

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044784**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.29

(21) Номер заявки
202292119

(22) Дата подачи заявки
2021.01.14

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(54) ПЕПТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

(31) 272074

(32) 2020.01.15

(33) IL

(43) 2022.10.13

(86) PCT/IL2021/050044

(87) WO 2021/144798 2021.07.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИММУНИТИ ФАРМА ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
**Овадия Эран, Бен-Шимон Ави, Козн
Илана (IL)**

(74) Представитель:
**Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков
К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В.,
Стукалова В.В. (RU)**

(56) WO-A2-2012160563
WO-A2-2006021954

JOHANNES HERKEL ET AL.: "Activation of the Akt-CREB signalling axis by a proline-rich heptapeptide confers resistance to stress-induced cell death and inflammation", IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 4, 1 August 2017 (2017-08-01), pages 474-480, XP055623927, GB, ISSN: 0019-2805, DOI: 10.1111/imm.12745, abstract

HARRIS T.K.: "PDK1 AND PKB/AKT: IDEAL TARGETS FOR DEVELOPMENT OF NEW STRATEGIES TO STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN", IUBMB LIFE, vol. 55, no. 3, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 117-126, XP009041386, ISSN: 1521-6543, DOI: 10.1080/1521654031000115951, abstract

WO-A1-2016172722
WO-A2-2020012478

(57) В изобретении раскрыты выделенные пептиды, способные снижать количество вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мыши. Также раскрыты их применения для лечения воспалительных или дегенеративных заболеваний.

044784 B1

044784 B1

Ссылка на родственную заявку

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента Израиля №272074, поданной 15 января 2020 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

Файл ASCII под названием 84727 SequenceListing.txt, созданный 13 января 2021 г. и имеющий размер 12288 байт, поданный одновременно с подачей настоящей заявки, включен в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники и предшествующий уровень техники изобретения

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к композициям и способам их использования для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Существует неудовлетворенная потребность в новых композициях, которые могут служить для ослабления клеточного и иммунного ответа на стресс в нормальных тканях специфичным, безопасным и эффективным образом, тем самым снижая тяжесть дегенеративных заболеваний, связанных со стрессом, и воспаления, вызванного стрессом.

Пептид LPPLPYP (SEQ ID NO: 42, также известный как Stressin-1 и IPL344) представляет собой короткий пептид из 7 аминокислот, который защищает клетки различных типов от проапоптотического давления и активирует сигнальную систему Akt. Структура IPL344 напоминает сайты связывания адапторных белков. Был предложен механизм действия, который предусматривает имитацию таких белков и активацию клеточных защитных процессов через Akt и, возможно, другими путями.

В публикациях международных патентных заявок № WO 2006/021954 и WO2012/160563 раскрыто применение пептида LPPLPYP (SEQ ID NO: 42) для лечения заболеваний, таких как ALS.

Краткое раскрытие изобретения

Согласно аспекту настоящее изобретение относится к выделенному пептиду, составляющему пять или семь аминокислот, который состоит из аминокислотной последовательности, представленной формулой $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (SEQ ID NO: 45), где:

- (i) X_1 , выбрана из группы, состоящей из лейцина, d-лейцина, d-валина, d-аргинина, или отсутствует,
 - (ii) X_2 выбрана из группы, состоящей из диметилпролина (dMP), пролина, α -аминоизомасляной кислоты (Aib) и d-пролина,
 - (iii) X_3 выбрана из группы, состоящей из dMP, пролина Aib и d-пролина,
 - (iv) X_4 выбрана из группы, состоящей из гистидина, серина, валина, лейцина, d-лейцина и треонина,
 - (v) X_5 представляет собой пролин или аланин,
 - (vi) X_6 выбрана из группы, состоящей из тирозина, d-валина, d-аспарагиновой кислоты, триптофана и фенилаланина, и
 - (vii) X_7 выбрана из группы, состоящей из пролина, dMP, d-пролина, или отсутствует,
- пептид способен снижать количество вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мыши, при условии, что пептид не состоит из последовательности согласно SEQ ID NO 42, 43 или 44.

Согласно аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей пептид, раскрытый в настоящем документе, в качестве активного агента и физиологически приемлемый носитель.

Согласно аспекту настоящее изобретение относится к выделенному пептиду, имеющему не более десяти аминокислот в длину, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-33 и 34, где пептид способен снижать количество вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мыши.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-33 и 34.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-12 и 13.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO SEQ ID NO: 1-4 и 5.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-33 и 34.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой сшитый пептид.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой циклический пептид.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения порядок последовательности является обратным и все аминокислоты относятся к D-типу.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид присоединен к фрагменту проникновения в клетку.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения фрагмент проникновения в клетку присоединен к N-концу пептида.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид предназначен для применения для лечения заболевания, связанного с апоптозом.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения заболеванием, связанным с апоптозом, является воспалительное или дегенеративное заболевание.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения воспалительным заболеванием является аутоиммунное заболевание.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения дегенеративным заболеванием является нейродегенеративное заболевание.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения заболевание, связанное с апоптозом, выбрано из группы, состоящей из возрастной дегенерации макулы (AMD), пигментной дегенерации сетчатки, инсульта и инфаркта миокарда.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и/или научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения, иллюстративные способы и/или материалы описаны ниже. В случае противоречия описание настоящей заявки, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для обязательного ограничения.

Описание конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к композициям и способам их использования для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Перед подробным пояснением по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения необходимо отметить, что применение настоящего изобретения не обязательно ограничено деталями, изложенными в последующем описании, или проиллюстрированными примерами. Настоящее изобретение охватывает другие варианты осуществления или может быть осуществлено на практике или реализовано различными способами.

Мультипролиновый пептид LPPLPYP (SEQ ID NO: 42), также известный как IPL344 и Stressin-1, представляет собой короткий пептид из 7 аминокислот, который защищает клетки различных типов от проапоптотического давления и активирует сигнальную систему Akt. Он является кандидатом для лечения дегенеративных, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

При исследовании вклада отдельных аминокислот пептида, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что конкретные замены аминокислот основной последовательности показали значительное улучшение в снижении количества вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей, тогда как другие замены и/или делеции сильно сократили снижение. Кроме того, было показано, что пептиды минимизируют снижение индуцированного дексаметазоном числа клеток селезенки и тимуса.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что большинство этих пептидов соответствуют формуле, приведенной в SEQ ID NO: 45, и предложили использовать такие пептиды для лечения дегенеративных, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

При дальнейшем применении настоящего изобретения на практике, авторы настоящего изобретения отметили, что замены пролина синтетической аминокислотой Aib в определенных положениях также приводили к пептидам, обладающим повышенным улучшением в снижении количества вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей и минимизирующим снижение индуцированного дексаметазоном числа клеток селезенки и тимуса.

В контексте настоящего изобретения термин "пептид" относится к полимеру природных или синтетических аминокислот, включая нативные пептиды (продукты деградации, синтетически синтезированные полипептиды или рекомбинантные полипептиды) и пептидомиметики (как правило, синтетически синтезированные пептиды), а также пептоиды и полупептоиды, которые являются аналогами полипептидов, которые могут иметь, например, модификации, придающие пептидам еще большую стабильность в организме или большую способность проникать в клетки.

Настоящее изобретение также охватывает производные (с модификацией и/или добавлением химической функции в аминокислотную боковую цепь без химического изменения пептидной цепи) и аналоги (с модификацией и/или добавлением химической функции в пептидную основную цепь, например, модификация N-конца или C-конца или модификация пептидной связи).

Такие модификации включают без ограничения модификацию N-конца, модификацию C-конца, модификацию полипептидной связи, включая без ограничения CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH или CF=CH, модификации основной цепи и модификации остатков. Способы получения соединений пептидомиметиков хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в *Quantitative Drug Design*, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), которая включена посредством ссылки, как если бы она была полностью раскрыта в настоящем документе. Дополнительные детали в этом отношении представлены ниже в настоящем документе.

Полипептидные связи (-CO-NH-) внутри полипептида могут быть замещены, например, N-метилированными связями (-N(CH₃)-CO-), сложноэфирными связями (-C(R)HCOOC(R)-N-), кетометиленовыми связями (-CO-CH₂-), α-аза-связями (-NH-N(R)-CO-), где R представляет собой любой алкил, например, метил, карба-связями (-CH₂-NH-), гидроксипропиленовыми связями (-CH(OH)-CH₂-), тиоамидными связями (-CS-NH-), олефиновыми двойными связями (-CH=CH-), ретро-амидными связями (-NH-CO-), полипептидными производными (-N(R)-CH₂-CO-), где R представляет собой "нормальную" боковую цепь, естественно представленную при атоме углерода.

Эти модификации могут происходить при любой из связей в полипептидной цепи и даже при нескольких (2-3) одновременно.

Неприродные аминокислоты раскрыты в табл. 2, приведенной в настоящем документе ниже.

В контексте настоящего изобретения в описании и в разделе формулы изобретения термин "аминокислота" или "аминокислоты" понимается как включающий 20 встречающихся в природе аминокислот, аминокислоты, которые часто посттрансляционно модифицированы *in vivo*, включая, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин, и другие нестандартные аминокислоты, включая без ограничения 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксипролин, изодесмосин, норвалин, норлейцин и орнитин. Кроме того, термин "аминокислота" включает как D-, так и L-аминокислоты (стереоизомеры).

В приведенных ниже табл. 1 и 2 перечислены встречающиеся в природе аминокислоты (табл. 1) и нестандартные или модифицированные аминокислоты (табл. 2), которые можно использовать в настоящем изобретении.

Таблица 1

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

Таблица 2

Нестандартная аминокислота	Обозначение	Нестандартная аминокислота	Обозначение
орнитин	Orn	гидроксипролин	Hyp
α -аминомасляная кислота	Abu	аминонорборнил-карбоксилат	Norb
D-аланин	Dala	аминоциклопропан-карбоксилат	Cpro
D-аргинин	Darg	N-(3-гуанидинопропил)глицин	Narg
D-аспарагин	Dasn	N-(карбамилметил)глицин	Nasn
D-аспарагиновая кислота	Dasp	N-(карбоксиметил)глицин	Nasp
D-цистеин	Dcys	N-(тиометил)глицин	Ncys
D-глутамин	Dgln	N-(2-карбамилэтил)глицин	Ngln
D-глутаминовая кислота	Dglu	N-(2-карбоксиэтил)глицин	Nglu
D-гистидин	Dhis	N-(имидазолилэтил)глицин	Nhis
D-изолейцин	Dile	N-(1-метилпропил)глицин	Nile
D-лейцин	Dleu	N-(2-метилпропил)глицин	Nleu
D-лизин	Dlys	N-(4-аминобутил)глицин	Nlys
D-метионин	Dmet	N-(2-метилтиоэтил)глицин	Nmet
D-орнитин	Dorn	N-(3-аминопропил)глицин	Norn
D-фенилаланин	Dphe	N-бензилглицин	Nphe
D-пролин	Dpro	N-(гидроксиметил)глицин	Nser
D-серин	Dser	N-(1-гидроксиэтил)глицин	Nthr
D-треонин	Dthr	N-(3-индолилэтил) глицин	Nhtrp
D-триптофан	Dtrp	N-(<i>n</i> -гидроксифенил)глицин	Ntyr
D-тирозин	Dtyr	N-(1-метилэтил)глицин	Nval
D-валин	Dval	N-метилглицин	Nmgly
D-N-метилаланин	Dnmala	L-N-метилаланин	Nmala
D-N-метиларгинин	Dnmarg	L-N-метиларгинин	Nmarg

D-N-метиласпарагин	Dnmasn	L-N-метиласпарагин	Nmasn
D-N-метиласпартат	Dnmasp	L-N-метиласпарагиновая кислота	Nmasp
D-N-метилцистеин	Dnmcys	L-N-метилцистеин	Nmcys
D-N-метилглутамин	Dnmglu	L-N-метилглутамин	Nmgln
D-N-метилглутамат	Dnmglu	L-N-метилглутаминовая кислота	Nmglu
D-N-метилгистидин	Dnmhis	L-N-метилгистидин	Nmhis
D-N-метилизолейцин	Dnmile	L-N-метилизолейцин	Nmile
D-N-метиллейцин	Dnmleu	L-N-метиллейцин	Nmleu
D-N-метиллизин	Dnmlys	L-N-метиллизин	Nmlys
D-N-метилметионин	Dnmmtet	L-N-метилметионин	Nmmtet
D-N-метилорнитин	Dnmorn	L-N-метилорнитин	Nmorn
D-N-метилфенилаланин	Dnmphe	L-N-метилфенилаланин	Nmphe
D-N-метилпролин	Dnmpro	L-N-метилпролин	Nmpro
D-N-метилсерин	Dnmser	L-N-метилсерин	Nmser
D-N-метилтреонин	Dnmthr	L-N-метилтреонин	Nmthr
D-N-метилтриптофан	Dnmtrp	L-N-метилтриптофан	Nmtrp
D-N-метилтирозин	Dnmtyr	L-N-метилтирозин	Nmtyr
D-N-метилвалин	Dnmval	L-N-метилвалин	Nmval
L-норлейцин	Nle	L-N-метилноглейцин	Nmnle
L-норвалин	Nva	L-N-метилнорвалин	Nmnva
L-этилглицин	Etg	L-N-метил-этилглицин	Nmetg
L-трет-бутилглицин	Tbug	L-N-метил-трет-бутилглицин	Nmtbug
L-гомофенилаланин	Hphe	L-N-метил-гомофенилаланин	Nmhphe
α -нафтилаланин	Anap	N-метил- α -нафтилаланин	Nmanap
пеницилламин	Pen	N-метил пеницилламин	Nmpen
γ -аминомасляная кислота	Gabu	N-метил- γ -аминобутират	Nmgabu
циклогексилаланин	Chexa	N-метил-циклогексилаланин	Nmchexa
циклопентилаланин	Cpen	N-метил-циклопентилаланин	Nmcpen

α -амино- α -метилбутират	Aabu	N-метил- α -амино- α -метилбутират	Nmaabu
α -аминоизомасляная кислота	Aib	N-метил- α -аминоизобутират	Nmaib
D- α -метиларгинин	Dmarg	L- α -метиларгинин	Marg
D- α -метиласпарагин	Dmasn	L- α -метиласпарагин	Masn
D- α -метиласпартат	Dmasp	L- α -метиласпартат	Masp
D- α -метилцистеин	Dmcys	L- α -метилцистеин	Mcys
D- α -метилглутамин	Dmgln	L- α -метилглутамин	Mgln
D- α -метил глутаминовая кислота	Dmglu	L- α -метилглутамат	Mglu
D- α -метилгистидин	Dmhis	L- α -метилгистидин	Mhis
D- α -метилизольцин	Dmile	L- α -метилизольцин	Mile
D- α -метиллейцин	Dmleu	L- α -метиллейцин	Mleu
D- α -метиллизин	Dmlys	L- α -метиллизин	Mlys
D- α -метилметионин	Dmmet	L- α -метилметионин	Mmet
D- α -метилорнитин	Dmorn	L- α -метилорнитин	Morn
D- α -метилфенилаланин	Dmphe	L- α -метилфенилаланин	Mphe
D- α -метилпролин	Dmpro	L- α -метилпролин	Mpro
D- α -метилсерин	Dmser	L- α -метилсерин	Mser
D- α -метилтреонин	Dmthr	L- α -метилтреонин	Mthr
D- α -метилтриптофан	Dmtrp	L- α -метилтриптофан	Mtrp
D- α -метилтирозин	Dmtyr	L- α -метилтирозин	Mtyr
D- α -метилвалин	Dmval	L- α -метилвалин	Mval
N-циклобутилглицин	Ncbut	L- α -метилпогвалин	Mnva
N-циклогептилглицин	Nchep	L- α -метилэтилглицин	Metg
N-циклогексилглицин	Nchex	L- α -метил- <i>трет</i> -бутилглицин	Mtbug
N-циклодецилглицин	Ncdec	L- α -метил-гомофенилаланин	Mhphe
N-циклододecilглицин	Ncdod	α -метил- α -нафтилаланин	Manap
N-циклооктилглицин	Ncoct	α -метил пеницилламин	Mpen

N-циклопропилглицин	Ncpro	α -метил- γ -аминобутират	Mgabv
N-циклоундецилглицин	Ncund	α -метил- циклогексилаланин	Mchexa
N-(2-аминоэтил)глицин	Naeg	α -метил- циклопентилаланин	Mcpen
N-(2,2-дифенилэтил)глицин	Nbhm	N-(N-(2,2-дифенилэтил) карбамилметил-глицин	Nnbhm
N-(3,3- дифенилпропил)глицин	Nbhe	N-(N-(3,3-дифенилпропил) карбамилметил-глицин	Nnbhe
1-карбоксит-1-(2,2-дифенил этиламино)циклопропан	Nmbc	1,2,3,4- тетрагидроизохинолин-3- карбоновая кислота	Tic
фосфосерин	pSer	фосфотреонин	pThr
фосфотирозин	pTyr	O-метил-тирозин	
2-аминоадипиновая кислота		гидроксилизин	
Диметилпролин	dmp		

Как указано, N- и C-концы пептидов согласно настоящему изобретению могут быть защищены функциональными группами. Подходящие функциональные группы описаны в Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительными защитными группами являются те, которые облегчают транспорт присоединенного к ним соединения в клетку, например, посредством снижения гидрофильности и повышения липофильности соединений.

Эти фрагменты могут быть расщеплены *in vivo* либо путем гидролиза, либо ферментативно внутри клетки. Защитные группы гидроксила включают сложноэфирные, карбонатные и карбаматные защитные группы. Защитные группы амина включают алкокси- и арилоксикарбонильные группы, как описано выше для N-концевых защитных групп. Защитные группы карбоновой кислоты включают алифатические, бензильные и арильные сложные эфиры, как описано выше для C-концевых защитных групп. Согласно одному варианту осуществления группа карбоновой кислоты в боковой цепи одного или нескольких остатков глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты в пептиде согласно настоящему изобретению защищена предпочтительно метиловым, этиловым, бензиловым или замещенным бензиловым сложным эфиром.

Примеры N-концевых защитных групп включают ацильные группы (-CO-R1) и алкоксикарбонильные или арилоксикарбонильные группы (-CO-O-R1), где R1 представляет собой алифатическую, замещенную алифатическую, бензильную, замещенную бензильную, ароматическую или замещенную ароматическую группу. Конкретные примеры ацильных групп включают ацетил, (этил)-CO-, н-пропил-CO-, изопропил-CO-, н-бутил-CO-, втор-бутил-CO-, трет-бутил-CO-, гексил, лауроил, пальмитоил, миристоил, стеарил, олеоил, фенил-CO-, замещенный фенил-CO-, бензил-CO- и (замещенный бензил)-CO-. Примеры алкоксикарбонильной и арилоксикарбонильной групп включают CH₃-O-CO-, (этил)-O-CO-, н-пропил-O-CO-, изопропил-O-CO-, н-бутил-O-CO-, втор-бутил-O-CO-, трет-бутил-O-CO-, фенил-O-CO-, замещенный фенил-O-CO- и бензил-O-CO-, (замещенный бензил)-O-CO-, адамантан, нафталин, миристолеил, тулуол, бифенил, циннамоил, нитробензоил, толуоил, фууроил, бензоил, циклогексан, норборнан, Z-капроат. Для облегчения N-ацилирования на N-конце молекулы могут присутствовать от одного до четырех остатков глицина.

Карбоксильная группа на C-конце соединения может быть защищена, например, амидом (т.е. гидроксильная группа на C-конце замещена на -NH₂, -NHR₂ и -NR₂R₃) или сложным эфиром (т.е. гидроксильная группа на C-конце замещена на -OR₂). R₂ и R₃ независимо представляют собой алифатическую, замещенную алифатическую, бензильную, замещенную бензильную, арильную или замещенную арильную группу. Кроме того, вместе с атомом азота R₂ и R₃ могут образовывать гетероциклическое кольцо от C4 до C8 с приблизительно 0-2 дополнительными гетероатомами, такими как азот, кислород или сера.

Примеры подходящих гетероциклических колец включают пиперидинил, пирролидинил, морфолино, тиоморфолино или пиперазинил. Примеры C-концевых защитных групп включают -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -NH(этил), -N(этил)₂, -N(метил)(этил), -NH(бензил), -N(C₁-C₄ алкил)(бензил), -NH(фенил), -N(C₁-C₄ алкил)(фенил), -OCH₃, -O-(этил), -O-(н-пропил), -O-(н-бутил), -O-(изо-пропил), -O-(втор-бутил), -O-(трет-бутил), -O-бензил и -O-фенил.

Пептиды согласно настоящему изобретению могут также содержать неаминокислотные фрагменты, такие как, например, гидрофобные фрагменты (различные линейные, разветвленные, циклические, полициклические или гетероциклические углеводороды и углеводородные производные), присоединенные к пептидам, непептидные агенты проникновения, различные защитные группы, особенно если соединение является линейным, которые присоединяются к концам соединения для уменьшения разрушения. Химические (неаминокислотные) группы, присутствующие в соединении, могут быть включены для улучшения различных физиологических свойств, таких как снижение разрушения или клиренса, снижение толчка различными клеточными насосами, улучшение иммуногенной активности, улучшение различных способов введения (например, присоединение различных последовательностей, обеспечивающих проникновение через различные барьеры, через кишечник и т.д.), повышенная специфичность, повышенная аффинность, пониженная токсичность и т.п.

Присоединение компонента аминокислотной последовательности пептидов согласно настоящему изобретению к другим неаминокислотным агентам может быть осуществлено путем ковалентного связывания, посредством нековалентного образования комплекса, например, посредством образования комплекса с гидрофобным полимером, который может разрушаться или расщепляться с образованием соединения, способного к устойчивому высвобождению, путем захвата аминокислотной части пептида в липосому или мицеллы с получением конечного пептида согласно настоящему изобретению. Ассоциация может быть осуществлена посредством включения аминокислотной последовательности в другой компонент (липосому, мицеллу) или импрегнации аминокислотной последовательности в полимер с получением конечного пептида согласно настоящему изобретению.

Согласно конкретному варианту осуществления пептид присоединен к фрагменту проникновения в клетку.

В контексте настоящего изобретения термин "фрагмент проникновения в клетку" относится к фрагменту (например, липиду, такому как пальмитиновая кислота), который усиливает транслокацию присоединенного пептида через клеточную мембрану. Согласно конкретному варианту осуществления фрагмент проникновения в клетку не является пептидным фрагментом. Фрагмент может быть присоединен к N- или C-концу.

Пептиды согласно настоящему изобретению могут быть линейными или циклическими (циклизация может улучшить стабильность). Циклизация может происходить любыми способами, известными в данной области техники. Если соединение состоит преимущественно из аминокислот, циклизация может проходить посредством циклизации N-конца с C-концом, N-конца с боковой цепью и N-конца с основной цепью, C-конца с боковой цепью, C-конца с основной цепью, боковой цепи с основной цепью и боковой цепи с боковой цепью, а также основной цепи с основной цепью. Циклизация пептида также может происходить посредством неаминокислотных органических остатков, содержащихся в пептиде.

Авторами настоящего изобретения также охватываются сшитые пептиды.

В контексте настоящего изобретения термин "сшитый пептид" относится к пептиду, содержащему выбранное количество стандартных или нестандартных аминокислот и дополнительно имеющему по меньшей мере два фрагмента, способных вступать в реакцию,

способствующую образованию углерод-углеродной связи, которые вступили в контакт с реагентом с образованием по меньшей мере одного сшивающего линкера между по меньшей мере двумя фрагментами, что модулирует, например, стабильность пептида.

В контексте настоящего изобретения термин "сшивание" означает введение в пептид по меньшей мере двух фрагментов, способных вступать в реакцию, способствующую образованию углерод-углеродной связи, которые могут контактировать с реагентом с образованием по меньшей мере одного сшивающего линкера между по меньшей мере двумя фрагментами. Сшивание обеспечивает ограничение вторичной структуры, такой как структура альфа-спирали. Длина и геометрия сшивающего линкера могут быть оптимизированы для повышения выхода желаемого содержания вторичной структуры. Предусмотренное ограничение может, например, препятствовать разворачиванию вторичной структуры и/или может усиливать форму вторичной конструкции. Вторичная структура, которая не может разворачиваться, например, более стабильна.

Пептиды согласно настоящему изобретению могут быть синтезированы биохимически, например, с использованием стандартных твердофазных методик. Эти способы предусматривают эксклюзивный твердофазный синтез, способы парциального твердофазного синтеза, конденсацию фрагментов, классический синтез в растворе. Методики твердофазного синтеза полипептидов хорошо известны в данной области техники и дополнительно описаны в John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

Жидкофазные методики, которые особенно подходят для небольших пептидов, также рассматриваются авторами настоящего изобретения.

Крупномасштабный синтез пептидов описан в Andersson *Biopolymers* 2000, 55(3):227-50.

Синтетические пептиды могут быть очищены с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии [Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y.], и их состав может быть подтвержден секвенированием аминокислот.

Рекомбинантные методики также могут быть использованы для получения пептидов согласно настоящему изобретению. Для получения пептида согласно настоящему изобретению с использованием рекомбинантной технологии полинуклеотид, кодирующий пептид согласно настоящему изобретению, лигируют в вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, который содержит полинуклеотидную последовательность под транскрипционным контролем цис-регуляторной последовательности (например, промоторной последовательности), подходящей для управления конститутивной, тканеспецифической или индуцируемой транскрипцией полипептидов согласно настоящему изобретению в клетках-хозяевах.

В дополнение к возможности синтеза в клетках-хозяевах пептиды согласно настоящему изобретению также могут быть синтезированы с использованием систем экспрессии *in vitro*. Эти способы хорошо известны в данной области техники, а компоненты системы являются коммерчески доступными.

Описанные в настоящем документе пептиды способны снижать количество вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мыши, например, после инъекции (IP) 100 мкг дексаметазона. Кроме того, они способны минимизировать снижение индуцированного дексаметазоном числа клеток селезенки и тимуса.

Согласно другому варианту осуществления пептиды, описанные в настоящем документе, способны вмешиваться и блокировать секрецию как TNF- α , так и IL-6 клетками-макрофагами в ответ на врожденные активаторы, такие как липополисахарид (LPS) и олигонуклеотиды CpG.

Дополнительно или альтернативно описанные в настоящем документе пептиды способны снижать, предотвращать или ингибировать апоптоз в эукариотических клетках. Независимо от механизма, с помощью которого пептиды согласно настоящему изобретению опосредуют ответы на стресс, и без ограничения какой-либо теорией или механизмом действия, полагают, что пептиды могут быть способны активировать ось Akt-CREB. Пептид можно протестировать посредством анализа его способности активировать фактор транскрипции киназы Akt и/или белка, связывающегося с cAMP-чувствительным элементом (CREB), как описано в Herkel et al., *Immunology*, 2017, 151, pages 474-480, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Способы измерения апоптоза: апоптоз представляет собой активный, ген-направленный процесс саморазрушения клетки и связан с характерными морфологическими и биохимическими изменениями. Ядерная и цитоплазматическая конденсация и фрагментация умирающей клетки в связанные с мембранной апоптотические тельца являются типичными характеристиками апоптоза. Другим признаком апоптотической гибели клеток является разрушение хромосомной ДНК на олигонуклеосомные фрагменты после активации специфических нуклеаз.

"Ингибирование апоптоза" или "ингибирование апоптотической активности" означает любое снижение числа клеток, подвергающихся апоптозу, по сравнению с необработанным контролем (т.е. клетками, не подвергшимися воздействию пептидов согласно настоящему изобретению). Предпочтительно снижение составляет по меньшей мере 25%, более предпочтительно снижение составляет по меньшей мере 50%, более предпочтительно снижение составляет по меньшей мере 65% и наиболее предпочтительно снижение составляет по меньшей мере 80%.

Протоочная цитометрия предоставляет широкий спектр возможностей для измерения апоптоза. Были разработаны и реализованы различные способы, некоторые из которых предусматривают окрашивание поверхности клеток, а некоторые предусматривают внутриклеточное окрашивание.

Одним из первых подходов было, помимо наблюдения за тем, что апоптотические клетки сокращаются и имеют более высокую внутриклеточную гранулярность, окрашивание ДНК-специфичными флуорохромами (например, йодидом пропидия [PI], бромидом этидия [EtBr]). Как только наносится смертельный удар, ДНК начинает менять свой профиль. Апоптотическая ДНК состоит не только из фрагментированной ДНК (представленной в виде более коротких полос, так называемой лестницы ДНК в агарозном геле), но также частично расщеплена на отдельные нуклеотиды, так что флуорохромы, такие как PI или EtBr, имеют меньше ДНК для окрашивания (Nicoletti et al., 1991). Обычно это наблюдают по сдвигу влево, называемому пиком sub-G1, на конкретном канале обнаружения флуорохрома в FACScan™ (от Becton Dickinson, USA).

Другим способом является опосредованное терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT) мечение разрывов нити ДНК (TUNEL). Способ TUNEL обнаруживает разрывы нитей ДНК в клетках, подвергающихся апоптозу. TdT представляет собой фермент, который катализирует присоединение дезоксирибонуклеотидтрифосфата к 3'-ОН-концам двух- или одноцепочечной ДНК. В отличие от нормальных клеток ядра апоптотических клеток включают экзогенные нуклеотиды (dUTP)-DIG в присутствии TdT. Фрагмент антитела против DIG с конъюгированным флуорохромом позволяет визуализировать апоптотические клетки. Увеличение апоптотических клеток вызывает большее количество фрагментов ДНК и, следовательно, более яркую флуоресценцию. Преимуществом этого способа является очень высокая специфичность (Gavrieli et al., 1992). Недостатком этого способа является то, что он является дорогостоящим и может использоваться только для небольшого набора образцов, поскольку является трудоемким. Поэтому он не применим для больших программ скрининга.

Потеря полярности клеточной мембраны и презентация повышенных количеств фосфатидилсерина (PS) на внешней части клеточной мембраны во время ранней фазы апоптоза привели к новому подходу.

Аннексин V представляет собой кальций-зависимый белок, связывающий фосфолипиды, с высоким сродством к PS. Целостность клеточной мембраны сохраняется на ранней и промежуточной фазах апоптоза. Клетки на ранней и промежуточной фазах апоптоза демонстрируют повышенное связывание аннексина-FITC и в основном не окрашиваются PL. Клетки на поздних стадиях апоптоза и некротические клетки становятся дважды положительными из-за презентации PS на поверхности и окрашивания PI внутриклеточных нуклеиновых кислот из-за распада мембраны. Этот способ также является дорогостоящим и трудоемким.

Другие способы измерения апоптоза *in vivo* и *in vitro* раскрыты в патентах США №№ 6726895 и 6723567.

Таким образом, согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному пептиду, составляющему пять или семь аминокислот, который состоит из аминокислотной последовательности, представленной формулой X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 45), где:

- (i) X₁, выбрана из группы, состоящей из лейцина, d-лейцина, d-валина, d-аргинина, или отсутствует,
 - (ii) X₂ выбрана из группы, состоящей из dMP, пролина, Aib и d-пролина,
 - (iii) X₃ выбрана из группы, состоящей из dMP, пролина, Aib и d-пролина,
 - (iv) X₄ выбрана из группы, состоящей из гистидина, серина, валина, лейцина, d-лейцина и треонина,
 - (v) X₅ представляет собой пролин или аланин,
 - (vi) X₆ выбрана из группы, состоящей из тирозина, d-валина, d-аспарагиновой кислоты, триптофана и фенилаланина, и
 - (vii) X₇ выбрана из группы, состоящей из пролина, dMP, d-пролина, или отсутствует,
- пептид способен снижать количество вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мыши, при условии, что пептид не состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 42, 43 или 44.

Пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения может составлять пять или 7 аминокислот в длину. Соответственно, когда X₁ отсутствует, X₇ также отсутствует.

Примеры пептидов, которые охватываются этим аспектом настоящего изобретения, представлены в SEQ ID NO: 6-34.

Согласно одному варианту осуществления пептид состоит из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 6-34.

Согласно другому варианту осуществления пептид состоит из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 6-13.

Следует понимать, что для этого аспекта настоящего изобретения аминокислоты представлены в формуле согласно SEQ ID NO: 45, и никакие консервативные/неконсервативные мутации, кроме указанных, не рассматриваются. Кроме того, когда в формуле появляется конкретный стереоизомер, ясно, что его нельзя заменить другим стереоизомером.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенному пептиду, составляющему не более десяти аминокислот в длину, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-33 и 34, где пептид способен снижать количество вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мыши.

Согласно одному варианту осуществления пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения составляет 10 аминокислот в длину.

Согласно одному варианту осуществления пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения составляет 9 аминокислот в длину.

Согласно одному варианту осуществления пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения составляет 8 аминокислот в длину.

Согласно одному варианту осуществления пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения составляет 7 аминокислот в длину.

Согласно одному варианту осуществления пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения составляет 6 аминокислот в длину.

Согласно одному варианту осуществления пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения составляет 5 аминокислот в длину.

Примеры таких пептидов включают представленные в SEQ ID NO: 1-34 и, более конкретно, представленные в SEQ ID NO: 1-5.

Для любого из описанных в настоящем документе пептидов настоящее изобретение также охватывает ретро-инверсопептиды. Такие пептиды устойчивы к протеазам и состоят из D-аминокислот в обратном порядке, что приводит к изменению пептидного остова, но неизменной ориентации боковых цепей.

Описанные в настоящем документе пептиды можно применять для лечения множества заболеваний, включая заболевания, связанные с ответами на стресс. К ним относятся патологические состояния, такие как нейродегенеративные заболевания (например, инсульт, болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера), инфаркт миокарда, воздействие радиации или химиотерапевтических средств, воспаление, травмы (например, ожоги и повреждения центральной нервной системы), клеточное старение, гипертермия, судороги, гипоксия (например, ишемия и инсульт), а также в тканях и органах трансплантата перед трансплантацией.

Эти состояния также включают аутоиммунные заболевания, характеризующиеся состоянием иммунизации индивидуума против по меньшей мере одного из нормальных компонентов организма. Эти явления наблюдаются, в частности, при патологиях, включая без ограничения инфекции, связанные с SLE (системная красная волчанка), синдром Гужеро-Шегрена (или болезнь Шегрена) и ревматоидный полиартрит, а также такие патологии, как саркоидоз и остеопения, спондилоартрит, склеродермия, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз (ALS), гипертиреоз, болезнь Аддисона, аутоиммунная гемолитическая анемия, болезнь Крона, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, идиопатическая пурпура, геморрагия, инсулинозависимый диабет, миастения, вульгарная пузырчатка, пернициозная анемия, постстрептококковый гломерулонефрит, псориаз и самопричинное бесплодие, а также немедленные или отсроченные явления, наблюдаемые при отторжении трансплантата и реакции "трансплантат против хозяина". Согласно другому варианту осуществления пептиды согласно настоящему изобретению полезны для лечения ишемии или инфаркта миокарда.

Согласно конкретному варианту осуществления заболеванием является ALS.

Другие заболевания, охватываемые настоящим изобретением, включают без ограничения болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, вторичную дегенерацию после травмы, инсульт, интоксикацию ЦНС, глаукому, дегенерацию желтого пятна, диабет I типа, системную красную волчанку, аутоиммунный увеит, реакцию "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата, артрит, синдром системного воспалительного ответа (SIRS), воспалительное заболевание кишечника (IBD), респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), псориаз, атеросклероз, инфаркт миокарда, лучевую болезнь, гипертермию, гипоксию, фульминантный токсический гепатит, почечную недостаточность, бесплодие и многие другие.

Явление отторжения трансплантата представляет собой состояние иммунизации индивидуума против чужеродных компонентов (жидкости организма, такие как кровь, спинномозговая жидкость и т.д., клетки, ткани, органы, антитела и т.д.), преднамеренно имплантированных пациенту.

В контексте настоящего изобретения термины "дегенеративное нарушение", "дегенеративное заболевание" и "дегенеративное состояние" относятся к любому нарушению, заболеванию или состоянию, характеризующимся неадекватной пролиферацией клеток или неадекватной гибелью клеток, или, в некоторых случаях, и тем и другим, или аберрантным или нерегулируемым апоптозом. Эти состояния также включают состояния, при которых избыточный апоптоз, хотя и уместный и регулируемый на уровне отдельной клетки, связан с дисфункцией или недостаточностью органа.

Согласно одному варианту осуществления пептиды полезны для предотвращения гибели клеток в незлокачественной ткани или клеток у субъекта, страдающего неопластическим заболеванием и подвергающегося химиотерапии и/или лучевой терапии для лечения рака.

В контексте настоящего изобретения термины "воспалительное заболевание" и "воспалительное состояние" означают любое заболевание или состояние, при котором чрезмерная или нерегулируемая воспалительная реакция приводит к чрезмерным воспалительным симптомам, повреждению ткани хозяина или потере функции ткани.

Согласно одному варианту осуществления воспалительное заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание.

Согласно другому варианту осуществления воспалительное заболевание или состояние имеет этиологию, связанную с продукцией по меньшей мере одного провоспалительного цитокина, выбранного из IL-6 и TNF- α .

Согласно другому варианту осуществления заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, вторичной дегенерации после травмы, инсульта, интоксикации ЦНС, глаукомы, дегенерации желтого пятна, инфаркта миокарда, лучевой болезни, гипертермии, гипоксии, скоротечной токсичности печени, почечной недостаточности и бесплодия.

Согласно другому варианту осуществления заболевание включает пигментную дегенерацию сетчатки и дегенерацию желтого пятна.

Согласно другому варианту осуществления заболевание включает инсульт или инфаркт миокарда.

Пептиды могут быть предоставлены сами по себе или как часть фармацевтической композиции, в которой они смешаны с подходящими носителями или вспомогательными веществами.

В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату из одного или нескольких активных ингредиентов, описанных в настоящем документе, с другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Целью фармацевтической композиции является облегчение введения соединения в организм.

В контексте настоящего изобретения термин "активный ингредиент" относится к пептидам, ответственным за биологический эффект.

Далее в настоящем документе фразы "физиологически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель", которые могут использоваться взаимозаменяемо, относятся к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения организма и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Адьювант включен в эти фразы.

Получение фармацевтических композиций, содержащих пептиды или полипептиды в качестве активных ингредиентов, хорошо известно в данной области техники. Как правило, такие композиции полу-

чают в инъекционной форме в виде либо жидких растворов, либо суспензий, однако, могут быть получены и твердые формы, которые могут быть суспендированы или солюбилизованы перед инъекцией. Препарат также может быть эмульгирован. Активный терапевтический ингредиент смешивают с неорганическими и/или органическими носителями, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом. Носители представляют собой фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (носители), содержащие более или менее инертные вещества, которые при добавлении к фармацевтической композиции придают композиции подходящей консистенции или формы. Подходящими носителями являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п. и их комбинации. Кроме того, при желании композиция может содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты и pH-буферные агенты, которые усиливают эффективность активного ингредиента.

Токсичность и терапевтическую эффективность описанных в настоящем документе пептидов можно определить стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, путем определения IC₅₀ (концентрация, приводящая к 50% ингибированию) и LD₅₀ (летальная доза, приводящая к гибели 50% тестируемых животных) для рассматриваемого соединения. Данные, полученные в результате этих анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать для определения диапазона доз для применения у человека. Доза может варьироваться в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Точный состав, способ введения и доза могут быть выбраны врачом в зависимости от состояния пациента. (См., например, Fingl et al., 1975).

Количество активного агента, используемого в композиции для введения согласно настоящему изобретению, является количеством, эффективным для достижения цели конкретного активного агента для целевого показания. Количество активного агента в композициях, как правило, представляет собой фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество. Однако количество может быть меньше этого количества, когда композицию используют в виде стандартной лекарственной формы, поскольку стандартная лекарственная форма может содержать множество соединений или активных агентов в одной композиции или может содержать разделенное фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество. Затем общее эффективное количество можно вводить в кумулятивных единицах, содержащих в общем эффективное количество активного агента.

Терапевтически эффективное количество пептида согласно настоящему изобретению представляет собой количество, которое при введении пациенту способно проявлять антиапоптотическую активность и/или противовоспалительную активность. Анализы для обнаружения антиапоптотической активности пептида согласно настоящему изобретению включают без ограничения окрашивание ДНК специфическими флуорохромами, такими как йодид пропидия и бромид этидия, анализы аннексина V, анализы TUNEL и т.п., определенные неограничивающие примеры таких анализов представлены в приведенных ниже примерах. Анализы для определения противовоспалительной активности пептидов также хорошо известны в данной области техники.

Хотя подходящая доза пептида согласно настоящему изобретению варьируется в зависимости от пути введения, возраста, массы тела, пола или состояния пациента и в конечном итоге должна быть определена врачом, доза, подходящая для взрослых людей (например, при внутривенном введении), в общем может составлять приблизительно от 2 до 6 мг на 1 кг массы тела, предпочтительно приблизительно от 2 до 4 мг/кг.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат одно или несколько соединений согласно настоящему изобретению и одно или несколько вспомогательных веществ или добавителей. Согласно одному варианту осуществления одно или несколько соединений, или сольватов, или солей этих соединений.

В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям, которые практически нетоксичны для живых организмов. Типичные фармацевтически приемлемые соли включают соли, полученные реакцией соединений согласно настоящему изобретению с фармацевтически приемлемой минеральной или органической кислотой. Такие соли также известны как кислотно-аддитивные соли.

Композиции, содержащие соединения и активные агенты, являются подходящими для доставки активных агентов в выбранные биологические системы и для повышения или улучшения биодоступности активного агента по сравнению с введением активного агента без доставки. Доставка может быть улучшена посредством доставки большего количества активного агента в течение периода времени или посредством доставки активного агента в конкретный период времени (например, для осуществления более быстрой или отсроченной доставки) или в течение периода времени (например, устойчивая доставка).

Фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, могут быть составлены обычным образом с использованием одного или нескольких фармацевтически приемлемых носителей, содержащих вспомогательные вещества и вспомогательные средства,

которые облегчают обработку активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтике. Надлежащий состав зависит от выбранного пути введения.

Фармацевтические композиции можно вводить местно или системно любым обычным и подходящим путем, включая без ограничения пероральный, внутрибрюшинный, парентеральный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, чрескожный, интратекальный, местный, ректальный, трансбуккальный, ингаляционный или интраназальный.

Для инъекции соединения согласно настоящему изобретению могут быть составлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Для введения через слизистую оболочку в препарате используют пенетранты, соответствующие барьеру, который необходимо преодолеть. Такие пенетранты, например, ДМСО или полиэтиленгликоль, в общем известны в данной области техники.

Фармацевтические композиции, которые можно применять перорально, включают твердые капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие, запечатанные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Твердые капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующими веществами, такими как крахмалы, смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния, и необязательно стабилизаторами.

В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы. Все составы для перорального введения должны быть в дозах, подходящих для выбранного пути введения.

Альтернативно, соединения согласно настоящему изобретению могут быть включены в пероральные жидкие препараты, такие как, например, водные или масляные суспензии, растворы, эмульсии, сиропы или эликсиры. Более того, составы, содержащие эти соединения, могут быть представлены в виде сухого продукта для разбавления водой или другой подходящей средой перед применением. Такие жидкие препараты могут содержать обычные добавки, такие как суспендирующие агенты, такие как сироп сорбита, метилцеллюлоза, сироп глюкозы/сахара, желатин, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гель стеарата алюминия и гидрогенизированные пищевые жиры, эмульгаторы, такие как лецитин, моноолеат сорбитана или аравийская камедь, неводные среды (которые могут включать пищевые масла), такие как миндальное масло, фракционированное кокосовое масло, масляные сложные эфиры, пропиленгликоль и этиловый спирт, и консерванты, такие как метил- или пропил-п-гидроксибензоат и сорбиновая кислота.

Для введения посредством ингаляции пептиды для применения согласно настоящему изобретению удобно доставлять в форме аэрозольного спрея, доставляемого из упаковки под давлением или распылителя с использованием подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана или диоксида углерода. В случае аэрозоля под давлением стандартная доза может быть определена путем обеспечения клапана для подачи отмеренного количества. Капсулы и картриджи, например, из желатина для использования в ингаляторах или инсуффляторах, могут быть составлены с содержанием порошковой смеси пептида и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также полезны для местного применения и внутриочагового применения. В контексте настоящего изобретения термин "местное" означает "относящееся к определенной области поверхности", например, коже и слизистой оболочке, и местное средство, нанесенное на определенную область поверхности, будет воздействовать только на ту область, на которую оно нанесено. Составы пептидов/аналогов пептидов можно вводить местно в виде геля, мази, крема, эмульсии, состава с замедленным высвобождением, включая трансдермальный пластырь, и они могут содержать липосомы и любой другой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для местного введения лекарственного средства. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут также содержать подходящие твердые или гелевые носители или вспомогательные вещества. Примеры таких носителей или вспомогательных веществ включают без ограничения карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли.

Композиции согласно настоящему изобретению могут, при желании, быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, таком как набор, одобренный FDA, который может содержать одну или несколько единичных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Упаковка или дозирующее устройство могут сопровождаться инструкциями по применению. На упаковку или дозирующее устройство также может быть нанесено уведомление, связанное с контейнером, в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических средств, такое уведомление отражает одобрение агентством формы композиций или введение человеку или животному. Такое уведомление, например, может быть маркировкой, одобренной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для отпускаемых по рецепту лекарственных средств, или листком-вкладышем одобренного продукта. Композиции

зиции, содержащие препарат согласно настоящему изобретению, составленный в совместимом фармацевтическом носителе, также могут быть получены, помещены в соответствующий контейнер и промаркированы для лечения указанного состояния, как более подробно описано выше.

В контексте настоящего изобретения термин "приблизительно" относится к $\pm 10\%$.

Термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеющий" и их сопряженные значения означают "включая без ограничения".

Термин "состоящий из" означает "включающий и ограничивающийся до".

Термин "состоящий по существу из" означает, что композиция, способ или структура могут включать дополнительные ингредиенты, стадии и/или части, но только в том случае, если дополнительные ингредиенты, стадии и/или части не изменяют существенно основные и новые характеристики заявленной композиции, способа или структуры.

В контексте настоящего изобретения форма единственного числа включает ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, термин "соединение" или "по меньшей мере одно соединение" может включать множество соединений, включая их смеси.

В настоящей заявке различные варианты осуществления настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазонов предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как строгое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, следует рассматривать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, как например, от 1 до 6, должно рассматриваться как имеющее конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

Каждый раз, когда в настоящем документе указан числовой диапазон, подразумевается, что он включает любое цитируемое числовое значение (дробное или целое) в указанном диапазоне. Фразы "в диапазоне/диапазон между" первым числом и вторым числом и "в диапазоне/диапазон от" первого числа и "до" второго числа используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают первое и второе указанные числа и все дробные и целые числа между ними.

В контексте настоящего изобретения термин "способ" относится к образам, средствам, методам и методикам выполнения данной задачи, включая без ограничения те образы, средства, методы и методики, которые либо известны, либо легко разработаны на основе известных образов, средств, методов и методик практикующими специалистами в области химии, фармакологии, биологии, биохимии и медицины.

В контексте настоящего изобретения термин "лечение" включает прекращение, существенное ингибирование, замедление или обращение вспять прогрессирования состояния, существенное улучшение клинических или эстетических симптомов состояния или существенное предотвращение появления клинических или эстетических симптомов состояния.

Понятно, что определенные признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены по отдельности или в любой подходящей подкомбинации или как подходящие в любом другом описанном варианте осуществления настоящего изобретения. Определенные признаки, описанные в контексте различных вариантов осуществления, не должны считаться существенными признаками этих вариантов осуществления, за исключением случаев, когда вариант осуществления не осуществим без этих элементов.

Различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, описанные выше и заявленные в разделе формулы изобретения ниже, находят экспериментальную поддержку в следующих примерах.

Примеры

Настоящим приведена ссылка на следующие примеры, которые вместе с вышеприведенным описанием иллюстрируют некоторые варианты осуществления настоящего изобретения без ограничения.

В общем, используемая в настоящем документе номенклатура и лабораторные методики, используемые в настоящем изобретении, включают молекулярные, биохимические, микробиологические и рекомбинантные методы ДНК. Такие методы подробно описаны в литературе; см., например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989), "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994), Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989), Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988), Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York, Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998), методы, изложенные в патентах США № 4666828, 4683202, 4801531, 5192659 и 5272057, "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994), "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition, "Current Protocols in Immunology" Volumes

I-III Coligan J.E., ed. (1994), Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994), Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980), доступные иммунологические анализы подробно описаны в патентной и научной литературе, см., например, патенты США № 3791932, 3839153, 3850752, 3850578, 3853987, 3867517, 3879262, 3901654, 3935074, 3984533, 3996345, 4034074, 4098876, 4879219, 5011771 и 5281521, "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984), "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., and Higgins S. J., eds. (1985), "Transcription and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984), "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986), "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986), "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990), Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996), все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе. Другие общие ссылки приведены в настоящем документе. Полагают, что описанные в них процедуры хорошо известны в данной области техники и предоставлены для удобства читателя. Вся информация, содержащаяся в них, включена в настоящий документ посредством ссылки.

Пример 1. Способы.

Дексаметазон представляет собой кортикостероидный препарат, который индуцирует апоптоз иммунных клеток и лимфоидных тканей. Мышей BALB/c применяли для изучения способности пептидов-кандидатов спасать клетки лимфоцитов от апоптоза. Мышам внутрибрюшинно вводили 100 мкг дексаметазона. Мыши, получавшие дексаметазон, получали сразу после и через 24 ч после лечения дексаметазоном внутривенную инъекцию пептидов-кандидатов (200 мкг пептида/мышь). Мышей умерщвляли через 48 ч после первой обработки. Селезенку и тимус взвешивали и проводили полный подсчет клеток обоих органов.

Пептиды, использованные при скрининге, представляли собой SEQ ID NO: 1-13. Пептид SEQ ID NO: 42 использовали в качестве положительного контроля. Пептиды, указанные в SEQ ID NO: 35-41, использовали в качестве отрицательных контролей.

Результаты.

Результаты приведены в табл. 3 и 4

Таблица 3

SEQ ID NO:	Нормальная	DE XA	42	13	11	12	3	4	8	9	10	1	2	6	7	5
Масса селезенки	100%	62 %	79 %	82 %	81 %	89 %	85 %	77 %	76 %	76 %	84 %	89 %	89 %	80 %	84 %	81 %
Число клеток селезенки	100%	59 %	78 %	84 %	91 %	85 %	79 %	82 %	82 %	82 %	85 %	82 %	85 %	80 %	82 %	91 %
Масса тимуса	100%	44 %	47 %	49 %	52 %	63 %	60 %	55 %	53 %	55 %	56 %	59 %	61 %	48 %	72 %	52 %
Число клеток тимуса	100%	23 %	34 %	44 %	49 %	51 %	33 %	31 %	30 %	31 %	33 %	28 %	25 %	23 %	29 %	49 %
Среднее	100%	47 %	59 %	65 %	68 %	72 %	64 %	61 %	60 %	61 %	65 %	65 %	65 %	58 %	67 %	68 %

Таблица 4

SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 38
Масса селезенки	69%	69%	62%	64%	72%	69%	67%
Число клеток селезенки	77%	73%	65%	69%	72%	61%	66%
Масса тимуса	48%	50%	42%	43%	41%	49%	50%
Число клеток тимуса	24%	27%	39%	40%	34%	25%	24%
Среднее	55%	55%	52%	54%	55%	51%	52%

Дексаметазон индуцировал потерю массы селезенки и тимуса, а также снижение количества клеток селезенки приблизительно на 50%. Количество клеток тимуса было снижено приблизительно на 60% по сравнению с нормальными мышами.

Все пептиды в табл. 3 продемонстрировали значительное улучшение по сравнению с SEQ ID NO: 42. Все пептиды в табл. 4 показали сниженный эффект по сравнению с SEQ ID NO: 42.

Хотя настоящее изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, очевидно, что специалистам в данной области техники очевидны многие альтернативы, модификации и вариации. Соответственно, предполагается, что все такие альтернативы, модификации и вариации, которые соответствуют сути и широкому объему прилагаемой формулы изобретения, охватываются.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны для включения в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, цитирование или идентификация любой ссылки в настоящей заявке не должны рассматриваться как допущение того, что такая ссылка доступна в качестве предшествующего уровня техники настоящего изобретения. В той мере, в какой используются заголовки разделов, они не должны толковаться как обязательно ограничивающие.

Кроме того, приоритетный документ настоящей заявки полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный пептид, составляющий не более десяти аминокислот в длину, который содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, где пептид способен снижать количество вызванной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мыши.

2. Выделенный пептид по п.1, состоящий из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 1.

3. Выделенный пептид по п.1, где порядок последовательности является обратным и все аминокислоты относятся к D-типу.

4. Выделенный пептид по п.1, где пептид присоединен к фрагменту проникновения в клетку.

5. Выделенный пептид по п.4, где указанный фрагмент проникновения в клетку присоединен к N-концу пептида.

6. Применение пептида, включающего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 для лечения заболевания, связанного с апоптозом.

7. Применение по п.6, где указанным заболеванием, связанным с апоптозом, является воспалительное или дегенеративное заболевание.

8. Применение по п.7, где воспалительным заболеванием является аутоиммунное заболевание.

9. Применение по п.7, где указанным дегенеративным заболеванием является нейродегенеративное заболевание.

10. Применение по п.6, где указанное заболевание, связанное с апоптозом, выбрано из группы, состоящей из возрастной дегенерации макулы (AMD), пигментной дегенерации сетчатки, инсульта и инфаркта миокарда.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по п.1 в качестве активного агента и физиологически приемлемый носитель.

