

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047845**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.19

(21) Номер заявки
202190906

(22) Дата подачи заявки
2019.11.06

(51) Int. Cl. **C07K 14/78** (2006.01)
A61K 8/65 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)

(54) **РЕКОМБИНАНТНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ПЕПТИДОВ КОЛЛАГЕНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **10 2018 218 916.1; 10 2019 200 790.2; 10 2019 202 606.0**

(32) **2018.11.06; 2019.01.23; 2019.02.26**

(33) **DE**

(43) **2021.08.03**

(86) **PCT/EP2019/080421**

(87) **WO 2020/094728 2020.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЖЕЛИТА АГ (DE)

(72) Изобретатель:
Хаусманн Штефан, Фрех Ханс-Ульрих, Эссер Штеффен, Хан Мартин (DE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **OLSEN D ET AL.** "Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin: development of a substitute for animal-derived gelatin with superior features" **PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION**, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, Vol. 40, No. 2, 01 April 2005 (2005-04-01), pages 346-357 DOI: 10.1016/J.PEP.2004.11.016 ISSN: 1046-5928, XP004781387 the whole document

WANG TIANYI ET AL. "Production of recombinant collagen: state of the art and challenges" **ENGINEERING BIOLOGY, THE INSTITUTION OF ENGINEERING AND TECHNOLOGY, MICHAEL FARADAY HOUSE, SIX HILLS WAY, STEVENAGE, HERTS. SG1 2AY, UK**, Vol. 1, No. 1, 01 June 2017 (2017-06-01), pages 18-23 DOI: 10.1049/ENB.2017.0003 XP006075472 the whole document

**DE-A1-102012110612
WO-A2-0134801**

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения препаратов пептидов коллагена, содержащих рекомбинантные пептиды коллагена, к препаратам пептидов коллагена, полученным с помощью этих способов, продуктам, содержащим препараты пептидов коллагена, и применениям указанных препаратов и продуктов.

B1

047845

047845 B1

Настоящее изобретение относится к способам получения препаратов пептидов коллагена, содержащих рекомбинантные пептиды коллагена, препаратам пептидов коллагена, полученным с помощью этих способов, продуктам, содержащим препараты пептидов коллагена, и применениям указанных выше препаратов и продуктов.

Коллаген представляет собой внеклеточный структурный белок, содержащийся в организме таких животных, как млекопитающие, птицы и рыбы. Обычно он присутствует в соединительной ткани, главным образом в качестве составляющей внеклеточного матрикса. Сухожилия, связки, хрящи и кости особенно богаты коллагеном. Однако коллагены не обнаружены в растениях и одноклеточных организмах.

Коллагены бывают разных типов, которые различаются по структуре и функциональным свойствам, и, помимо прочего, они имеют разную структуру, функцию и происхождение. Отдельные полипептидные цепи, составляющие коллаген, синтезируются в клетке на рибосомах эндоплазматического ретикулума в виде более крупных молекул-предшественников и имеют протяженные повторяющиеся (Gly-XY)_n-последовательности, где X и Y могут быть любой аминокислотой, но в основном представляют собой пролин и 4-гидроксипролин.

Эти полипептидные цепи-предшественники подвергаются в эндоплазматическом ретикулуме посттрансляционному гидроксилированию остатков пролина и лизина полипептидной цепи с образованием остатков гидроксипролина и гидроксилизина. Гидроксилирование обеспечивает стабилизацию смежных полипептидных цепей коллагена формирующейся в клетке правой тройной спирали, которая состоит из трех полипептидных цепей-предшественников (проколлагена).

Образованный таким образом проколлаген подвергается внутриклеточному гликозилированию, секретируется из клетки в виде гликозилированной трехспиральной структуры (тропоколлагена) с последующим образованием коллагена в результате опосредованного пептидазой расщепления концевых остатков. В процессе фибриллогенеза происходит самосборка коллагена в коллагеновые фибриллы, которые затем ковалентно сшиваются с образованием коллагеновых волокон.

Коллаген часто используется в денатурированной форме, известной как желатин, или в форме гидролизатов.

Если желатин и коллаген подвергнуть гидролитическим процессам, в частности ферментативному гидролизу, то можно получить гидролизаты коллагена разнообразные по своему составу и имеющие широкий спектр применений, в зависимости от типа, происхождения используемого коллагена, а также условий ферментации. Эти гидролизаты коллагена представляют собой смесь пептидов, молекулярные массы которых находятся в определенных диапазонах. Использование таких гидролизатов коллагена, например, в качестве пищевых добавок или вспомогательных косметических средств, давно известно, в том числе для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с костями, суставами или соединительной тканью.

Так, в WO 2012/065782 описаны гидролизаты коллагена, полученные из желатина свиной кожи, которые используются для стимуляции биосинтеза белков внеклеточного матрикса клетками кожи и особенно подходят для косметических целей.

В WO 2012/117012 описан ферментативно гидролизованный коллаген со средней молекулярной массой от 1500 до 8000 Да, полученный из ретикулярного слоя кожи крупного рогатого скота, состоящего из прочных и эластичных коллагеновых волокон с высоким содержанием белков (Rinderspalt), который можно использовать вместе с пребиотиком для профилактики и/или лечения остеопороза.

Несмотря на то, что использование гидролизатов коллагена, полученных из материалов животного происхождения, имеет преимущества для многих применений и групп потребителей, однако с точки зрения определенных групп потребителей и профилей применения использование полученных таким образом гидролизатов коллагена может быть менее желательным. Определенные группы потребителей настроены крайне критически или отрицательно к использованию сырья, полученного из материалов животного происхождения, либо из-за опасения заражения вредными микроорганизмами или загрязнения агентами, например вспомогательными веществами, используемыми при производстве, либо из-за нежелательных иммунных реакций, либо по религиозным или этическим причинам. Кроме того, производственные процессы, используемые для получения гидролизатов коллагена, полученных из материалов животного происхождения, часто включают сложные и дорогостоящие этапы расщепления, очистки и дальнейшей обработки. Наконец, для некоторых применений целесообразно использовать стандартизированный гидролизат коллагена, с четко и надежно определенным происхождением и составом, который можно было бы производить в промышленных масштабах предпочтительно недорогим способом.

На этом фоне не вызывает удивления разработка способов получения желатина и коллагена и их гидролизатов с помощью рекомбинантных методов генной инженерии.

Так, в WO 2006/052451 A2 описано получение рекомбинантного коллагена типа III в штаммах *Pichia pastoris*, которые также экспрессируют пролилгидроксилазы человека.

В WO 2005/012356 A2 описано получение желатина из человеческого коллагена типа I, а также из отдельных видов пептидов коллагена размером 50 кДа, 65 кДа и 100 кДа, в полностью гидроксилированной, частично гидроксилированной и негидроксилированной форме.

WO 01/34646 A2 также описывает получение отдельных видов рекомбинантного желатина с опре-

деленной молекулярной массой, которые в зависимости от рекомбинантного способа получения, могут быть негидроксилированными, частично или полностью гидроксилированными.

Однако производство рекомбинантного коллагена или его гидролизатов со структурными и функциональными свойствами, которые были бы такими же или по меньшей мере аналогичными свойствам коллагена или гидролизатов коллагена, полученных из природных источников, является проблематичным. Отчасти это связано с тем, что естественный процесс образования коллагена является относительно сложным физиологическим процессом, характеризующимся влиянием ряда внутри- и внеклеточных факторов, который к тому же включает этапы посттрансляционного синтеза, такие как гликозилирование и гидроксилирование. Эти этапы посттрансляционного синтеза, в частности точное позиционирование и степень гидроксилирования пролина и лизина, обеспечивают получение стабильного тропоколлагена, который в конечном итоге собирается в фибриллы и волокна. Из Wang et al. (*Engineering Biology*, 2017 (1), 18-23) известно, что современное производство коллагена с помощью рекомбинантных методов характеризуется низким выходом, высокими затратами и, в частности, отсутствием или отступлением от этапов посттрансляционного синтеза, которые присутствуют при образовании природного коллагена. Также известно, что именно эти посттрансляционные модификации являются существенными как с точки зрения природной структуры коллагена и его функций, так и с точки зрения областей применения, в которых используется коллаген или гидролизаты коллагена.

Соответственно, на сегодняшний день не известны рекомбинантно полученные коллагены или гидролизаты коллагена со структурой, в частности качеством и количеством посттрансляционных модификаций, в частности степенью гидроксилирования и гликозилирования и положений, подверженных гидроксилированию и гликозилированию, которые были бы идентичны природному коллагену или полученным из него гидролизатам коллагена.

Предоставление рекомбинантно полученного коллагена и гидролизатов коллагена с потенциалом свойств, присущих коллагену или гидролизатам коллагена, которые получены обычным способом, невозможно из-за описанных выше причин, в частности из-за различий в исходных материалах и процессах производства. В частности, в прокариотических организмах, которые сами по себе подходят для промышленного производства рекомбинантных белков, производство рекомбинантного коллагена является проблематичным, поскольку, как правило, в клетку также должны быть введены этапы посттрансляционного синтеза с помощью рекомбинантных методов, что приводит к дополнительной метаболической нагрузке, затрудняющей или делающей невозможными экспрессию и продуцирование требуемых пептидов коллагена. Кроме того, экспрессия чужеродных белков может быть токсичной для клетки-хозяина; выделение из клеток-хозяев рекомбинантно продуцируемых в них белков может оказаться технически или экономически невыполнимым; стабильность полученного продукта экспрессии может быть слишком низкой; или возможны другие проблемы такие, как нарушение роста и репродуктивной функции клетки-хозяина.

Таким образом, все еще существует сильная потребность в получении гидролизатов коллагена с помощью рекомбинантных методов для применения в самых разных областях, в частности, в терапевтических целях, в частности для профилактики или лечения состояний или заболеваний, поражающих мышцы, суставы, кости и кожу людей и животных.

Таким образом, в основе настоящего изобретения лежит техническая задача, заключающаяся в предоставлении способов получения препаратов пептидов коллагена и препаратов рекомбинантных пептидов коллагена, в которых отсутствуют указанные выше недостатки, в частности, которые могут быть получены рекомбинантными методами в стандартизированной, четко и надежно определенной форме, к тому же в промышленном масштабе и экономически эффективным способом, и которые имеют свойства, сопоставимые с гидролизатами коллагена, полученными из материалов животного происхождения, в частности обладают улучшенными свойствами, в частности эффективностью, в частности, проявляют биологическую эффективность точки зрения поддержания здоровья мышц, суставов, костей и кожи, а также профилактики или лечения заболеваний, поражающих мышцы, суставы, кости и кожу, у людей и животных.

Настоящее изобретение решает лежащую в его основе техническую задачу путем предоставления технических решений, охарактеризованных в независимых пунктах формулы изобретения, в частности также предпочтительных вариантов осуществления этих технических решений, охарактеризованных в описании и зависимых пунктах формулы изобретения.

Настоящее изобретение относится, в частности, к способу получения препарата пептидов коллагена, содержащего рекомбинантные пептиды коллагена, включающему этапы:

- a) предоставления системы экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, причем экспрессионная кассета содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует пептид коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа,
- b) инкубации системы экспрессии в условиях, допускающих экспрессию пептида коллагена,
- c) получения пептида коллагена,
- d) гидролиза пептида коллагена в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, который содержит пептиды коллагена, имеющие среднюю молекулярную массу от 1 до 7 кДа и

молекулярную массу в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, и

е) получения препарата пептидов коллагена.

Способ получения препаратов пептидов коллагена, предлагаемый согласно изобретению, отличается, в частности, тем, что рекомбинантно полученный препарат пептидов коллагена, получают путем гидролиза по меньшей мере одного, предпочтительно точно определенного, рекомбинантно полученного пептида коллагена определенного размера от 8 до 100 кДа, который имеет молекулярно-массовое распределение и структуру, которые являются следствием того, что для гидролиза и последующих стадий процесса, в частности стадии гидролиза, в частности профиля гидроксирования, используют специфические рекомбинантные виды пептидов коллагена, и который, несмотря на рекомбинантный способ получения, сам по себе обладает полезной биологической активностью без дополнительных стадий обработки.

Препараты пептидов коллагена, предлагаемые согласно изобретению, имеют существенные структурные отличия от гидролизатов коллагена, полученных из природных источников, обусловленные их рекомбинантным получением, в частности, модификациями, вносимыми на этапах посттрансляционного синтеза, таких как гидроксирование и гликозилирование. Неожиданно было обнаружено, что они могут быть получены путем использования широкого спектра систем экспрессии, даже в промышленном масштабе, без нежелательного загрязнения, и имеют благоприятную биологическую эффективность, в частности, в отношении применения для поддержания и улучшения здоровья костей, хрящей, кожи, волос и ногтей.

Биологическая эффективность предлагаемых препаратов рекомбинантных пептидов коллагена, полученных в соответствии с изобретением, также присуща препаратам, полученным непосредственно в результате гидролиза, без необходимости дополнительных этапов обработки.

Биологическая эффективность, полученная в соответствии с изобретением и присущая рекомбинантно полученным препаратам пептидов коллагена по настоящему изобретению, может быть определена, в частности, с помощью тестов *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, предпочтительно с помощью тестов *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса или мРНК, кодирующих эти белки, в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности с помощью тестов *in vitro*, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах.

В предпочтительном варианте осуществления полученные согласно изобретению препараты пептидов коллагена, содержащие рекомбинантные пептиды коллагена по настоящему изобретению, проявляют биологическую активность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5.

Полученные согласно изобретению препараты рекомбинантных пептидов коллагена по настоящему изобретению предпочтительно имеют такую же биологическую активность по меньшей мере в одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех в тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, что и препараты пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученные препараты пептидов коллагена.

Полученные согласно изобретению препараты пептидов коллагена, содержащие рекомбинантные пептиды коллагена по настоящему изобретению предпочтительно проявляют улучшенную биологическую активность по меньшей мере в одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, по сравнению с препаратами пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученными препаратами пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения система экспрессии, представленная на этапе а), представляет собой клеточную или бесклеточную систему экспрессии.

Система экспрессии, представленная на этапе а), в частности клеточная система экспрессии, предпочтительно представляет собой клетку-хозяина, в частности прокариотическую или эукариотическую клетку.

Система экспрессии, в частности клеточная система экспрессии, предпочтительно представляет собой клетку-хозяина, выбранную из группы, состоящей из бактериальных клеток, дрожжевых клеток, клеток грибов, клеток млекопитающих, клеток насекомых и клеток растений.

Система экспрессии, в частности клеточная система экспрессии, предпочтительно представляет со-

бой бактериальную клетку, в частности вида *Escherichia coli* или *Bacillus subtilis*.

В другом предпочтительном варианте осуществления система экспрессии, в частности клеточная система экспрессии, представляет собой дрожжевую клетку, в частности видов *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* или *Ogataea angusta* (*Hansenula polymorpha*).

Система экспрессии, в частности клеточная система экспрессии, предпочтительно представляет собой клетку грибов, в частности вида *Aspergillus niger*.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения система экспрессии, в частности клеточная система экспрессии, представляет собой клетку млекопитающего, в частности клетку СНО, клетку HeLa или клетку HEK293.

Система экспрессии, в частности клеточная система экспрессии, предпочтительно представляет собой клетку насекомого, в частности клетку Sf-9, Sf-21 или Tn-5.

Система экспрессии, в частности клеточная система экспрессии, представляет собой растительную клетку, в частности клетку кукурузы или табака.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения система экспрессии, представленная на этапе а), представляет собой систему экспрессии, в частности клеточную систему экспрессии, которая способна обеспечить гидроксирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена. Система экспрессии, представленная на этапе а), предпочтительно представляет собой клетку-хозяина, которая способна обеспечить гидроксирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена.

Система экспрессии, представленная на этапе а), предпочтительно представляет собой систему экспрессии, в частности клеточную систему экспрессии, которая проявляет активность пролилгидроксилазы и/или лизилгидроксилазы. Система экспрессии, представленная на этапе а), предпочтительно представляет собой клетку-хозяина, которая обладает активностью пролилгидроксилазы и/или лизилгидроксилазы.

В предпочтительном варианте осуществления система экспрессии, представленная на этапе а), представляет собой клеточную систему экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую пролил-4-гидроксилазу. Система экспрессии, представленная на этапе а), предпочтительно представляет собой клеточную систему экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую пролил-4-гидроксилазу, для получения на этапе е) способа препарата *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления система экспрессии, представленная на этапе а), представляет собой клеточную систему экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую лизилгидроксилазу. Система экспрессии, представленная на этапе а), предпочтительно представляет собой клеточную систему экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую лизилгидроксилазу, для получения на этапе е) способа препарата *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения система экспрессии, представленная на этапе а), представляет собой клеточную систему экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую пролил-4-гидроксилазу, и по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую лизилгидроксилазу. Система экспрессии, представленная на этапе а), предпочтительно представляет собой клеточную систему экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую пролил-4-гидроксилазу, и по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую лизилгидроксилазу, для получения на этапе е) способа препарата *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу получения препарата пептидов коллагена, содержащего рекомбинантные пептиды коллагена, в частности препарата *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена, включающему этапы:

а) предоставления клеточной системы экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа, причем клеточная система экспрессии способна обеспечить гидроксирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена,

б) инкубации системы экспрессии, в частности культивирования клеточной системы экспрессии, в условиях, допускающих экспрессию и гидроксирование пептида коллагена,

с) получения пептида коллагена, в частности *in vivo* гидроксированного пептида коллагена,

д) гидролиза пептида коллагена, в частности *in vivo* гидроксированного пептида коллагена, в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, причем указанные пептиды коллагена, в частности *in vitro* гидроксированные пептиды коллагена, имеют среднюю молекулярную массу от 1 до 7 кДа и молекулярную массу в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, и

е) получение препарата пептидов коллагена, в частности препарата *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена, в дальнейшем также называемого препаратом А пептидов коллагена.

Таким образом, с помощью указанного выше способа предпочтительно получают препарат коллагена с *in vivo* гидроксированными рекомбинантно полученными пептидами коллагена с определенной молекулярной массой и определенной средней молекулярной массой, которые, в зависимости от используемой клеточной системы экспрессии, характеризуются специфическим паттерном посттрансляционных модификаций, в частности гидроксирования и гликозилирования. Таким образом, можно, в частности, непосредственно получать препарат биологически эффективных пептидов коллагена, т.е. без необходимости последующей модификации пептидов коллагена препарата пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный пептид коллагена, содержащийся в полученном согласно изобретению препарате *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена, т.е. препарате А пептидов коллагена, проявляет биологическую активность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5.

Рекомбинантный пептид коллагена, содержащийся в полученном согласно изобретению препарате *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена, т.е. в препарате А пептидов коллагена, предпочтительно проявляет такую же биологическую эффективность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, что и в препарате пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нерекомбинантно полученном препарате пептидов коллагена.

Рекомбинантный пептид коллагена, содержащийся в полученном согласно изобретению препарате *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена, т.е. препарате А пептидов коллагена, предпочтительно проявляет улучшенную биологическую активность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, по сравнению с препаратом пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности, нерекомбинантно полученном препарате пептидов коллагена.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения система экспрессии, представленная на этапе а), представляет собой систему экспрессии, которая не способна обеспечить гидроксирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена, в частности, система экспрессии на этапе а) не обладает активностью пролилгидроксилазы и лизилгидроксилазы.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения препарата пептидов коллагена, содержащего рекомбинантные пептиды коллагена, в частности препарата негидроксированных пептидов коллагена, включающему этапы:

а) предоставления системы экспрессии, имеющей по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа, причем система экспрессии не обеспечивает гидроксирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена,

б) инкубации системы экспрессии в условиях, допускающих экспрессию пептида коллагена,

с) получения пептида коллагена, в частности негидроксированного пептида коллагена,

д) гидролиза пептида коллагена, в частности негидроксированного пептида коллагена, в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, причем указанные пептиды коллагена имеют среднюю молекулярную массу от 1 до 7 кДа и молекулярную массу в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, и

е) получения препарата пептидов коллагена, в частности негидроксированных пептидов коллагена, в дальнейшем также называемого препаратом В пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена, содержащий негидроксированные рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат В пептидов коллагена, проявляет биологическую активность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5.

Предпочтительно, полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена, содержащий

негидроксилированные рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат В пептидов коллагена, проявляет такую же биологическую эффективность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, что и в препарате пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученном препарате пептидов коллагена.

Особенно предпочтительно, полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена, содержащий негидроксилированные рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат В пептидов коллагена, проявляет улучшенную биологическую эффективность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, по сравнению с препаратом пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученным препаратом пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полученный на этапе с) способ пептид коллагена подвергают гидроксилированию на этапе x1) способа перед выполнением этапа d) способа, и на этапе e) способа получают *ex vivo* гидроксилированный до лизиса, т.е. до гидролиза, препарат пептидов коллагена.

Соответственно, настоящее изобретение дополнительно включает способ получения препарата пептидов коллагена, содержащего рекомбинантные пептиды коллагена, в частности *ex vivo* гидроксилированного до лизиса препарата пептидов коллагена, включающий этапы:

a) предоставления системы экспрессии, имеющей по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа, причем система экспрессии не обеспечивает гидроксилирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена,

b) инкубации системы экспрессии в условиях, допускающих экспрессию пептида коллагена,

c) получения пептида коллагена,

x1) *ex vivo* гидроксилирования пептида коллагена, полученного на этапе c),

d) гидролиза пептида коллагена, в частности *ex vivo* гидроксилированного пептида коллагена, в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, причем указанные пептиды коллагена, в частности *ex vivo* гидроксилированные пептиды коллагена, имеют среднюю молекулярную массу от 1 до 7 кДа и молекулярную массу в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, и

e) получения препарата пептидов коллагена, в частности *ex vivo* гидроксилированного до лизиса препарата пептидов коллагена, в дальнейшем также называемого препаратом С пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления полученный согласно изобретению *ex vivo* гидроксилированный до лизиса препарат пептидов коллагена, содержащий рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат С пептидов коллагена, проявляет биологическую активность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5.

Предпочтительно, полученный согласно изобретению *ex vivo* гидроксилированный до лизиса препарат пептидов коллагена, содержащий рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат С пептидов коллагена, проявляет такую же биологическую эффективность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, что и в препарате пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученном препарате пептидов коллагена.

Особенно предпочтительно, полученный согласно изобретению *ex vivo* гидроксилированный до лизиса препарат пептидов коллагена, содержащий рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат С пептидов коллагена, проявляет улучшенную биологическую эффективность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, по сравнению с препаратом пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученным препаратом пептидов коллагена.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полученный на этапе

с) способа пептид коллагена подвергают гидроксированию на этапе х2) способа после выполнения этапа d), и на этапе е) способа получают *ex vivo* гидроксированный после лизиса, т.е. после гидролиза, препарат пептидов коллагена.

Соответственно, настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения препарата пептидов коллагена, содержащего рекомбинантные пептиды коллагена, в частности *ex vivo* гидроксированного после лизиса препарата пептидов коллагена, включающему этапы:

а) предоставления системы экспрессии, имеющей по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа, причем система экспрессии не обеспечивает гидроксирования остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена,

б) инкубации системы экспрессии в условиях, допускающих экспрессию пептидов коллагена,

с) получения пептидов коллагена,

д) гидролиза пептидов коллагена в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, который содержит пептиды коллагена, имеющие среднюю молекулярную массу от 1 до 7 кДа и молекулярную массу в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, и

х2) *ex vivo* гидроксирования пептидов коллагена препарата пептидов коллагена, полученного на этапе d),

е) получения препарата пептидов коллагена, в частности *ex vivo* гидроксированного после лизиса препарата пептидов коллагена, в дальнейшем также называемого препаратом D пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления полученный согласно изобретению *ex vivo* гидроксированный после лизиса препарат пептидов коллагена, содержащий рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат D пептидов коллагена, проявляет биологическую активность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5.

Предпочтительно, полученный согласно изобретению *ex vivo* гидроксированный после лизиса препарат пептидов коллагена, содержащий рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат D пептидов коллагена, проявляет такую же биологическую эффективность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, что и в препарате пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученном препарате пептидов коллагена.

Особенно предпочтительно, полученный согласно изобретению *ex vivo* гидроксированный после лизиса препарат пептидов коллагена, содержащий рекомбинантные пептиды коллагена, т.е. препарат D пептидов коллагена, проявляет улучшенную биологическую эффективность в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, по сравнению с препаратом пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нереккомбинантно полученным препаратом пептидов коллагена.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность по меньшей мере одной экспрессионной кассеты оптимизирована по кодонам, т.е. те кодоны в нуклеотидной последовательности, которые не используются или предпочтительно не используются, заменены кодонами, которые предпочтительно используются системой трансляции представленной системы экспрессии, в частности, представленной клеточной системой экспрессии, в частности представленной клетки-хозяина, без изменения аминокислотной последовательности кодируемого пептида или белка.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, представляет собой пептид коллагена позвоночного животного, в частности млекопитающего, например человека или млекопитающего, не являющегося человеком, например лошади, осла, кенгуру, овцы, грызуна, свиньи или крупного рогатого скота, птицы, такой как курица, рыбы, амфибии, рептилии или беспозвоночного животного, например медузы.

Пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, предпочтительно содержит коллаген типов I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII, предпочтительно типа I, II или III, предпочтительно типа I, предпочтительно типа II, предпочтительно типа III.

Пептид коллагена типа I, II или III, кодируемый нуклеотидной последовательностью, предпочтительно является типом I или II, особенно предпочтительно типом I.

Пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, встречающуюся в коллагене позвоночных животных, в частности рыб, земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих, в частности в коллагене типа I, II или III человека, крупного рогатого скота, свиней, лошадей или птиц, предпочтительно типа I, предпочтительно типа II, предпочтительно типа III.

Пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, особенно предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, встречающуюся в коллагене человека, в частности в коллагене I типа человека, предпочтительно в цепи $\alpha 1$ коллагена I типа человека.

Пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, особенно предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, встречающуюся в коллагене, отличном от человеческого, в частности в коллагене типа I, отличном от человеческого, предпочтительно в цепи $\alpha 1$ коллагена типа I, отличного от человеческого, в частности в коллагене крупного рогатого скота, свиньи, лошади, или аминокислотную последовательность, встречающуюся в коллагене птиц.

Пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, предпочтительно представляет собой природный пептид коллагена. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, не является природным пептидом коллагена. Пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, предпочтительно представляет собой генетически модифицированный пептид коллагена. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, представляет собой генетически модифицированный пептид коллагена, в котором по меньшей мере одна аминокислота из аминокислотной последовательности встречающегося в природе пептида коллагена, предпочтительно по меньшей мере одна заменимая аминокислота, в частности Ala, Asn, Asp, Glu, Ser аминокислотной последовательности встречающегося в природе пептида коллагена, заменена по меньшей мере одной специфичной аминокислотой, в частности по меньшей мере одной незаменимой аминокислотой, в частности Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Cys, Tyr, особенно предпочтительно Trp.

Согласно изобретению пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, представляет собой генетически модифицированный пептид коллагена, в котором в аминокислотную последовательность природного пептида коллагена добавлена по меньшей мере одна аминокислота, предпочтительно по меньшей мере одна незаменимая аминокислота, в частности Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Cys, Tyr, особенно предпочтительно Trp. Согласно изобретению по меньшей мере одна аминокислота, предпочтительно по меньшей мере одна незаменимая аминокислота, в частности Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Cys, Tyr, особенно предпочтительно Trp, может быть добавлена на N-конце, C-конце и/или внутри аминокислотной последовательности природного пептида коллагена.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность кодирует пептид коллагена с молекулярной массой в диапазоне предпочтительно от 8 до 95 кДа, предпочтительно от 8 до 90 кДа, предпочтительно от 8 до 85 кДа, предпочтительно от 8 до 80 кДа, предпочтительно от 9 до 95 кДа, предпочтительно от 9 до 90 кДа, предпочтительно от 9 до 85 кДа, предпочтительно от 9 до 80 кДа, предпочтительно от 10 до 95 кДа, предпочтительно от 10 до 90 кДа, предпочтительно от 10 до 85 кДа, предпочтительно от 10 до 80 кДа.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гидролиз представляет собой ферментативный или кислотно-катализируемый гидролиз, предпочтительно ферментативный гидролиз, предпочтительно кислотно-катализируемый гидролиз. Особенно предпочтительно выполнять гидролиз пептида коллагена, полученного на этапе c), путем добавления по меньшей мере одной протеазы бактерий или микроорганизмов, в частности по меньшей мере одной серин-, цистеин-, аспарат- и/или металлопротеазы бактерий и/или микроорганизмов, предпочтительно, по меньшей мере, одной эндопротеазы бактерий и/или микроорганизмов, предпочтительно по меньшей мере одной экзопротеазы бактерий и/или микроорганизмов.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептид коллагена гидролизуют на этапе d) в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, причем пептиды коллагена имеют среднюю молекулярную массу от 1 до 3 кДа и молекулярную массу в диапазоне от 0,1 до 10 кДа, предпочтительно от 0,18 до 10 кДа, предпочтительно от 0,2 до 10 кДа.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептид коллагена гидролизуют на этапе d) в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, содержащего пептиды коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 5 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 12 кДа, предпочтительно от 0,18 до 12 кДа, предпочтительно от 0,2 до 12 кДа.

Настоящее изобретение также относится к препарату пептидов коллагена, полученному с помощью одного из указанных выше способов согласно изобретению, в частности, препарату пептидов коллагена, содержащему пептиды коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, предпочтительно от 0,18 до 13,5, предпочтительно от 0,2 до 13,5.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения препарат пептидов коллагена

препарат *in vivo* гидроксированных пептидов коллагена, т.е. препарат А пептидов коллагена.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения препарат пептидов коллагена, в частности препарат пептидов коллагена, который содержит пептиды коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, является препаратом негидроксированных пептидов коллагена, т.е. препарат В пептидов коллагена.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения препарат пептидов коллагена, в частности препарат пептидов коллагена, который содержит пептиды коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, представляет собой препарат *ex vivo* гидроксированных пептидов коллагена, т.е. препарат С или D пептидов коллагена.

Предпочтительным препаратом пептидов коллагена, в частности препаратом пептидов коллагена, который содержит пептиды коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, является *ex vivo* гидроксированный до лизиса, т.е. до гидролиза, препарат пептидов коллагена, т.е. препарат С пептидов коллагена.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения препарат пептидов коллагена, в частности препарат пептидов коллагена, который содержит пептиды коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, представляет собой *ex vivo* гидроксированный после лизиса, т.е. после гидролиза, препарат пептидов коллагена, т.е. препарат D пептидов коллагена.

В частности, настоящее изобретение также относится к препарату пептидов коллагена, в частности препарату гидроксированного или негидроксированного коллагена, который получают гидролизом пептида коллагена, полученного рекомбинантно в клетке-хозяине, с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа, причем препарат пептидов коллагена содержит пептиды коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа.

Присутствие характерных пептидов препарата пептидов коллагена, которые обеспечивают его эффективность, может быть определено, в частности, с помощью масс-спектропии, предпочтительно с помощью ESI (ионизации электронным распылением) или масс-спектропии MALDI, причем характерные пептиды появляются на масс-спектре в виде пиков. В молекулярно-массовом распределении, определенном с помощью масс-спектропии MALDI, характерные пептиды имеют по меньшей мере в два раза более сильную интенсивность, более предпочтительно по меньшей мере в четыре раза более сильную интенсивность, по сравнению с их окружением.

Препараты пептидов коллагена по изобретению, в частности препарат А пептидов коллагена, препарат В пептидов коллагена, препарат С пептидов коллагена и препарат D пептидов коллагена, также могут иметь характерные пептиды с размером от 1500 до 3500 Да.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения препараты пептидов коллагена согласно изобретению, в частности препарат А пептидов коллагена, препарат В пептидов коллагена, препарат С пептидов коллагена и препарат D пептидов коллагена, содержат максимум 5,5%, предпочтительно максимум 5%, предпочтительно максимум 4,5%, предпочтительно максимум 4%, предпочтительно максимум 3,5% пептидов коллагена размером <500 Да.

Согласно этому варианту осуществления особенно низкая доля пептидов с размером менее 500 Да предпочтительно улучшает вкус препаратов пептидов коллагена по сравнению с препаратами, известными в предшествующем уровне техники, в частности, снижает горечь препаратов пептидов коллагена.

Предпочтительно от 35 до 60%, предпочтительно от 35 до 55%, предпочтительно от 35 до 50%, предпочтительно от 36 до 48%, предпочтительно от 36 до 46%, предпочтительно от 37 до 45%, предпочтительно от 38 до 44% пептидов коллагена препаратов пептидов коллагена согласно изобретению, в частности препарата А пептидов коллагена, препарата В пептидов коллагена, препарата С пептидов коллагена и препарата D пептидов коллагена, имеют размер в диапазоне от 1500 Да до 3500 Да.

Препараты пептидов коллагена согласно изобретению, в частности препарат А пептидов коллагена, препарат В пептидов коллагена, препарат С пептидов коллагена и препарат D пептидов коллагена, предпочтительно содержат максимум 2,8%, предпочтительно максимум 2,75%, предпочтительно максимум 2,7%, предпочтительно максимум 2,65%, предпочтительно максимум 2,6%, предпочтительно максимум 2,55%, предпочтительно максимум 2,5%, предпочтительно 2,45%, предпочтительно 2,4%, предпочтительно 2,35%, предпочтительно 2,3% пептидов коллагена размером от 7500 Да до 13500 Да.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 93%, предпочтительно по меньшей мере 93,5%, предпочтительно по меньшей мере 94%, предпочтительно по меньшей мере 94,5%, предпочтительно по меньшей мере 95% пептидов коллагена в препаратах пептидов коллагена согласно изобретению, в частности препарата А пептидов коллагена, препарата В пептидов коллагена, препарата С пептидов коллагена и препарата D пептидов коллагена, имеют размер в диапазоне от 500 Да до 7500 Да.

Предпочтительно по меньшей мере 94,5%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 95,5%, предпочтительно по меньшей мере 95,6%, предпочтительно по меньшей мере 95,7%, предпочтительно по меньшей мере 95,6%, предпочтительно по меньшей мере 95,7%, предпочти-

тельно по меньшей мере 95,8%, предпочтительно по меньшей мере 95,9%, предпочтительно по меньшей мере 96%, предпочтительно по меньшей мере 96,1%, предпочтительно по меньшей мере 96,2%, предпочтительно по меньшей мере 96,3%, предпочтительно по меньшей мере 96,4%, предпочтительно по меньшей мере 96,5% пептидов коллагена препаратов пептидов коллагена согласно изобретению, в частности препарата А пептидов коллагена, препарата В пептидов коллагена, препарата С пептидов коллагена и препарата D пептидов коллагена, имеют размер в диапазоне от 500 Да до 13500 Да.

В предпочтительном варианте осуществления, согласно настоящему изобретению, препарат пептидов коллагена вводят местно, в частности местно или системно, в частности энтерально, предпочтительно перорально.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения препарат пептидов коллагена вводят в форме пищевой добавки. Пищевая добавка согласно изобретению предпочтительно находится в форме раствора, суспензии или геля, например в ампуле, в виде гранул или порошка. Благодаря хорошей растворимости препарат пептидов коллагена также можно добавлять в различные напитки, не вызывая помутнения.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения пищевая добавка согласно изобретению не содержит дополнительных белков или гидролизатов белков в дополнение к препарату пептидов коллагена.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения пищевая добавка согласно изобретению не содержит других физиологически активных компонентов в дополнение к препарату пептидов коллагена, в частности не содержит белков или гидролизатов белков.

Изобретение также относится к продукту, содержащему препарат пептидов коллагена согласно изобретению и по меньшей мере одну добавку.

Изобретение также относится к пищевой добавке, содержащей препарат коллагена согласно изобретению и по меньшей мере один дополнительный компонент, в частности по меньшей мере одну добавку, приемлемую для пищевых продуктов.

В одном из вариантов осуществления препарат пептидов коллагена может быть добавлен в пищевой или пищевкусовой продукт, например шоколадный батончик, протеиновый батончик, зерновой батончик, молоко, молочные продукты, например йогурт, сыворотку или творог, и заменитель молока, например соевое молоко, рисовое молоко, миндальное молоко и кокосовое молоко (т.н. функциональное питание).

Таким образом, изобретение также относится к продуктам питания или пищевкусовым продуктам, содержащим препарат коллагена согласно изобретению.

В соответствии с изобретением также может быть предусмотрено введение препарата пептидов коллагена в форме фармацевтической композиции. Фармацевтическую композицию согласно изобретению особенно предпочтительно вводить, например, в форме таблеток, пастилок, жевательных таблеток, капсул, таблеток для рассасывания, таблеток с покрытием, пастилок, соков, гелей или мазей.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей препарат пептидов коллагена согласно изобретению и по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую добавку.

В дополнительном варианте осуществления препарат пептидов коллагена можно вводить в форме косметической композиции. Косметическая композиция согласно изобретению предпочтительно изготовлена, например, в форме лосьонов, мазей, кремов, гелей, порошков, шприцев или спреев.

Настоящее изобретение также относится к косметической композиции, содержащей препарат пептидов коллагена согласно изобретению и по меньшей мере одну совместимую с кожей добавку.

Если препарат пептидов коллагена согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения не используется в качестве единственного физиологически активного компонента продукта, в частности диетической добавки, пищевого продукта или вкусопищевого продукта, фармацевтической композиции или косметической композиции, его можно комбинировать с одним или более другими компонентами, которые положительно влияют на общее состояние здоровья, особенно на выносливость. Такие компоненты предпочтительно выбирают из группы, состоящей из витамина С, витаминов серий В, D, Е и К, омега-3 жирных кислот, омега-6 жирных кислот, конъюгированных линоленовых кислот, кофеина и его производных, экстракта гуараны, экстракта зеленого чая, галлата эпигаллокатехина, креатина, L-карнитина, α -липоевой кислоты, N-ацетилцистеина, НАДН, D-рибозы, аспартата магния, антиоксидантов, таких как антоцианы, каротиноиды, флавоноиды, ресвератрола, глутатиона и супероксиддисмутазы, каннабиноидов, таких как каннабидиол (CBD), адаптогенов, таких как *Rhodiola rosea*, *Panax ginseng*, *Withania somnifera*, *Shiitake*, *Ganoderma lucidum* *Lepidium meyenii*, минералов, таких как железо, магний, кальций, цинк, селен и фосфор, а также других белков, гидролизатов и пептидов, таких как соя, пшеница и сывороточный белок.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения препарат пептидов коллагена вводят в количестве от 1 до 40 г в сутки, предпочтительно от 1 до 30 г в сутки, предпочтительно от 1 до 20 г в сутки, предпочтительно от 1 до 15 г в сутки, предпочтительно от 2,5 до 30 г в сутки, предпочтительно от 2,5 до 20 г в сутки, предпочтительно от 2,5 до 15 г в сутки, предпочтительно от 2,5 до 10 г в сутки, пред-

почтительно от 4 до 15 г в сутки, предпочтительно от 4 до 12 г в сутки, более предпочтительно от 5 до 25 г в сутки, предпочтительно от 5 до 15 г в сутки, более предпочтительно от 10 до 25 г в сутки, предпочтительно от 12 до 22 г в сутки и, в частности, от 12,5 до 20 г в сутки, особенно предпочтительно от 6 до 15 г в сутки, в частности от 2,5 до 7,5 г в сутки, предпочтительно от 2,5 до 5 г в сутки.

Настоящее изобретение также относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению, предназначенному для использования в терапевтическом способе поддержания и улучшения здоровья костей, для профилактики и/или лечения остеопороза, для профилактики и/или лечения саркопении, для профилактики и/или лечения дегенеративных заболеваний, потери мышечной массы, для увеличения мышечной силы, стимуляции потери жира, уменьшения массы тела.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения заболеваний костей, в частности остеопороза.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения саркопении.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения дегенеративной потери мышечной массы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения заболеваний хрящей, в частности артроза или артрита.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе увеличения мышечной силы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения патологического состояния, характеризующегося пониженной митохондриальной активностью, в частности для профилактики и/или лечения патологического состояния, характеризующегося пониженной выносливостью.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе стимуляции расщепления жиров.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе снижения массы тела.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения дегенеративных заболеваний суставов, в частности остеоартрита, ревматоидного артрита, ревматических заболеваний, спондилита и/или фибромиалгии.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения заболеваний сухожилий или связок.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения кожных заболеваний, в частности, вульгарного псориаза, угрей, атопического дерматита, хронического зуда и/или розацеа.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе лечения ран, в частности хронических ран, острых ран и/или ожогов.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения дегенеративных заболеваний нервной системы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения деменции.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для использования в способе профилактики и/или лечения болезни Альцгеймера.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения патологического состояния, характеризующегося снижением умственных способностей.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с нарушением функции гематоэнцефалического барьера, в частности структуры и/или функции мозговых оболочек.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения заболе-

ваний кишечника, в частности хронических воспалительных заболеваний кишечника.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, в частности структуры и/или функции кровеносных сосудов, в частности сосудистой стенки, в частности для профилактики и/или лечения высокого артериального давления и/или нарушений кровообращения.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе профилактики и/или лечения заболеваний пародонта.

Настоящее изобретение также относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в нетерапевтических способах поддержания и улучшения здоровья костей, для профилактики остеопороза, профилактики и/или лечения саркопении, профилактики дегенеративной потери мышечной массы, увеличения мышечной силы, стимуляции расщепления жиров, уменьшения массы тела и/или профилактики дегенеративных заболеваний суставов.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к нетерапевтическому применению препарата пептидов коллагена согласно изобретению для улучшения внешнего вида и структуры кожи, в частности для уменьшения морщин, повышения эластичности кожи, увеличения эластичности кожи, увеличения содержания влаги в коже, уменьшения целлюлита и/или уменьшения стрий, в частности растяжек.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к нетерапевтическому применению пептидов коллагена согласно изобретению для ускорения роста ногтей и/или уменьшения ломкости ногтей.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к нетерапевтическому применению препарата пептидов коллагена согласно изобретению для улучшения внешнего вида и структуры волос, в частности для улучшения качества волос, уменьшения количества секущихся кончиков и/или уменьшения/замедления выпадения волос.

В следующем предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к нетерапевтическому применению препарата пептидов коллагена согласно изобретению для увеличения количества митохондрий и/или митохондриальной активности.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к нетерапевтическому применению препарата пептидов коллагена согласно изобретению для улучшения выносливости.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения относится к нетерапевтическому применению препарата пептидов коллагена согласно изобретению для улучшения умственной активности.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в одном из применений, предусмотренных согласно изобретению, используется только препарат пептидов коллагена по изобретению, т.е. без дополнительных веществ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения в применении, предусмотренном согласно настоящему изобретению, препарат пептидов коллагена по настоящему изобретению используется в качестве единственного агента, проявляющего биологическую активность.

В другом предпочтительном варианте осуществления в применении, предусмотренном в соответствии с изобретением, препарат пептидов коллагена по изобретению используется вместе по меньшей мере с одним дополнительным агентом, в частности с дополнительным биологически активным веществом.

Настоящее изобретение также относится к способам профилактики и/или лечения указанных выше показаний, в частности, указанных выше терапевтических показаний, в соответствии с которыми в организм человека или животного вводят терапевтически эффективное количество препарата пептидов коллагена согласно изобретению, необязательно с добавками.

Настоящее изобретение также относится к нетерапевтическому способу увеличения мышечной силы, увеличения мышечной массы, стимуляции расщепления жиров, уменьшения массы тела, поддержания и/или улучшения здоровья костей, поддержания и/или улучшения здоровья кожи, поддержания и/или улучшения здоровья кишечника, поддержания и/или улучшения структуры кровеносных сосудов, поддержания и/или улучшения здоровья сердечно-сосудистой системы, поддержания и/или улучшения состояния десен, поддержания и/или улучшения здоровья ногтей и волос человека или животного, поддержания и/или увеличения количества митохондрий и/или митохондриальной активности, поддержания и/или улучшения выносливости или поддержания и/или улучшения умственных способностей, при этом в организм человека или животного вводят по меньшей мере один препарат пептидов коллагена по изобретению.

Настоящее изобретение также относится к препарату пептидов коллагена согласно изобретению для применения в способе получения пленок, фольги и покрытий. Покрытия могут быть, например, лакокрасочными материалами, в частности лакокрасочными материалами со специальными оптическими эффектами, или покрытиями для получения самоочищающихся поверхностей.

В предпочтительном варианте осуществления термин "коллаген" в контексте настоящего изобретения используется в значении, общепринятом в данной области техники, в частности как определено, например, в WO 01/34646. В предпочтительном варианте осуществления термин "коллаген" относится к типам коллагена I-XXVII. В другом предпочтительном варианте осуществления термин "коллаген" означает пептид, имеющий последовательность глицин-пролин, глицин-4-гидроксипролин или глицин-X-4-гидроксипролин, предпочтительно повторяющийся мотив $(\text{Gly-X}_n\text{Y})_n$, где X и Y могут быть любой аминокислотой, предпочтительно пролином и 4-гидроксипролином. Предпочтительно термин "коллаген" означает пептид, имеющий повторяющийся мотив $(\text{Gly-Pro-Y})_n$ и/или $(\text{Gly-X}_n\text{Hyp})_n$, где X и Y могут быть любой аминокислотой.

В контексте настоящего изобретения термин "желатин" предпочтительно используется в значении, общепринятом в данной области техники, в частности как определено, например, в WO 01/34646.

В контексте настоящего изобретения термин "пептид коллагена" предпочтительно следует понимать как обозначающий пептид, имеющий определенную выше аминокислотную последовательность, встречающуюся в коллагене. "Пептид коллагена" предпочтительно также следует понимать как означающий генетически модифицированный пептид коллагена, который был получен путем модификации аминокислотной последовательности встречающегося в природе пептида коллагена, причем препарат пептидов коллагена, полученный из "пептида коллагена", полученного на этапе е) способа по изобретению, предпочтительно проявляет в по меньшей мере одном тесте *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, в частности в по меньшей мере одном, предпочтительно в по меньшей мере двух, предпочтительно во всех тестах *in vitro* по стимуляции синтеза белков внеклеточного матрикса в остеобластах, фибробластах и хондроцитах, описанных в примерах 3-7, в частности в примерах 3-5, предпочтительно такую же биологическую активность, что и препарат пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нерекombинантно полученный препарат пептидов коллагена, в частности предпочтительно проявляет улучшенную биологическую эффективность по сравнению с препаратом пептидов коллагена, выделенных из природных источников, в частности нерекombинантно полученным препаратом пептидов коллагена.

В контексте настоящего изобретения термин "рекомбинантная ДНК" обозначает искусственно полученную или измененную молекулу ДНК, которая получена *in vitro* с помощью методов генной инженерии. В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантная ДНК состоит из компонентов, происходящих из разных организмов.

В контексте настоящего изобретения "рекомбинантный или рекомбинантный пептид коллагена" означает пептид коллагена, кодируемый рекомбинантной ДНК.

В контексте настоящего изобретения термин "экспрессионная кассета" означает сегмент ДНК, который отвечает за транскрипцию информации, закодированной в этом сегменте, в РНК, в частности в мРНК, и содержит по меньшей мере один промотор и одну нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, как правило, по меньшей мере один промотор, по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и, необязательно, терминатор.

В контексте настоящего изобретения "нуклеотидная последовательность" означает последовательность нуклеотидов нуклеиновой кислоты, в частности цепь нуклеиновой кислоты, в частности цепь ДНК или РНК. Следовательно, "нуклеотидную последовательность" следует понимать и как информационную единицу, и как цепь ДНК или РНК, физически выражающую эту информацию.

В контексте настоящего изобретения "система экспрессии" означает систему, в которой может происходить целевой и контролируемый биосинтез белка. Согласно изобретению термин "система экспрессии" охватывает как бесклеточные системы экспрессии, в которых компоненты, необходимые для биосинтеза белка, не присутствуют в клетке, т.е. синтез белка происходит вне клетки, так и клеточные системы экспрессии, в которых биосинтез белка происходит в живой клетке. В контексте настоящего изобретения бесклеточная система экспрессии предпочтительно представляет собой лизат или экстракт из клеток *E. coli*, насекомых, зародышей пшеницы, клеток табака или клеток млекопитающих, в частности клеток СНО или ретикулоцитов кролика, которые содержат компоненты необходимые для биосинтеза белков, в частности системы трансляции и транскрипции.

В контексте настоящего изобретения "клетка-хозяин" означает живую клетку, которая способна экспрессировать пептиды или белки, кодируемые чужеродной ДНК, в частности рекомбинантной ДНК.

В контексте настоящего изобретения термины "до лизиса" и "после лизиса" означают момент времени до или после гидролиза, в частности до или после ферментативного или кислотно-катализируемого гидролиза.

В контексте настоящего изобретения термин "инкубация" означает как культивирование клеточной системы экспрессии, в частности клетки-хозяина, так и действие определенных условий на бесклеточную систему экспрессии.

В контексте настоящего изобретения термины "получение пептида коллагена" согласно этапу с) способа и "получение препарата пептидов коллагена" согласно этапу е) способа относятся к способу, известному специалисту в данной области, выделения пептида коллагена или препарата пептидов коллагена из композиции, содержащей несколько компонентов, с помощью известных методов выделения,

таких как методы центрифугирования, в частности дифференциальное центрифугирование и/или центрифугирование в градиенте плотности, методы хроматографии, в частности гель-фильтрационная, ионообменная хроматография, аффинная и/или высокоэффективная жидкостная хроматография, методы электрофореза, методы фильтрации и/или экстракции, причем обогащение и очистка представляющего интерес компонента композиции, содержащей несколько предпочтительных компонентов, могут быть достигнуты путем последовательного применения нескольких методов выделения.

В контексте настоящего изобретения "условия, допускающие экспрессию пептида коллагена", означают условия, такие как, в частности температура, давление, время, свет и наличие или отсутствие индукторов и/или репрессоров, которые активируют или усиливают экспрессию пептида коллагена. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия пептида коллагена происходит в контексте ферментации с высокой плотностью клеток, в частности под высоким давлением, предпочтительно высоким давлением воздуха. Конкретные условия, допускающие экспрессию пептида коллагена, известны специалисту в данной области и зависят от используемой системы экспрессии и используемой экспрессионной cassette, в частности содержащегося в ней промотора. Экспрессия пептида коллагена может быть конститутивной или индуцибельной, в зависимости от структуры cassette экспрессии.

В контексте настоящего изобретения под термином "гидролиз пептида коллагена в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена" следует понимать такие условия, в частности тип гидролиза, необязательно, тип и количество по меньшей мере одного фермента, используемого для гидролиза, значение pH, время гидролиза, температуру гидролиза, которые приводят к получению пептидов коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа из рекомбинантно полученного пептида коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа. Для получения пептидов коллагена со средней молекулярной массой от 1 до 7 кДа и с молекулярной массой в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа из рекомбинантно полученного пептида коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа подходящими условиями являются, например, условия, определенные в примере 1.

Данные, выраженные в %, приведенные в связи с молекулярно-массовым распределением пептидов коллагена в препаратах пептидов коллагена согласно изобретению, относятся в каждом случае к мас.% по отношению ко всем пептидам коллагена, содержащимся в рассматриваемом препарате пептидов коллагена.

В контексте настоящего изобретения термины "содержащий" и "имеющий" следует понимать как означающие, что в дополнение к элементам, явно охватываемым этими терминами, могут быть добавлены дополнительные элементы, которые не указаны в явном виде. В контексте настоящего изобретения эти термины также означают, что включены только элементы, указанные в явном виде, без каких-либо дополнительных элементов. В этом конкретном варианте осуществления термины "содержащий" и "имеющий" являются синонимами термина "состоящий из". Кроме того, термины "содержащий" и "имеющий" также включают композиции, которые, помимо элементов, указанных в явном виде, также содержат другие не указанные элементы, которые, однако, имеют функционально и качественно подчиненный характер. В таком варианте осуществления термины "содержащий" и "имеющий" синонимичны термину "по существу состоящий из".

В контексте настоящего изобретения термин "и/или" следует понимать как означающий, что все члены группы, которые связаны термином "и/или", раскрыты в виде альтернативы друг другу, а также в совокупности друг с другом в любой комбинации. Выражение "А, В и/или С" означает, что раскрыты следующие варианты: а) А или В, или С; или b) (А и В); или с) (А и С); или d) (В и С); или e) (А, В и С).

Дополнительные предпочтительные варианты осуществления следуют из зависимых пунктов формулы изобретения.

Изобретение описано ниже без ограничения общей идеи изобретения со ссылкой на фигуры, таблицы и связанные с ними иллюстративные варианты осуществления.

Описание рисунков.

На фиг. 1 показано процентное содержание отдельных пептидов коллагена в продуктах 1 и 2 сравнения и препаратах пептидов коллагена согласно примерам 1.3, 1.4 и 1.5 в определенных диапазонах молекулярной массы.

На фиг. 2А показана хроматограмма 1%-ного раствора продукта 1 сравнения. Значения молекулярной массы отложены по оси абсцисс в логарифмической шкале.

На фиг. 2В показана хроматограмма 1%-ного раствора продукта 2 сравнения. Значения молекулярной массы отложены по оси абсцисс в логарифмической шкале.

На фиг. 3А представлена хроматограмма 1%-ного раствора препарата пептидов коллагена согласно примеру 1.3. Значения молекулярной массы отложены по оси абсцисс в логарифмической шкале.

На фиг. 3В представлена хроматограмма 1%-ного раствора препарата пептидов коллагена согласно примеру 1.4. Значения молекулярной массы отложены по оси абсцисс в логарифмической шкале.

На фиг. 4 представлена хроматограмма 1%-ного раствора препарата пептидов коллагена согласно примеру 1.5. Значения молекулярной массы отложены по оси абсцисс в логарифмической шкале.

На фиг. 5 показано сравнение стимуляции синтеза коллагена в первичных фибробластах человека в

отсутствие пептида коллагена (контроль 1), в присутствии 0,5 мг/мл пептида коллагена размером 100 кДа (контроль 2), препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 1,8 кДа (образец 1), препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 2,4 кДа (образец 2) или препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 3,4 кДа (образец 3). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 6 показано сравнение стимуляции синтеза эластина в первичных фибробластах человека в отсутствие пептида коллагена (контроль 1), в присутствии 0,5 мг/мл пептида коллагена размером 100 кДа (контроль 2), препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 1,8 кДа (образец 1), препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 2,4 кДа (образец 2) или препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 3,4 кДа (образец 3). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 7 показано сравнение стимуляции синтеза протеогликана в первичных фибробластах человека в отсутствие пептида коллагена (контроль 1), в присутствии 0,5 мг/мл пептида коллагена размером 100 кДа (контроль 2), препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 1,8 кДа (образец 1), препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 2,4 кДа (образец 2) или препарата негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 3,4 кДа (образец 3). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 8 показано сравнение стимуляции синтеза коллагена в первичных фибробластах человека в отсутствие пептида коллагена (контроль 1), в присутствии 0,5 мг/мл препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 7 кДа (образец 4), препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 5,6 кДа (образец 5) или препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 1,3 кДа (образец 6). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 9 показано сравнение стимуляции синтеза эластина первичных фибробластов человека в отсутствие пептида коллагена (контроль 1), в присутствии 0,5 мг/мл препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 7 кДа (образец 4), препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 5,6 кДа (образец 5) или препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 1,3 кДа (образец 6). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фиг. 10 показано сравнение стимуляции синтеза протеогликана первичных фибробластов человека в отсутствие пептида коллагена (контроль 1) в присутствии 0,5 мг/мл препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 7 кДа (образец 4), препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 5,6 кДа (образец 5) или препарата гидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению со средней молекулярной массой 1,3 кДа (образец 6). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

Примеры.

Пример 1 - Получение пептидов коллагена.

1.1. Гидролиз негидроксилированного пептида коллагена быка размером 45 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии нейтральной протеазы.

0,789% раствор коллагена сначала нагревали до 50°C в 50 мл колбе в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 6,2 с помощью 10% раствора NaOH. На следующем этапе к раствору коллагена добавляли 0,8% Sumizyme BNP-L (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 180 минутного гидролиза составила 5,04 кДа.

1.2. Гидролиз негидроксилированного пептида коллагена быка размером 45 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

0,792% раствор коллагена сначала нагревали до 63°C в 50 мл колбе в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 7,75 с помощью 10% раствора NaOH. На следующем этапе к раствору коллагена добавляли 2,4 л 0,3% алкалазы (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 180 минутного гидролиза составила 3,01 кДа.

1.3. Гидролиз негидроксилированного пептида коллагена человека размером 25 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

2,85% раствор коллагена сначала нагревали до 63°C в 50 мл колбе в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на

сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 7,6 с помощью 10% раствора NaOH. На следующем этапе к раствору коллагена добавляли 2,4 л 0,3% алкалазы (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 45 минутного гидролиза составляла 1,8 кДа.

1.4. Гидролиз негидроксилированного пептида коллагена человека размером 100 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

Сначала 2,85% раствор коллагена нагревали до 63°C в 50 мл колбе в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 7,6 с помощью 10% раствора NaOH. Затем к раствору коллагена добавляли 2,4 л 0,4% алкалазы (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 45 минутного гидролиза составляла 2,4 кДа. Полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена использовали в качестве образца 2 в примере 6.

1.5. Гидролиз негидроксилированного пептида коллагена человека размером 100 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

1,5% раствор коллагена нагревали до 63°C в 50 мл колбе в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 7,6 с помощью 10% раствора NaOH. Наконец, к раствору коллагена добавляли 2,4 л 0,3% алкалазы (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 60 минутного гидролиза составляла 1,8 кДа. Полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена использовали в качестве образца 1 в примере 6.

1.6. Гидролиз негидроксилированного пептида коллагена человека размером 25 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

2,85% раствор коллагена сначала нагревали до 63°C в 50 мл колбе в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 7,6 с помощью 10% раствора NaOH. На следующем этапе к раствору коллагена добавляли 2,4 л 0,1% алкалазы (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 60 минутного гидролиза составляла 3,4 кДа. Полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена использовали в качестве образца 3 в примере 6.

1.7. Гидролиз гидроксилированного пептида коллагена быка размером 45 кДа, рекомбинантным полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

5,53% раствор коллагена сначала нагревали до 55°C в 250 мл стеклянной бутылки в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 7,59 с помощью 2% раствора NaOH. На следующем этапе к раствору коллагена добавляли 2,4 л 0,2% алкалазы (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 150 минутного гидролиза составляла 7 кДа. Полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена использовали в примере 7 в качестве образца 4.

1.8. Гидролиз гидроксилированного пептида коллагена быка размером 45 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

5,00% раствор коллагена сначала нагревали до 55°C в 100 мл стеклянной бутылки в криостате. Затем к раствору коллагена с поддерживаемой температурой добавляли 200 частей на миллион $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в расчете на сухое вещество (СВ) коллагена), и доводили pH раствора до 7,60 с помощью 2% раствора NaOH. Затем к раствору коллагена добавляли 0,25% NZ37071 (в расчете на СВ коллагена).

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена после 240 минутного гидролиза составляла 5,6 кДа. Полученный согласно изобретению препарат пептидов коллагена использовали в примере 7 в качестве образца 5.

1.9. Гидролиз гидроксилированного пептида коллагена быка размером 45 кДа, рекомбинантно полученного в *Pichia pastoris* в присутствии щелочной протеазы.

Используя гидролизат пептидов коллагена, полученный согласно примеру 1.7, компоненты гидролизата с более высокой молекулярной массой удаляли с помощью концентратора (например, Vivaspin 20) с мембраной с отсечкой по молекулярной массе 5000 Да.

Средняя молекулярная масса пептидов коллагена, полученных таким образом, составляла 1,3 кДа. Полученный согласно изобретению препарат пептида коллагена использовали в качестве образца 6 в примере 7.

1.10. Гель-хроматографический анализ гидролизатов пептидов коллагена.

Распределение молекулярной массы гидролизатов пептида коллагена, полученных в примерах 1.3-1.5, и двух коммерчески доступных продуктов сравнения со средней молекулярной массой 2,3 кДа и 1,7 кДа определяли с помощью гель-хроматографии (Knauer, Германия). Статистический анализ выпол-

няли с помощью программы WinGPC (компания PSS GmbH, Mainz, Germany). Для гель-хроматографии использовали следующие параметры:

неподвижная фаза: TSK 2000 SW XL (TOSOH Bioscience GmbH);

подвижная фаза: 0,4 моль/л дигидрофосфат натрия, pH 5,3;

скорость потока: 0,5 мл/мин;

калибровочный стандарт: определенные фрагменты коллагена типа 1 (FILK);

обнаружение: УФ-обнаружение при 214 нм (Knauer);

концентрация образца: 1%.

Для различных гидролизатов пептида коллагена процентное содержание отдельных пептидов коллагена, показанное в табл. 1 и на фиг. 1, получали в определенных диапазонах молекулярной массы.

Таблица 1

Оценка процентного содержания отдельных пептидов коллагена в определенных диапазонах молекулярной массы. Анализ выполняли с помощью гель-хроматографии с использованием определенных стандартов пептида коллагена I типа

диапазон молекулярной массы отдельных пептидов, Да	продукт 1 сравнения 2,3 кДа	продукт 2 сравнения 1,7 кДа	Пример 1.3	Пример 1.4	Пример 1.5
доля мас. %	доля мас. %	доля мас. %	доля мас. %	доля мас. %	доля мас. %
<500	5,81	13,09	2,72	2,47	3,26
1500-500	43,63	50,84	45,78	37,69	47,84
3500-1500	31,87	25,52	43,67	40,82	39,29
7500-3500	15,63	8,93	7,64	16,74	9,23
13500-7500	2,88	1,41	0,19	2,28	0,38
>13500	0,2	0,21	0	0	0

Хроматограммы 1% раствора каждого из продуктов сравнения и препаратов пептидов коллагена согласно примерам 1.3-1.5 показаны на фиг. 2-4.

Благодаря более узкому молекулярно-массовому распределению, отсутствию пептидов с более высокой молекулярной массой и осуществлению гидролиза согласно изобретению, доля пептидов размером <500 Да может быть существенно снижена, при этом может быть получен продукт со средней молекулярной массой менее 2 кДа. В то же время количество пептидов с размером в предпочтительном диапазоне от 1500 до 3500 Да значительно увеличено. В то время как пептиды размером >1500 Да классифицируются специалистами как нейтральные по вкусу, именно низкомолекулярные пептиды размером <500 Да вносят значительный вклад в горечь продуктов пептидов коллагена.

Предотвращение образования таких пептидов является дополнительным преимуществом для получения пептидов коллагена с превосходными вкусовыми и органолептическими характеристиками, классифицируемыми потребителем как "нейтральные" на вкус. То же самое относится и к продуктам с более высокой средней молекулярной массой в диапазоне от 3 до 7 кДа.

Исходя из раскрытых выше вариантов осуществления можно сделать вывод, что способ по изобретению и, таким образом, применение однородных рекомбинантных фрагментов коллагена в качестве исходного материала для гидролиза позволяют получить предпочтительные отдельные пептиды в пределах узкого молекулярно-массового распределения, которые, в зависимости от выбранных условий гидролиза имеют характерные пики, обычно между 4 и 6 (фиг. 3А, 3В, 4).

Образование этих отдельных пептидов можно целенаправленно контролировать путем выбора исходного фрагмента, а также условий гидролиза, что практически невозможно при использовании исходного материала животного происхождения из-за его неоднородности.

Пример 2 - *ex vivo* гидроксирование фрагментов коллагена.

Для посттрансляционной модификации (гидроксирования остатков пролина) фрагментов коллагена *ex vivo* использовали специфическую 4-ОН пролилгидроксилазу (P4H) в присутствии кофакторов α -кетоглутарата, ионов железа (II) и O_2 , причем также возможно использование неспецифических гидроксилаз. Для этой цели 8 мМ фрагмента коллагена в присутствии 14 мМ α -кетоглутарата, 0,5 мМ сульфата железа (II) и 1,5 мМ L-аскорбиновой кислоты в 50 мМ буфере MES (pH 6,5) и раствора фермента общим объемом 1 мл инкубировали при встряхивании (300 об/мин) при 37°C в термомиксере в течение 14-18 часов. В качестве альтернативы инкубацию также можно выполнять в инкубаторе при вышеупомянутых условиях.

Пример 3 - Активность остеобластов (в частности, здоровье костей).

Для анализа биологической эффективности препарата пептидов коллагена согласно изобретению в

отношении поддержания здоровья костей, профилактики и лечения заболеваний костей, изучали *in vitro*, используя остеобласты, стимулирующее действие препарата на синтез матричных белков и ферментов, которые играют роль в структуре и минерализации матрикса. Исследования выполняли путем определения экспрессии соответствующей мРНК методом ПЦР в реальном времени и полуколичественной оценки (на основе контроля без гидролизата коллагена).

С этой целью человеческие остеобласты сначала выделяли из коленных суставов путем инкубации костного материала при интенсивном перемешивании при 37°C в течение 1 часа в растворе Хенкса с добавлением 7 мг/мл гиалуронидазы типов I и III-S и 5 мг/мл проназы. Затем ферментацию продолжали при 37°C в течение 3-5 часов в растворе Хэнкса с добавлением 16 мг/мл коллагеназы типа CLS IV. Первичные остеобласты, полученные после ферментативного расщепления, культивировали в среде Хэма F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 20 Ед/мл смеси пенициллин-стрептомицин, 50 мкг/мл партрицина, 0,05 мг/мл аскорбиновой кислоты и 0,15 мг/мл глутамин. В качестве альтернативы первичные остеобласты (кат. №. C-12760; 2019) для исследования биологической эффективности также можно приобрести в компании PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland. Затем клетки культивировали в среде Хэма F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 20 Ед/мл смеси пенициллин-стрептомицин, 50 мкг/мл партрицина и 0,15 мг/мл глутамин.

Для изучения биологической эффективности однослойные клеточные культуры выделенных остеобластов человека инкубировали в течение 24 часов в среде, в которую добавлено 0,5 мг/мл соответствующего препарата пептидов коллагена. Контроль инкубировали в среде без препарата. Затем определяли экспрессию соответствующей мРНК.

Пример 4 - Активность фибробластов (в частности, здоровье кожи).

Пример 4.1 - Стимуляция синтеза мРНК.

Стимуляцию синтеза коллагена (тип I) и протеогликанов бигликана и версикана изучают *in vitro*, используя дермальные фибробласты (клетки кожи) человека. Для этого клетки инкубируют в течение 24 часов с 0,5 мг/мл препарата низкомолекулярных пептидов коллагена или препарата пептидов коллагена по изобретению, и затем с помощью ПЦР в реальном времени и полуколичественного анализа (на основе контроля без подготовки) определяют экспрессию РНК коллагена, РНК бигликана и РНК версикана.

Пример 4.2 - Стимуляция синтеза белков соединительной ткани.

Для определения стимуляции синтеза белков соединительной ткани препаратами пептидов коллагена согласно изобретению подвергнутые ферментативному расщеплению первичные дермальные фибробласты человека сначала культивируют в среде Хэма F12, содержащей 10% FCS, 20 ед./мл смеси пенициллин-стрептомицин, 50 мкг/мл партрицина, 0,05 мг/мл аскорбиновой кислоты и 0,15 мг/мл глутамин. После достижения слияния 80% соответствующую культуральную среду заменяют средой, не содержащей пептиды коллагена (контроль) или содержащей 0,5 мг/мл исследуемого препарата пептидов коллагена, и первичные фибробласты человека инкубируют в соответствующей среде в течение не менее 14 дней, предпочтительно в течение 14-21 дня, в частности 14 дней. Затем с помощью подходящих анализов можно определить и оценить экспрессию различных белков соединительной ткани (см., например, примеры 6 и 7).

Пример 5 - Активность хондроцитов (в частности, здоровье хрящевой ткани).

Для получения клеточных культур хондроциты свиньи или человека выделяют из хрящевой ткани известным способом, и затем их высевают в планшеты для клеточных культур с плотностью приблизительно 350000 клеток/см для культивирования. В качестве культуральной среды используют среду Хэма F12 с 10% фетальной телячьей сывороткой, 10 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл амфотерицина В. В качестве альтернативы, вместо 10 мкг/мл гентамицина также можно использовать 10 мкг/мл смеси пенициллин-стрептомицин. Культивирование выполняют при 37°C в атмосфере с пониженным содержанием кислорода (5% O₂, 5% CO₂ и 90% N₂).

Определение биосинтеза коллагена.

Количественное определение коллагена, синтезируемого хондроцитами (главным образом, типа II), выполняют путем радиоактивного мечения ¹⁴C-пролином, включенным в коллаген.

Сначала в культуральную среду добавляют радиоактивный ¹⁴C-пролин, и хондроциты культивируют в этих условиях до момента определения. Для того чтобы при детектировании можно было отличить включенный ¹⁴C-пролин от невключенного, культуральную среду, содержащую изотопы, заменяют чистой культуральной средой, и культивируют еще в течение 3 дней. Затем культуральную среду отбрасывают, а прикрепленный клеточный слой смешивают с дистиллированной водой, чтобы разрушить клеточные мембраны вследствие осмотического шока и высвободить цитозольный несвязанный С-пролин. Клеточный дебрис с синтезированным внеклеточным матриксом осаждают центрифугированием. Осадок ресуспендируют в свежей дистиллированной воде, и добавляют смесь для сцинтилляции на основе кислоты. Затем может быть определено количество синтезированного коллагена путем количественного определения С-пролина с помощью бета-счетчика.

В качестве альтернативы количественное определение может быть выполнено с помощью набора Sircol Collagen Assay Kit (кат. №. 054S5000, 2019, tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя (см. примеры 6 и 7).

Определение биосинтеза протеогликанов.

Количественную оценку протеогликанов, синтезируемых хондроцитами, осуществляют путем окрашивания альциановым синим и с помощью фотометрического метода определения гликозаминогликанов (ГАГ), которые являются компонентами протеогликанов.

Для определения содержания ГАГ в культуре клеток сначала отбрасывают культуральную среду, и прикрепленный клеточный слой промывают буфером PBS (рН 7). Затем клетки фиксируют при 4°C в течение 2 часов в 10% растворе формальдегида в PBS. После удаления формальдегида к клеточному слою добавляют реагент для окрашивания альциановый синий (5% альциановый синий в 3% уксусной кислоте), и клетки инкубируют при 4°C в течение ночи. Несвязанный альциановый синий сливают и смывают путем тщательной промывки PBS три-четыре раза. При добавлении кислого раствора гуанидина (8 моль/л) из клеточного слоя высвобождаются комплексы ГАГ. Затем можно определить количество гликозаминогликанов с помощью фотометрического метода при длине волны 620 нм.

В качестве альтернативы количественное определение может быть выполнено с помощью набора Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit (кат. № 054B3000, 2019, tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя (см. примеры 6 и 7).

Пример 6 - Стимуляция синтеза коллагена, эластина и протеогликана в первичных фибробластах человека препаратами негидроксилированных пептидов коллагена согласно изобретению.

Для определения стимуляции синтеза коллагена, эластина и протеогликана первичные дермальные фибробласты человека, полученные в соответствии с примером 4.2, инкубировали в течение не менее 14 дней, предпочтительно в течение 14-21 дня, в частности 14 дней, в среде, не содержащей пептиды коллагена (контроль 1) и содержащей 0,5 мг/мл препарата пептидов коллагена размером 100 кДа (контроль 2), препарата пептидов коллагена со средней молекулярной массой 1,8 кДа (образец 1), препарата пептидов коллагена со средней молекулярной массой 2,4 кДа (образец 2) и препарата пептидов коллагена со средней молекулярной массой 3,4 кДа (образец 3).

Пример 6.1 - Определение стимуляции синтеза коллагена.

Определение синтеза коллагена первичными дермальными фибробластами человека выполняли с помощью набора Sircol Collagen Assay Kit (кат. № 054S5000, 2019, tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты эксперимента представлены в табл. 2 и на фигурах.

Таблица 2

Определение синтеза коллагена выполняли с помощью анализа Sircol Collagen Assay (tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) путем измерения оптической плотности (OD) при длине волны 450 нм

	Контроль 1	Контроль 2 (молекулярная масса=100 кДа)	Образец 1 (средняя молекулярная масса=1,8 кДа)	Образец 2 (средняя молекулярная масса=2,4 кДа)	Образец 3 (средняя молекулярная масса=3,4 кДа)
Среднее значение (OD450)	1	1,01	1,2	1,24	1,21
Стандартное отклонение	0	0,01	0,07	0,1	0,06

Пример 6.2 - Определение стимуляции синтеза эластина.

Определение синтеза эластина первичными дермальными фибробластами человека выполняли методом анализа Fastin Elastin Assay (кат. № 054F2000, 2019, tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты эксперимента представлены в табл. 3 и на фигурах.

Таблица 3

Определение синтеза эластина выполняли с помощью анализа Fastin Elastin Assay (tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) путем измерения оптической плотности (OD) при длине волны 450 нм

	Контроль 1	Контроль 2 (молекулярная масса=100 кДа)	Образец 1 (средняя молекулярная масса=1,8 кДа)	Образец 2 (средняя молекулярная масса=2,4 кДа)	Образец 3 (средняя молекулярная масса=3,4 кДа)
Среднее значение (OD450)	1	0,96	1,28	1,25	1,38
Стандартное отклонение	0	0,22	0,13	0,02	0,3

Пример 6.3 - Определение стимуляции синтеза гликозаминогликана.

Определение синтеза гликозаминогликанов первичными дермальными фибробластами человека выполняли с помощью набора для анализа гликозаминогликанов Blyscan (кат. № 054B3000, 2019, tebu-bio, Offenbach или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты эксперимента представлены в табл. 4 и на фигурах.

Таблица 4

Определение синтеза гликозаминогликанов выполняли с помощью анализа Blyscan Glycosaminoglycan Assay (tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) путем измерения оптической плотности (OD) при длине волны 450 нм

	Контроль 1	Контроль 2 (молекулярная масса=100 кДа)	Образец 1 (средняя молекулярная масса=1,8 кДа)	Образец 2 (средняя молекулярная масса=2,4 кДа)	Образец 3 (средняя молекулярная масса=3,4 кДа)
Среднее значение (OD450)	1	1	1,28	1,26	1,2
Стандартное отклонение	0	0,09	0,08	0,08	0,06

Пример 7 - Стимуляция синтеза коллагена, эластина и протеогликана в первичных фибробластах человека препаратами гидроксированных пептидов коллагена согласно изобретению.

Для определения стимуляции синтеза коллагена, эластина и протеогликана первичные дермальные фибробласты человека, полученные в соответствии с примером 4.2, культивировали в течение не менее 14 дней, предпочтительно в течение 14-21 дня, в частности 14 дней, в среде, не содержащей пептиды коллагена (контроль 1) и содержащей 0,5 мг/мл препарата пептидов коллагена со средней молекулярной массой 7,0 кДа (образец 4), препарата пептидов коллагена со средней молекулярной массой 5,6 кДа (образец 5) и препарата пептидов коллагена со средней молекулярной массой 1,3 кДа (образец 6).

Пример 7.1 - Определение стимуляции синтеза коллагена.

Определение синтеза коллагена первичными дермальными фибробластами человека выполняли с помощью набора Sircol Collagen Assay Kit (кат. №. 054S5000, 2019, tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты эксперимента представлены в табл. 5 и на фигурах. Среднее значение, определенное для необработанного контроля (контроль 1), принимали в качестве стандарта, равного 1.

Таблица 5

Определение синтеза коллагена с помощью анализа Sircol Collagen Assay (tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) путем измерения оптической плотности (OD)

	Контроль 1	Образец 4 (средняя молекулярная масса=7,0 кДа)	Образец 5 (средняя молекулярная масса=5,6 кДа)	Образец 6 (средняя молекулярная масса=1,3 кДа)
среднее значение	1	1,35	1,36	1,39
Стандартное отклонение	0	0,16	0,1	0,09

Пример 7.2 - Определение стимуляции синтеза эластина.

Определение синтеза эластина первичными дермальными фибробластами человека выполняли с помощью анализа Fastin Elastin Assay (кат. № 054F2000, 2019, tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты эксперимента представлены в табл. 6 и на фигурах. Среднее значение, определенное для необработанного контроля (контроль 1), принимали в качестве стандарта, равного 1.

Таблица 6

Определение синтеза эластина с помощью анализа Fastin Elastin Assay (tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) путем измерения оптической плотности (OD)

	Контроль 1	Образец 4 (средняя молекулярная масса=7,0 кДа)	Образец 5 (средняя молекулярная масса=5,6 кДа)	Образец 6 (средняя молекулярная масса=1,3 кДа)
среднее значение	1	1,32	1,33	1,31
Стандартное отклонение	0	0,11	0,07	0,04

Пример 7.3 - Определение стимуляции синтеза гликозаминогликана.

Определение синтеза гликозаминогликанов первичными дермальными фибробластами человека выполняли с помощью набора для анализа гликозаминогликанов (кат. №. 054B3000, 2019, tebu-bio, Offenbach, Germany или Biocolor Ltd., UK) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты эксперимента представлены в табл. 7 и на фигурах. Среднее значение, определенное для необработанного контроля (контроль 1), принимали в качестве стандарта, равного 1.

Таблица 7

Определение синтеза гликозаминогликанов с помощью анализа гликозаминогликанов Blyscan Glycosaminoglycan Assays (tebu-bio, Offenbach, Germany, или Biocolor Ltd., UK) путем определения оптической плотности (OD)

	Контроль 1	Образец 4 (средняя молекулярная масса=7,0 кДа)	Образец 5 (средняя молекулярная масса=5,6 кДа)	Образец 6 (средняя молекулярная масса=1,3 кДа)
среднее значение	1	1,37	1,41	1,40
Стандартное отклонение	0	0,15	0,11	0,12

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения препарата пептидов коллагена, содержащего рекомбинантные пептиды коллагена, включающий этапы:

- а) предоставления системы экспрессии, которая имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, причем экспрессионная кассета содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует пептид коллагена с молекулярной массой в диапазоне от 8 до 100 кДа,
- б) инкубации системы экспрессии в условиях, допускающих экспрессию пептида коллагена,
- в) получения пептида коллагена,

d) гидролиза пептида коллагена в условиях, обеспечивающих получение препарата пептидов коллагена, который содержит пептиды коллагена, имеющие среднюю молекулярную массу от 1 до 7 кДа и молекулярную массу в диапазоне от 0,1 до 13,5 кДа, и

e) получения препарата пептидов коллагена.

2. Способ по п.1, в котором система экспрессии представляет собой клетку-хозяина, выбранную из группы, состоящей из бактериальной клетки, дрожжевой клетки, клетки гриба, клетки млекопитающего, клетки насекомого и клетки растения.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пептид коллагена, кодируемый нуклеотидной последовательностью, представляет собой пептид коллагена позвоночного животного, в частности млекопитающего, птицы, рыбы, амфибии, рептилии или беспозвоночного животного.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором система экспрессии представляет собой клетку-хозяина, которая способна обеспечить гидроксилирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена.

5. Способ по п.4, в котором клетка-хозяин имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, которая кодирует пролил-4-гидроксилазу, и в котором на этапе e) способа получают препарат *in vivo* гидроксилированных пептидов коллагена.

6. Способ по п.4 или 5, в котором клетка-хозяин имеет по меньшей мере одну экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую лизилгидроксилазу, и в котором на этапе e) способа получают препарат *in vivo* гидроксилированных пептидов коллагена.

7. Способ по любому из пп.1-3, в котором система экспрессии не способна обеспечить гидроксилирование остатков пролина, лизина или пролина и лизина экспрессированного пептида коллагена.

8. Способ по п.1, дополнительно в котором пептид коллагена, полученный на этапе c) способа, гидроксилируют перед выполнением этапа d) способа, и на этапе e) способа получают *ex vivo* гидроксилированный до лизиса препарат пептидов коллагена.

9. Способ по п.1, дополнительно в котором препарат пептидов коллагена, полученный на этапе d) способа, подвергают гидроксилированию после выполнения этапа d) способа, и на этапе e) способа получают *ex vivo* гидроксилированный после лизиса препарат пептидов коллагена.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором гидролиз представляет собой ферментативный гидролиз или кислотно-катализируемый гидролиз.

11. Препарат пептидов коллагена для терапевтических или косметических целей, полученный способом по любому из пп.1-10 и включающий рекомбинантные пептиды коллагена, имеющие среднюю молекулярную массу от 1 до 5 кДа, где не более 5,5 мас.% гидролизованых пептидов коллагена имеют молекулярную массу менее 500 Да, не более 2,8 мас.% гидролизованых пептидов коллагена имеют молекулярную массу от 7500 до 13500 Да, и от 35 до 60 мас.% гидролизованых пептидов коллагена имеют молекулярную массу от 1500 до 3500 Да.

12. Препарат пептидов коллагена по п.11, для поддержания и улучшения здоровья костей, для профилактики и/или лечения остеопороза, для профилактики и/или лечения саркопении, для профилактики и/или лечения дегенеративной потери мышечной массы, для повышения мышечной силы, для профилактики и/или лечения патологического состояния, характеризующегося пониженной митохондриальной активностью, в частности, для профилактики и/или лечения патологического состояния, характеризующегося пониженной выносливостью, для стимуляции потери жира, для снижения веса тела и/или для профилактики и/или лечения дегенеративных заболеваний суставов, для профилактики и/или лечения заболеваний хрящей, для профилактики и/или лечения заболеваний сухожилий и связок, для профилактики и/или лечения кожных заболеваний, для лечения ран, для профилактики и/или лечения дегенеративных заболеваний нервной системы, для профилактики и/или лечения деменции, для профилактики и/или лечения болезни Альцгеймера, для профилактики и/или лечения патологического состояния, характеризующегося снижением умственных способностей, для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с дисфункцией гематоэнцефалического барьера, для профилактики и/или лечения кишечных заболеваний, для профилактики и/или лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы и/или для профилактики или лечения заболеваний пародонта.

13. Препарат пептидов коллагена по п.11, для улучшения внешнего вида и структуры кожи, для ускорения роста ногтей и/или уменьшения ломкости ногтей, для улучшения внешнего вида и структуры волос, для увеличения количества митохондрий и/или митохондриальной активности, для повышения выносливости и/или для улучшения умственных способностей.

14. Препарат пептидов коллагена по любому из пп.11-13, который является негидроксилированным, частично гидроксилированным или полностью гидроксилированным.

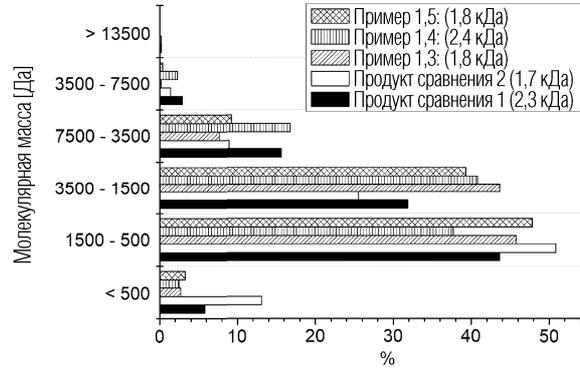
15. Препарат пептидов коллагена по любому из пп.11-14, который представляет собой *ex vivo* гидроксилированный до лизиса препарат пептидов коллагена или *ex vivo* гидроксилированный после лизиса препарат пептидов коллагена.

16. Пищевая добавка, содержащая препарат пептидов коллагена по любому из пп.11-15 и по меньшей мере одну добавку, приемлемую для пищевых продуктов.

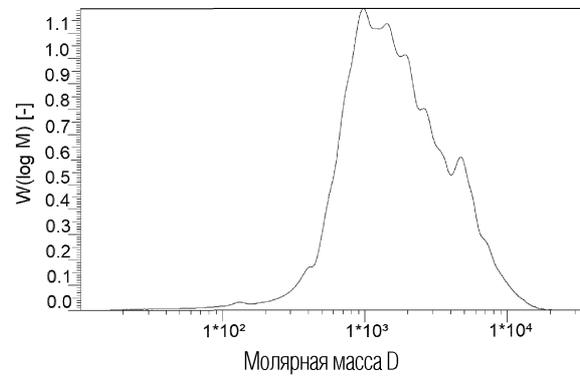
17. Фармацевтическая композиция, содержащая препарат пептидов коллагена по любому из пп.11-15

и по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую добавку.

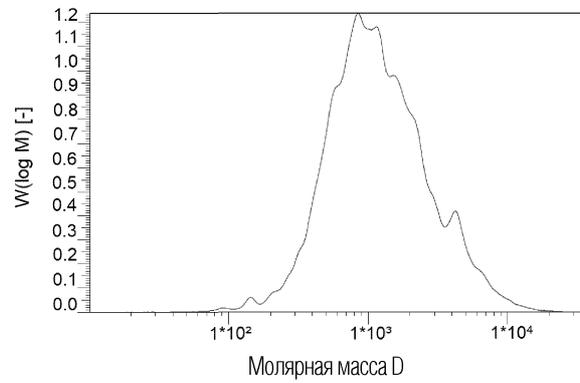
18. Косметический продукт, содержащий препарат пептидов коллагена по одному из пп.11-15 и по меньшей мере одну совместимую с кожей добавку.



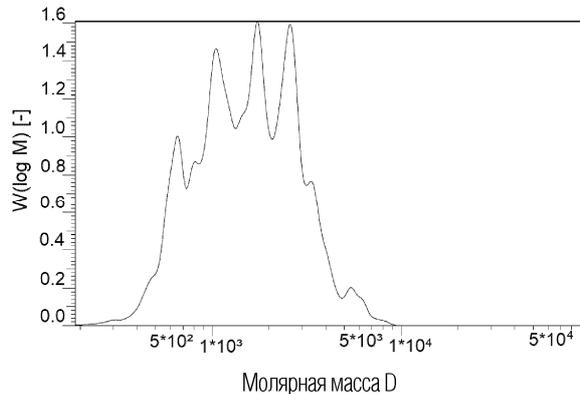
Фиг. 1



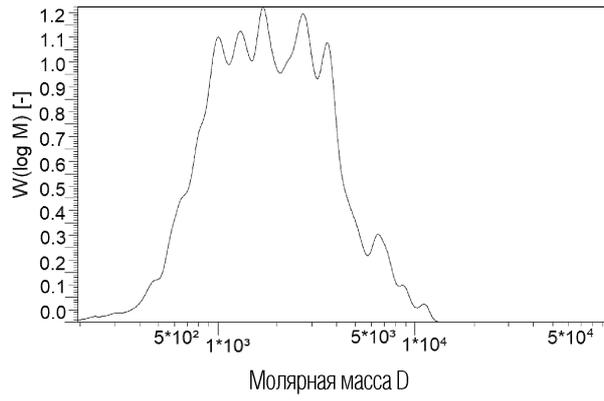
Фиг. 2А



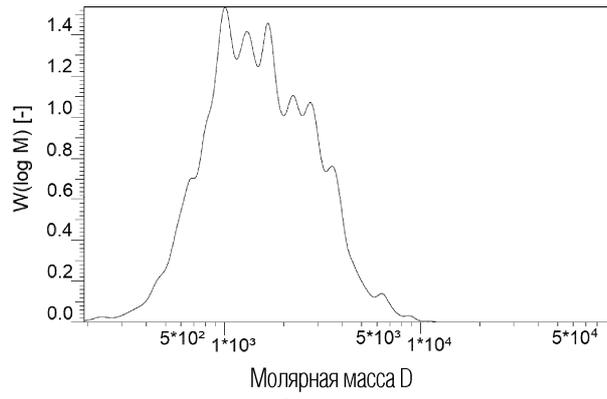
Фиг. 2В



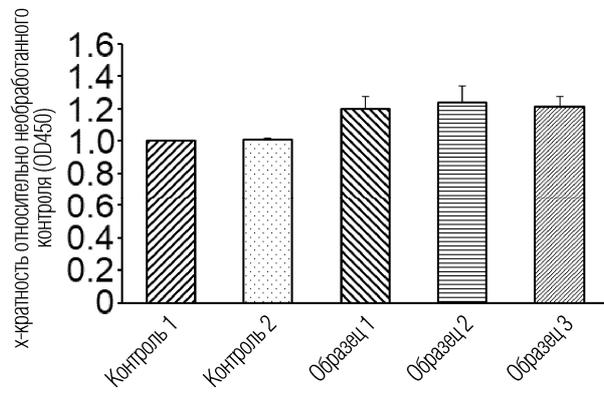
Фиг. 3А



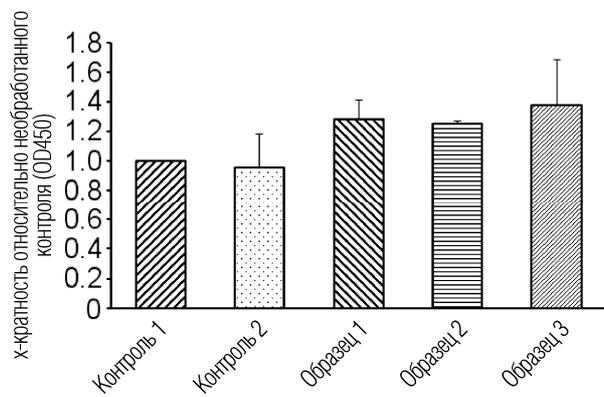
Фиг. 3В



Фиг. 4

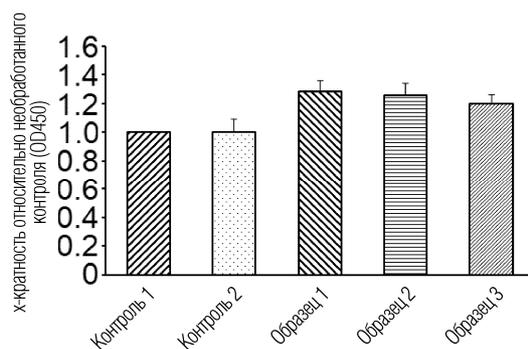


Фиг. 5

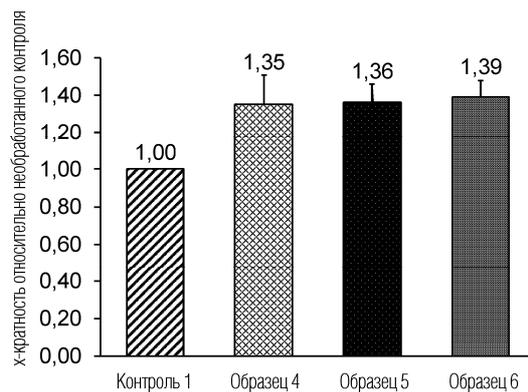


Фиг. 6

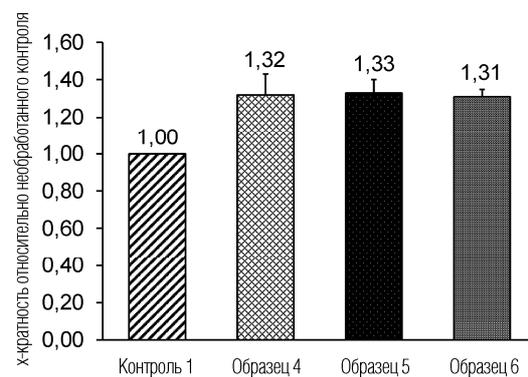
047845



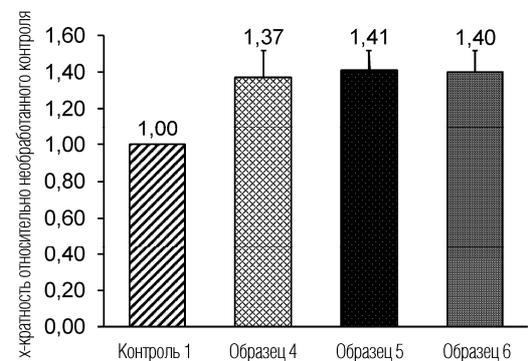
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

