ткань в течение периода времени.

Другой способ введения NTP-пептида и дополнительного активного средства согласно вариантам осуществления предусмотрен в сочетании с хирургической или аналогичной процедурой, используемой для физического удаления, абляции или иного уничтожения или разрушения опухолевой или другой ткани или клеточных элементов, которые необходимо или желательно удалить или разрушить, при этом

NTP-пептид вариантов осуществления вводят в прилегающий(прилегающие) участок(участки), окружающий(окружающие) участок(участки), в которых опухолевая или другая ткань была устранена с целью разрушения или задержки роста любых опухолевых клеток или других клеточных элементов, не устраненных или не разрушенных с помощью этой процедуры.

Другой способ введения NTP-пептида согласно вариантам осуществления заключается в имплантации устройства в опухолевую или другую ткань, подлежащую лечению. В данном варианте осуществления дополнительное активное средство, как правило, будут вводить посредством пути введения, отличного от пути введения для NTP-пептида. Одним примером такого варианта осуществления является имплантация капсулы-имплантата, содержащей пептид, в опухолевую или другую ткань, подлежащую лечению, и введение дополнительного активного средства посредством перорального введения.

Капсула высвобождает терапевтическую дозу NTP-пептида в ткань с течением времени. Альтернативно или дополнительно композицию можно вводить местно посредством имплантации в пораженный участок мембраны, губки или другого соответствующего материала, на котором был абсорбирован NTP-пептид. При использовании имплантационного устройства данное устройство можно имплантировать в любую подходящую ткань или орган, при этом доставка пептида может осуществляться непосредственно через устройство с помощью болюсного или непрерывного введения, или посредством катетера с помощью непрерывной инфузии.

Альтернативным способом введения является введение одной или более копий гена, кодирующего NTP-пептид, в клетку, подлежащую целенаправленному воздействию, и при необходимости индукция копии(копий) гена для начала продуцирования пептида внутриклеточно. В данном варианте осуществления дополнительное активное средство, как правило, будут вводить посредством пути введения, отличного от пути введения для NTP-пептида. Один способ, в котором может быть использована генная терапия, заключается в применении гена, кодирующего NTP-пептид (либо геномной ДНК, кДНК и/либо синтетической ДНК, кодирующей пептид (или его фрагмента, варианта, гомолога или производного)), который может быть функционально связан с конститутивным или индуцируемым промотором с образованием конструкции ДНК для генной терапии. Промотор может быть гомологичным или гетерологичным по отношению к эндогенному гену, кодирующему пептид, при условии, что он является активным в типе клетки или ткани, в которую конструкция будет встроена. Другие компоненты конструкции ДНК для генной терапии могут включать при необходимости молекулы ДНК, сконструированные для сайт-специфической интеграции (например, эндогенные фланкирующие последовательности, применимые для гомологической рекомбинации), тканеспецифичный промотор, энхансер(энхансеры) или сайленсер(сайленсеры), молекулы ДНК, способные обеспечивать селективное преимущество по отношению к родительской клетке, молекулы ДНК, применимые в качестве меток для идентификации трансформированных клеток, системы отрицательного отбора, связывающие средства, специфичные по отношению к клеткам (как, например, в случае целенаправленного воздействия на клетку), факторы интернализации, специфичные по отношению к клеткам, и факторы транскрипции для усиления экспрессии с помощью вектора, а также факторы для обеспечения получения векторов.

Средства для доставки генов в клетку или ткань *in vivo* включают (без ограничения) прямую инъекцию "голой" ДНК, баллистические способы, опосредованный липосомами перенос, опосредованный рецепторами перенос (комплекс лиганд-ДНК), электропорацию и осаждение фосфатом кальция. См. патенты США №№4970154, WO 96/40958, патент США №5679559, патент США №5676954 и патент США №5593875, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Они также включают использование вирусного вектора, такого как ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, поксвирус, лентивирус, вирус папилломы или вирус простого герпеса, использование конъюгата ДНК-белок и использование липосомы. Использование векторов для генной терапии описано, например, в патенте США № 5672344, патенте США №5399346, патенте США №5631236 и патенте США №5635399, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Ген, кодирующий NTP-пептид, может быть доставлен посредством имплантации в определенные клетки пациентов, которые были генетически сконструированы *ex vivo* с помощью таких способов, как описанные в данном документе, с целью экспрессии и секреции NTP-пептида или его фрагментов, вариантов, гомологов или производных. Такие клетки могут представлять собой клетки животных или человека, и они могут быть получены из собственной ткани пациента или из другого источника, либо относящегося к человеку, либо не относящегося к человеку. Необязательно клетки могут быть иммортализованными или стволовыми клетками. Однако с целью снижения вероятности иммунологического ответа предпочтительно, чтобы клетки были инкапсулированы во избежание инфильтрации окружающих тканей. Материалы для инкапсулирования, как правило, являются биологически совместимыми, полупроницаемыми полимерными оболочками или мембранами, которые обеспечивают высвобождение белково(белковых) продукта(продуктов), однако предупреждают разрушение клеток иммунной системой пациента или другими разрушительными факторами окружающей тканей. Способы, используемые для инкапсулирования мембраны клеток, известны специалисту в данной области, и получение инкапсулированных клеток и их имплантацию в пациентов можно выполнить без лишних экспериментов. См., на-

пример, патенты США №№ 4892538; 5011472 и 5106627, раскрытия каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Система для инкапсулирования живых клеток описана в РСТ WO 91/10425. Методики разработки ряда других средств для доставки с замедленным или контролируемым высвобождением, таких как липосомные носители, биоразрушаемые частицы или гранулы, также известны специалистам в данной области и описаны, например, в патенте США № 5653975, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей его полноте. Клетки с инкапсулированием или без него можно имплантировать в подходящие ткани или органы организма пациента.

Особо предпочтительные варианты осуществления способов лечения нарушения, при котором требуется устранение или разрушение клеток, путем введения одного или более NTP-пептидов и дополнительных активных средств согласно вариантам осуществления, при этом клетками, подлежащими устранению или разрушению, является лимфоидная ткань. Другие предпочтительные варианты осуществления включают лечение состояний, при которых требуется устранение или разрушение клеток, таких как любые из, выбранные из, в отдельности или в комбинации, гипертрофии миндалин, гиперплазии предстательной железы, сосудистого заболевания (атеросклероза или артериосклероза), геморроя, варикозного расширения вен, псориаза, экземы, дерматоза и косметического изменения ткани. Другие подлежащие лечению состояния включают стеноз, рестеноз, окклюзию или закупорку артерии или стента, помещенного или имплантированного в артерию. Подходящая ткань, которую можно лечить в предпочтительных вариантах осуществления, включает в себя кожу, ткань глаза, носа, горла, рта, мышечную, соединительную ткань, волосы и ткань молочной железы.

Другими предпочтительные состояния, лечение которых осуществляют в соответствии с вариантами осуществления, включают в себя такие, которые выбраны из воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, метаболического заболевания, наследственного/генетического заболевания, травматического заболевания или физического повреждения, болезни недостаточности питания, инфекционного заболевания, амилоидоза, фиброза, болезни накопления, врожденного порока развития, заболевания, вызванного недостаточностью ферментов, отравления, интоксикации, заболевания, вызываемого загрязнением окружающей среды, лучевой болезни, эндокринной болезни, дегенеративной болезни и болезни, вызванной механическими причинами. В другом предпочтительном варианте осуществления пептид конъюгирован, связан или соединен с молекулой, выбранной из антитела, фрагмента антитела и антителоподобной связывающей молекулы, при этом указанная молекула характеризуется более высокой аффинностью связывания с опухолью или другой мишенью, чем с другими клетками. В другом варианте осуществления пептид представляет собой часть одной новой клонированной рекомбинантной молекулы, состоящей из пептида и молекулы, выбранной из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела и антителоподобной связывающей молекулы, при этом молекула характеризуется более высокой аффинностью связывания с опухолью или другой мишенью, чем при связывании с другими клетками.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения ВРН, который предусматривает введение терапевтически эффективного количества NTP-пептида, в частности выделенного пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO. 66 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu), в комбинации по меньшей мере с одним активным средством, выбранным из группы, состоящей из (1) ингибитора 5 α -редуктазы и/или антиэстрогена, (2) ингибитора 5 α -редуктазы и/или ингибитора ароматазы, (3) ингибитора 5 α -редуктазы и/или ингибитора 17 β -HSD, (4) ингибитора 5 α -редуктазы, антиэстрогена и ингибитора ароматазы, (5) ингибитора 5 α -редуктазы, антиэстрогена и ингибитора 17 β -HSD, (6) ингибитора 5 α -редуктазы, ингибитора ароматазы, антиэстрогена и ингибитора 17 β -HSD, (7) ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена и антиэстрогена, (8), ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена и ингибитора ароматазы, (9) ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена и ингибитора 17 β -HSD, (10) ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена, антиэстрогена и ингибитора ароматазы, (11) ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена, ингибитора ароматазы и ингибитора 17 β -HSD, (12) ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена, ингибитора ароматазы, антиэстрогена и ингибитора 17 β -HSD, (13) ингибитора 17 β -HSD и антиэстрогена, (14) ингибитора 17 β -HSD и ингибитора ароматазы, (15) ингибитора 17 β -HSD, ингибитора ароматазы и антиэстрогена, (16) ингибитора 17 β -HSD, антиандрогена и антиэстрогена, (17) ингибитора 17 β -HSD и ингибитора ароматазы, (18) ингибитора 17 β -HSD, антиандрогена, антиэстрогена и ингибитора ароматазы, (19) антиэстрогена и ингибитора ароматазы, (20) антиэстрогена, ингибитора ароматазы и антиэстрогена, (21) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы и антиэстрогена, (22) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы и ингибитора ароматазы, (23) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы и ингибитора 17 β -HSD, (24) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, антиэстрогена и ингибитора ароматазы, (25) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, антиэстрогена и ингибитора 17 β -HSD, (26) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, ингибитора ароматазы, антиэстрогена и ингибитора 17 β -HSD, (27) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена и антиэстрогена, (28) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -

редуктазы, антиандрогена и ингибитора ароматазы, (29) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена и ингибитора 17 β -HSD, (30) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена, антиэстрогена и ингибитора ароматазы, (31) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена, ингибитора ароматазы и ингибитора 17 β -HSD, (32) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 5 α -редуктазы, антиандрогена, ингибитора ароматазы, антиэстрогена и ингибитора 17 β -HSD, (33) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 17 β -HSD и антиэстрогена, (34) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 17 β -HSD и ингибитора ароматазы, (35) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 17 β -HSD, ингибитора ароматазы и антиэстрогена, (36) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 17 β -HSD, антиандрогена и антиэстрогена, (37) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 17 β -HSD, антиандрогена и ингибитора ароматазы, (38) агониста или антагониста LHRH, ингибитора 17 β -HSD, антиандрогена, антиэстрогена и ингибитора ароматазы, (39) агониста или антагониста LHRH, антиэстрогена и ингибитора ароматазы и (40) агониста или антагониста LHRH, антиэстрогена, ингибитора ароматазы и антиандрогена.

Следующие примеры приведены для иллюстрации вариантов осуществления по настоящему изобретению. Однако следует понимать, что варианты осуществления не ограничены конкретными условиями или подробностями, описанными в этих примерах. Во всем описании любая и все ссылки на документ, находящийся в публичном доступе, в том числе патент США, особым образом включены посредством ссылки. В частности, варианты осуществления специально включают посредством ссылки примеры, содержащиеся в публикациях заявки на патент США, находящихся на рассмотрении №№ 2003/0054990 (в настоящее время аннулирована); 2007/0237780 (в настоящее время аннулирована); 2003/0054990 (в настоящее время патент США № 7172893); 2003/0096350 (в настоящее время патент США №6924266); 2003/0096756 (в настоящее время патент США №7192929); 2003/0109437 (в настоящее время патент США №7241738); 2003/0166569 (в настоящее время патент США №7317077) и 2005/0032704 (в настоящее время патент США №7408021), в каждой из которых показано, что определенные описанные пептиды являются эффективными средствами, чтобы вызывать гибель клеток *in vivo* в мышечной ткани, подкожной соединительной ткани, дерме и другой ткани здоровых грызунов.

Пример 1.

В исследовании, включающем 97 пациентов, которые ранее принимали или ранее никогда не принимали стандартные одобренные лекарственные препараты для перорального введения для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ВРН), пациенты получали в двойном слепом режиме однократную инъекцию конкретного пептида, описанного аминокислотной последовательностью Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu (далее в данном документе "ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО") (n=61) или среду отдельно (плацебо) (n=36) и находились под клиническим контролем и наблюдением в течение 2-5 лет. Уролог посредством внутривенной инъекции вводил пациентам с ВРН либо а) ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО в фосфатно-буферном солевом растворе с pH 7,2 ("PBS"), либо б) PBS отдельно в условиях двойного слепого режима, в условиях медицинского учреждения под контролем ультразвукового исследования. Контроль и наблюдение за пациентами осуществляли в течение 2-5 лет с проведением регулярных физикальных осмотров, лабораторных тестов и оценок симптомов. Пациентов, которые а) получали ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, а затем получали в дополнение стандартные лекарственные препараты для перорального введения, используемые для лечения ВРН, в том числе альфа-блокаторы, такие как тамсулозин, теразозин, доксазозин, силодозин и т. д., или ингибиторы 5-альфа-редуктазы, такие как финастерид, дутастерид, или ингибиторы фосфодиэстеразы 5-го типа (PDE5), такие как тадалафил, или их комбинации, сравнивали с пациентами, которые б) получали только инъекции среды (PBS), а затем получали стандартные лекарственные препараты для перорального применения, такие как описанные в а) выше.

Симптоматическую оценку измеряли с помощью Международной шкалы суммарной оценки симптомов при заболеваниях предстательной железы (IPSS), которая представляет собой количественную шкалу, используемую для оценки улучшения или ухудшения симптомов при заболеваниях предстательной железы. С помощью IPSS количественно оценивали следующее: 1) неполное опорожнение мочевого пузыря после мочеиспускания; 2) частое мочеиспускание; 3) прерывистость процесса мочеиспускания; 4) срочный позыв помочиться; 5) слабость струи при мочеиспускании; 6) необходимость проталкивания мочи и напряжения во время мочеиспускания; 7) необходимость мочиться после отхождения ко сну ночью (ноктурия). Разницу от IPSS исходного уровня сравнивали у пациентов, которым ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО совместно со стандартными лекарственными препаратами для перорального введения, по сравнению с пациентами, которые принимали только PBS совместно со стандартными лекарственными препаратами для перорального введения для лечения ВРН. Неожиданным было то, что результаты лечения лекарственным препаратом для перорального введения у субъектов, которые получали разовую предварительную инъекцию лекарственного средства, превосходили результаты лечения лекарственным препаратом для перорального введения в случае субъектов, которые получали предварительную инъекцию только среды. Результаты кратко изложены в табл. 4.

Таблица 4

Группа	N	Лечение	Продолжительность после лечения	Улучшение среднего балла IPSS
ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО вместе с дополнительным лекарственным препаратом для перорального введения	61	ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО	2-5 лет	7,61* (станд. откл. 6,85)
ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО вместе с дополнительным лекарственным препаратом для перорального введения	36	PBS	2-5 лет	5,44 (станд. откл. 6,51)

* $p < 0,01$ по сравнению с ожидаемым средним улучшением в 4 балла в случае лечения только лекарственным средством для перорального введения.

В соответствии с этим примером использование NTP-пептида в комбинации с дополнительным лекарственным препаратом для перорального введения при лечении ВРН обеспечивало улучшение среднего балла IPSS по сравнению с контролем на приблизительно 40%.

Пример 2.

В исследовании, включающем 30 пациентов, которые ранее никогда не принимали стандартные одобренные препараты для перорального введения для лечения ВРН, пациенты получали в двойном слепом режиме однократную инъекцию ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ($n=21$) или среды отдельно (плацебо) ($n=9$) и находились под клиническим контролем и наблюдением в течение 2-5 лет. Пациентов из обеих из вышеуказанных групп введения лекарственного средства и плацебо, включающего только носитель, которые ранее не получали стандартных лекарственных препаратов для перорального введения, а затем перешли на стандартные лекарственные препараты для перорального введения, оценивали в отношении их ответов на стандартные препараты для перорального введения для лечения ВРН. Неожиданно было то, что пациенты, которые получали лечение ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ, характеризовались значимо более высоким улучшением ожидаемого симптоматического ответа на лечение ВРН после стандартного лекарственного препарата для перорального введения для лечения ВРН (среднее улучшение, составляющее 7,48 баллов по шкале оценки симптомов по сравнению с ожидаемым улучшением, составляющим 3-5 баллов в случае лечения стандартным лекарственным средством для перорального введения отдельно, $p < 0,02$), тогда как пациенты в группе плацебо, включающего только среду, не отмечали этого (среднее улучшение составило 2,33 балла по сравнению с ожидаемым улучшением, составляющим 3-5 баллов).

В соответствии с этим примером использование NTP-пептида в комбинации с дополнительным лекарственным препаратом для перорального введения при лечении ВРН обеспечивало улучшение среднего балла IPSS по сравнению с контролем на приблизительно 221%.

Пример 3.

В другом исследовании уролог посредством внутривенной инъекции вводил пациентам с ВРН носитель отдельно в виде PBS с pH 7,2 в условиях двойного слепого режима, в условиях медицинского учреждения под контролем ультразвукового исследования. Контроль и наблюдение за пациентами осуществляли в течение 1-3 лет с проведением регулярных физикальных осмотров, лабораторных тестов и оценок симптомов. Пациентов, которые получали инъекции только носителя PBS и которые затем дополнительно получали стандартные лекарственные препараты для перорального введения, используемые для лечения ВРН, такие как альфа-блокаторы, оценивали до и после получения дополнительной инъекции лекарственного средства в фосфатно-буферном солевом растворе с pH 7,2 ("PBS"). Симптоматическую оценку измеряли с помощью Международной шкалы суммарной оценки симптомов при заболеваниях предстательной железы (IPSS), которая представляет собой количественную шкалу, используемую для оценки улучшения или ухудшения симптомов при заболеваниях предстательной железы. Разницу от IPSS исходного уровня сравнивали у пациентов, которым вводили в двойном слепом режиме только PBS совместно со стандартными лекарственными препаратами для перорального введения, с результатами у тех же самых пациентов, принимавших лекарственные препараты для перорального применения после перехода на ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО. Неожиданно было обнаружено, что симптоматические результаты были намного лучше у субъектов, принимавших лекарственные препараты для перорального введения для лечения ВРН, после инъекции ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА по сравнению с предыдущими результатами у тех же самых субъектов, получавших только носитель в слепом режиме. Результаты кратко изложены в табл. 5.

Таблица 5

Группа	N	Лечение	Продолжительность после лечения	Улучшение среднего балла IPSS
ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО	3	PBS + лекарственный препарат для перорального введения + ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО	1-3 года, повторная оценка через 6 месяцев	11,83* (станд. отклон. 4,17)
Контроль	3	PBS + лекарственный препарат для перорального введения	1-3 года	5,67 (станд.отклон. 512)

* $p < 0,05$ по сравнению с ожидаемым средним, составляющим 4 балла, в случае лечения только лекарственным средством для перорального введения.

В соответствии с этим примером использование NTP-пептида в комбинации с дополнительным лекарственным препаратом для перорального введения при лечении ВРН обеспечивало улучшение среднего балла IPSS по сравнению с контролем на приблизительно 110%.

Пример 4.

973 пациента, которых ранее никогда не подвергали хирургическим процедурам по причине ВРН (в том числе всем типам хирургических процедур, таким как трансуретральная резекция предстательной железы, лазерная абляция, микроволновая пункционная абляция и другие минимально инвазивные хирургические виды лечения), получали в двойном слепом режиме однократную инъекцию ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА или только среды (плацебо) и находились под клиническим контролем и наблюдением в течение 2-5 лет. Всех (N=58) пациентов из вышеуказанных групп лекарственного средства и плацебо, включающего только среду, которых ранее не подвергали хирургическому лечению по причине ВРН и которых затем подвергали хирургическому лечению по причине ВРН (N=58), затем оценивали в отношении их ответов на хирургические процедуры. Неожиданным было то, что у пациентов, которые получали лечение ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ (n=31), был значимо лучший ожидаемый симптоматический ответ на лечение ВРН после хирургического вмешательства (среднее улучшение, составляющее 15,3 балла по шкале оценки симптомов по сравнению с ожидаемым улучшением, составляющим 10 баллов, $p=0,001$), тогда как у пациентов в группе только среды (плацебо) (n=27) не отмечали этого (среднее улучшение, составляющее 10,8 балла по сравнению с ожидаемым улучшением, составляющим 10 баллов).

В соответствии с этим примером использование NTP-пептида перед хирургическим лечением обеспечивало улучшение среднего балла IPSS по сравнению с контролем на приблизительно 142%.

Результаты из вышеизложенных примеров иллюстрируют неожиданный превосходящий эффект NTP-пептидов в комбинации с одним или более дополнительными активными средствами в лечении млекопитающих, у которых имеется состояние, при котором требуется устранение или разрушение нежелательных клеточных пролифератов. Специалистам в данной области будет очевидно, что различные модификации и вариации могут быть выполнены в способах и композициях согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, без отклонения от идеи или объема вариантов осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы у млекопитающего, заключающийся в том, что млекопитающему вводят путем внутривенной инъекции композицию, содержащую пептид аминокислотной последовательности Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu в терапевтически эффективном количестве и перорально - по меньшей мере один альфа-1-адреноблокатор, выбранный из тамсулозина, теразозина, доксазозина, празозина, альфузолина и силодозина.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что пептид и альфа-1-адреноблокатор вводят одновременно или альфа-1-адреноблокатор вводят после лечения пептидом.

