

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046208**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.16

(21) Номер заявки
202190249

(22) Дата подачи заявки
2019.07.10

(51) Int. Cl. **C07K 7/06** (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) ПЕПТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 260555

(32) 2018.07.11

(33) IL

(43) 2021.05.21

(86) PCT/IL2019/050774

(87) WO 2020/012478 2020.01.16

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

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

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

(56) WO-A2-2006021954

RACHEL DIMRI ET AL.: "Specific Inhibition of Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis by Substance P", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 164, no. 5, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 2479-2486, XP055625708, US, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.164.5.2479, the whole document

US-A1-2016038571

US-A1-2007197444

US-A1-2004204340

NOMIZU M. ET AL.: "Convulsant peptides related to corticotropin-releasing factor (CRF)", BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 505, no. 2, 29 December 1989 (1989-12-29), pages 326-328, XP024276988, ISSN: 0006-8993, DOI: 10.1016/0006-8993(89)91461-3 [retrieved on 1989-12-29], table I

YUN HUANG ET AL.: "Electronic interactions of i, i+1 dithioamides: increased fluorescence quenching and evidence for n-to-[pi]* interactions", CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 52, no. 50, 2016, pages 7798-7801, XP055656869, UK, ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/C6CC00105J, figures 1, 3

US-B2-10011829

MIRGORODSKAYA O.A. ET AL.: "Bradykinin degradation pathways in human blood plasma", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 307, no. 3, 3 August 1992 (1992-08-03), pages 263-266, XP025983822, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/0014-5793(92)80691-9 [retrieved on 1992-08-03], table I

YOSHIDA TOMOYUKI ET AL.: "Bax-inhibiting peptide derived from mouse and rat Ku70", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 321, no. 4, 2004, pages 961-966, XP028808286, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2004.07.054, the whole document

(57) Описаны выделенные пептиды, способные снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей, а также их применение.

B1

046208

046208 B1

Родственные заявки

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на патент Израиля № 260555, поданной 11 июля 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Изложение перечня последовательностей

Файл ASCII под названием 77809 Sequence Listing.txt, созданный 7 июля 2019 г. и содержащий 8069120 байт, представленный одновременно с подачей заявки на данное изобретение, включен в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение, и предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение, согласно некоторым его вариантам осуществления, относится к композициям и способам их применения для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

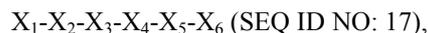
Существует неудовлетворенная потребность в новых композициях, которые могут служить для ослабления клеточного и иммунного ответа на стресс в нормальной ткани специфическим, безопасным и эффективным образом, тем самым снижая тяжесть связанных со стрессом дегенеративных заболеваний и вызванного стрессом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

Пептид LPPLPYP (SEQ ID NO: 2, также известный как Stressin-1 и IPL344) представляет собой короткий пептид из 7 аминокислот, который защищает клетки различных типов от проапоптического давления и активирует систему передачи сигналов Akt. Структура IPL344 напоминает сайты связывания адаптерных белков. Был предложен механизм действия, который включает в себя имитацию таких белков и активацию клеточных защитных процессов посредством Akt и, возможно, других путей.

В публикациях международных патентных заявок WO 2006/021954 и WO 2012/160563 раскрывается применение пептида LPPLPYP (SEQ ID NO: 2) для лечения таких заболеваний, как ALS.

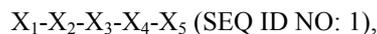
Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен выделенный пептид, состоящий более чем из десяти аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой



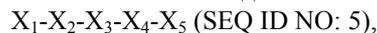
- где (i) X_1 представляет собой пролин или его аналог или производное;
(ii) X_2 представляет собой пролин или его аналог;
(iii) X_3 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, лейцина, цистеина, изолейцина, метионина и их производного или аналога;
(iv) X_4 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, серина и их производного или аналога;
(v) X_5 представляет собой любую аминокислоту;
(vi) X_6 представляет собой пролин или его аналог или производное и
(vii) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен выделенный пептид, длина которого не превышает шесть аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой



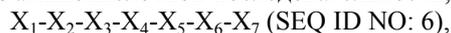
- где (i) X_1 представляет собой пролин или его аналог или производное;
(ii) X_2 представляет собой пролин или его аналог или производное;
(iii) X_3 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, лейцина, цистеина, изолейцина, метионина и их производного или аналога;
(iv) X_4 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, серина, пролина и их производного или аналога;
(v) X_5 представляет собой любую аминокислоту и
(vi) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен выделенный пептид, состоящий из пяти аминокислот, который состоит из аминокислотной последовательности, представленной формулой



- где (i) X_1 и X_3 представляют собой любые аминокислоты;
(ii) X_2 представляет собой пролин или его аналог или производное;
(iii) X_4 не представляет собой пролин;
(iv) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен выделенный пептид, состоящий из семи аминокислот, который состоит из аминокислотной последовательности, представленной формулой



- где (i) X_1 , X_5 и X_6 представляют собой любые аминокислоты;

- (ii) X₂, X₃ и X₇ представляют собой пролин или его аналог или производное;
- (iii) X₄ не представляет собой пролин и
- (iv) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп.1-27 в качестве активного средства и физиологически приемлемый носитель.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения производное пролина выбрано из группы, состоящей из N-метилпролина, альфа-метилпролина и α-аминомасляной кислоты.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения длина пептида составляет 6 аминокислот.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид содержит аминокислоту, которая присоединена к N-концу X₁, причем аминокислота выбрана из группы, состоящей из аланина, валина, лейцина, цистеина, изолейцина, метионина и их производного или аналога.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения аминокислота, которая присоединена к N-концу X₁, представляет собой лейцин или его производное или аналог.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения аминокислота, которая присоединена к N-концу X₁, представляет собой D-аминокислоту.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения длина пептида составляет 7 аминокислот.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения X₄ представляет собой аланин или его аналог или производное.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения X₅ выбран из группы, состоящей из тирозина, фенилаланина, триптофана и их производного или аналога.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения X₅ представляет собой тирозин.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения выделенный пептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения выделенный пептид состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения выделенный пептид состоит из 5 аминокислот.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения X₄ выбран из группы, состоящей из аланина, пролина, производного или аналога аланина и производного или аналога пролина.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения производное или аналог пролина выбирают из группы, состоящей из N-метилпролина, альфа-метилпролина и α-аминомасляной кислоты.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность включает в себя последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения выделенный пептид состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 18.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения X₃ представляет собой лейцин.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения X₁ и/или X₃ представляют собой D-аминокислоты.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой штапельный пептид.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой циклический пептид.

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

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

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения проникающая в клетку часть присоединена к N-концу пептида.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения пептид предназначен для лечения воспалительного или дегенеративного заболевания.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения заболевание, связанное с апоптозом, представляет собой воспалительное или дегенеративное заболевание.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения воспалительное заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения дегенеративное заболевание представляет собой нейродегенеративное заболевание.

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

Если не указано иное, все технические и/или научные термины, используемые в настоящем документе, характеризуются тем же значением, которое обычно понимается специалистом в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, можно применять на практике или при тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения, ниже описаны иллюстративные способы и/или материалы. В случае конфликта описание патента, включая в себя определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Краткое описание графических материалов

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения описаны в настоящем документе только в качестве примера со ссылкой на сопровождающие графические материалы. Обращаясь теперь к конкретным подробным графическим материалам, следует подчеркнуть, что подробности представлены в качестве примера и в целях иллюстративного обсуждения вариантов осуществления настоящего изобретения. В этом отношении описание графических материалов делает очевидным для специалистов в настоящей области техники, как варианты осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы на практике.

На графических материалах:

Фиг. 1 представляет собой график, иллюстрирующий влияние иллюстративных пептидов на массу селезенки, количество клеток селезенки, массу тимуса и количество клеток тимуса.

Пептиды, использованные при скрининге, были следующими:

PPLPY - SEQ ID NO: 3
 LPPLAYP - SEQ ID NO: 4
 PLPYP - SEQ ID NO: 9
 PPL - SEQ ID NO: 10
 PLP - SEQ ID NO: 11
 PYP - SEQ ID NO: 12
 LPGLPYP - SEQ ID NO: 13
 LPPLGYP - SEQ ID NO: 14
 LAPLPYP - SEQ ID NO: 15
 LPALPYP - SEQ ID NO: 16

Фиг. 2 представляет собой график, иллюстрирующий влияние иллюстративных пептидов на массу селезенки, количество клеток селезенки, массу тимуса и количество клеток тимуса.

Пептиды, использованные при скрининге, были следующими:

LPPLPYP - SEQ ID NO: 2 (контроль)
 PPLAYP - SEQ ID NO: 18
 LPPLPY - SEQ ID NO: 7
 LPPLAYP - SEQ ID NO: 4
 PPLPY-NH₂ - SEQ ID NO: 19
 PPLPY - SEQ ID NO: 3

Описание конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения

Настоящее изобретение, согласно некоторым его вариантам осуществления, относится к композициям и способам их применения для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Прежде чем подробно объяснять по меньшей мере один вариант осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что настоящее изобретение необязательно ограничивается в своем применении деталями, изложенными в нижеследующем описании или проиллюстрированными примерами. Настоящее изобретение может быть реализовано в других вариантах осуществления или реализовано на практике различными способами.

Пептидные связи почти всегда встречаются в транс-конформации с омега-углом кручения, близким к 180°, тогда как в цис-конформации наблюдается лишь очень ограниченная часть с омега-углом приблизительно 0°. Энергетический барьер между транс/цис-конфигурациями составляет приблизительно 20 [ккал/моль], а энергетический барьер для транс-изомера составляет ~2,5 [ккал/моль]. Среди 20 канонических аминокислот пролин играет особую роль. Пептидная связь пролина с предшествующим аминокислотным остатком (Хаа-Pro, Хаа обозначает любую аминокислоту) лишена амидного водорода, так что эта пептидная связь не может действовать как донор водородной связи, и энергетический барьер, а также энергетический пропуск значительно уменьшаются до ~13 и ~0,5 [ккал/моль] соответственно [2], смещая транс/цис-равновесие в сторону цис-конфигурации. Сильные изменения омега-угла, связанные с процессом транс/цис-изомеризации пролина (от 0 до 180), модулируются как внутри-, так и межмолекулярными

взаимодействиями и оказывают колоссальное влияние на соотношение структурной активности полипептидной цепи. Таким образом, изомеризация пролина становится важным компонентом в управлении активностью многих биологических процессов. Это особенно актуально для коротких пептидов, в которых цис-конфигурация может занимать более 30% конформационной популяции, в зависимости от предшествующего остатка.

Кроме того, известно, что мультikonформационный эффект пролина проявляется в остатках пролина, расположенных в качестве второго остатка от N-конца пептида (предпоследний пролин). Усечение первого N-концевого остатка в пептиде, содержащем предпоследний пролин, как правило, приводит к конформационному изменению пептида. В наборе данных из 58 пептидов было обнаружено, что почти 80% пептидов проявляли этот эффект [Glover, M.S., et al., 2014, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 26(3): p. 444-5].

Мультипролиновый пептид LPPLPYP (SEQ ID NO: 2), также известный как IPL344 и Stressin-1, представляет собой короткий пептид из 7 аминокислот, который защищает клетки различных типов от проапоптического давления и активирует систему передачи сигналов Akt. Подходит для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Учитывая тонкую конформационную природу пролинов, авторы настоящего изобретения поставили задачу определить, доминирует ли конфигурация транс-пролина над функциональностью всех четырех остатков пролина в пептиде LPPLPYP (SEQ ID NO: 2). Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что замена предпоследнего пролина на аланин приводит к пептиду (SEQ ID NO: 4), который значительно снижает количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей (фиг. 1). В отличие от этого, замена предпоследнего пролина на глицин приводила к получению пептида, лишённого этой активности.

При дальнейшем применении настоящего изобретения на практике авторы настоящего изобретения обнаружили, что удаление первой и последней аминокислоты с SEQ ID NO: 2 также приводит к пептиду (имеющему последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3), который значительно снижает количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что короткие пептиды на основе SEQ ID NO: 3 и 4 перспективны для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

При дальнейшем применении настоящего изобретения на практике авторы настоящего изобретения обнаружили, что дополнительный пептид (SEQ ID NO: 18), который соответствовал формуле, приведенной в SEQ ID NO: 17, показал значительное улучшение снижения количества индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей (см. фиг. 2).

Авторы настоящего изобретения также показали, что иллюстративные пептиды, которые подпадают под любую из раскрытых общих формул, демонстрируют значительное улучшение по сравнению с основным пептидом (SEQ ID NO: 2) в отношении снижения количества индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Используемый в настоящем документе термин "пептид" относится к полимеру из природных или синтетических аминокислот, включая в себя нативные пептиды (продукты деградации, синтетически синтезированные полипептиды или рекомбинантные полипептиды) и пептидомиметики (как правило, синтетически синтезированные пептиды), а также пептоиды и полупептоиды, которые представляют собой аналоги полипептидов, которые могут иметь, например, модификации, делающие пептиды даже более стабильными в организме или более способными проникать в клетки.

Настоящее изобретение также охватывает производные (с модификацией и/или добавлением химической функции к боковой цепи аминокислоты, без химического изменения пептидного скелета) и аналоги (с модификацией и/или добавлением химической функции в пептидном скелете, например, модификация N-конца или C-конца, модификация пептидной связи, модификация аминокислоты, не определенная как "производная"), комплексы с другими частицами, такими как ион металла (например, медь, цинк, марганец, магний и другие).

Такие модификации включают в себя, без ограничения, модификацию N-конца, модификацию C-конца, модификацию полипептидной связи, включая в себя, без ограничения, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH или CF=CH , модификации основной цепи и модификации остатков. Способы получения пептидомиметических соединений хорошо известны в настоящей области техники и описаны, например, в публикации Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Глава 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), которая включена посредством ссылки, как если бы она была полностью изложена в настоящем документе. Более подробная информация по этому поводу приводится ниже.

Полипептидные связи (-CO-NH-) внутри полипептида могут быть замещены, например, N-метилированными связями (-N(CH₃)-CO-), сложноэфирными связями (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), кетометиленовыми связями (-CO-CH₂-), α-азасвязями (-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-), ретроамидными связями (-NH-CO-), производными полипептида (-N(R)-CH₂-CO-), где R представляет собой "нормальную" боко-

вую цепь, естественно присутствующую на атоме углерода.

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

Природные ароматические аминокислоты, Trp, Tyr и Phe, могут быть заменены синтетическими неприродными кислотами, такими как аналог фенилглицина, TIS, нафтиламин (Nol), метилированные по кольцу производные Phe, галогенированные производные Phe или о-метил-Tyr.

Пролин может быть замещен синтетическими, неприродными кислотами, такими как производные N-метилпролина, α -метилпролина и аналога α -аминомасляной кислоты.

Другие неприродные аминокислоты приведены в табл. 2 ниже.

В дополнение к вышеизложенному, полипептиды по настоящему изобретению могут также включать в себя одну или несколько модифицированных аминокислот или один или несколько мономеров, не представляющих собой аминокислоты (например, жирные кислоты, сложные углеводы и т.д.).

Термин "аминокислота" или "аминокислоты", используемый в настоящем документе в описании и в разделе формулы изобретения, включает в себя 20 встречающихся в природе аминокислот; те аминокислоты, которые часто посттрансляционно модифицируются *in vivo*, включая в себя, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; и другие необычные аминокислоты, включая в себя, без ограничения, 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин. Кроме того, термин "аминокислота" включает в себя как D-, так и L-аминокислоты (стереоизомеры).

В табл. 1 и 2 перечислены встречающиеся в природе аминокислоты (табл. 1) и нетрадиционные или модифицированные аминокислоты (табл. 2), которые можно использовать с настоящим изобретением.

Таблица 1

<i>Аминокислота</i>	<i>Трехбуквенное сокращение</i>	<i>Однобуквенный символ</i>
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

<i>Нетрадиционная аминокислота</i>	<i>Код</i>	<i>Нетрадиционная аминокислота</i>	<i>Код</i>
орнитин	Orn	гидроксипролин	Hyp
α -аминомасляная кислота	Abu	аминонорборнилкарбоксилат	Norb
D-аланин	Dala	аминоциклопропанкарбоксилат	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-карбоксилэтил)глицин	Nglu
D-гистидин	Dhis	N-(имидазолэтил)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-(п-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-метиласпаратат	Dnmasp	L-N-метиласпарагиновая кислота	Nmasp
D-N-метилцистеин	Dnmcys	L-N-метилцистеин	Nmcys
D-N-метилглутамин	Dnmglu	L-N-метилглутамин	Nmglu
D-N-метилглутамат	Dnmglu	L-N-метилглутаминовая кислота	Nmglu
D-N-метилгистидин	Dnmhis	L-N-метилгистидин	Nmhis
D-N-метилизольцин	Dnmile	L-N-метилизольцин	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-метилнорлейцин	Nmle
L-норвалин	Nva	L-N-метилнорвалин	Nmva
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-метилпеницилламин	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 -метиласпаратат	Dmasp	L- α -метиласпаратат	Masp
D- α -метилцистеин	Dmcys	L- α -метилцистеин	Mcys
D- α -метилглутамин	Dmgln	L- α -метилглутамин	Mgln
D- α -метилглутаминовая 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 -метилнорвалин	Mnva
N-циклогептилглицин	Nchep	L- α -метилэтилглицин	Metg
N-циклогексилглицин	Nchex	L- α -метил-трет-бутилглицин	Mtbug
N-циклодецилглицин	Ncdec	L- α -метил-гомофенилаланин	Mhphe
N-циклододецилглицин	Ncdod	α -метил- α -нафтилаланин	Manap
N-циклооктилглицин	Ncoct	α -метилпеницилламин	Mpen
N-циклопропилглицин	Ncpro	α -метил- α -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-карбокси-1-(2,2-дифенилэтиламино)циклопропан	Nmbc	1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота	Tic
фосфосерин	pSer	фосфотреонин	pThr
фосфотиروزин	pTyr	O-метил-тирозин	
2-аминоадипиновая кислота		гидроксиллизин	

Аминокислоты пептидов по настоящему изобретению могут быть заменены консервативно или неконсервативно.

Используемый в настоящем документе термин "консервативная замена" относится к замене аминокислоты, присутствующей в нативной последовательности в пептиде, на встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе аминокислоты или пептидомиметики, характеризующиеся аналогичными стерическими свойствами. Если боковая цепь нативной аминокислоты, которую необходимо заменить, является полярной или гидрофобной, консервативная замена должна происходить на природную аминокислоту, неприродную аминокислоту или пептидомиметический фрагмент, который также является полярным или гидрофобным (в дополнение к тем же стерическим свойствам, что и боковая цепь замененной аминокислоты).

Поскольку встречающиеся в природе аминокислоты, как правило, группируются в соответствии с их свойствами, консервативные замены встречающимися в природе аминокислотами могут быть легко определены с учетом того факта, что в соответствии с настоящим изобретением рассматривается замена заряженных аминокислот на стерически схожие незаряженные аминокислоты в качестве консервативных замен.

Для получения консервативных замен не встречающимися в природе аминокислотами также можно использовать аналоги аминокислот (синтетические аминокислоты), хорошо известные в настоящей области техники. Пептидомиметик встречающейся в природе аминокислоты хорошо описан в литературе, известной квалифицированному практикующему специалисту.

При использовании консервативных замен заменяющая аминокислота должна содержать такую же или аналогичную функциональную группу в боковой цепи, что и исходная аминокислота.

Используемая в настоящем документе фраза "неконсервативные замены" относится к замене аминокислоты, присутствующей в исходной последовательности, другой природной или неприродной аминокислотой, характеризующейся другими электрохимическими и/или стерическими свойствами. Таким образом, боковая цепь заменяющей аминокислоты может быть значительно больше (или меньше), чем боковая цепь заменяемой нативной аминокислоты, и/или может содержать функциональные группы со значительно отличающимися электронными свойствами, чем замещаемая аминокислота. Примеры неконсервативных замен этого типа включают в себя замену фенилаланина или циклогексилметилглицина на аланин, изолейцина на глицин или $-\text{NH}-\text{CH}[(\text{-CH}_2)_5\text{-COOH}]-\text{CO}-$ на аспарагиновую кислоту. Те неконсервативные замены, которые подпадают под объем настоящего изобретения, представляют собой замены, которые все еще составляют пептид, обладающий антибактериальными свойствами.

Как упоминалось, N- и C-концы пептидов по 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, идеи которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительными защитными группами являются те, которые облегчают транспорт присоединенного к ним соединения в клетку, например, за счет сниже-

ния гидрофильности и увеличения липофильности соединений.

Эти фрагменты можно расщеплять *in vivo* либо путем гидролиза, либо ферментативно внутри клетки. Гидроксильные защитные группы включают в себя сложные эфиры, карбонаты и карбаматные защитные группы. Защитные группы амина включают в себя алкокси- и арилоксикарбонильные группы, как описано выше для N-концевых защитных групп. Защитные группы карбоновых кислот включают в себя алифатические, бензиловые и ариловые 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 по настоящему изобретению защищена предпочтительно метиловым, этиловым, бензиловым или замещенным бензиловым сложным эфиром.

Примеры N-концевых защитных групп включают в себя 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 в себя ацетил, (этил-СО-, н-пропил-СО-, изопротил-СО-, н-бутил-СО-, втор-бутил-СО-, трет-бутил-СО-, гексил, лауроил, пальмитоил, миристоил, стеарил, олеоилфенил-СО-, замещенный фенил-СО-, бензил-СО- и (замещенный бензил)-СО-. Примеры алкоксикарбонильных и арилоксикарбонильных групп включают в себя СН₃-О-СО-, (этил)-О-СО-, н-пропил-О-СО-, изопротил-О-СО-, н-бутил-О-СО-, втор-бутил-О-СО-, трет-бутил-О-СО-, фенил-О-СО-, замещенный фенил-О-СО- и бензил-О-СО-, (замещенный бензил)-О-СО-, адамантан, нафтаден, миристолеил, толуол, бифенил, циннамоил, нитробензол, толуоил, фууроил, бензоил, циклогексан, норборнан, Z-капроновая кислота. Чтобы облегчить N-ацилирование, 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, взятые вместе с атомом азота, R₂ и R₃ могут образовывать гетероциклическое кольцо от C₄ до C₈ примерно с 0-2 дополнительными гетероатомами, такими как азот, кислород или сера. Примеры подходящих гетероциклических колец включают в себя пиперидинил, пирролидинил, морфолино, тиоморфолино или пиперазинил. Примеры C-концевых защитных групп включают в себя -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-(изопротил), -O-(втор-бутил), -O-(трет-бутил), -O-бензил и -O-фенил.

Пептиды по 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; средства, не проникающие в пептиды; различные защитные группы, особенно если соединение является линейным, которые присоединены к концам соединения для уменьшения деградации. Химические (не аминокислотные) группы, присутствующие в соединении, могут быть включены для улучшения различных физиологических свойств, таких как; уменьшенная деградация или клиренс; снижение отталкивания различными клеточными насосами, улучшение иммуногенной активности, улучшение различных способов введения (таких как присоединение различных последовательностей, которые позволяют проникать через различные барьеры, через кишечник и т.д.); повышенная специфичность, повышенная аффинность, пониженная токсичность и т.п.

Присоединение компонента аминокислотной последовательности пептидов по настоящему изобретению к другим не аминокислотным средствам может происходить путем ковалентного связывания, образованием нековалентного комплекса, например, образованием комплекса с гидрофобным полимером, который может разрушаться или расщепляться с образованием соединения, способного к пролонгированному высвобождению; путем захвата аминокислотной части пептида липосомами или мицеллами с получением конечного пептида по настоящему изобретению. Связь может происходить путем захвата аминокислотной последовательности другим компонентом (липосомой, мицеллой) или импрегнирования аминокислотной последовательности в полимер с получением конечного пептида по настоящему изобретению.

Согласно конкретному варианту осуществления пептид присоединен к фрагменту, проникающему в клетку.

Используемый в настоящем документе термин "проникающий в клетку фрагмент" относится к фрагменту (например, липиду, например, пальмитиновой кислоте), который усиливает транслокацию присоединенного пептида через клеточную мембрану. Согласно конкретному варианту осуществления фрагмент, проникающий в клетку, не представляет собой пептидный фрагмент. Фрагмент может быть присоединен к N- или C-концу.

Пептиды по настоящему изобретению могут быть линейными или циклическими (циклизация может улучшить стабильность). Циклизация может происходить любыми способами, известными в на-

стоящей области техники. Если соединение состоит преимущественно из аминокислот, циклизация может происходить через N- к С-концу, N-конец к боковой цепи и N-конец к основной цепи, С-конец к боковой цепи, С-конец к основной цепи, боковую цепь к основной цепи и боковую цепь к боковой цепи, а также циклизация от основной цепи к основной цепи. Циклизация пептида может также происходить через неаминокислотные органические фрагменты, содержащиеся в пептиде.

Авторы настоящего изобретения также рассматривают штапельные пептиды.

Термин "штапельный пептид" в контексте настоящего описания относится к пептиду, имеющему выбранное количество стандартных или нестандартных аминокислот и, кроме того, имеющему по меньшей мере две части, способные вступать в реакцию, способствующую образованию углерод-углеродной связи, который контактировал с реагентом для создания по меньшей мере одного сшивающего средства между по меньшей мере двумя фрагментами, который модулирует, например, стабильность пептида.

Используемый в настоящем документе термин "штапельирование" вводит в пептид по меньшей мере два фрагмента, способные вступать в реакцию, способствующую образованию углерод-углеродной связи, которые могут контактировать с реагентом для образования по меньшей мере одного сшивающего средства между по меньшей мере двумя фрагментами. Штапельирование накладывает ограничения на вторичную структуру, такую как структура α -спирали. Длину и геометрию сшивающего средства можно оптимизировать, чтобы улучшить выход желаемого содержания вторичной структуры. Обеспечиваемое ограничение может, например, предотвратить разворачивание вторичной структуры и/или может усилить форму вторичной структуры. Например, вторичная структура, которая не может разворачиваться, более устойчива.

Пептиды по настоящему изобретению можно синтезировать биохимически, например, с использованием стандартных твердофазных технологий. Эти способы предусматривают исключительно твердофазный синтез, способы частичного твердофазного синтеза, конденсацию фрагментов, классический синтез из растворов. Процедуры твердофазного полипептидного синтеза хорошо известны в настоящей области техники и дополнительно описаны John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

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

Синтетические пептиды можно очищать с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии [Creighton T. (1983), *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y.], состав которых можно подтвердить с помощью аминокислотного секвенирования.

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

Помимо того, что пептиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы в клетках-хозяевах, они также могут быть синтезированы с использованием систем экспрессии *in vitro*. Эти способы хорошо известны в настоящей области техники, и компоненты системы коммерчески доступны.

Описанные в настоящем документе пептиды способны снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей, например, после инъекции (IP) 100 мкг дексаметазона.

Согласно другому варианту осуществления описанные в настоящем документе пептиды способны вмешиваться и блокировать секрецию как TNF- α , так и IL-6 клетками макрофагов 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 по настоящему изобретению опосредуют стрессовые реакции, и не желая связываться какой-либо теорией или механизмом действия, постулируется, что пептиды могут быть способны связывать p53, таким образом предотвращая связывание p53 с поврежденными ДНК. Пептид может быть протестирован путем анализа его способности ингибировать ответ на гипертермию клеточной линии L12 (которая лишена эндогенной активности p53 и была стабильно трансфицирована геном p53 или контрольным вектором). В этих клетках активность p53 вызывает остановку роста и выживаемость клеток, а не апоптоз в ответ на гипертермию (как описано в публикации международной заявки WO 2012/160563, содержание которой включено в настоящем документе посредством ссылки).

Способы измерения апоптоза.

Апоптоз представляет собой активный генно-направленный процесс самоуничтожения клетки, связанный с характерными морфологическими и биохимическими изменениями. Ядерная и цитоплазматическая конденсация и фрагментация умирающей клетки на мембранно-связанные апоптотические тельца являются типичными характеристиками апоптоза. Другой особенностью апоптотической гибели клеток

является деградация хромосомной ДНК на олигонуклеосомные фрагменты после активации специфическими нуклеазами.

Под "ингибированием апоптоза" или "подавлением апоптической активности" подразумевается любое уменьшение количества клеток, которые претерпевают апоптоз, по сравнению с необработанным контролем (т.е. клетки, не подвергшиеся воздействию пептидов по настоящему изобретению). Предпочтительно уменьшение составляет по меньшей мере 25%, более предпочтительно уменьшение составляет по меньшей мере 50% и наиболее предпочтительно уменьшение составляет по меньшей мере однократное.

Проточная цитометрия предлагает широкий спектр возможностей для измерения апоптоза. Были разработаны и внедрены различные способы, некоторые из которых окрашивают поверхность клеток, а некоторые - внутриклеточно.

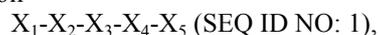
Одним из первых подходов было, помимо наблюдения, что апоптические клетки сжимаются и имеют более высокую внутриклеточную гранулярность, окрашивать ДНК-специфическими флуорохромами (например, йодидом пропидия [PI], бромидом этидия [EtBr]). Как только наносится смертельный удар, ДНК начинает менять свой профиль. Апоптическая ДНК не только состоит из фрагментированной ДНК (визуализируемой в виде более коротких полос, так называемой лестницы ДНК, в агарозном геле), но также частично расщепляется на отдельные нуклеотиды, так что флуорохромы, такие как PI или EtBr, имеют меньше ДНК для окрашивания (Nicoletti et al., 1991). Как правило, это наблюдается по сдвигу влево, называемому пиком суб-G1, на конкретном канале обнаружения флуорохрома в FACScan™ (от Becton Dickinson, США).

Другой способ заключается в опосредованном терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT) мечении концов разрывов цепи ДНК (TUNEL). Способ TUNEL обнаруживает разрывы цепи 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 апоптических клеток содержат экзогенные нуклеотиды (dUTP)-DIG в присутствии TdT. Фрагмент антитела к DIG с конъюгированным флуорохромом позволяет визуализировать апоптические клетки. Увеличение количества апоптических клеток вызывает большее количество фрагментов ДНК и, следовательно, более яркую флуоресценцию. Достоинством этого способа является очень высокая специфичность (Gavrieli et al., 1992). Недостатком этого способа является то, что он дорогостоящий и может использоваться только для небольшого набора образцов, так как это требует много времени. Следовательно, это неприменимо для больших программ скрининга.

Потеря полярности клеточной мембраны и представление повышенных количеств фосфатидилсерина (PS) на внешней стороне клеточной мембраны во время ранней фазы апоптоза привели к еще одному новому подходу. Аннексин V представляет собой кальций-зависимый связывающий фосфолипид белок с высоким сродством к PS. Целостность клеточной мембраны сохраняется на ранней и промежуточной фазах апоптоза. Клетки раннего и промежуточного апоптоза демонстрируют повышенное связывание аннексина-FITC и в основном отрицательны для окрашивания PI. Поздние стадии апоптоза и некротические клетки становятся дважды положительными из-за презентации PS на поверхности и окрашивания внутриклеточных нуклеиновых кислот PI из-за распада мембраны. Этот способ также дорог и трудоемок.

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

Таким образом, согласно первому аспекту настоящего изобретения предусмотрен выделенный пептид, длина которого не превышает шести аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой



- где (i) X_1 представляет собой пролин или его аналог или производное;
(ii) X_2 представляет собой пролин или его аналог или производное;
(iii) X_3 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, лейцина, цистеина, изолейцина, метионина и их производного или аналога;
(iv) X_4 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, серина, пролина и их производного или аналога;
(v) X_5 представляет собой любую аминокислоту и
(vi) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Пептид согласно этому аспекту настоящего изобретения может составлять в длину пять или шесть аминокислот.

Предпочтительно аминокислоты выбраны таким образом, чтобы пептидная связь между X_1 и X_2 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в *цис*-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону *цис*-конфигурации; и пептидная связь между X_3 и X_4 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже

90% времени) находилась в транс-конфигурация, т.е. равновесие было смещено в сторону транс-конфигурации.

Способы тестирования цис/транс-конфигурации пептидной связи известны в настоящей области техники и предусматривают, например, ЯМР.

Согласно одному варианту осуществления X_4 выбран из группы, состоящей из аланина, пролина, производного или аналога аланина и производного или аналога пролина.

Согласно конкретному варианту осуществления производное или аналог пролина представляет собой N-метилпролин, α -метилпролин или α -аминоасляную кислоту.

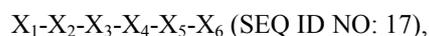
Согласно одному варианту осуществления пептид содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 (PPLPY).

Согласно другому варианту осуществления пептид состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3 (PPLPY).

Согласно другому варианту осуществления пептид состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7 (LPPLPY).

Согласно конкретному варианту осуществления X_1 и/или X_3 могут представлять собой D-аминокислоты, такие как пептид, приведенный в SEQ ID NO: 20 (d-LPPLPY).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен выделенный пептид, состоящий не более чем из десяти аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой



- где (i) X_1 представляет собой пролин или его аналог или производное;
(ii) X_2 представляет собой пролин или его аналог;
(iii) X_3 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, лейцина, цистеина, изолейцина, метионина и их производного или аналога;
(iv) X_4 выбран из группы, состоящей из аланина, валина, серина и их производного или аналога;
(v) X_5 представляет собой любую аминокислоту;
(vi) X_6 представляет собой пролин или его аналог или производное и
(vii) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Предпочтительно аминокислоты выбраны таким образом, чтобы пептидная связь между X_1 и X_2 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в цис-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону цис-конфигурации; и пептидная связь между X_3 и X_4 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в транс-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону транс-конфигурации; и пептидная связь между X_5 и X_6 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в цис-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону цис-конфигурации.

Согласно одному варианту осуществления пептид этого аспекта настоящего изобретения составляет в длину 6 аминокислот.

Примером такого пептида является пептид, приведенный в SEQ ID NO: 18 (PPLAYP).

Предпочтительные неприродные аминокислоты, которые можно использовать для замены пролина, включают в себя, без ограничения, N-метилпролин, α -метилпролин и α -аминоасляную кислоту.

Авторы настоящего изобретения рассматривают дополнительную аминокислоту, присоединенную к N-концу X_1 SEQ ID NO: 17.

Дополнительная аминокислота предпочтительно выбирается так, чтобы пептидная связь между ней и X_1 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в цис-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону цис-конфигурации.

Кандидаты в аминокислоты включают в себя, без ограничения, аланин, валин, лейцин, цистеин, изолейцин, метионин и их производное или аналог.

Согласно конкретному варианту осуществления дополнительная аминокислота, присоединенная к N-концу X_1 , представляет собой лейцин или его производное или аналог.

Согласно дополнительному варианту осуществления дополнительная аминокислота, присоединенная к N-концу X_1 , представляет собой D-аминокислоту.

Таким образом, авторы настоящего изобретения представляют пептиды, содержащие 7 аминокислот и имеющие формулу, приведенную в SEQ ID NO: 17.

Согласно конкретному варианту осуществления X_4 представляет собой аланин или его аналог или производное.

Согласно еще одному варианту осуществления X_5 выбран из группы, состоящей из тирозина, фенилаланина, триптофана и их производного или аналога.

Примером аминокислоты, которая рассматривается в качестве X_5 , является тирозин.

Примером аминокислоты, которая рассматривается в качестве X_3 , является лейцин.

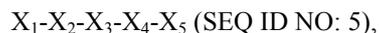
Пептид этого аспекта настоящего изобретения может содержать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 (LPPLAYP). Такой пептид может состоять из 7, 8, 9 или 10 аминокислот.

Пептид этого аспекта настоящего изобретения может состоять из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4.

Для пептидов этого аспекта настоящего изобретения X_1 и/или X_3 и/или X_5 могут представлять собой D-аминокислоты, такие как, например, d-LPPLAYP (SEQ ID NO: 21).

Для любого из пептидов, описанных в настоящем документе, настоящее изобретение также рассматривает ретро-инверсные пептиды. Такие пептиды устойчивы к протеазам и состоят из D-аминокислот в обратном порядке, что приводит к изменению основной цепи пептида, но неизменной ориентации боковых цепей.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен другой выделенный пептид, состоящий из пяти аминокислот, который состоит из аминокислотной последовательности, представленной формулой



где (i) X_1 и X_3 представляют собой любые аминокислоты;

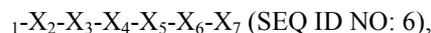
(ii) X_2 представляет собой пролин или его аналог или производное;

(iii) X_4 не представляет собой пролин;

(iv) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Предпочтительно аминокислоты выбраны так, чтобы пептидная связь между X_1 - X_2 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в цис-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону цис-конфигурации; и пептидная связь между X_3 - X_4 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в транс-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону транс-конфигурации.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен выделенный пептид, состоящий из семи аминокислот, который состоит из аминокислотной последовательности, представленной формулой



где (i) X_1 , X_5 и X_6 представляют собой любые аминокислоты;

(ii) X_2 , X_3 и X_7 представляют собой пролин или его аналог или производное;

(iii) X_4 не представляет собой пролин и

(iv) пептид способен снижать количество индуцированной дексаметазоном потери массы селезенки и/или тимуса у мышей.

Предпочтительно аминокислоты выбраны так, чтобы пептидная связь между X_1 - X_2 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в цис-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону цис-конфигурации; пептидная связь между X_2 - X_3 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в цис-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону цис-конфигурации; пептидная связь между X_6 - X_7 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в цис-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону цис-конфигурации; и пептидная связь между X_4 - X_5 (по меньшей мере 50% времени, по меньшей мере 60% времени, по меньшей мере 70% времени, по меньшей мере 80% времени или даже 90% времени) находилась в транс-конфигурации, т.е. равновесие было смещено в сторону транс-конфигурации.

Описанные в настоящем документе пептиды можно использовать для лечения множества заболеваний, включая в себя те, которые связаны со стресс-ассоциированными ответами. 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, гипоксии (например, ишемия и инсульт), а также в тканях и органах трансплантата до трансплантации.

Эти состояния также включают в себя аутоиммунные заболевания, характеризующиеся состоянием иммунизации человека по меньшей мере против одного из нормальных компонентов организма. Эти явления наблюдаются, в частности, при патологиях, включающих в себя, без ограничения, инфекции, связанные с SLE (системная красная волчанка), синдромом Гугеро-Шегрена (или болезнью Шегрена) и ревматоидным полиартритом, а также при таких патологиях, как саркоидоз и остеопения, спондилоартрит, склеродермия, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз (ALS), гипертиреоз, болезнь Ад-

дисона, аутоиммунная гемолитическая анемия, болезнь Крона, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, идиопатическая пурпура, геморрагия, инсулинозависимый сахарный диабет, миастения, вульгарная пузырчатка, пернициозная анемия, постстрептококковый гломерулонефрит, псориаз и спонтанное бесплодие, а также немедленные или отсроченные явления, наблюдаемые во время отторжения трансплантата и реакции "трансплантат против хозяина". Согласно одному конкретному варианту осуществления пептиды по настоящему изобретению применимы для лечения рассеянного склероза. Согласно другому варианту осуществления пептиды по настоящему изобретению применимы для лечения ишемии или инфаркта миокарда.

Другие заболевания, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают в себя, без ограничения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, вторичную дегенерацию после травмы, инсульт, интоксикацию ЦНС, глаукому, макулярную дегенерацию, сахарный диабет 1 типа, рассеянный склероз, системную красную волчанку, аутоиммунный увеит, болезнь трансплантат против хозяина, отторжение трансплантата, артрит, синдром системной воспалительной реакции (SIRS), воспалительное заболевание кишечника (IBD), респираторный дистресс-синдром (ARDS) у взрослых, псориаз, атеросклероз, инфаркт миокарда, лучевую болезнь, гипертермию, гипоксию, молниеносную токсическую печень, почечную недостаточность, бесплодие и многие другие.

Феномен отторжения трансплантата представляет собой состояние иммунизации человека против инородных компонентов (биологических жидкостей, таких как кровь, спинномозговая жидкость и т.д., клеток, тканей, органов, антител и т.д.), намеренно имплантированных пациенту.

Используемые в настоящем документе термины "дегенеративное расстройство", "дегенеративное заболевание" и "дегенеративное состояние" относятся к любому нарушению, заболеванию или состоянию, характеризующемуся несоответствующей пролиферацией клеток или несоответствующей гибелью клеток, или в некоторых случаях и тем, и другим, или абберантным или нерегулируемым апоптозом. Эти состояния также включают в себя состояния, при которых чрезмерный апоптоз, хотя и уместен и регулируется на уровне отдельной клетки, связан с дисфункцией или отказом органа.

Согласно одному варианту осуществления пептиды применимы для предотвращения гибели клеток в незлокачественной ткани или клетках у субъекта, страдающего неопластическим заболеванием и проходящего химиотерапию и/или лучевую терапию для лечения рака.

Используемые в настоящем документе 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 характеризуется этиологией, связанной с производством 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, макулярной дегенерации, инфаркта миокарда, лучевой болезни, гипертермии, гипоксии, фульминантно-токсической печени, почечной недостаточности и бесплодия.

Согласно еще одному варианту осуществления заболевание включает в себя пигментный ретинит и макулярную дегенерацию.

Согласно другому варианту осуществления заболевание включает в себя инсульт или инфаркт миокарда.

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

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату одного или нескольких активных ингредиентов, описанных в настоящем документе, с другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Назначение фармацевтической композиции заключается в том, чтобы облегчить введение соединения в организм.

В настоящем документе термин "активный ингредиент" относится к пептидам, ответственным за биологический эффект.

В настоящем документе и далее 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. Под этими фразами включено вспомогательное средство.

Приготовление фармацевтических композиций, содержащих пептиды или полипептиды в качестве активных ингредиентов, хорошо известно в настоящей области техники. Как правило, такие композиции готовят по назначению либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, однако также могут быть приготовлены твердые формы, которые могут быть суспендированы или солюбилизированы перед инъ-

екцией. Также препарат можно эмульгировать. Активный терапевтический ингредиент смешивают с неорганическими и/или органическими носителями, которые фармацевтически приемлемы и совместимы с активным ингредиентом. Носители представляют собой фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (наполнители), содержащие более или менее инертные вещества, при добавлении к фармацевтической композиции для придания 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 средства и буферные средства pH, которые повышают эффективность активного ингредиента.

Токсичность и терапевтическая эффективность описанных в настоящем документе пептидов можно определить стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных, например, путем определения IC₅₀ (концентрация, обеспечивающая 50% ингибирование) и LD₅₀ (летальная доза, вызывающая смерть 50% тестируемых животных) для исследуемого соединения. Данные, полученные в результате этих анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать для определения диапазона доз для применения у человека. Дозировка может варьироваться в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Точный состав, способ введения и дозировка могут быть выбраны индивидуальным врачом с учетом состояния пациента. (См., например, Fingl et al., 1975).

Количество активного средства, используемого в композиции для введения по настоящему изобретению, представляет собой количество, эффективное для достижения цели конкретного активного средства для целевого показания. Количество активного средства в композициях, как правило, представляет собой фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество. Однако это количество может быть меньше, чем то количество, когда композиция применяется в единичной дозированной форме, поскольку единичная дозированная форма может содержать множество соединений или активных средств в одной композиции или может содержать разделенные фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективные количества. Общее эффективное количество затем можно вводить в кумулятивных единицах, содержащих в целом эффективное количество активного средства.

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

Хотя подходящая дозировка пептида по настоящему изобретению варьируется в зависимости от пути введения, возраста, массы тела, пола или состояния пациента и должна определяться врачом в конце, доза, подходящая для взрослых людей, как правило, может составлять приблизительно 0,2-2000 мг/кг массы тела, предпочтительно приблизительно 2-200 мг/кг.

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

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям, которые по существу нетоксичны для живых организмов. Иллюстративные фармацевтически приемлемые соли включают в себя те соли, которые получают реакцией соединений по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемой минеральной или органической кислотой. Такие соли также известны как кислотно-аддитивные соли.

Композиции, содержащие соединения и активные средства, применимы для доставки активных средств в выбранные биологические системы и для увеличения или улучшения биодоступности активного средства по сравнению с введением активного средства без средства доставки. Доставка может быть улучшена путем доставки большего количества активного средства в течение определенного периода времени или путем доставки активного средства в конкретный период времени (например, для обеспечения более быстрой или отсроченной доставки) или в течение периода времени (например, длительная доставка).

Таким образом, фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены обычным способом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, содержащих вспомогательные вещества и вспомогательные средства, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтике. Правильный состав зависит от выбранного пути введения.

Фармацевтические композиции можно вводить местно или системно любым общепринятым и под-

ходящим путем, включая в себя, помимо прочего, пероральный, внутривенный, парентеральный, внутримышечный, подкожный, трансдермальный, интратекальный, местный, ректальный, буккальный, ингаляционный или интраназальный.

Для инъекции соединения по настоящему изобретению могут быть составлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Для введения через слизистые оболочки в составе используются обеспечивающие проникновение вещества, подходящие для проницаемого барьера. Такие обеспечивающие проникновение вещества, например ДМСО или полиэтиленгликоль, как правило, известны в настоящей области техники.

Фармацевтические композиции, которые можно применять перорально, включают в себя твердые капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие герметичные капсулы из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Твердые капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с таким наполнителем, как лактоза, такими связующими веществами, как крахмалы, такими смазывающими веществами, 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 дозировках, подходящих для выбранного пути введения.

Альтернативно, соединения по настоящему изобретению могут быть включены в жидкие препараты для перорального применения, такие как водные или масляные суспензии, растворы, эмульсии, сиропы или эликсиры, например. Более того, составы, содержащие эти соединения, могут быть представлены в виде сухого продукта для смешивания с водой или другим подходящим носителем перед применением. Такие жидкие препараты могут содержать обычные добавки, такие как суспендирующие средства, такие как сироп сорбита, метилцеллюлоза, сироп глюкозы/сахара, желатин, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гель стеарата алюминия и гидрогенизированные пищевые жиры; эмульгирующие средства, такие как лецитин, моноолеат сорбитана или гуммиарабик; неводные наполнители (которые могут включать в себя пищевые масла), такие как миндальное масло, фракционированное кокосовое масло, масляные сложные эфиры, пропиленгликоль и этиловый спирт; и консерванты, такие как метилипропил-пара-гидроксибензоат и сорбиновая кислота.

Для введения путем ингаляции пептиды для применения в соответствии с настоящим изобретением удобно доставлять в форме аэрозольного спрея из упаковки под давлением или распылителя с использованием подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана или диоксида углерода. В случае аэрозоля под давлением дозированная единица может быть определена путем обеспечения клапана для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи, например, из желатина для применения в ингаляторе или инсуффляторе могут быть составлены с содержанием порошковой смеси пептида и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также применимы для местного применения и внутри очага поражения. Используемый в настоящем документе термин "местный" означает "относящийся к конкретной области поверхности", например коже и слизистым оболочкам, а местное средство, нанесенное на определенную область поверхности, повлияет только на область, на которую оно нанесено. Составы пептидов/аналогов пептидов можно вводить местно в виде геля, мази, крема, эмульсии, состава с замедленным высвобождением, включая в себя трансдермальный пластырь, и они могут содержать липосомы и любой другой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для местного введения лекарственного средства. Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут также включать в себя подходящие твердые носители или вспомогательные вещества гелевой фазы. Примеры таких носителей или вспомогательных веществ включают в себя, без ограничения, карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли.

Композиции по настоящему изобретению могут, если желательно, быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, таком как одобренный FDA набор, который может содержать одну или несколько единичных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. К упаковке или дозатору могут прилагаться инструкции по применению. На упаковке или дозаторе также может быть размещено уведомление, связанное с контейнером, в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов, причем это уведомление отражает одобрение агентством формы композиций или введение человеку или животному. Такое уведомление, например, может относиться к маркировке, одобренной Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами США для рецептурных лекарств, или к утвержденному вкладышу продукта. Композиции, содержащие препарат по настоящему изобретению, составленный в совместимом фармацевтическом носителе, также могут быть приготовлены, помещены в соответствующий контейнер и помечены для лечения указанного состояния, как дополнительно подробно описано выше.

Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" относится к $\pm 10\%$.

Термины "содержит", "содержащий", "включает в себя", "включая в себя", "имеющий" и родственные им слова по корню и значению означают "включая в себя, без ограничения".

Термин "состоящий из" означает "включающий в себя и ограниченный".

Термин "состоящий по существу из" означает, что композиция, способ или структура могут включать в себя 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 заявленного состава, способа или структуры.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают в себя множественные ссылки, если контекст явно не диктует иное. Например, термин "соединение" или "по меньшей мере одно соединение" может включать в себя множество соединений, включая в себя их смеси.

В настоящей документе различные варианты осуществления настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, должно рассматриваться как 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.

Всякий раз, когда в настоящем документе указывается числовой диапазон, подразумевается, что он включает в себя любое процитированное число (дробное или целое) в пределах указанного диапазона. Фразы "диапазон/диапазоны между" первым указанным числом и вторым указанным числом и "диапазон/диапазоны от" первого указанного числа "до" второго указанного числа используются в настоящем документе взаимозаменяемо и предназначены для включения первого и второго указанных чисел и всех дробных и целых чисел между ними.

Используемый в настоящем документе термин "способ" относится к методам, средствам, технологиям и процедурам для выполнения данной задачи, включая в себя, без ограничения, те методы, средства, технологии и процедуры, которые либо известны, либо легко разработаны из известных методов, средств, технологий и процедур практикующими специалистами в химии, фармакологии, биологии, биохимии и медицине.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" включает в себя прекращение, существенное подавление, замедление или обращение вспять прогрессирования состояния, существенное облегчение клинических или эстетических симптомов состояния или существенное предотвращение появления клинических или эстетических симптомов состояния.

Понятно, что определенные особенности настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предусмотрены в комбинации согласно одному варианту осуществления. И наоборот, различные особенности настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подходящей подкомбинации или как подходящие в любом другом описанном варианте осуществления настоящего изобретения. Определенные особенности, описанные в контексте различных вариантов осуществления, не следует рассматривать как существенные особенности этих вариантов осуществления, если только вариант осуществления не работает без этих элементов.

Различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, как описано выше и заявлено в разделе формулы изобретения, находят экспериментальную поддержку в следующих примерах.

Примеры

Сделана ссылка на следующие примеры, которые вместе с вышеприведенными описаниями иллюстрируют некоторые варианты осуществления настоящего изобретения без ограничения.

Как правило, используемая в настоящем документе номенклатура и лабораторные процедуры, используемые в настоящем изобретении, включают в себя молекулярные, биохимические, микробиологические и рекомбинантные способы ДНК. Такие способы 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); методологии, 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 иммуноанализы подробно описаны в патентной и научной литературе, смотрите, 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 они включены в ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе. В этом документе приводятся другие общие ссылки. Предполагается, что приведенные в нем процедуры хорошо известны в настоящей области техники и предоставлены для удобства читателя. Вся информация, содержащаяся в нем, включена в настоящий документ посредством ссылки.

Пример 1.

Дексаметазон представляет собой кортикостероидное лекарственное средство, которое вызывает апоптоз иммунных клеток и лимфомиелоидных тканей. Мышей BALB/c использовали для исследования способности пептидов-кандидатов спасти лимфоцитарные клетки от апоптоза. Мышам внутрибрюшинно вводили 100 мкг дексаметазона. Мыши, получавшие дексаметазон, получали внутривенную инъекцию пептидов-кандидатов (250 или 400 мкг пептида/мышь) сразу после лечения дексаметазоном и через 24 ч после этого. Мышей умерщвляли через 48 ч после первого воздействия. Селезенку и тимус взвешивали и выполняли полный подсчет клеток обоих органов.

Пептиды, использованные при скрининге, представляли собой следующие:

PPLPY - SEQ ID NO: 3
 LPPLAYP - SEQ ID NO: 4
 PLPYP - SEQ ID NO: 9
 PPL - SEQ ID NO: 10
 PLP - SEQ ID NO: 11
 PYP - SEQ ID NO: 12
 LPGLPYP - SEQ ID NO: 13
 LPPLGYP - SEQ ID NO: 14
 LAPLPYP - SEQ ID NO: 15
 LPALPYP - SEQ ID NO: 16

Результаты.

Дексаметазон вызывал потерю массы селезенки и тимуса и снижение количества клеток селезенки приблизительно на 50%. Количество клеток тимуса уменьшалось почти на 80% по сравнению с нормальными мышами. Два пептида оказывали значительный эффект на уменьшение потери массы селезенки и тимуса, а также уменьшение количества клеток - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 (см. фиг. 1). Не было

разницы между двумя дозами воздействия (250 или 400 мкг/мышь).

Пример 2.

Мышей BALB/c использовали для исследования способности пептидов-кандидатов спасти лимфоцитарные клетки от апоптоза. Мышам внутривенно вводили 100 мкг дексаметазона. Мыши, получавшие дексаметазон, получали внутривенную инъекцию пептидов-кандидатов (200 мкг пептида/мышь) сразу после лечения дексаметазоном и через 24 ч после него. Мышей умерщвляли через 48 ч после первого воздействия. Селезенку и тимус взвешивали и выполняли полный подсчет клеток обоих органов. Пептиды, использованные при скрининге, представляли собой следующие:

LPPLPYP - SEQ ID NO: 2 (контроль)

PPLAYP - SEQ ID NO: 18

LPPLPY - SEQ ID NO: 7

LPPLAYP - SEQ ID NO: 4

PPLPY - SEQ ID NO: 3

PPLPY-NH2 - SEQ ID NO: 19

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 2. Каждый из исследованных пептидов показал улучшение по сравнению с контрольным пептидом (SEQ ID NO: 2).

Хотя настоящее изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, очевидно, что многие альтернативы, модификации и вариации будут очевидны для специалистов в настоящей области техники. Соответственно, предполагается, что оно охватывает все такие альтернативы, модификации и вариации, которые находятся в пределах сущности и широкого объема прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, цитирование или идентификация любой ссылки в настоящей заявке не должно толковаться как признание того, что такая ссылка доступна в качестве известного уровня техники для настоящего изобретения. В той степени, в которой используются заголовки разделов, их не следует рассматривать как обязательные ограничения.

Кроме того, приоритетный документ заявки на данное изобретение полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

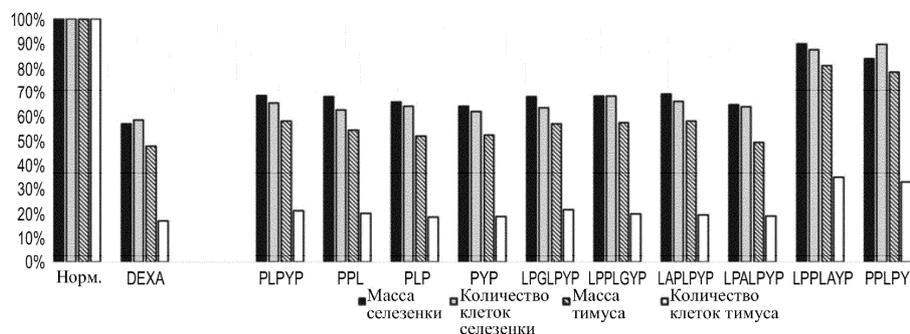
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный пептид, состоящий не более чем из десяти аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 21.

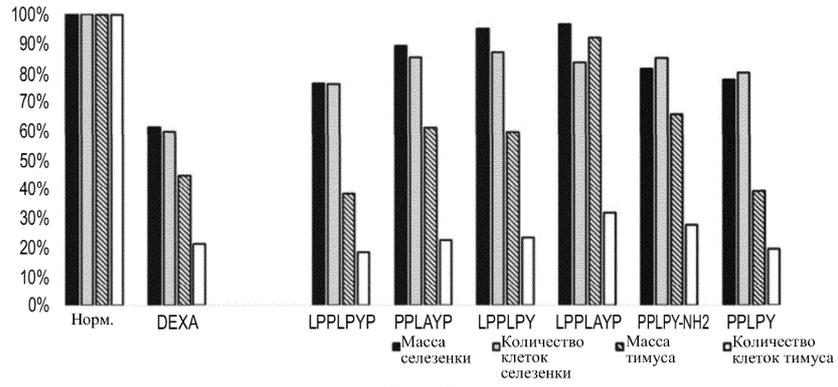
2. Выделенный пептид по п.1, состоящий из 6 или 7 аминокислот.

3. Выделенный пептид по п.1, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 21.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп.1-3 в качестве активного средства и физиологически приемлемый носитель.



Фиг. 1



Фиг. 2

