

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046469**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.18

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202293245

(22) Дата подачи заявки
2021.05.19

(54) СРЕДСТВО ПРОЛОНГИРОВАННОГО АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

(31) 2020117918

(32) 2020.05.20

(33) RU

(43) 2023.01.18

(86) PCT/RU2021/050133

(87) WO 2021/235983 2021.11.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ТИХООКЕАНСКИЙ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ ИМ. Г.Б. ЕЛЯКОВА
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК (ТИБОХ ДВО
РАН) (RU)**

**Гладких Ирина Николаевна,
Климович Анна Анатольевна,
Монастырная Маргарита
Михайловна, Дьяченко Игорь
Александрович, Мурашев Аркадий
Николаевич, Мошарова Ирина
Владимировна, Козлов Сергей
Александрович, Козловская Эмма
Павловна (RU)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) SINTSOVA O.V. et al. Peptidny blokator ionnogo kanala trpv1 proyavlyayet dlitelny analgetichesky effekt v modeli teplovoy stimulyatsii. Doklady Rossiyskoy akademii nauk. Nauki o zhizni. 06.03.2020, v. 493, p. 423-426, abstract, p. 423-425
MONASTYRNAYA M. et al. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone Heteractis crispa is a full antagonist of the TRPV1 receptor. Marinedrugs. 2016, v. 14, N. 12, p. 1-20, abstract, p. 2, 3, 5, 7, 16

(72) Изобретатель:
**Лейченко Елена Владимировна,
Синцова Оксана Владимировна,**

(57) Изобретение относится к биохимии, конкретно к применению биологически активных пептидов, обладающих ингибирующим действием на болевые рецепторы, и касается способов применения в качестве анальгетического средства рекомбинантного аналога пептида HCRG21 из морской анемоны Heteractis crispa, обладающего длительным анальгетическим эффектом за счет ингибирования функциональной активности ионного канала TRPV1. Указанный пептид может быть использован как лекарственное средство самостоятельно или в смеси с другими активными компонентами для снижения болевых синдромов различной этиологии, в том числе острых и хронических, для снятия воспаления, а также для достижения умеренного гипотермического эффекта. Изобретение позволяет получить эффективный анальгетический препарат длительного действия, имеющий направленное действие на клеточную мишень, который может быть доставлен в организм как неинвазивным, так и парентеральным путем.

B1

046469

046469

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к биохимии, конкретно к использованию биологически активных пептидов как анальгетических средств, которые могут найти применение в медицине и ветеринарии для снижения болевых синдромов, в том числе острых и хронических, а также использоваться в научных исследованиях для разработки методов поиска новых перспективных лекарств или в качестве инструментов изучения молекулярной организации и механизмов функционирования ионных каналов, рецепторов и протеолитических ферментов.

Предшествующий уровень техники

Боль - важное физиологическое явление, почти всегда сопровождающееся развитием патологий. Различают острую и хроническую боль. В отличие от хронической, острая боль, как правило, краткосрочна, имеет легко идентифицируемую причину и обычно хорошо поддается излечению. Хроническая боль бывает ноцицептивной (вызванная повреждением ткани или воспалением) или нейропатической. Нейропатическая боль возникает в результате патологического возбуждения нейронов в периферической или центральной нервной системе и поддерживается нарушенными соматосенсорными процессами. Традиционно терапия болевых состояний включает сочетание применения нестероидных противовоспалительных препаратов и прочих неопиоидных анальгетиков, таких как ацетилсалициловая кислота и ее производные, ацетаминофен, ибупрофен, фенпрофен, дифлузинал и напроксен; и/или опиоидных анальгетиков, включая морфин, гидроморфон, метадон, леворфанол, фентанил, оксикодон и оксиморфон. Использование опиоидов связано с многочисленными побочными эффектами, включая физическую и наркотическую зависимость. Доказано, что быстрый рост в использовании рецептурных опиоидных препаратов в Соединенных Штатах хорошо коррелирует с увеличением смертности от передозировки опиоидами и ростом продаж наркотиков на нелегальном рынке. Злоупотребление и зависимость от опиоидов из года в год растет, и это ведет мировое сообщество в целом к серьезному кризису, который имеет разрушительные последствия для здравоохранения и экономики. К сожалению, в настоящее время нет эффективных альтернатив для замены опиоидных анальгетических препаратов в случаях острых послеоперационных болей и при онкологических заболеваниях.

Создание принципиально новых анальгетических средств, способных управлять молекулярными механизмами генерации боли, невозможно без выяснения таргетной специфичности исследуемого препарата. Установлено, что ключевыми игроками в процессах болевого сигналинга являются рецепторы и ионные каналы периферических терминалей и аксонов ноцицепторов (Basbaum A.I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain// Cell 2009, 139, 267-284). К ним относятся, в частности, неселективные катионные каналы семейства TRP (Transient Receptor Potential), участвующие у живых организмов в различных физиологических процессах, таких как фоторецепция, восприятие феромонов, ощущение вкуса, боль, механорецепция, регуляция кровяного давления и другие. Для млекопитающих было показано, что нарушение функционирования этих каналов напрямую связано с развитием ряда патологических состояний (Mickle A.D. et al. Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies// Pharmaceuticals 2016, 9, e72).

Определенные типы TRP каналов используются животными как терморекцепторы для регулирования температуры тела и измерения температуры окружающей среды, что особенно актуально для предохранения от опасной для жизнедеятельности организма температуры и обеспечения выживания организма. Среди так называемых "термо" TRP каналов, наиболее хорошо охарактеризованным является TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1), неселективный катионный канал с предпочтением к Ca^{2+} (Szallasi A. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist pro of-of-concept// Nat. Rev. Drug Discov. 2007, 6, 357-372). Он является полимодальным ионным каналом, который активируется различными химическими веществами, такими как капсаицин перца чили, резинифератоксин из молочая смолоносного, камфора из камфорного дерева, пептидные токсины, эндогенные липиды (анандамид, N-арахидоноилдопамин, лейкотриен B4), известные как "эндованилоиды", а также отвечает на закисление межклеточной среды (pH<5,9). Однако, наиболее значимой его функцией у млекопитающих является активация опасной температурой (>42°C) (Starowicz K. et al. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids// Pharmacol. Ther. 2007, 114:13-33; Cao E., et al. TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids// Neuron 2013, 77, 667-679). Косвенно TRPV1 также активируется и сенсибилизируется широким спектром других медиаторов воспаления, таких как гистамин, брадикинин, простагландины и АТФ, а также NGF, который, помимо всего прочего, увеличивает экспрессию TRPV1 в сенсорных нейронах (RU 2621708, RU 2648445, RU 2541127, RU 2506077, RU 2379282, EP 2352726, US 2017266139).

TRPV1 экспрессируется в клетках центральной и периферической нервной системы и участвует во многих важных физиологических процессах, таких как терморегуляция, липогенез, функционирование мочевого пузыря, сердечная деятельность, нейрогенез в головном мозге.

Многочисленные исследования показали, что этот канал вовлечен в регуляцию ряда патологических состояний, таких как гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, недержание кала/мочи, аллергический контактный дерматит, гиперчувствительность дыхательных путей, сердечно-сосудистые расстройства, диабетическая и периферическая нейропатия и боли, связанные с онкологическими заболеваниями

(Jara-Oseguera A. et al. TRPV1: On the road to pain relief// *Curr. Mol. Pharmacol.* 2008, 1, 255-269; Mickle A.D. et al. Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies// *Pharmaceuticals* 2016, 9, pii.E72).

В медицинской практике в качестве анальгетиков давно применяются агонисты TRPV1 канала капсаицин и резинифератоксин (RTX) (US 5178879, US 566378, US 6239180, US 4313958, US 4599342, US 5188837), которые также используются для активации или абляции клеток, экспрессирующих TRPV1, что дает представление о роли этих специфических ноцицепторов в соматических или висцеральных болевых ощущениях (Cianchetti C. Capsaicin jelly against migraine pain// *Int. J. Clin. Pract.* 2010, 64, 457-459; Myzsik G. Capsaicin as new orally applicable gastroprotective and therapeutic drug alone or in combination with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in healthy human subjects and in patients// *Prog. Drug Res.* 2014, 68, 209-258). В патентной литературе практическое использование таких агонистов встречается в документах известных международных компаний: Glenmark Pharmaceuticals S.A. (WO 2007042906, WO 2008110863, WO 2008059339, WO 2009095726, WO 2009010824, WO 2009081219, WO 2009081222, WO 2008010061, WO 2009090548, WO 2009034433), Gruenenthal GmbH (WO 2007045462, WO 2008125295, WO 2008125296, WO 2008125337, WO 2008125342, WO 2008046647), PharmEste s.r.l. (WO 2008075150, WO 2008006481, WO 2008006480) и Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. (WO 2008091021). Основным недостатком использования этих агонистов канала в качестве лекарственных препаратов являются сильные болевые реакции при их введении.

Обнаружение антагонистов TRPV1 инициировало обширные исследования, как в научно-исследовательских институтах, так и фармацевтических компаниях, в результате которых был сформулирован терапевтический потенциал этих соединений. Рекомендовано использовать их для лечения болезней, сопровождающихся проявлениями хронических болевых состояний (RU 2151014, RU 2396261, RU 2448108, RU 2450006, RU 2452733, RU 2458055, RU 2468020, RU 2621708, RU 2621708, EP 2352726, US 2017266139, US 6248788, JP 2016047822), а также для лечения или профилактики заболеваний или состояний, в которых играет роль или участвует активация ионного канала TRPV1, таких как мигрень (RU 2448108), остеоартрит (RU 2151014, RU 2448108, RU 2458055, RU 2621708), гиперактивное состояние мочевого пузыря (RU 2151014, RU 2448108, RU 2450006, RU 2452733, RU 2458055, RU 2468020, RU 2621708, EP 2352726), кашель (Khalid S. et al. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonism in patients with refractory chronic cough: a double-blind randomized controlled trial// *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014, 134, 56-62; Cabral L.D.M. & Giusti-Paiva A. The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Antagonist Capsazepine Improves the Impaired Lung Mechanics during Endotoxemia// *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2016, 119, 421-427; EP 2352726, RU 2448108), воспалительные заболевания дыхательных путей (Lv H. et al. Effect of transient receptor potential vanilloid-1 on cough hypersensitivity induced by particulate matter 2.5// *Life Science*, 2016, 151, 157-166), в том числе астма (RU 2151014, RU 2448108), воспалительные заболевания кишечника (IBD), в том числе синдром раздраженного кишечника (IBS) (RU 2151014, RU 2448108, RU 2452733, RU 2458055, RU 2621708), язвенная болезнь (RU 2151014, RU 2448108, RU 2621708), диабет (Gram D.X. et al. TRPV1: A Potential Therapeutic Target in Type 2 Diabetes and Comorbidities?// *Trends in Molecular Medicine*, 2017, 23, 1002-1013; Zhong, B. et al. TRPV1 mediates glucose-induced insulin secretion through releasing neuropeptides// *In Vivo (Brooklyn)*, 2019, 33, 1431-1437; RU 2448108) и дерматит (Yun, J.W. et al. TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery// *Journal of Dermatological Science*, 2011, 62, 8-15; RU 2448108).

Для ряда лекарственных средств для лечения хронической боли на основе антагонистов TRPV1 были опубликованы клинические данные испытаний фазы I: SB-705498 (GSK), AMG-517 (Amgen), МК-2295 (Merck), AZD-1386 (Astra-Zeneca) и GRC-6211 (Lilly/Glenmark), (Gunthorpe M.J. et al. Clinical development of TRPV1 antagonists: target in pivotal point in the pain pathway// *Drug Discov Today*, 2009, 14, 56-67; Khairatkar-Joshi N. et al. TRPV1 antagonists: the challenges for therapeutic targeting// *Trends Mol. Med.* 2009, 15, 14-22). Показано, что высокая доза (400 мг) SB-705498, имеющего период полувыведения 35-93 ч, показывает целевую фармакодинамическую активность в снижении воспаления, вызванного термическими ожогами, УФ радиацией, и после применения капсаицина (Gunthorpe M.J. et al. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway// *Drug Discov. Today* 2009, 14, 56-67; Chizh B.A. et al. The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans// *Pain* 2007, 132, 132-141). AMG-517, имеющий период полувыведения от 13 до 23 дней, вызывает большое и устойчивое повышение температуры у людей, которое ослабляется лишь частично многократным дозированием (Gavva N.R. et al. Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade// *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, 323, 128-37). Установлено, что АВТ-102, по сравнению с AMG-517, демонстрирует незначительное повышение температуры, которое быстро затухает при многократном введении препарата (Honore P. et al. Repeated dosing of АВТ-102, a potent and selective TRPV1 antagonist, enhances TRPV1-mediated analgesic activity in rodents, but attenuates antagonist-induced hyperthermia// *Pain* 2009, 142, 27-35).

Дальнейшие испытания с использованием перорального способа введения антагонистов TRPV1 канала, таких как SB-705498, AMG-517, МК-2295 и GRC-6211, на сегодняшний день отложены или остановлены. Основным препятствием для введения большинства из этих агентов в клинику остается их не-

удовлетворительный профиль безопасности, в частности гипертермия.

Антагонистами TRPV1, не обладающими гипертермическим эффектом, являются соединения АРНС1, АРНС2 и АРНС3 - первые пептидные ингибиторы этого канала, которые были найдены в яде морской анемоны *Heteractis crispa*. Они обладают выраженным анальгетическим действием при внутривенном введении в дозах 0,01 мг/кг, связанным с частичным ингибированием TRPV1, что было показано на различных моделях стимуляции боли у экспериментальных животных (RU 2368621 С1, 27.09.2009; RU 2404245, С1, 20.11.2010; RU 2619170, С2, 12.05.2017).

Пептид HCRG21 (номер последовательности в базе UniProt P0DL86), родственная соединениям АРНС1, АРНС2 и АРНС3, который может быть получен биотехнологическим способом или быть выделенным из экстракта морской анемоны, также является антагонистом TRPV1 канала (Monastyrnaya M.M. et al. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor// *Mar. Drugs* 2016, 14, 229-234). Потенциал пептида HCRG21 как анальгетика раскрыт ранее не был.

Раскрытие изобретения

В настоящем документе мы показываем возможность использования пептида HCRG21 как анальгетика, средства, понижающего температуру тела и/или противовоспалительного средства, что подтверждается данными, полученными на нескольких животных моделях. Пептид HCRG21 имеет преимущество над пептидом АРНС1 по длительности обезболивающего действия, которое было обнаружено в ходе сравнительных экспериментов. Пептид HCRG21 также характеризуется выраженным гипотермическим и противовоспалительным эффектом. Таким образом, лекарственное средство на основе пептида HCRG21 превосходит известные аналоги по своей эффективности.

Изобретение решает задачу разработки активной фармакологической субстанции с пролонгированным анальгетическим действием, и/или выраженным гипотермическим и противовоспалительным действием, и создания на его основе лекарственного препарата, предназначенного для облегчения болезненных состояний у человека и животных при парентеральном или интраназальном способе введения.

Задачу решают применением пептида HCRG21, который обладает пролонгированным анальгетическим действием, выраженным гипотермическим эффектом и противовоспалительной активностью. Такой пептид является активной фармакологической субстанцией, которую вводят в состав готовой лекарственной формы для изготовления лекарственного средства для парентерального или интраназального способа введения.

Получаемый лекарственный препарат предназначен для облегчения острых болевых состояний и боли при хронических патологических процессах, где нарушена нормальная функциональная активность и задействована повышенная активность ионного канала TRPV1. Препарат снимает воспаление, эффективно снижает температуру тела млекопитающих, в том числе человека.

Таким образом, настоящее изобретение относится к пептиду HCRG21 для применения в качестве лекарственного средства, обладающего пролонгированным анальгетическим, противовоспалительным и/или гипотермическим действием.

Предпочтительно пептид HCRG21 получают рекомбинантным путем.

В частности, изобретением предусмотрено применение пептида HCRG21 парентерально или интраназально в дозе не менее 0,1 мг/кг.

Лекарственное средство на основе пептида HCRG21 предназначено для лечения пациентов, конкретно для снятия болевых ощущений, вызванных полосными операциями, суставными и онкологическими болями.

Данным пациентом может быть млекопитающее, и в том числе человек.

В следующем аспекте изобретения предусмотрен пептид HCRG21 для применения в качестве лекарственного средства, для лечения острых и хронических заболеваний: мигрень, остеоартрит, кашель, гиперактивное состояние мочевого пузыря, воспалительное заболевание дыхательных путей, астма, воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника, диабет, дерматит.

Предпочтительно, пептид HCRG21 получают рекомбинантным путем.

Также в изобретении предлагается способ лечения, где предусмотрено введение лекарственного средства, содержащего пептид HCRG21, для обеспечения пролонгированного анальгетического, противовоспалительного и гипотермического действия.

В частности, вводимое в способе лекарственное средство, содержит эффективное количество пептида HCRG21.

Эффективное количество пептида HCRG21, представляет собой количество, достаточное для достижения конкретной заявленной цели, такой как снятие или уменьшение болевого синдрома, снятие или уменьшение воспаления, понижение температуры тела. "Эффективное количество" может быть определено опытным путем и известными способами, относящимися к заявленной цели.

Технический эффект изобретения заключается в значительно более длительном анальгетическом действии заявляемого средства, наблюдаемом в животных моделях боли (не менее 13 ч) при внутривенном, подкожном, внутримышечном и интраназальном способе введения мышам в дозе 0,1 мг/кг.

Изобретение раскрывает информацию о биологических свойствах пептида HCRG21, полученную в

результате тестирования пептида в различных моделях болевой чувствительности на животных. В сравнительных тестах заявляемый пептид превосходит аналоги АРНС1 - АРНС3 по следующим параметрам:

- более длительное анальгетическое действие;
- более длительный латентный период первой реакции на боль, вызванную капсаицином, меньшее время облизывания и меньшее количество актов облизывания;
- более выраженный гипотермический эффект.

Лучшая эффективность заявляемого пептида по сравнению с ближайшими аналогами обусловлена принципиальными различиями в механизме действия на биологическую мишень. Аналоги АРНС1 и АРНС3 являются полимодальными, и, в зависимости от силы стимула (концентрация агониста (капсаицина), рН, температура), они либо потенцируют TRPV1, либо ингибируют (до 32%) проходящий через канал ток (Andreev Y.A. et al. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia// *Mar. Drugs* 2013, 11(12):5100-15), тогда как пептид HCRG21 полностью блокирует (ингибирует на 95%) индуцированный капсаицином ионный ток через мембрану клеток.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - ингибирование уровня внутриклеточного кальция в ответ на добавление 3 мкМ раствора капсаицина на линии клеток СНО, стабильно экспрессирующей ионный канал TRPV1. Используют 30 нМ концентрацию пептида HCRG21. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение *** - $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Фиг. 2 - анальгетический эффект разных доз пептида HCRG21 в тесте "горячая пластина" при внутримышечном способе введения. По оси ординат откладывают время реакции на болевой стимул. Контрольные животные получают аналогичный объем физиологического раствора (PBS). Для сравнения измеряют аналог - пептид АРНС1, в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 3 - анальгетический эффект разных доз пептида HCRG21 и аналога - пептида АРНС1, в тесте "горячая пластина" при внутривенном способе введения. По оси ординат откладывают время реакции на болевой стимул. Контрольные животные получают аналогичный объем раствора PBS. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 4 - анальгетический эффект разных доз пептида HCRG21 в тесте "горячая пластина" при интраназальном способе введения. По оси ординат откладывают время реакции на болевой стимул. Контрольные животные получают аналогичный объем раствора PBS. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 5 - фармакодинамика анальгетического эффекта пептида HCRG21 и аналога - пептида АРНС1, в тесте "горячая пластина" в дозе 0,1 мг/кг при внутримышечном введении. По оси ординат откладывают время реакции на болевой стимул, по оси абсцисс приводят время между введением пептида и измерением эффекта. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой контрольных животных, которым вводили равный объем PBS.

Фиг. 6 - анальгетический эффект 0,1 мг/кг дозы пептида HCRG21 в тесте "горячая пластина" при подкожном (А) и при внутривенном (Б) способе введения для двух временных точек измерения эффекта через 2 и 13 ч после введения препарата. По оси ординат откладывают время реакции на болевой стимул. Контрольные животные получают аналогичный объем раствора PBS. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 7 - анальгетический эффект пептида HCRG21 и аналога - пептида АРНС1, в дозе 0,1 мг/кг при внутримышечном введении в капсаициновом тесте. По оси ординат откладывают измеряемые параметры за 15 мин наблюдения: (А) латентный период первой реакции, (Б) время, которое мышь провела за лизанием лапы, (В) количество актов облизывания. Контрольные животные получают аналогичный объем раствора PBS. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 8 - противовоспалительный эффект пептида HCRG21 в дозе 0,1 мг/кг при внутримышечном введении в тесте тепловой гиперчувствительности, вызванной интраплантарным введением полного адьюванта Фрейнда. По оси ординат откладывают время отдергивания воспаленной лапы от горячей пластины ($t=53^{\circ}\text{C}$). Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение ** - $p < 0,01$ по сравнению с группой контрольных животных, которым вводили равный объем PBS.

Фиг. 9 - анальгетический эффект пептида HCRG21 в дозах 0,1 и 1 мг/кг при внутримышечном введении в формалиновом тесте. Контрольные животные получают аналогичный объем раствора PBS (отрицательный контроль) или раствор ибупрофена в дозе 100 мг/кг (положительный контроль). По оси ординат откладывают измеряемые параметры за 1 мин наблюдения: (А) латентное время поджатия задней лапы, (Б) количество актов облизывания задней лапы, по оси абсцисс приводят время между введением

пептида и началом очередного измерения. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 10 - анальгетический эффект пептида HCRG21 в дозах 0,1 и 1 мг/кг при внутримышечном введении в тесте механической гиперчувствительности в условиях острого локального воспаления, индуцируемого интраплаттарным введением каррагинана. Контрольные животные получают аналогичный объем раствора PBS (отрицательный контроль) или раствор ибупрофена в дозе 100 мг/кг (положительный контроль). По оси ординат откладывают силу сдавливания щипцами. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 11 - противовоспалительный эффект пептида HCRG21 в дозах 0,1 и 1 мг/кг при внутривенном введении в тесте острого локального воспаления, индуцируемого интраплаттарным введением каррагинана. Контрольные животные получают аналогичный объем раствора PBS (отрицательный контроль) или раствор индометацина в дозе 10 мг/кг (положительный контроль). По оси ординат откладывают увеличение объема лапы животного в процентах от исходного объема. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по сравнению с группой PBS.

Фиг. 12 - влияние пептида HCRG21 и аналога - пептида APHC1, на ректальную температуру тела мышей линии ICR при внутримышечном введении в дозе 0,1 мг/кг. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой контрольных животных, которым вводили равный объем PBS.

Фиг. 13 - влияние пептида HCRG21 на ректальную температуру тела мышей линии ICR при различных способах введения в дозе 0,1 мг/кг. Достоверность различий вычисляют t-критерием Стьюдента, достоверным считают значение * - $p < 0,05$ по сравнению с группой контрольных животных, которым вводили равный объем PBS.

Осуществление изобретения

Пример 1. Получение пептида HCRG21.

Активный пептид получают биотехнологическим методом в составе химерного белка с фрагментом тиоредоксина. Синтез гена *hcrG21* проводят с помощью ПЦР (2 стадии) с использованием специфичных праймеров, созданных на основе полученной последовательности гена *hcrG21* и оптимизированных в соответствии с редкими кодонами для экспрессии в *E. coli*, которые полностью перекрывают нуклеотидную последовательность (Monastyrnaya M.M. et al. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor// *Mar. Drugs* 2016, 14, 229-234). В последовательность прямого и обратного фланкирующих праймеров вводят сайты рестрикции для *EcoRI* и *XhoI* соответственно. В последовательность прямого фланкирующего праймера перед последовательностью, кодирующей первый аминокислотный остаток пептида HCRG21, вводят дополнительный кодон, ATG, кодирующий остаток метионина. За сайтом рестрикции *XhoI* в последовательность обратного праймера добавляют стоп-кодон TAA. Генно-инженерную конструкцию (экспрессионный вектор), способную экспрессировать пептид HCRG21 в клетках *E. coli*, получают на основе синтезированного фрагмента гена *hcrG21* путем лигирования с экспрессирующим вектором pET32b+ (Novagen) после обработки фрагмента гена *hcrG21* и плазмиды pET32b+ рестриктазами *EcoRI* и *XhoI*. Полученные плазмиды проверяют секвенированием. В результате получают плазмиду, несущую гены химерного белка TrxA-HCRG21 под контролем T7 промотера.

В состав химерного белка для синтеза пептида HCRG21 может входить любой другой коммерчески доступный белок-помощник (например, барназа (*bar*'), дисульфид-обменный белок (*DsbC*), белок, связывающий мальтозу (*MBP*), или же комбинация хитин-связывающего домена и мини-интеина *DnaB* из *Synchocystis sp.*, способного подвергаться pH-зависимому самоотщеплению). Химерный белок TrxA-HCRG21 представляет собой слитную аминокислотную последовательность фрагмента тиоредоксина А (TrxA, 109 аминокислотных остатков), последовательности 6 аминокислотных остатков гистидина, остатка метионина, расположенного непосредственно перед первым остатком пептида HCRG21, и целевого пептида HCRG21.

Клетки BL21(DE3) трансформируют экспрессионным вектором, содержащим последовательность, кодирующую химерный белок. После селекции на чашках с селективным антибиотиком (карбенициллин), клетки пересеивают в колбу с 1200 мл жидкой питательной среды (LB) с селективным антибиотиком (карбенициллин) и выращивают при перемешивании до оптической плотности $\sim 0,6$ единиц (A_{600}) при температуре 37°C. Индукцию экспрессии проводят добавлением изопропил- β -D-1-тиогаалактопиранозидом до концентрации 0,4 мМ. Клетки продолжают инкубировать и перемешивать при 19°C для продукции химерного белка и через 20 ч осаждают и замораживают. Для проведения дезинтеграции клетки ресуспендируют в буферном растворе (20 мМ Трис-HCl pH 7,2, 150 мМ NaCl).

Дезинтегрируют клетки ультразвуком, клеточный дебрис осаждают центрифугированием. Целевой химерный белок выделяют из растворимой фракции.

Отделение продукта от прочих клеточных белков проводят с помощью металло-аффинной хроматографии на Ni^{2+} -сорбенте в буферном растворе (20 мМ Трис-HCl pH 7,2, 150 мМ NaCl), для элюирования химерного белка используют буферный раствор (150 мМ имидазол, 300 мМ NaCl, 20 мМ Tris, pH 7,5).

Далее аффинную метку и белок-помощник удаляют, расщепляя слитный белок бромцианом по остатку метионина, введенному специально перед первой аминокислотой пептида HCRG21. Химерный белок растворяют в 0,1 М HCl до концентрации белка 1 мг/мл, расщепляют бромцианом 18 ч в темноте, используя 600-кратный молярный избыток бромциана. Растворитель и избыток бромциана удаляют на вакуумном концентраторе, далее смесь продуктов гидролиза наносят на колонку с обращенной фазой сорбента Jupiter C 18 (10×250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Фракционирование проводят в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной (v/v) трифторуксусной кислоте. Контроль чистоты полученного рекомбинантного пептида проводят методом масс-спектрометрического анализа.

Пример 2. Подтверждение правильности фолдинга рекомбинантного аналога.

Проводят тестированием методом *in vitro* на культуре клеток CHO, стабильно экспрессирующей ионный канал TRPV1. Стабильную линию клеток размораживают из криобанка и ведут не менее 2 недель на питательной среде (DMEM/10% фетальная телячья сыворотка/1% PS (пенициллин/стрептомицин)) с добавлением смеси антибиотиков B/Z (Blasticidin S (5 мкг/мл), zeocin (250 мкг/мл)), в стерильных матрасах при 37°C в присутствии 5% CO₂, регулярно пересаживая через каждые 2-3 дня. Для измерения клетки высевают в 96-луночные планшеты с черными стенками и прозрачным дном в количестве 75000 штук на лунку и культивируют ночь при 37°C в присутствии 5% CO₂ в полной среде без антибиотиков PS, содержащей 1 мкг/мл тетрациклина.

Клетки окрашивают цитоплазматическим кальциевым индикатором Fluo-4AM с использованием методики и готовых растворов для анализа кальция Fluo-4 Direct™ (Invitrogene) и последовательно инкубируют в темноте при 37°C 45-60 мин и далее при 25°C в течение 45-60 мин. Измерения проводят при комнатной температуре с использованием планшетного спектрофотометра, укомплектованного встроенной автоматической системой дозирования жидкости, NOVOstar (BMG LABTECH, Германия). Селективные ионные токи через ионный канал TRPV1 (разгорание красителя за счет повышения концентрации внутриклеточного кальция) вызываются добавлением 3 мкМ раствора капсаицина дозирующим устройством в каждую лунку в ходе измерения. Флуоресцентные сигналы регистрируют снизу при следующих параметрах ($\lambda_{ex} = 485$ нМ, $\lambda_{em} = 520$ нМ, интервал измерения каждые 2 с по 10 вспышек). В качестве отрицательного контроля используют клетки CHO без ионного канала TRPV1, максимальную флуоресценцию определяют через 20 с после добавления капсаицина. Тестируемый пептид HCRG21 вносят в лунку перед началом измерения так, чтобы его конечная концентрация равнялась 30 нМ, в контрольные лунки вносят равный объем буферного раствора. Пептид HCRG21 вызывает достоверное снижение уровня внутриклеточного кальция (фиг. 1), рассчитанного как разница между максимальной и базовой флуоресценции (dFl), деленная на базовую флуоресценцию (Fl₀). Усредняют результаты по 9 независимым измерениям, достоверность отличий между контрольной и экспериментальной группой определяют t-критерием Стьюдента.

Пример 3. Тестирование анальгетического действия пептида HCRG21 на мышах в тесте "горячая пластина" при различных способах введения.

Мышей делят на 19 групп (3 контрольные и 16 экспериментальных) по 9 особей в каждой. Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Болевое раздражение моделируют, помещая мышь на металлическую поверхность прибора, разогретую до 55°C. Для предотвращения ожогов лап время воздействия раздражения ограничивают 60 с. Тестируемый образец пептида HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят в дозе 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 и 1 мг/кг. Для определения наиболее эффективного способа используют различные маршруты введения: внутримышечно, внутривенно, интраназально. Пептид APHC1 применяют как контроль для сравнения эффективности обезболивающего действия в тех же условиях при внутримышечном и внутривенном введении. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Анальгетический эффект измеряют по увеличению времени, прошедшего от момента посадки животного на пластину до момента первого подпрыгивания. Измерение болевой чувствительности проводят через 60 мин после внутримышечного (фиг. 2), через 30 мин после внутривенного (фиг. 3) и через 120 мин после интраназального (фиг. 4) введения препаратов. На основании полученных результатов определяют, что при внутримышечном введении анальгетический эффект пептида HCRG21 наступает в дозе 0,1 мг/кг, при этом APHC1 обладает немного большим эффектом, который сопоставим с эффектом HCRG21 в дозе 0,5 мг/кг. При повышении дозы до 1 мг/кг происходит незначительное снижение эффективности обоих пептидов (фиг. 2). При внутривенном введении контрольный образец эффективен в диапазоне доз 0,01-1 мг/кг, тогда как HCRG21 в диапазоне 0,1-1 мг/кг (фиг. 3). При интраназальном введении активность пептида HCRG21 сохраняется в той же минимальной дозе 0,1 мг/кг. Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента. Получают, что в дозе 0,1 мг/кг пептид HCRG21 эффективно снижает болевую чувствительность при любых способах введения.

Пример 4. Тестирование длительности анальгетического действия пептида HCRG21 на мышах в тесте "горячая пластина" при внутримышечном введении.

Мышей делят на 24 группы (контрольные и экспериментальные) по 9 особей в каждой. Тесты про-

вводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Болевое раздражение моделируют, помещая мышь на металлическую поверхность прибора, разогретую до 55°C. Для предотвращения ожогов лап время воздействия раздражения ограничивают 60 с. Тестируемый образец пептида HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят в дозе 0,1 мг/кг внутримышечно. Пептид АРНС1 применяют как контроль для сравнения длительности обезболивающего действия в той же концентрации при тех же условиях. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Анальгетический эффект измеряют по увеличению времени, прошедшего от момента посадки животного на пластину до момента первого подпрыгивания (фиг. 5). Измерение болевой чувствительности проводят через 5 мин, 15 мин, 1, 2, 3, 6, 13 и 24 ч после введения препарата. На основании полученных результатов определяют, что анальгетическое действие HCRG21 развивается постепенно, достоверно отлично от контроля к 1 ч (максимальный эффект 2 ч), является пролонгированным (не менее 13 ч). Это отличает действие пептида HCRG21 от аналога АРНС1, который быстро дает анальгетический эффект, но только на 2 ч. Каждая мышь используется только для одного измерения анальгетического эффекта. Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента.

Пример 5. Тестирование длительности анальгетического действия пептида HCRG21 на мышах в тесте "горячая пластина" при различных способах введения.

Мышей делят на 8 групп (4 контрольные и 4 экспериментальные) по 7 особей в каждой. Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Болевое раздражение моделируют, помещая мышь на металлическую поверхность прибора, разогретую до 55°C. Для предотвращения ожогов лап время воздействия раздражения ограничивают 60 с.

Тестируемый образец пептида HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят в дозе 0,1 мг/кг внутривенно и подкожно. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Анальгетический эффект измеряют по увеличению времени, прошедшего от момента посадки животного на пластину до момента первого подпрыгивания (фиг. 6). Измерение болевой чувствительности проводят через 2 и 13 ч после введения препарата.

На основании полученных результатов определяют, что анальгетическое действие HCRG21 достоверно отлично от контроля и является пролонгированным (не менее 13 ч) как в случае подкожного (фиг. 6А), так и в случае внутривенного введения (фиг. 6Б). Каждая мышь используется только для одного измерения анальгетического эффекта. Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента.

Пример 6. Тестирование анальгетического действия пептида HCRG21 в капсаициновом тесте.

Тестирование проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 3 группы (контрольную и экспериментальные) по 9 особей в каждой. Тестируемый пептид HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят внутримышечно в дозе 0,1 мг/кг. Пептид АРНС1 применяют как контроль для сравнения эффекта в той же концентрации при тех же условиях. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Через 60 мин всем мышам в подушечку задней лапы вводят 20 мкл смеси (соотношение 1:9 (v/v)) 10% спиртового раствора капсаицина с физиологическим раствором. Количество капсаицина в 20 мкл смешанного раствора составляет 3 мкг. После инъекции капсаицина немедленно начинают наблюдение за поведением мыши и регистрируют время начала реакции животного на индукцию боли (первое облизывание или подергивание поврежденной лапы), далее подсчитывают количество и продолжительность облизывания поврежденной лапы. Наблюдение за каждым животным проводится в течение 15 мин. Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента.

Анальгетический эффект измеряют по увеличению времени, прошедшего от момента посадки животного на пластину до момента начала реакции животного на индукцию боли (фиг. 7А), а также уменьшению продолжительности (фиг. 7Б) и количества (фиг. 7В) облизываний поврежденной лапы. На основании полученных результатов определяют, что анальгетическое действие HCRG21 выражается в снижении чувствительности животных к раздражающему действию капсаицина: уменьшается интенсивность и время облизывания раздраженной лапы более чем в 2,5 раза и увеличивается в 3,5 раза время начала поведенческих реакций животного на индукцию боли по сравнению с контрольной группой. Анальгетическое действие пептида сравнения АРНС1 является менее выраженным по всем трем регистрируемым параметрам.

Пример 7. Тестирование противовоспалительного действия пептида HCRG21 в модели тепловой гиперчувствительности.

Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 2 группы (контрольную и экспериментальную) по 9 особей в каждой. Мышам экспериментальной группы в подушечку задней лапы вводят воспалительный агент, представляющий собой 20 мкл смеси полного адьюванта Фрейнда и физраствора в соотношении 1:1 (v/v). Через 24 ч животным внутримышечно вводят 200 мкл раствора тестируемого пептида HCRG21 в стерильном физиологическом растворе в дозе 0,1 мг/кг; животным контрольной группы вводят 200 мкл физиологического раствора. Измерение проводят через

60 мин после введения. Фиксируют латентное время отдергивания лапы, подвергшейся действию воспалительного агента, от горячей пластины ($t=53^{\circ}\text{C}$). Анальгетический эффект измеряют по увеличению времени прошедшего от момента посадки животного на пластину до момента первого облизывания задней лапы (фиг. 8). Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента.

Пример 8. Тестирование анальгетического действия пептида HCRG21 в формалиновом тесте.

Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 4 группы (контрольную и экспериментальные) по 9 особей в каждой. Тестируемый пептид HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят внутримышечно в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Ибупрофен в дозе 100 мг/кг применяют в качестве положительного контроля и вводят животным перорально. Через 60 мин всем мышам в подушечку задней лапы вводят 20 мкл 2,5% раствора формалина. Сразу после введения подсчитывают паттерны болевой реакции (количество актов облизывания и время поджатия задней лапы) в следующем режиме:

1-й период (острый): в течение 20 мин после инъекции паттерны подсчитывают за 1 мин через 6-минутные интервалы (0, 6, 12, 18 мин);

2-й период (тонический): спустя 30 мин после введения формалина паттерны подсчитывали в течение 20 мин за 1 мин через 6-минутные интервалы (30, 36, 42, 48 мин).

Анальгетический эффект оценивают по уменьшению продолжительности паттернов болевой реакции относительно контрольных животных (фиг. 9). Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента.

На основании полученных результатов определяют, что анальгетическое действие HCRG21 выражается в значительном уменьшении количества актов облизывания и времени поджатия задней лапы как в I фазе острого периода формалинового теста (0-10 мин), характеризующей взаимодействие с ноцицепторами, так и во II фазе (спустя 10-15 мин), блокируя опосредованную pH или модулированную активацию TRPV1, которая происходит во время воспаления. Ибупрофен (типичный анальгетик группы НПВС) намного проигрывает по своим анальгетическим свойствам пептиду HCRG21.

Пример 9. Тестирование анальгетического действия пептида HCRG21 в модели боли, вызванной воспалением, индуцированным введением каррагинана.

Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 4 группы (контрольную и экспериментальные) по 9 особей в каждой. Тестируемый пептид HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят внутримышечно в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Ибупрофен в дозе 100 мг/кг применяют в качестве положительного контроля и вводят животным перорально. Через 60 мин всем мышам в подушечку задней лапы вводят 20 мкл 1% раствора каррагинана. Сразу после введения измеряют силу сдавливания щипцами (значения больше 300 принимаются за 300). Анальгетический эффект оценивают по увеличению силы воздействия относительно контрольных животных (фиг. 10). Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента. Статистически значимый анальгетический эффект HCRG21 проявляется в дозе 1 мг/кг и выражается в увеличении силы воздействия, что значительно превосходит показатели (доза и сила воздействия), которые наблюдаются для ибупрофена.

Пример 10. Тестирование противовоспалительного действия пептида HCRG21 в модели острого локального воспаления, индуцированного введением каррагинана.

Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 4 группы (контрольную и экспериментальные) по 6 особей в каждой. Тестируемый пептид HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят внутривенно в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Индометацин в дозе 10 мг/кг применяют в качестве положительного контроля и вводят животным перорально. Всем животным измеряют объем задней правой лапы при помощи плетизмометра (Ugo Basile). Через 30 мин мышам, подвергнутым внутривенному введению физиологического раствора или пептида HCRG21, и через 60 мин мышам, получавшим перорально индометацин, в подушечку задней правой лапы вводят 20 мкл 1% раствора каррагинана (Sigma, США). Затем при помощи плетизмометра проводят измерение образовавшегося отека через 1, 2, 3, 4 и 24 ч. Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента. Статистически значимый противовоспалительный эффект HCRG21 проявляется в дозах 0,1 и 1 мг/кг и выражается в меньшем объеме отека по сравнению с контролем и сравнимым с таковым в результате применения индометацина, противовоспалительного препарата группы НПВС, в дозе 10 мг/кг (фиг. 11).

Пример 11. Влияние пептида HCRG21 на температуру тела.

Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 3 группы (контрольную и экспериментальные) по 9 особей в каждой. Тестируемый образец пептида HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят в дозе 0,1 мг/кг внутримышечно. Пептид АРНС1

применяют как контроль для сравнения активности в той же концентрации при тех же условиях. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. С помощью электронного термометра, введенного ректально, измеряют исходную температуру тела (0 мин), далее проводят измерения спустя 60, 180 и 360 мин после введения пептидов (фиг. 12). Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента.

Оба пептида вызывают статистически значимое понижение температуры тела животных на 0,7-1,0°C на 60 мин после введения, при этом HCRG21 проявляет более длительный гипотермический эффект, который наблюдают даже спустя 360 мин, с максимальным снижением температуры на 1,5°C через 180 мин после введения.

Пример 12. Влияние пептида HCRG21 на температуру тела при различных способах введения.

Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 4 группы (контрольную и экспериментальные) по 7 особей в каждой. Тестируемый образец пептида HCRG21 растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят в дозе 0,1 мг/кг интраназально, подкожно и внутривенно. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. С помощью электронного термометра, введенного ректально, измеряют исходную температуру тела (0 мин), далее проводят измерения спустя 1, 3 и 6 и 13 ч после введения пептида (фиг. 13). Результаты обрабатывают статистически, достоверность отличий результатов контрольной и экспериментальной группы определяют с помощью теста Стьюдента.

Пептид HCRG21 вызывает статистически значимое понижение температуры тела животных на 0,4-0,5°C на 60 мин после внутривенного и интраназального введения, при этом HCRG21 проявляет длительный гипотермический эффект, который наблюдают даже спустя 13 ч, после интраназального введения.

Пример 13. Тестирование локомоторной активности в тесте "Открытое поле".

Для анализа возможного нейротоксического или раздражающего действия тестируемого пептида HCRG21 проводят оценку его влияния на локомоторную активность и поведение животных в тесте "Открытое поле" с помощью автоматического актометра "ОПТО-VARIMEX ATM3 AUTO SYSTEM". Тесты проводят на самцах белых мышей линии ICR массой 20-30 г. Мышей делят на 7 групп (контрольную и экспериментальные) по 8 особей в каждой. Тестируемый образец растворяют в стерильном физиологическом растворе и вводят в дозах 0,01-1,0 мг/кг внутримышечно. Пептид АРНС1 применяют как контроль для сравнения активности в той же концентрации при тех же условиях. Контрольные животные получают эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Спустя 55 мин после введения веществ, животное помещают на исследовательскую площадку прибора. Время пребывания животного на поле составляет 3 мин. Регистрируют показатели двигательной деятельности: пройденное расстояние (DT - Ambulatory distance traveled by the subject), время отсутствия перемещения животного (RT - Resting time), время перемещения животного (AT - Ambulatory time, when the subject), количество принятия животным вертикального положения (VIC/VIB rearing).

Данные для каждой группы заносят в таблицу, результаты представляют как среднее значение \pm SEM. Достоверные отличия представляют относительно контрольной группы (1%-ный PBS), * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$.

Группа	DT, см	RT, с	AT, с	VIC/VIB
PBS	779,4 \pm 14	69,3 \pm 2,9	110,7 \pm 2,9	10,7 \pm 2,5
АРНС1 - 1мг/кг	851 \pm 17,2	70,6 \pm 4,3	109,4 \pm 4,2	10,2 \pm 2,6
Изменение от конт, %	9,2	1,9	- 1,2	- 4,3
АРНС1 - 0,1мг/кг	1261,4 \pm 19**	55,4 \pm 3,8*	124,6 \pm 3,7*	19,9 \pm 3,1*
Изменение от конт, %	61,8	-20,0	12,6	85,5
АРНС1 - 0,01мг/кг	892,9 \pm 13	68,4 \pm 3,9	104,1 \pm 3,6	19,5 \pm 2,4*
Изменение от конт, %	14,5	-1,3	-5,9	82,0
HCRG21 - 1 мг/кг	771,5 \pm 18,3	88,6 \pm 5*	91,4 \pm 5*	16,2 \pm 1,8*
Изменение от конт, %	-1,0	27,9	-17,5	51,7
HCRG21 - 0,1 мг/кг	1399,4 \pm 26,9*	56,1 \pm 5,1	123,9 \pm 5,1	21,5 \pm 3,3*
Изменение от конт, %	79,5	-19,0	11,9	100,7
HCRG21 - 0,01 мг/кг	863 \pm 17,3	78,6 \pm 4,2	101,4 \pm 4,2	15,4 \pm 2,5
Изменение от конт, %	10,7	13,5	-8,4	43,5

Статистический анализ по критерию Стьюдента показывает, что, по сравнению с контрольной группой, у животных в опытных группах не наблюдается дозозависимых достоверных отличий по анализируемым параметрам. Тестируемый пептид HCRG21 и контрольный АРНС1 не проявляют ярко-

выраженного депрессивного действия на ЦНС, их введение в дозе 0,1 мг/кг наоборот приводит к слабому усилению двигательной активности. Так как в исследуемых дозах оба пептида не оказывают побочного нейротоксического действия на организм животных, считают, что все специфические эффекты анальгезии являются прямыми.

Промышленная применимость

Приведенные выше примеры доказывают, что пептид HCRG21 проявляет анальгетическую активность на млекопитающих при различных способах введения (внутримышечно, внутривенно, подкожно и интраназально).

Эффект пептида HCRG21 изучался в пяти различных тестах на диком типе мышей, что подтверждает возможность использования пептида как анальгетика для купирования болевых синдромов различной этиологии. Тест "горячая пластина" является наиболее связанным с ингибированием ионного канала TRPV1, поскольку TRPV1 играет важную роль в ощущении температуры. В связи с тем, что капсаицин является селективным агонистом канала TRPV1, эффективность пептида тестируют в качестве антагониста этого рецептора в модели боли, вызванной капсаицином. Инъекция капсаицина моделирует боль от различных провоспалительных эндогенных и экзогенных лигандов, что проявляется в облизывании и встряхивании инъекционной лапы. Формалиновый тест представляет собой сложную модель боли *in vivo*, в которой оценивают не только анальгетическую активность, а противовоспалительное действие в целом. У мышей инъекции формалина вызывают двухфазную поведенческую реакцию. Первая фаза (острая) длится в течение первых 10 мин после введения формалина и обусловлена прямой стимуляцией ноцицепторов; вторая фаза (хроническая) фиксируется спустя 10-15 мин после введения формалина и длится в течение 20-40 мин, связана с механизмами развития нейрогенного воспаления и сенсибилизацией ЦНС. Термическая гипералгезия, индуцированная введением полного адьюванта Фрейнда (CFA), еще один вариант воспалительной модели, в котором задействованы различные пути воспаления. Введение каррагинана вызывает развитие воспалительного процесса и как следствие боль, которая обусловлена активацией таких ноцицепторов, как TRPA1 и TRPV1, посредством медиаторов воспаления и изменения (уменьшения) кислотности.

Контрольный пептид APHC1 используют во многих экспериментах для сравнения. HCRG21 показывает более длительное анальгетическое действие (не менее 13 ч), чем APHC1 (менее 3 ч), при внутримышечном способе введения в дозе 0,1 мг/кг (фиг. 5). HCRG21 обладает более длительным (8 с) латентным периодом первой реакции на боль, вызванную капсаицином, меньшим временем (59 с) и меньшим количеством актов облизывания соответствующей лапы (10 с), в отличие от APHC1 (5, 9, 110 и 18 с соответственно) при внутримышечном введении в дозе 0,1 мг/кг (фиг. 7). HCRG21, по сравнению с APHC1, оказывает более длительный гипотермический эффект, который наблюдается даже спустя 360 мин после введения (фиг. 12).

Заявляемое средство проявляет достоверный анальгетический эффект при внутримышечном введении в формалиновом тесте в дозе 0,1-1,0 мг/кг, превосходящий эффект ибупрофена, широко применяемого на практике анальгетического и противовоспалительного препарата (фиг. 9).

HCRG21 в тесте открытое поле не оказывает негативного воздействия на ЦНС (таблица), и его анальгетическое и противовоспалительное действие относится к эффекту специфического ингибирования канала TRPV1.

Все вышеперечисленное позволяет использовать пептид HCRG21 индивидуально или как активный компонент готовой лекарственной формы обезболивающего средства для нужд ветеринарии и медицины. Лекарственные препараты, содержащие заявляемое средство в качестве активной формы, могут вводиться парентерально или интраназально.

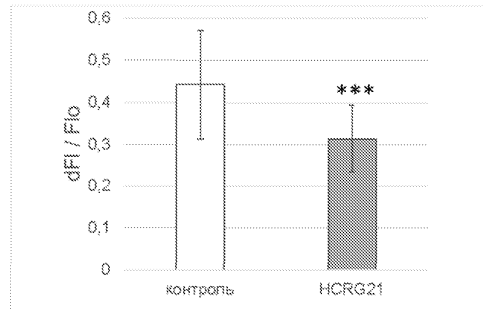
Все публикации или патенты, процитированные в настоящем документе, включены во всей своей полноте в настоящий документ путем отсылки, поскольку они показывают уровень техники на момент настоящего изобретения и/или обеспечивают описание и реализацию настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

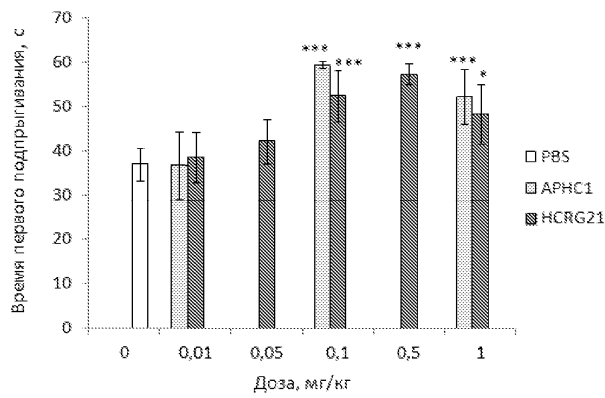
1. Применение пептида HCRG21 в качестве лекарственного средства, обладающего пролонгированным анальгетическим, противовоспалительным и/или гипотермическим действием.
2. Применение по п.1, где пептид HCRG21 получают рекомбинантным путем.
3. Применение по п.2, где пептид HCRG21 применяют парентерально или интраназально в дозе не менее 0,1 мг/кг.
4. Применение по п.2, где пептид HCRG21 применяют у млекопитающих, в частности человека.
5. Применение по пп.2-4, где пептид HCRG21 применяют для снятия болевых ощущений, вызванных полостными операциями, суставными и онкологическими болями.

6. Применение пептида HCRG21 в качестве лекарственного средства для лечения острых и хронических заболеваний, в которых играет роль или участвует активация ионного канала TRPV1, таких как мигрень, остеоартрит, кашель, гиперактивное состояние мочевого пузыря, воспалительное заболевание дыхательных путей, астма, воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника, диабет, дерматит.

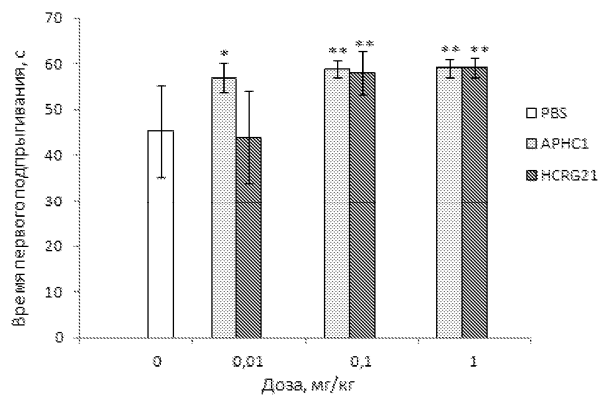
7. Применение по п.6, где пептид HCRG21 получают рекомбинантным путем.



Фиг. 1

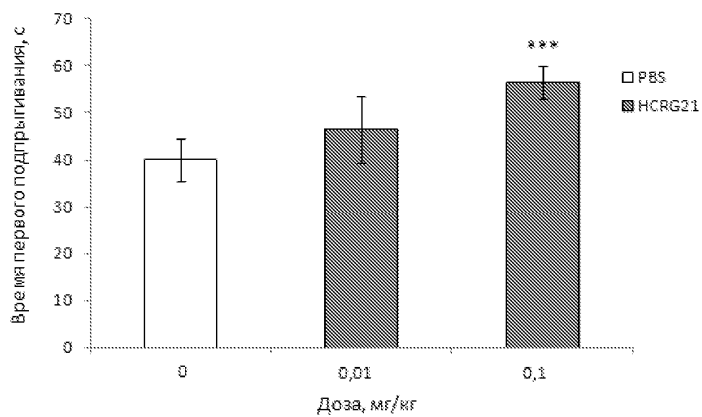


Фиг. 2

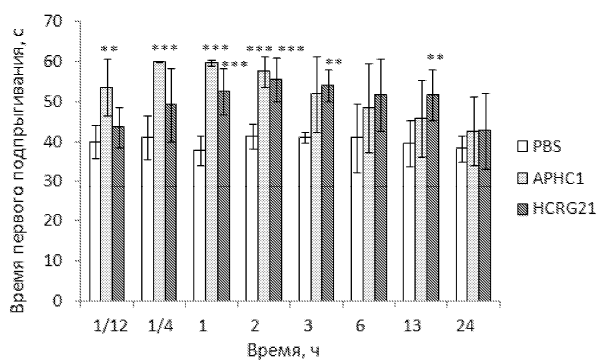


Фиг. 3

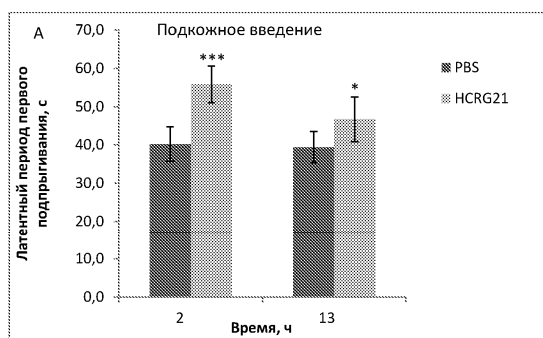
046469



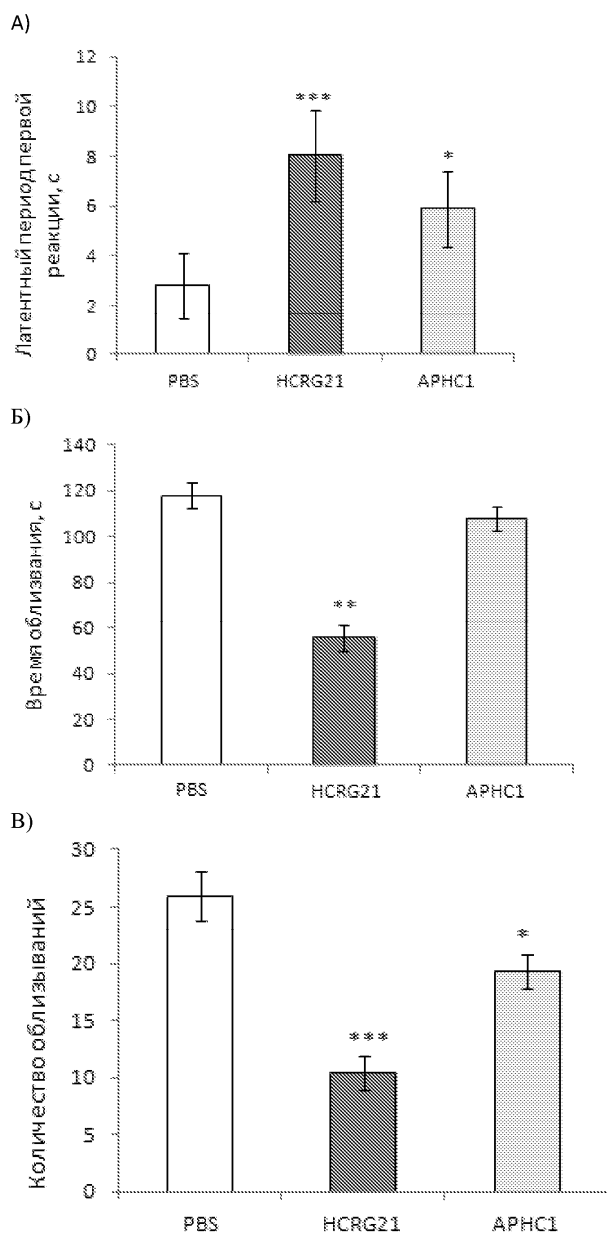
Фиг. 4



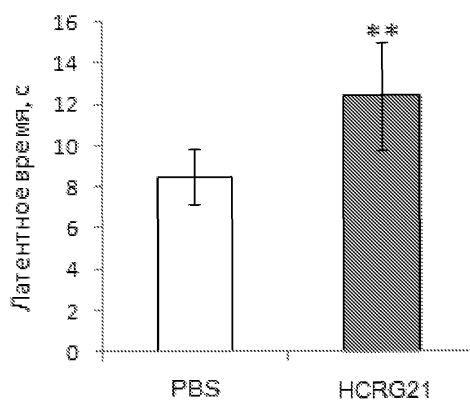
Фиг. 5



Фиг. 6

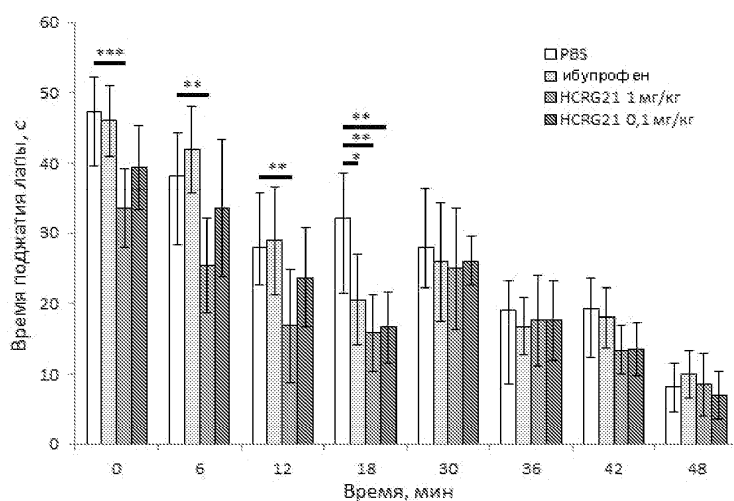


Фиг. 7

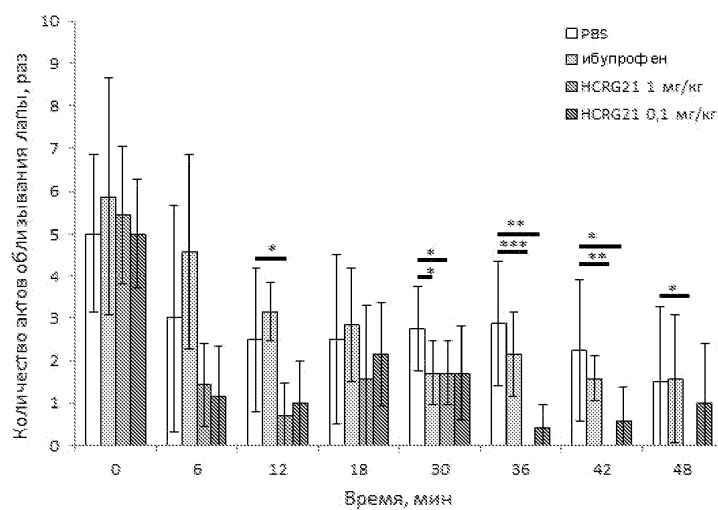


Фиг. 8

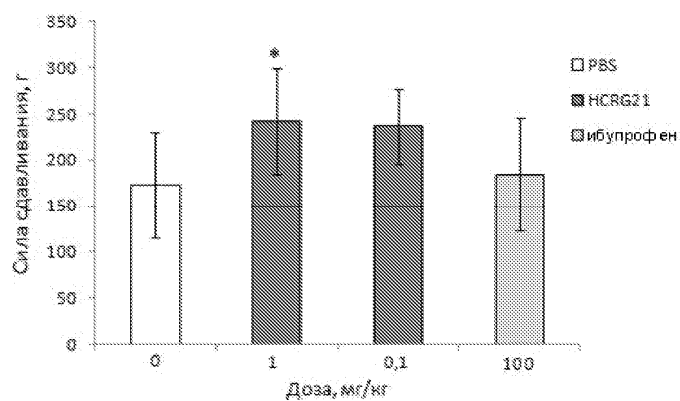
А)



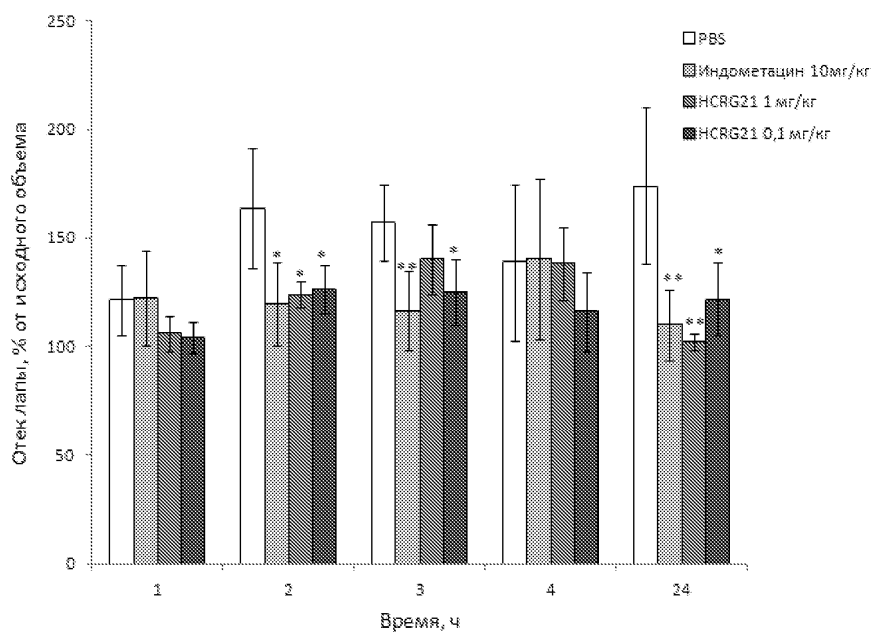
Б)



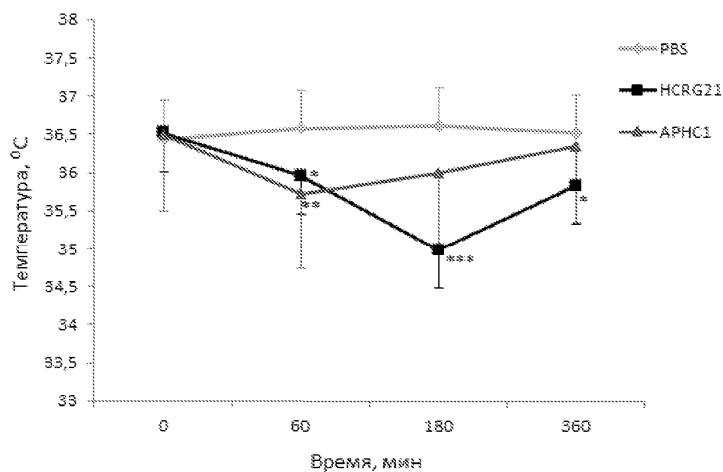
Фиг. 9



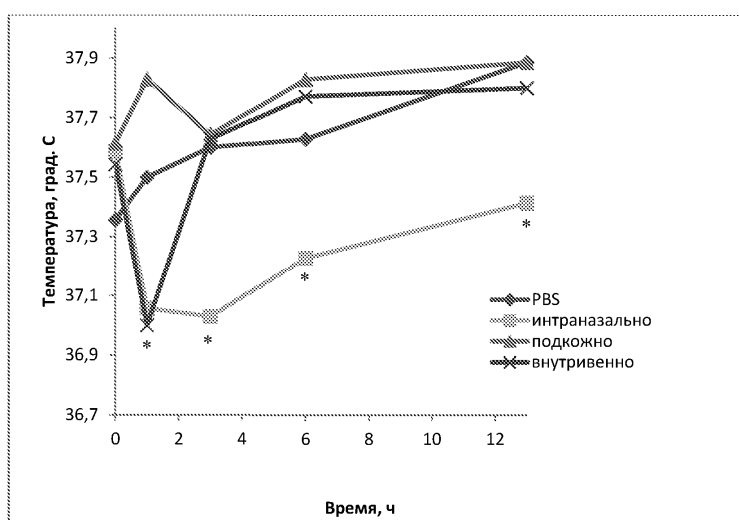
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

