

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043861**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.29**

(21) Номер заявки  
**202200151**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.08.10**

(51) Int. Cl. **C07K 5/10** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 38/07** (2006.01)

(54) **СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ**(31) **2020119551**(32) **2020.06.11**(33) **RU**(43) **2023.02.03**(86) **PCT/RU2021/050257**(87) **WO 2021/251850 2021.12.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ  
МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА  
МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)  
(RU)**

(72) Изобретатель:

**Замятин Андрей Александрович,  
Руджиньска Магдалена, Пароди  
Алессандро, Савватеева Людмила**

**Владимировна, Гороховец Неонила  
Васильевна, Макаров Владимир  
Алексеевич, Тарасов Вадим  
Владимирович (RU)**

(56) RUDZISKA, M. et al.: "Cysteine Cathepsins Inhibition Affects Their Expression and Human Renal Cancer Cell Phenotype", *Cancers*, published: 21 May 2020, vol. 12, № 5, 1310, p. 1-20, DOI: 10.3390/cancers12051310, in particular, abstract, c. 2, last paragraph, chapter 2.2, chapter 2.3, p.11, paragraph 3, p.12, paragraph 2, fig. 4a, s, d, chapter 5

SCHOTTE R. et al.: "Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases", *FEBS letters*, 1999, vol. 442, № 1, p. 117-121, abstract, chapter 4, discussion

GOROKHOVETS N.V. et al.: "Rational Design of Recombinant P apain-Like Cysteine Protease: Optimal Domain Structure and Expression Conditions for Wheat-Derived Enzyme Triticain-alpha", *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18, 1395, p. 1-17, DOI: 10.3390/ijms18071395, abstract

RASNICK D.: "Synthesis of peptide fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B", *Analytical biochemistry*, 1985, vol. 149, p. 461-465, abstract, table 1

RAUBER R. et al.: "The synthesis of peptidylfluoromethanes and their properties as inhibitors of serine proteinases and cysteine proteinases", *Biochem. J.*, 1986, vol. 239, p. 633-440, abstract, table 1

FRANSOLET M. et al.: "In vitro evaluation of the anti-apoptotic drug Z-VAD-FMK on human ovarian granulosa cell lines for further use in ovarian tissue transplantation", *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2015, 32, p. 1551-1559, DOI: 10.1007/s10815-015-0536-9, abstract

**RU-C2-2692799**

(57) Изобретение относится к биоинженерии. Предложено применение синтетических пептидов (пептидных соединений) в качестве специфических ингибиторов цистеиновых катепсинов. Синтетические пептиды представляют собой соединения с общей формулой R1-PEPT-R2, где PEPT - одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE; R1 - одна из защитных групп: ацетильная, бензилоксикарбонильная или отсутствует; R2 - производные фторметилкетона (ФМК) или хлорметилкетона (СМК). Предложенные пептиды обладают высокой аффинностью к каталитической триаде цистеиновых катепсинов и могут быть использованы для создания терапевтических средств, являющихся специфическими ингибиторами протеолитических процессов с участием цистеиновых катепсинов, в частности процессов онкогенеза.

**B1****043861****043861****B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к биоинженерии, а именно к пептидам (пептидным соединениям), обладающим высокой аффинностью к каталитической триаде цистеиновых катепсинов, и может быть использовано для создания терапевтических средств, являющихся специфическими ингибиторами протеолитических процессов с участием цистеиновых катепсинов.

### Уровень техники

Цистеиновые катепсины являются гомологичными протеиназами клана СА цистеиновых пептидаз, экспрессирующимися в различных клетках и тканях многих видов организмов [Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., Finn, R.D. (2018), The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Res.*, 46, D624-D632]. В геноме человека идентифицировано 11 цистеиновых катепсинов: В, С, F, Н, К, L, O, S, V, W и X(Z), которые проявляют разнообразную каталитическую активность. Так, катепсины F, O, S, K, V, L и W представляют собой эндопептидазы с широкой субстратной специфичностью; катепсины Н и В обладают как эндо-, так и экзопептидазной активностью, тогда как катепсины С и X являются исключительно аминок- и карбоксипептидазой соответственно. Наибольшую активность цистеиновые катепсины проявляют в средах с пониженными значениями pH, вследствие чего изначально считалось, что функционирование этих ферментов ограничивается лизосомами и эндосомами. Однако появляется все больше данных о высокоспецифичной и направленной протеолитической активности катепсинов в других компартментах клеток, таких как секреторные везикулы, цитозоль и ядро, а также вне клеток [Spira, D., Stypmann, J., Tobin, D.J., Petermann, I., Mayer, C., Hagemann, S., Vasiljeva, O., Giinther, T., Schüle, R., Peters, C., Reinheckel, T. (2007), Cell type-specific functions of the lysosomal protease cathepsin L in the heart, *J. Biol. Chem.*, 282, 37045-37052]. Основной функцией катепсинов является низкоспецифичная деградация белков в лизосоме, однако некоторые представители этой группы ферментов выполняют и другие функции. Так, например, катепсины В, Н, L, S, К задействованы в процессе апоптоза [Boya, P., Kroemer, G. (2008), Lysosomal membrane permeabilization in cell death, *Oncogene*, 27, 6434-6451; Repnik, U., Cesen, M.H., Turk, B. (2013), The Endolysosomal System in Cell Death and Survival, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a008755-a008755], а катепсины S, F, L и V участвуют в презентации антигенов МНС класса II [Sadegh-Nasser, S., Kim, A. (2015), MHC class II auto-antigen presentation is unconventional, *Front. Immunol.*, 6, 372.].

Таким образом, цистеиновые катепсины выполняют различные функции в клетках и тканях, однако их активность должна строго регулироваться. Совокупность таких факторов как локализация (преимущественно в лизосомах), экспрессия эндогенных ингибиторов (цистатинов) низкие уровни pH (для оптимальной работы) катепсинов ограничивают область их действия и позволяют организму предотвращать деградацию белков цитоплазмы и межклеточного матрикса. Тем не менее любой сбой в регуляции, выраженной, например, в повышении уровня экспрессии и активности катепсинов часто связан с развитием различных патологических состояний, таких как неврологические расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, ожирение, ревматоидный артрит и опухолевые заболевания. В частности, при онкогенезе цистеиновые катепсины детектируются в микроокружении опухолей, где они участвуют в процессах пролиферации, инвазии и метастазирования, обеспечивая деградацию внеклеточного матрикса, разрушение межклеточных взаимодействий и стимулируя ангиогенез. В связи с этим цистеиновые катепсины являются перспективными мишенями при разработке противоопухолевых препаратов, направленных на ингибирование этих ферментов.

Известны различные препараты, которые являются ингибиторами цистеиновых катепсинов. В основном это низкомолекулярные соединения, основанные на структурах эпоксисукцинила, винилсульфона или нитрила, действующие по принципу связывания с активным центром ферментов. Кроме того, для некоторых катепсинов были разработаны ингибиторы на основе антител. Однако все эти ингибиторы имеют различную специфичность, а также биологические свойства, связанные с проницаемостью в клетки и обладающие значительными побочными эффектами, ограничивающими возможности применения таких ингибиторов на практике [Petushkova A.I., Savvateeva L.V., Korolev D.O., Zamyatnin A.A. Jr. (2019), Cysteine Cathepsins: Potential Applications in Diagnostics and Therapy of Malignant Tumors. *Biochemistry (Mosc.)*, 84(7):746-761].

Кроме того, для ингибирования цистеиновых катепсинов (K, S, L) авторами патентов [RU 2692799, RU 2535479, RU 2399613] предложены конкретные соединения непептидного происхождения, которые предлагается использовать для лечения или профилактики катепсин-зависимых заболеваний или состояний у млекопитающих. Разнообразие представленных модификаций этих соединений также обусловлено их различной специфичностью и биологическими свойствами при тех или иных условиях использования.

Наиболее близкими к предлагаемому решению являются универсальный ингибитор каспаз, имеющий структуру Z-VAD-FMK (N-бензоилоксикарбонил-Val-Ala-Asp-трифторметилкетон) [Van Noorden C.J. (2001), The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition, *Acta Histochem.*, 103(3):241-51], который предотвращает апоптоз, а также пептидные ингибиторы каспаз: z-DEVD.fmk, Ac-YVAD.cmk. Каспазы относятся к семейству цистеиновых протеиназ, расщепляющих белки после аспартата. С помощью пептидных производных фторметилкетонов и хлорметилкетонов (на-

поминающими место расщепления известных каспазных субстратов), необратимо алкилирующих остаток цистеина в активном участке каспазы, было показано эффективное ингибирование этих ферментов. Ингибирующий эффект z-VAD.fmk, z-DEVD.fmk и Ac-YVAD.cmk также был показан и для катепсинов В и Н [Schotte P. et al., Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases // FEBS letters. - 1999. - Т. 442. - №. 1. - С. 117-121]. Для бензилоксикарбонил-фенил-аланил-фторметилкетона (z-FA-FMK), помимо подавления процессов апоптоза и воспаления посредством ингибирования некоторых каспаз, также показана способность ингибировать катепсин В [The Cathepsin B Inhibitor, z-FA-FMK, Inhibits Human T Cell Proliferation In Vitro and Modulates Host Response to Pneumococcal Infection In Vivo Clare P. Lawrence, Aras Kadioglu, Ai-Li Yang, William R. Coward, Sek C. Chow The Journal of Immunology September 15, 2006, 177(6):3827-3836].

Однако в связи с тем, что вышеуказанные пептидные ингибиторы были созданы для ингибирования членов семейства каспаз, их специфичности может быть не вполне достаточно для эффективного ингибирования ферментов семейства цистеиновых катепсинов.

Технической проблемой, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, является создание новых пептидных последовательностей, являющихся специфическими ингибиторами цистеиновых катепсинов, т.е. способных ингибировать функциональную (протеолитическую) активность цистеиновых катепсинов, с перспективой использования в разработке противоопухолевых терапевтических средств.

#### **Раскрытие сущности изобретения**

Техническим результатом изобретения является создание специфических пептидов (пептидных соединений), обладающих ингибирующим действием на функциональную активность цистеиновых катепсинов.

Технический результат достигается за счет синтеза специфических пептидных соединений - производных фторметилкетонов или хлорметилкетонов тетрапептидов структуры



где PEPT - одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE;

R1 - одна из защитных групп: ацетильная (Ac), бензилоксикарбонильная (Z) или отсутствует;

R2 - производные фторметилкетона (FMK) или хлорметилкетона (CMK), характеризующиеся способностью ингибировать протеолитическую активность цистеиновых катепсинов.

Заявленное изобретение может применяться для приготовления фармацевтических композиций для подавления специфической активности цистеиновых катепсинов, содержащих пептидное соединение и фармацевтически приемлемый носитель. Пептидные соединения могут применяться для приготовления лекарственных средств, вызывающих подавление специфической активности цистеиновых катепсинов, в терапии опухолевых заболеваний.

Получение таких модифицированных пептидов легко осуществимо стандартными методами пептидного синтеза. Пептидная природа специфических ингибиторов позволяет использовать их в качестве действующего вещества для разработок фармкомпозиций. Преимуществами пептидов перед другими типами препаратов состоит в том, что они, в основном, безопасны, быстро выводятся из организма и имеют значительно меньше побочных эффектов, чем средства непептидной природы. Большинство пептидных лекарств вводят парентеральным путем, но с развитием соответствующих технологий разрабатываются и иные формы введения: пероральный, интраназальный, трансдермальный, т.е. возможен подбор вариантов места действия пептида конкретно под определенные условия применения.

#### **Краткое описание чертежей**

Изобретение поясняется иллюстрациями.

На фиг. 1 представлены структуры специфических пептидных ингибиторов цистеиновых катепсинов Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK.

На фиг. 2 представлены графики зависимости интенсивности флуоресценции продукта гидролиза (свободной метки 7-Амино-4-метилкумарина (АМК), у.е.) цистеиновыми катепсинами (CtsB и CtsL) флуорогенного субстрата Ac-PLVQ-АМК от времени (мин), характеризующие ингибирующую активность ферментов, где а) график зависимости для катепсина В (CtsB), б) график зависимости для катепсина L (CtsL), в) график зависимости в отсутствие ферментов (в качестве контроля отсутствия флуоресценции метки); линиями показана активность ферментов без добавления ингибиторов, в присутствии пептидного ингибитора структуры Ac-PLVE-FMK, в присутствии пептидного ингибитора структуры Ac-VLPE-FMK.

На фиг. 3 представлены изображение и численные показатели результатов "скретч"-теста на моно-слое опухолевых клеток почки линии 769-P.

На фиг. 4 представлены изображение и численные показатели результатов "скретч"-теста на моно-слое опухолевых клеток почки линии A498.

#### **Осуществление изобретения**

Изобретение иллюстрируется с использованием соединений



где PEPT - одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE;

R1 - ацетильная группа (Ac);

R2 - производные фторметилкетона (FMK), т.е. Ac-PLVE-FMK (Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu-FMK) и Ac-VLPE-FMK (Acetyl-Val-Leu-Pro-Glu-FMK).

На примере изучения функциональной активности цистеиновой протеиназы пшеницы Тритикаина-альфа были определены аминокислотные последовательности с предпочтительными сайтами расщепления субстратов [Savvateeva L.V., Gorokhovets N.V., Makarov V.A., Serebryakova M.V., Solovyev A.G., Morozov S.Y., Reddy V.P., Zernii E.Y., Zamyatnin A.A. Jr, Aliev G. (2015), Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain- $\alpha$ : feasibility for enzymatic therapy assays, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 62:115-24]. На основе полученных данных посредством компьютерного моделирования (с помощью программы PLANTS [Korb, O., Stutzle, T., Exner, T.E., Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *Journal of chemical information and modeling*, 2009, 49, 84-96] для моделирования белково-лигандного взаимодействия) были подобраны пептидные последовательности, обладающие наибольшей аффинностью к каталитическому центру цистеиновых протеиназ, в частности тетрапептиды PLVQ(E) и VLPQ(E). Путем конъюгирования фторметилкетонной группы (FMK) к данным пептидам PLVE и VLPE были получены новые высокоспецифические ингибиторы цистеиновых протеиназ (фиг. 1). Механизм необратимого ингибирования осуществляется за счет ковалентного связывания каталитического цистеина с FMK [Rasnick, D., Synthesis of peptide fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B, *Analytical biochemistry*, 1985, 149, 461-465].

Пептиды получали стандартными методами химического синтеза (твердофазным или в жидкой фазе), при котором пептиды получают путем соединения различных аминокислот друг с другом с последующей химической модификацией для введения функциональных групп. Способы химического синтеза пептидов широко известны и хорошо описаны с помощью известных в данной области техники методов [US 6015881; Mergler и др., *Tetrahedron Letters*, 29, 1988, с. 4005-4008; Mergler и др., *Tetrahedron Letters*, 29, 1988, с. 4009-4012; *Peptides, Chemistry and Biology*, под ред. Kamber и др., изд-во ESCOM, Leiden, 1992, с. 525-526; Riniker и др., *Tetrahedron Letters*, 49, 1993, с. 9307-9320; Lloyd-Williams и др., *Tetrahedron Letters*, 49, 1993, с. 11065-11133; и Andersson и др., *Biopolymers*, 55, 2000, с. 227-250].

Ингибирующие свойства Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK оценивали *in vitro* биохимическими методами и на опухолевых линиях клеток. В качестве модельных ферментов были взяты рекомбинантные цистеиновые катепсины L и B человека (CtsL и CtsB), так как они проявляют как эндо-, так и эндо-/экзопептидазную активность соответственно.

Пример 1. Определение ингибирующей активности Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK с использованием специфического флуорогенного субстрата.

Активность рекомбинантных катепсинов Cts B и L определяли по способности гидролизовать синтетический модельный пептидный субстрат цистеиновой протеиназы пшеницы тритикаина-альфа Ac-PLVQ-AMK, конъюгированный с 7-амино-4-метилкумарином (AMK), с определением продуктов гидролиза по интенсивности флуоресценции свободного AMK, как описано ранее [патент RU 2603054]. Так, к 20 нМ раствору рекомбинантного Cts B или Cts L в 0,1 М натрий-ацетатного буфере с содержанием 100 мМ NaCl, 0,5% DMSO, 0,6 мМ ЭДТА, pH 4,6 в присутствии и отсутствии 2 мкМ тетрапептидных ингибиторов Ac-PLVE-FMK (фиг. 2) и Ac-VLPE-FMK (фиг. 2) добавляют 50 мМ флуорогенного субстрата (фиг. 2) и детектируют интенсивность флуоресценции при комнатной температуре при длине волны возбуждения флуоресценции, равной 360 нм, и длине волны испускания флуоресценции, равной 460 нм (количество гидролизованного субстрата Ac-PLVQ-AMK определяют по интенсивности флуоресценции; скорость реакции при необходимости определяют по графику зависимости количества субстрата (моль) от времени гидролиза (с) с последующей обработкой полученных данных с применением метода линейной регрессии).

Как видно из фиг. 2 и табл. 1, интенсивность флуоресценции заметно снижалась в присутствии заживляемых тетрапептидов (синие и зеленые линии), что говорит об активной конкуренции субстрата и ингибиторов за активный центр фермента, и, следовательно, свидетельствует о специфичном и эффективном подавлении протеиназной активности цистеиновых катепсинов.

Таблица 1

Время, мин	Интенсивность флуоресценции, у.е.						
	Blank (Субстрат Ac-PLVQ- АМК (Sub) без фермента)	CtsB			CtsL		
		+ Sub	+Sub+ +Ac- PLVE- FMK	+ Sub + Ac- VLPE- FMK	+ Sub	+Sub+ +Ac-PLVE- FMK	+ Sub + Ac-VLPE- FMK
0.3	0	3500	3000	3100	5000	4000	4300
3	0.1	4300	3700	3700	7300	6300	6400
6	0	5600	4700	4600	9500	7200	7800
9	0.1	6300	4900	4800	11300	8200	9100
12	0	7000	5050	4950	14000	9200	9500

Пример 2. Оценка ингибирующей активности Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK с использованием опухолевых клеточных линий.

Известно, что эффективное ингибирование активности цистеиновых катепсинов ассоциировано с изменениями определенных свойств опухолевых клеток, в частности инвазии и подвижности.

Для исследования влияния Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK на подвижность клеток использовали scratch-тест ("скретч-тест"): на монослой клеток рака почки линий 769-P и A498, выращенных в ростовой среде RPMI 1640 с добавлением 10% бычьей сыворотки и 1% содержанием антибиотиков пенициллин-стрептомицин в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C, наносят царапину с помощью наконечника пипетки. Монослой промывают дважды фосфатно-солевым буфером для удаления открепившихся клеток и дегриза и добавляют ингибиторные тетрапептиды Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK в конечной концентрации 20 мкМ, после чего клетки продолжают наращивать в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, детектируя "заживление" клеточного монослоя с использованием микроскопа в определенные временные интервалы (фиг. 3, 4, табл. 2, 3).

Таблица 2

Клетки линии 769-P	Размер повреждения клеток (царапины), мкм		
	Ctrl (без добавления специфических пептидных ингибиторов)	Ac-PLVE-FMK	Ac-VLPE-FMK
Время, ч			
0	390	389	387
8	236	300	277
24	15	56	80

Таблица 3

Клетки линии A489	Размер повреждения клеток (царапины), мкм		
	Ctrl (без добавления специфических пептидных ингибиторов)	Ac-PLVE-FMK	Ac-VLPE-FMK
Время, ч			
0	508	514	520
8	437	467	476
24	282	407	376

Как видно из фиг. 3, 4 и табл. 2, 3, добавление тетрапептидов замедляло рост образования монослоя опухолевых клеток, т.е. пептидные ингибиторы эффективно препятствовали "заживлению" (закрытию зазора) как через 8, так и через 24 ч после образования царапины. Для наилучшей репрезентативности данных были построены гистограммы, отражающие процентное соотношение зарегистрированных изменений в размерах повреждения клеточного монослоя по сравнению с контролем (клетки без обработки тетрапептидами). Таким образом, можно утверждать, что ингибирование Cts с использованием тетрапептидов в опухолевых клетках может влиять на адгезию клеток, препятствуя образованию межклеточных контактов.

Таким образом, заявленные специфические пептидные ингибиторы, обладающие способностью ингибировать цистеиновые катепсины, могут служить основой фармацевтических композиций для разработки и получения лекарственных средств для лечения заболеваний, связанных с повышенной активностью цистеиновых катепсинов, в частности, противоопухолевых препаратов.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидное соединение с общей формулой

R1-PEPT-R2,

где PEPT - одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE;

R1 - одна из защитных групп: ацетильная, бензилоксикарбонильная или отсутствует;

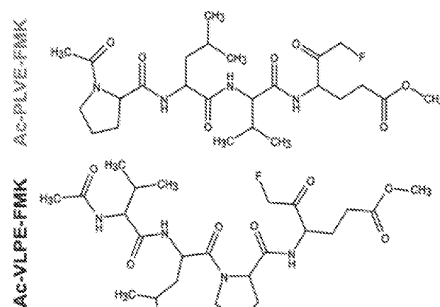
R2 - производные фторметилкетона (FMK) или хлорметилкетона (CMK), характеризующиеся способностью ингибировать протеолитическую активность цистеиновых катепсинов.

2. Применение пептидного соединения по п.1 в качестве ингибитора протеолитической активности цистеиновых катепсинов.

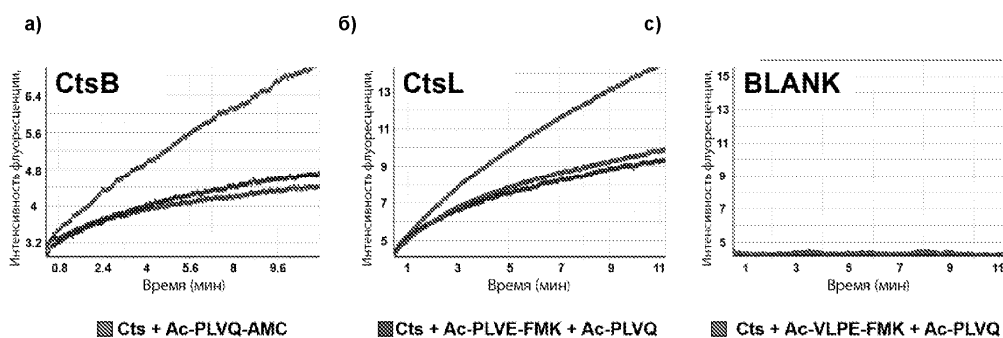
3. Применение пептидного соединения по п.1 для терапии опухолевых заболеваний.

4. Применение пептидного соединения по п.1 для приготовления лекарственного средства, вызывающего подавление специфической активности цистеиновых катепсинов.

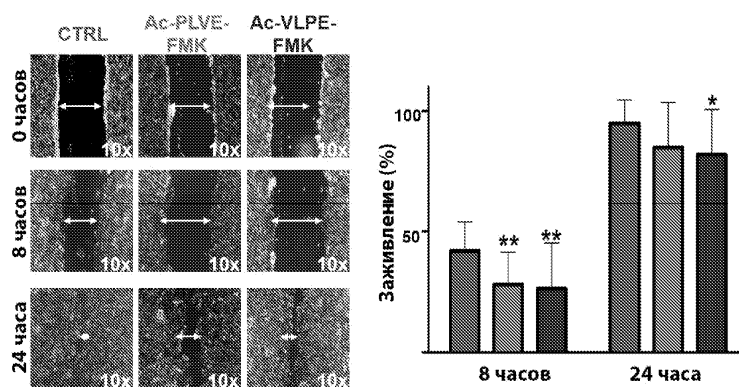
5. Фармацевтическая композиция для подавления специфической активности цистеиновых катепсинов, содержащая пептидное соединение по п.1, и фармацевтически приемлемый носитель.



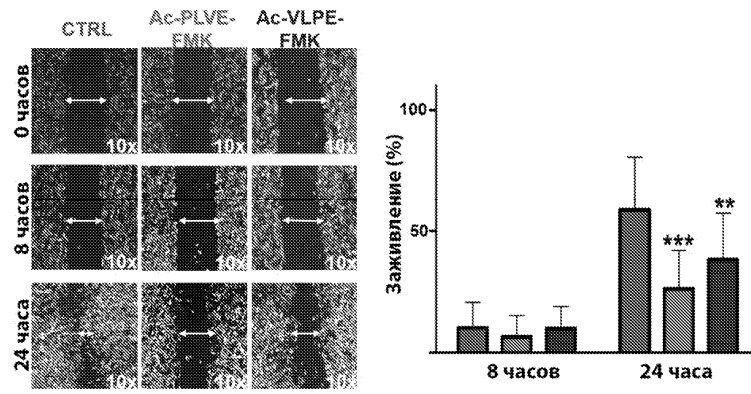
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

