

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490682 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.08.13

(51) Int. Cl. *A61K 38/39* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.09.07

(54) ЭНДОСТАТИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ, ФИБРОЗА И
ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ

(31) 63/241,274

(32) 2021.09.07

(33) US

(86) PCT/US2022/076016

(87) WO 2023/039399 2023.03.16

(88) 2023.04.13

(71) Заявитель:

МАСК ФАУНДЕЙШЕН ФОР РИСЕЧ
ДЕВЕЛОПМЕНТ (US)

(72) Изобретатель:

Фегали-Боствик Кэрол (US)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложены композиции и способы лечения или предупреждения роста опухоли, фиброза, острого повреждения легких или их комбинации. В одном варианте осуществления композиция содержит пептид, полученный из С-концевой области эндостатина.

A1

202490682

202490682

A1

ЭНДОСТАТИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ, ФИБРОЗА И ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/241,274, поданной 7 сентября 2021 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Суть многих способов лечения и медицинских процедур заключается в удалении или разрушении вредоносных или нежелательных тканей. Примеры таких важных способов лечения включают хирургическое удаление раковых опухолей, разрушение метастатических опухолей с помощью химиотерапии и уменьшение железистой гиперплазии (например, гиперплазии предстательной железы).

15 Существует очевидная потребность в эффективном агенте, который будет разрушать и, следовательно, либо способствовать удалению, либо ингибировать дальнейший рост вредоносных или нежелательных клеток и тканей, но при этом будет оказывать преимущественно местное действие и обладать минимальной системной токсичностью, либо не обладать ей.

20 Эндостатин представляет собой фрагмент протеолитического расщепления, состоящий из 183 аминокислот, соответствующий С-концу коллагена 18, обладает противоопухолевой активностью без токсических побочных эффектов (O'Reilly et al. (1997) Cell, 88: 277-285.; Kisker et al. (2001) Cancer Res, 61:7669-7674; Dhanabal et al. (1999) Cancer Res, 59: 189-197; Yoon et al. (1999) Cancer Res, 59: 6251-6256; Folkman and Kalluri, 25 (2003) Cancer Medicine, 6th edition, pp. 161-194. Hamilton: B. C. Decker Inc.). Сообщалось о ряде антиангиогенных активностей данного белка, таких как ингибирование пролиферации, миграции эндотелиальных клеток и образование трубочек. Эта активность локализована в N-концевой области эндостатина. Эндостатин также подавляет проницаемость сосудов, индуцированную фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) 30 (Takahashi et al. (2003) Faseb J, 17: 896-898). Эндостатин ингибирует миграцию эндотелиальных клеток путем ингибирования фосфорилирования киназы фокальной адгезии посредством связывания с интегрином $\alpha 5\beta 1$ (Wickstrom et al. (2002) Cancer Res, 62: 5580-5589). Также было показано, что глипиканы клеточной поверхности представляют собой низкоаффинные рецепторы эндостатина (Karumanchi et al. (2001) Mol Cell, 7: 811- 35 822). Эндостатин участвует в нескольких сигнальных путях, таких как даун-регуляция активности c-мус (Shichiri and Hirata (2001) Faseb J, 15: 1044-1053), циклина-D1 (Hanai et al. (2002) J Biol Chem, 277. 16464-16469) и RhoA (Wickstrom et al. (2003) J Biol Chem, 278: 37895-37901), блокирование передачи сигналов VEGF (Hajitou et al. (2002) Faseb J, 16:

1802-1804; Kim et al. (2002) J Biol Chem, 277: 27872-27879) и ингибирование пути передачи сигнала wnt (Hanai et al. (2002) J Cell Biol, 158: 529-539). Кроме того, было показано, что эндостатин связывает и инактивирует металлопротеиназы (Kim et al. (2000) Cancer Res, 60: 5410-5413; Nyberg et al. (2003) J Biol Chem, 278: 22404-22411; Lee et al. (2002) FEBS Lett, 519: 147-152) и регулирует спектр генов, подавляющих ангиогенез (Abdollahi et al. (2004) Mol Cell, 13: 649-663).

Были определены кристаллические структуры как мышинового, так и человеческого эндостатина (Hohenester et al. (1998) Embo J, 17: 1656-1664; Ding et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95: 10443-10448) и они показывают нековалентно удерживаемый димер в высокой концентрации, необходимой для кристаллизации (Ding et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95: 10443-10448). Наличие двух дисульфидных связей приводит к сильно складчатой структуре. Эндостатин связывает один атом цинка на мономер посредством трех гистидиновых остатков на N-конце молекулы (гистидиновые остатки 1, 3 и 11) и остатка аспарагиновой кислоты 76. Свойство эндостатина связывать гепарин опосредовано несмежными аргининовыми остатками, сгруппированными на трехмерной глобулярной поверхности молекулы (Sasaki et al. (1999) Embo J, 18: 6240-6248).

Было показано, что олигомерный эндостатин (NC1 и димер) в первую очередь ассоциирован с ламинином базальной мембраны (Javaherian et al. (2002) J Biol Chem, 277: 45211-45218). Эта ассоциация может быть важна для некоторых биологических функций, проявляемых эндостатином. С другой стороны, гепаринсвязывающие свойства эндостатина проявляются при его взаимодействии с клеточной поверхностью. Вероятно, эндостатин выполняет ряд биологических функций, опосредованных различными областями белка.

Таким образом, в данной области техники существует потребность в новых нетоксичных композициях и способах лечения опухолевого роста, фиброза и острого повреждения легких. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном варианте осуществления изобретения предложена композиция, содержащая терапевтический агент, обладающий противоопухолевой активностью, противofiброзной активностью, активностью против повреждения легких или их комбинацией, где указанный агент представляет собой пептид, происходящий из C-концевого эндостатина, выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий из C-концевого эндостатина, или его варианты, производные, мутанты или их фрагменты.

В одном варианте осуществления пептид, происходящий из C-концевого эндостатина, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из одной из SEQ ID NO: 8-27, их фрагментов и их вариантов.

В одном варианте осуществления вариант пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, содержит не более 5 аминокислотных замен.

В одном варианте осуществления вариант пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, содержит непрерывную аминокислотную последовательность.

5 В одном варианте осуществления фрагмент пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, содержит по меньшей мере 8 последовательных аминокислот аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8-27.

В одном варианте осуществления терапевтический агент дополнительно включает второй агент, причем второй агент представляет собой противораковый агент.

10 В одном варианте осуществления терапевтический агент дополнительно включает второй агент, причем второй агент представляет собой противофиброзный агент.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ лечения или предупреждения заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей агент, причем указанный агент выбран из группы, состоящей из пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, происходящий из С-концевого эндостатина и его вариантов, производных, мутантов или фрагментов.

В одном варианте осуществления заболеванием или расстройством является рак. В одном варианте осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак печени, рак яичников, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, лимфому, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак желудка, миелому или глиому. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение второго агента, где указанный второй агент представляет собой

25 противораковый агент.

В одном варианте осуществления заболевание или расстройство является фиброзным или связанным с фиброзом заболеванием или расстройством. В одном варианте осуществления фиброзным или связанным с фиброзом заболеванием или расстройством является фиброз сердца, идиопатический легочный фиброз, интерстициальный легочный фиброз, семейный легочный фиброз, индуцированный облучением легочный фиброз, пневмокониоз, обусловленный воздействием угольной пыли (пневмокониоз угольщиков), асбестоз, блеомициновое легкое, саркоидоз, силикоз, острое повреждение легких, ОРДС, гипертрофические рубцы, келоидные рубцы, цирроз печени, системная склеродермия, локализованная склеродермия, морфея, сосудистый

30 фиброз, фиброз почек, фиброз в результате реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), субэпителиальный фиброз, эндомикардиальный фиброз, фиброз матки, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, нефрогенный системный фиброз, рубцевание после хирургического вмешательства, астма, гломерулонефрит,

мультифокальный фибросклероз, диабетическая нефропатия, ревматоидный артрит, атеросклероз, индуцированный облучением фиброз, фиброз, индуцированный химиотерапией, системный склероз, гепатит и синдром Шегрена. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение второго агента, где указанный
5 второй агент является противofiброзным агентом.

В одном варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой острое повреждение легких. В одном варианте осуществления острое повреждение легких представляет собой острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), индуцированное вирусом острое поражение легких, тяжёлый острый респираторный
10 синдром (SARS), коронавирусная инфекция COVID-19, острое повреждение легких, вызванное гриппом, острое повреждение легких, обусловленное сепсисом, острое повреждение легких обусловленное пневмонией, острое повреждение легких, обусловленное аспирацией, острое повреждение легких, обусловленное травмой, острое повреждение легких, обусловленное переливанием крови, острое повреждение легких,
15 обусловленное дымом, острое повреждение легких, обусловленное вдыханием токсичных газов, острое повреждение легких, обусловленное панкреатитом, острое повреждение легких, обусловленное передозировкой лекарственными средствами, острое повреждение легких из-за ожога и повреждение легких, связанное с искусственной вентиляцией легких, проявляющееся воспалением.

20

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения будет лучше понято при прочтении вместе с прилагаемыми чертежами. В целях иллюстрации настоящего изобретения на чертежах показаны варианты
25 осуществления, которые в настоящее время являются предпочтительными. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается точными конструкциями и инструментами вариантов осуществления, показанных на чертежах.

На фиг. 1 представлены результаты экспериментов, описанных в примерах, демонстрирующие описательные статистические данные по объемам необработанных
30 опухолей с течением времени в контрольной (n=4) и BioE4 (n=5, сутки 0–5; n=4, сутки 7–15) группах мышей. Измерения объема указаны в мм.

На фиг. 2A и 2B представлены результаты экспериментов, описанных в примерах, демонстрирующие специфичные для мышей траектории роста опухоли, разделенные для контрольной группы и группы, получавшей BioE4.

35 На фиг. 3 представлены результаты экспериментов, описанных в примерах, демонстрирующие оценки значений параметров для общей линейной смешанной модели. BioE4 - это индикаторная переменная, где 1 представляет группу BioE4, а 0 - контрольную группу.

На фиг. 4 показаны результаты эксперимента, приведенного в примерах, с использованием модели, описанной выше, при этом были проведены прямые сравнения между группой BioE4 и контрольной группой в отношении средних объемов опухолей на 15-е сутки и в отношении средней скорости изменения объемов опухолей на 15-е сутки.

5 Основанные на использовании модели оценочные данные на 15-е сутки показывают, что средний объем опухоли был значительно ($p=0,0001$) больше в контрольной группе по сравнению с группой, получавшей BioE4, а средняя скорость увеличения объема на 15-е сутки также была значительно ($p=0,02$) выше в контрольной группе по сравнению с группой, получавшей BioE4.

10 На фиг. 5 представлены результаты экспериментов, описанных в примерах, и описательные статистические данные по объемам необработанных опухолей с течением времени в группах мышей PBS ($n=5$), Bio96 ($n=5$) и BioE4-03 ($n=4$). Измерения объема указаны в мм.

15 На фиг. 6А, 6В и 6С представлены результаты экспериментов, описанных в примерах, демонстрирующие специфичные для мышей траектории роста опухоли, разделенные для разделенные для контрольной, Bio96 и BioE4-03 групп.

На фиг. 7 представлены результаты экспериментов, описанных в примерах, демонстрирующие оценки значений параметров для общей линейной смешанной модели, где сравнивается PBS с Bio96 и Bio96E4-03.

20 На фиг. 8 показаны результаты эксперимента из примера с использованием модели, описанной выше, при этом были проведены прямые сравнения между контрольной группой PBS и Bio96, а также между PBS и BioE4-03 в отношении средних объемов опухоли на 21-е сутки и в отношении средней скорости изменения объемов опухоли на 21-е сутки. Основанные на использовании модели оценочные данные на 21-е
25 сутки показывают, что средний объем опухоли был значительно больше в контрольной группе PBS по сравнению с группой Bio96 ($1492,1 \text{ мм}^3$ по сравнению с $871,4 \text{ мм}^3$, $p = 0,003$), и средний объем опухоли был значительно больше в контрольной группе PBS по сравнению с группой BioE4-03 ($1492,1 \text{ мм}^3$ по сравнению с $767,7 \text{ мм}^3$, $p=0,0009$). На 21-е
30 сутки средняя скорость увеличения объема была значительно выше в контрольной группе PBS по сравнению с группой Bio96 ($151,1 \text{ мм}^3$ в сутки по сравнению с $90,6 \text{ мм}^3$ в сутки, $p=0,004$), и средняя скорость увеличения объема была значительно выше в контрольной группе PBS по сравнению с группой BioE4-03 ($151,1 \text{ мм}^3$ в сутки по сравнению с $76,0 \text{ мм}^3$ в сутки, $p=0,0008$).

35 На фиг. 9 представлен типовой гистологический анализ опухолей с использованием окрашивания гематоксилином и эозином (H&E).

На фиг. 10 представлен типовой гистологический анализ опухолей с использованием окрашивания методом трихрома по Массону.

На фиг. 11 представлен типовой анализ экспрессии генов в клетках A549 (клетки аденокарциномы легкого человека).

На фиг. 12 представлен типовой анализ экспрессии генов в клетках HCT116T (клетки карциномы толстой кишки человека).

5 На фиг. 13 представлен типовой анализ экспрессии белка в нормальных фибробластах легких с использованием различных эндостатиновых пептидов.

На фиг. 14 представлен типовой анализ экспрессии генов в фибробластах легочных тканей нормальных доноров, обработанных Bio96-17. РНК гладкомышечного альфа-актина измеряли с помощью количественной ОТ-ПЦР в фибробластах после 48 часов обработки трансформирующим фактором роста бета (TGFбета) в присутствии или в
10 отсутствие пептида Bio96-17.

На фиг. 15 представлен типовой анализ экспрессии генов в фибробластах легких пациентов с системным склерозом (СС), получавших Bio96-17.

На фиг. 16 представлен типовой анализ экспрессии генов в фибробластах легких
15 пациентов с системным склерозом, получавших BioE4-03.

На фиг. 17 представлен типовой анализ экспрессии генов в фибробластах легких пациентов с идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ), получавших BioE4-03 или Bio96-17.

На фиг. 18 представлен типовой анализ экспрессии белка в фибробластах
20 нормальных легких, обработанных возрастающими концентрациями E96-87.

На фиг. 19 представлен типовой анализ экспрессии гена матричной металлопротеиназы (MMP)-1 в тканях легких при системном склерозе и фиброзе легких в органной культуре, обработанной различными пептидными фрагментами.

На фиг. 20 представлен типовой анализ уровней гидроксипролина в тканях легких
25 пациентов с системным склерозом в органной культуре, обработанной BioE4-03.

На фиг. 21 представлен типовой анализ уровней гидроксипролина в тканях легких пациентов с ИЛФ в органной культуре, обработанной BioE4-03.

На фиг. 22 представлен типовой анализ уровней гидроксипролина в тканях легких нормальных доноров в органной культуре, обработанной BioE4-03.

30 На фиг. 23 представлен типовой анализ уровней гидроксипролина в тканях легких нормальных доноров в органной культуре, обработанной Bio96-17.

На фиг. 24 представлен типовой анализ уровней секретируемого белка Col1A1 в тканях легких нормальных доноров в органной культуре, обработанной Bio96-17, после индукции фиброза с использованием TGF-бета.

35 На фиг. 25 представлен типовой анализ экспрессии генов Col1A1 и фибронектина (FN) в тканях кожи доноров, у которых был индуцирован фиброз с помощью TGF-бета, обработанных BioE4-03.

На фиг. 26 показано влияние BioE4, введенного через желудочный зонд, на размер опухоли у мышей (ось Y). Сутки лечения показаны на оси X. Пептид давали два раза в неделю. Красная линия обозначает мышей с необработанными опухолями, а синяя - мышей, которые получали BioE4.

5 На фиг. 27 показано влияние перорального введения E4 на инфильтрацию костного мозга плазматическими клетками миеломы CD138+ через 49 суток после инъекции клеток множественной миеломы, устойчивых к бортезомибу (MM.1S BzR). E4 или носитель вводили сначала через 14 суток после инъекции клеток MM.1S BzR и после этого дважды в неделю. Количество плазматических клеток миеломы CD138+ в костном мозге
10 использовали в качестве индикатора опухолевой нагрузки и эффективности пептида.

На фиг. 28А и фиг. 28В представлены результаты экспериментов, изложенных в примерах, демонстрирующие влияние BioE4-03 и E4-03 на IL6. На фиг. 28А показано влияние биотинилированного E4-03 на мРНК IL-6 в клетках аденокарциномы легкого человека (A549). На фиг. 28В показано влияние небитинилированного E4-03 на мРНК IL-
15 6 и экспрессию белка в клетках A549. Клетки A549 обрабатывали BioE4-03 или E4-03 в течение 48 часов перед анализом кПЦР на экспрессию мРНК и за 72 часа до ИФА анализа на экспрессию белка.

На фиг. 29 показаны лучшие результаты по ЖХ-МС/МС расщепления пепсином BioE4-03 (SEQ ID NO: 2). Ось X каждой диаграммы, помеченная SEQ ID NO, как описано в
20 таблице 1 примера 4 ниже, обозначает число совпадений пептидного спектра для каждой группы лечения, изображенной на оси Y: «Поставленный» обозначает нерасщепленный BioE4-03, разведенный в 0,1% муравьиной кислоте, «WKSL» обозначает аликвоту нерасщепленного BioE4-03, разведенного в 0,1% муравьиной кислоте, отобранную с помощью ZipTip®, T0 обозначает аликвоту BioE4-03, отобранную сразу после добавления
25 пепсина (расщепление в течение 0 минут), T15 обозначает аликвоту BioE4-03, отобранную через 15 минут после расщепления пепсином, и T45 означает аликвоту BioE4-03, отобранную через 45 минут после расщепления пепсином (T45).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения, ингибирования, предупреждения или уменьшения роста опухоли. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения, ингибирования, предупреждения или уменьшения фиброза или связанных с фиброзом заболеваний или расстройств. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к
35 способам и композициям для лечения, ингибирования, предупреждения или уменьшения комбинации роста опухоли и фиброза или связанных с фиброзом заболеваний или расстройств. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения, ингибирования, предупреждения или уменьшения острого

повреждения легких. В одном варианте осуществления композиция содержит агент, например, выделенную нуклеиновую кислоту, выделенный пептид, малую молекулу, пептидомиметик и т.п., которые получены из С-концевой области эндостатина. В одном варианте осуществления композиция содержит фрагменты, происходящие из С-концевой области полноразмерного эндостатина. В одном варианте осуществления композиция содержит рекомбинантные фрагменты, происходящие из С-концевой области эндостатина. В одном варианте осуществления композиция содержит эндостатиновые фрагменты, которые образуются в результате естественного расщепления *in vivo*.

10 Определения

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в контексте настоящего документа, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в контексте настоящего документа, могут быть использованы в практике или при испытании настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны в контексте настоящего документа.

Каждый из следующих терминов, используемых в контексте настоящего документа, имеет значение, связанное с ним в данном разделе.

20 Формы единственного числа используются в данном документе для обозначения одного или более чем одного (т.е. по крайней мере одного) грамматического объекта в тексте. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Термин «примерно», используемый в контексте настоящего документа для обозначения измеримой величины, такой как количество, временная продолжительность и т.п., включает в себя отклонения на $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для выполнения раскрытых способов.

30 Термин «ненормальный», используемый в контексте организмов, тканей, клеток или их компонентов, относится к тем организмам, тканям, клеткам или их компонентам, которые отличаются по крайней мере одной наблюдаемой или обнаруживаемой характеристикой (например, возраст, лечение, время суток и т. д.) от тех организмов, тканей, клеток или их компонентов, которые демонстрируют «нормальную» (ожидаемую) соответствующую характеристику. Характеристики, которые являются нормальными или ожидаемыми для одного типа клеток или тканей, могут быть ненормальными для другого типа клеток или тканей.

35 Заболевание или расстройство «облегчается», если уменьшается тяжесть признака или симптома заболевания или расстройства, частота, с которой такой признак или симптом появляются у пациента, или и то, и другое. «Облегчение» конкретных видов рака и/или их патологии включает в себя деградацию опухоли, например, разрушение

структурной целостности или соединительной ткани опухоли таким образом, что размер опухоли уменьшается по сравнению с размером опухоли до лечения. «Облегчение» метастазирования рака включает в себя снижение скорости, с которой рак распространяется на другие органы.

5 Термин «аутологичный», используемый в контексте настоящего документа, относится к биологическому материалу, полученному от того же индивидуума, которому этот материал впоследствии будет повторно введен.

Термин «аллогенный материал», используемый в контексте настоящего документа, относится к биологическому материалу, полученному от генетически отличного
10 индивидуума того же вида, что и индивидуум, которому этот материал будет введен.

Термины «клетки» и «популяция клеток» используются взаимозаменяемо и относятся к множеству клеток, т.е. более чем к одной клетке. Популяция может представлять собой чистую популяцию, содержащую один тип клеток. В альтернативном варианте популяция может включать более одного типа клеток. В настоящем изобретении
15 отсутствуют ограничения на число типов клеток, которые может содержать популяция клеток.

Термин «противоопухолевый эффект», используемый в контексте настоящего документа, относится к биологическому эффекту, который может проявляться уменьшением объема опухоли, снижением количества опухолевых клеток, снижением
20 количества метастазов, увеличением продолжительности жизни или улучшением различных физиологических симптомов, связанных с раковым заболеванием. «Противоопухолевый эффект» может также проявляться способностью пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по изобретению в первую очередь предупреждать возникновение опухолей.

25 Термин «рак», используемый в контексте настоящего документа, определяется как заболевание, характеризующееся аномальным ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных видов рака включают, помимо прочего, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи,
30 рак поджелудочной железы, рак желудка, миелому, рак толстой и прямой кишки, рак почек, рак печени, рак мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого, саркому и тому подобное.

«Заболевание» - это состояние здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если болезнь не улучшается, здоровье животного продолжает ухудшаться.

35 Напротив, «расстройство» у животного – это состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного является менее благоприятным, чем оно было бы при отсутствии расстройства.

В отсутствие лечения расстройство не обязательно приводит к дальнейшему ухудшению состояния здоровья животного.

«Кодирование» относится к свойству, присущему конкретным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить матрицами для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих либо определенную последовательность нуклеотидов, (т.е. рРНК, тРНК и мРНК) либо определенную последовательность аминокислот и возникшие в результате биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно представлена в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, может быть обозначена как кодирующая белок или другой продукт этого гена или кДНК.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» соединения представляет собой такое количество соединения, которое достаточно для того, чтобы обеспечить оказание благоприятного эффекта на субъекта, которому вводят соединение. «Эффективное количество» средства доставки представляет собой количество, достаточное для эффективного связывания или доставки соединения.

Термин «эндогенный», используемый в данном документе, относится к любому материалу, полученному из организма, клетки, ткани или системы или произведенному внутри него.

Используемый в данном документе термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному извне или произведенному вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин «экспрессия», используемый в контексте настоящего документа, определяется как транскрипция и/или трансляция конкретной нуклеотидной последовательности, управляемая ее промотором.

«Экспрессионный вектор» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Экспрессионный вектор содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть предоставлены клеткой-хозяином или *in vitro* системой экспрессии. Экспрессионные векторы включают все те векторы, которые известны в данной области техники, такие как космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

Используемые в данном документе термины «фиброзное заболевание», «фиброзное расстройство», «связанное с фиброзом заболевание» и «связанное с фиброзом расстройство» относятся к состояниям, включающим фиброз в одной или нескольких тканях. Используемый в данном документе термин «фиброз» относится к
5 образованию фиброзной ткани в качестве репаративного или реактивного процесса, а не в качестве нормальной составляющей органа или ткани. Фиброз характеризуется накоплением фибробластов и отложением коллагена в количестве, превышающем норму, в какой-либо конкретной ткани. В контексте настоящего документа термин «фиброз» используется как синоним термина «накопление фибробластов и отложение коллагена».

10 Термин «противофиброзная» активность, используемый в контексте настоящего документа, относится к способности активного вещества предотвращать чрезмерное патологическое накопление коллагенового рубца или соединительной ткани в различных структурах и органах организма (обычно вызванное какой-либо травмой, аллергией, инфекцией или каким-либо наследственным генетическим отклонением), или
15 способствовать безоперационному удалению или биологическому растворению существующего избыточного и патологического накопления фиброзной коллагеновой ткани.

«Гомологичный» относится к сходству последовательностей или идентичности последовательностей между двумя полипептидами или между двумя молекулами
20 нуклеиновых кислот. Когда положение в обеих сравниваемых последовательностях занято одной и той же субъединицей основания или аминокислотного мономера, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то данные молекулы гомологичны в этой позиции. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией числа совпадающих или гомологичных положений, общих для двух
25 последовательностей, деленного на число сравниваемых положений, умноженное на 100. Например, если 6 из 10 позиций в двух последовательностях совпадают или являются гомологичными, то две данные последовательности гомологичны на 60%. Например, последовательности ДНК ATTGCC и TATGGC имеют 50% общую гомологию. Как правило, сравнение выполняется, когда две последовательности выровнены для получения
30 максимальной гомологии.

Термин «ингибирование», используемый в контексте настоящего документа, означает подавление или блокировку активности или функции, по меньшей мере, примерно на десять процентов по сравнению с контрольным значением. В некоторых случаях активность подавляется или блокируется на 50%, 75%, 90% или 95% по
35 сравнению с контрольным значением.

Используемый в контексте настоящего документа термин «материал с инструкциями» включает в себя публикацию, запись, диаграмму или любое другое средство выражения, которое может быть использовано для сообщения о пользы

композиций и способов по изобретению. Материал с инструкциями набора по изобретению может, например, быть прикреплен к контейнеру, содержащему нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию по изобретению, или транспортироваться вместе с контейнером, содержащим нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию. В качестве альтернативы материал с инструкциями может быть отправлен отдельно от контейнера с намерением получателя использовать данный материал с инструкциями и соединение совместно.

«Выделенный» означает измененный или извлеченный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом животном, не являются «выделенными», при этом та же самая нуклеиновая кислота или тот же самый пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов, находящихся в своем естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут находиться в по существу очищенной форме, или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Термины «пациент», «субъект», «индивидуум» и т.п. используются в данном документе как взаимозаменяемые и относятся к любому животному или его клеткам, *in vitro* или *in situ*, поддающимся лечению описанными в контексте настоящего документа способами. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления пациент, субъект или индивидуум является человеком.

«Парентеральное» введение композиции включает, например, подкожное (п/к.), внутривенное (в/в), внутримышечное (в/м) или внутригрудинное введение, или инфузионное введение.

В контексте настоящего изобретения используются следующие аббревиатуры для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. «А» обозначает аденозин, «С» - цитозин, «G» - к гуанозин, «Т» - тимидин, а «U» - уридин.

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает в себя все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, или РНК», может также включать интроны в той степени, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторой версии содержать интрон (интроны).

Термин «полинуклеотид», используемый в контексте настоящего документа, определяется как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты являются полимерами нуклеотидов. Таким образом, используемые в контексте данного документа термины «нуклеиновые кислоты» и «полинуклеотиды» взаимозаменяемы. Специалисту в данной области техники известно, что нуклеиновые кислоты являются полинуклеотидами, которые могут быть гидролизованы на мономерные «нуклеотиды». Мономерные

нуклеотиды могут быть гидролизованы в нуклеозиды. Полинуклеотиды, используемые в контексте настоящего документа, включают, среди прочего, все последовательности нуклеиновых кислот, которые получены любыми способами, доступными в данной области техники, включая, помимо прочего, рекомбинантные средства, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновых кислот из рекомбинантной библиотеки или клеточного генома с использованием технологии стандартного клонирования и ПЦР™ и т. п., а также синтетическими средствами. Кроме того, "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" по настоящему изобретению включает в себя молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК).

5 Если не указано иное, выражение «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок, или РНК», может также включать интроны в такой степени, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в 15 некоторой версии содержать интрон(ы).

Используемые в данном документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид 20 должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, при этом максимальное число аминокислот, которые могут входить в последовательность белка или пептида, не ограничено. Полипептиды включают в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Используемый в контексте настоящего документа термин обозначает как короткие цепи, которые также 25 обычно называются в данной области техники как пептиды, олигопептиды и олигомеры, например, так и более длинные цепи, которые обычно называются в данной области техники белками, которых существует множество типов. «Полипептиды» включают, например, среди прочего, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. К полипептидам 30 относятся природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинации.

Термин «промотор», используемый в контексте данного документа, определяется как последовательность ДНК, распознаваемая синтетическим механизмом клетки или 35 введенным синтетическим механизмом, необходимая для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Используемый в данном документе термин «промоторная/регуляторная последовательность» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая

необходима для экспрессии генного продукта, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может представлять собой последовательность корового промотора, а в других случаях эта последовательность может также включать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии генного продукта. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, экспрессировать генный продукт тканеспецифичным образом.

«Конститутивный» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продукцию генного продукта в клетке при большинстве или при всех физиологических условиях клетки.

«Индукцибельный» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продукцию генного продукта в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, соответствующий промотору.

«Тканеспецифический» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продукцию генного продукта в клетке по существу только в том случае, если клетка представляет собой клетку типа ткани, соответствующего промотору.

В контексте настоящего документа термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо. В настоящем документе субъект предпочтительно представляет собой млекопитающее, такое как не примат (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т.д.) и примат (например, обезьяна и человек), наиболее предпочтительно человек.

«Терапевтическое» лечение представляет собой лечение, проводимое субъекту, у которого проявляются признаки патологии, с целью уменьшения или устранения этих признаков.

В настоящем документе «лечение заболевания или расстройства» означает снижение частоты, с которой пациент испытывает симптомы заболевания или расстройства.

Фраза «терапевтически эффективное количество», используемая в настоящем документе, относится к количеству, которое достаточно или эффективно для предупреждения или лечения (задержки или предупреждения наступления, предупреждения прогрессирования, ингибирования, уменьшения или регрессии) заболевания, расстройства или состояния, включая облегчение симптомов таких заболеваний.

«Лечение» заболевания в контексте настоящего документа означает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или расстройства, которое имеется у субъекта.

«Вектор» представляет собой композицию вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки указанной выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области техники известно множество векторов, включая, среди прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Данный термин также следует понимать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, соединения полилизина, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают, среди прочего, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.п.

Диапазоны: в данном описании различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено лишь для удобства и краткости и не должно толковаться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретным образом раскрывает все возможные субдиапазоны, а также конкретные числовые значения внутри этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует толковать как имеющее конкретно раскрытые субдиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применяется независимо от ширины диапазона.

25

Описание

Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что пептиды, происходящие из С-концевой области эндостатина, можно применять для лечения или предупреждения роста опухоли, фиброза и острого повреждения легких. Соответственно, в одном варианте осуществления изобретение включает композиции, содержащие С-концевые эндостатиновые пептиды, полипептиды, фрагменты и т.п., обладающие противоопухолевой активностью, противofiброзной активностью, активностью против повреждения легких или их комбинацией. В одном варианте осуществления нуклеотиды, кодирующие эти пептиды, клетки-хозяева, трансформированные указанными нуклеотидами, и способы применения данных пептидов и нуклеотидов включены в настоящее изобретение.

35

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены композиции для ингибирования роста опухоли, фиброза, острого повреждения легких или

их комбинации. Например, настоящее изобретение частично основано на определении участка эндостатина, который ингибирует рост опухоли, фиброз и острое повреждение легких. В настоящем документе показано, что эндостатиновые фрагменты и происходящие из эндостатина пептиды имитируют эндостатин в ингибировании роста 5 опухоли и фиброза. Кроме того, в настоящем документе показано, что эндостатиновые фрагменты и происходящие из эндостатина пептиды снижают уровень IL-6, который повышен в легочной ткани субъекта с острым повреждением легких и способствует цитокиновому шторму.

В некоторых вариантах осуществления пептид, происходящий из эндостатина, 10 содержит следующую аминокислотную последовательность:

96: ATGQASSLL (SEQ ID NO:1),

E4-03: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:2),

E4: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT (SEQ ID NO:3),

15 96-17: ATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:4),

96-87: ATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:5),

91-96: SYCETWRTEAPSATGQASSLL (SEQ ID NO:6),

91-97, SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:7), или ее вариант, или ее фрагмент.

20 В некоторых вариантах осуществления пептид, происходящий из эндостатина, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:8-27 или ее вариант, или фрагмент.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ 25 лечения или предупреждения роста опухоли. Данный способ может быть использован для лечения или предупреждения, например, опухолей легких, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, костей, яичников, кожи, почек, носовых пазух, толстой кишки, кишечника, желудка, прямой кишки, пищевода, крови, головного мозга и его оболочек, спинного мозга и его оболочек, мышц, соединительной ткани, надпочечников, паращитовидных желез, щитовидной железы, 30 матки, яичек, гипофиза, репродуктивных органов, печени, желчного пузыря, глаз, уха, носа, горла, миндалин, ротовой полости, лимфатических узлов и лимфоидной системы, а также других органов.

В одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения или предупреждения фиброза. Способ может быть использован для лечения или 35 предупреждения, например, легочного фиброза, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, костей, яичников, кожи, почек, пазух носа, толстой кишки, кишечника, желудка, прямой кишки, пищевода, крови, головного мозга и его оболочек, спинного мозга и его оболочек, мышц,

соединительной ткани, надпочечников, паращитовидной железы, щитовидной железы, матки, яичек, гипофиза, репродуктивных органов, печени, желчного пузыря, глаза, уха, носа, горла, миндалин, ротовой полости, лимфатических узлов и лимфоидной системы, а также других органов.

5 В одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения или предупреждения острого повреждения легких. В настоящем документе продемонстрировано, что эндостатиновые фрагменты и пептиды, происходящие из эндостатина, снижают секрецию IL-6 из клеток, полученных из легких. Уровни IL-6
10 повышаются в тканях легких пациентов с острым повреждением легких и способствуют цитокиновому шторму. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предложен способ лечения острого повреждения легких, ОРДС, острого повреждения легких, вызванного вирусом, SARS, COVID-19, острого повреждения легких, вызванного гриппом, острого повреждения легких вследствие сепсиса, пневмонии, аспирации, травмы, переливания крови, дыма, вдыхания токсичных газов, панкреатита,
15 передозировки лекарствами, ожогов и других повреждений легких или острых респираторных дистресс-синдромов, включая повреждение легких, ассоциированное с ИВЛ, проявляющиеся воспалением.

Композиции

20 В одном аспекте настоящего изобретения предложены композиции, содержащие агент, полученный из С-концевой области эндостатина, обладающий противоопухолевой активностью, противофиброзной активностью или их комбинацией. Типичные агенты включают, помимо прочего, выделенные нуклеиновые кислоты, векторы, выделенные пептиды, пептидные миметики, малые молекулы и т.п.

25 В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению содержит выделенный пептид, полученный из С-концевой области эндостатина, или его биологически функциональный фрагмент. Композиция может содержать, например, любую изоформу С-концевого пептида эндостатина по изобретению, включая эндостатин из любого организма.

30 В некоторых вариантах осуществления выделенный пептид композиции содержит следующую аминокислотную последовательность:

96: ATGQASSLL (SEQ ID NO:1),

E4-03: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:2),

35 E4: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT (SEQ ID NO:3),

96-17: ATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:4),

96-87: ATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:5),

91-96: SYCETWRTEAPSATGQASSLL (SEQ ID NO:6),

91-97, SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:7), или ее вариант, или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления пептид, происходящий из эндостатина, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 8-27 или ее
5 фрагмент, или вариант.

В одном из вариантов осуществления пептид биотинилирован на N-конце, амидирован на C-конце или содержит их комбинацию.

В некоторых случаях, как описано в настоящем документе, биотинилированные на N-конце пептиды представлены с приставкой «Bio». Таким образом, в одном варианте
10 осуществления Bio96 обозначает SEQ ID NO:1, биотинилированную на N-конце. В одном варианте осуществления BioE4-03 обозначает SEQ ID NO:2, биотинилированную на N-конце. В одном варианте осуществления BioE4 обозначает SEQ ID NO:3, биотинилированную на N-конце. В одном варианте осуществления Bio96-17 обозначает
15 SEQ ID NO:4, биотинилированную на N-конце. В одном варианте осуществления Bio96-87 обозначает SEQ ID NO:5, биотинилированную на N-конце. В одном варианте осуществления Bio91-96 обозначает SEQ ID NO:6, биотинилированную на N-конце. В одном варианте осуществления Bio91-97 обозначает SEQ ID NO:7, биотинилированную на N-конце. В некоторых вариантах осуществления биотинилированный пептид, описанный
настоящем документе, амидирован на C-конце.

В одном варианте осуществления композиция содержит фрагменты
20 полноразмерного эндостатина, полученные из m-области эндостатина. Фрагменты C-концевой области полноразмерных эндостатиновых пептидов включают, помимо прочего, фрагменты SEQ ID NO: 1-27, содержащие по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,
, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39,
25 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 последовательных аминокислот полноразмерного эндостатинового пептида C-концевой области, как указано в SEQ ID NO: 1-27. В одном варианте осуществления композиция содержит рекомбинантный C-концевой фрагмент эндостатина.

В одном варианте осуществления композиция содержит фрагмент любой из SEQ
30 ID NO: 1-27. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция содержит фрагмент или вариант любой из SEQ ID NO: 1-27, где длина указанного фрагмента или варианта составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45,
46, 47 или 48 аминокислотных остатков.

В одном варианте осуществления изобретение включает C-концевые
35 эндостатиновые полипептиды и их варианты. В одном варианте осуществления пептид, происходящий из эндостатина, включает фрагмент эндостатина, который имитирует способность эндостатина ингибировать рост опухоли, фиброз или их комбинацию. В

одном варианте осуществления пептид, происходящий из эндостатина, включает фрагмент эндостатина, который уменьшает, лечит или предотвращает острое повреждение легких. В одном варианте осуществления пептид, происходящий из эндостатина, включает производное фрагмента эндостатина.

5 В одном варианте осуществления фрагмент эндостатина содержит один или несколько пептидов, которые могут быть получены в результате расщепления эндостатина. В одном варианте осуществления расщепление происходит естественным образом в желудке млекопитающего. В одном варианте осуществления расщепление происходит с участием ферментативного белка *in vitro*. В одном варианте осуществления
10 указанный ферментативный белок включает пепсин. В одном варианте осуществления указанный эндостатин, подлежащий расщеплению, содержит BioE4-03 (SEQ ID NO: 2).

В одном варианте осуществления указанный эндостатиновый фрагмент или пептид, происходящий из эндостатина, содержит пептид, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный одному или
15 нескольким пептидам, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27, как показано в Таблице 1 Примера 4 ниже. В одном варианте осуществления указанный эндостатиновый фрагмент содержит пептид, составляющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины одного или
20 нескольких пептидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27. В одном варианте осуществления указанный эндостатиновый фрагмент по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен одному или нескольким пептидам, которые составляют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины одного или нескольких пептидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27. В одном варианте
25 осуществления указанный эндостатиновый фрагмент содержит один или несколько пептидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27.

В одном варианте осуществления композиция содержит фрагмент любой из SEQ ID NO: 8-27. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция содержит фрагмент или вариант любой из SEQ ID NO: 8-27, где длина указанного фрагмента или
30 варианта составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах осуществления пептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:8-27 или ее фрагмент, или вариант. В
35 некоторых вариантах осуществления пептид содержит фрагмент, который состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 последовательных аминокислот любой из SEQ ID NO:8-27. В некоторых вариантах

осуществления пептид содержит любую из SEQ ID NO:8-27, содержащую не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления пептид содержит фрагмент, который состоит по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 аминокислот любой из SEQ ID NO:8-27, содержащей не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен.

Пептид по настоящему изобретению можно получить химическими способами. Например, пептиды можно синтезировать методами твердофазного синтеза (Roberge J Y et al (1995) Science 269: 202-204), отщеплять от смолы и очищать препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией. Автоматизированный синтез может быть осуществлен, например, с использованием синтезатора пептидов ABI 431 A (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя.

В одном варианте осуществления изобретение включает любую форму пептида, содержащего аминокислоты, происходящие из С-концевой области белка эндостатина, но не включает полноразмерный белок эндостатин или N-концевую область белка эндостатина. В одном варианте осуществления изобретение включает аминокислотные последовательности, имеющие существенную гомологию с С-концевым эндостатином или пептидом, полученным из С-концевого эндостатина, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пептид, который является «по существу гомологичным», гомологичен примерно на 50%, гомологичен примерно на 70%, гомологичен примерно на 80%, гомологичен примерно на 85%, гомологичен примерно на 90%, гомологичен примерно на 91%, гомологичен примерно на 92%, гомологичен примерно на 93%, гомологичен примерно на 94%, гомологичен примерно на 95%, гомологичен примерно на 96%, гомологичен примерно на 97%, гомологичен примерно на 98%, или гомологичен примерно на 99% аминокислотной последовательности С-концевой области эндостатина.

В альтернативном варианте пептид можно получить рекомбинантным способом или путем отщепления от более длинного полипептида. Композиция пептида может быть подтверждена путем проведения анализа аминокислот или секвенирования.

Варианты пептидов по настоящему изобретению могут быть следующими (i) вариант, в котором один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным аминокислотным остатком, при этом такой замещенный аминокислотный остаток может представлять собой или не представлять собой остаток, который кодируется генетическим кодом, (ii) вариант, в котором имеется один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, например, остатков, которые модифицируются путем присоединения замещающих групп, (iii) вариант, в котором пептид является вариантом альтернативного сплайсинга пептида по настоящему изобретению, (iv) фрагменты пептидов и/или (v) вариант, в котором пептид слит с другим

пептидом, таким как лидерная или секреторная последовательность или последовательность, которая используется для очистки (например, His-метка) или для обнаружения (например, Sv5 эпитопная метка или Fc-область иммуноглобулина). Фрагменты включают пептиды, полученные в результате протеолитического расщепления (включая протеолиз множества сайтов) исходной последовательности. Варианты могут быть посттрансляционными или химически модифицированными. Считается, что такие варианты находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники после изучения данного документа.

Как известно в данной области техники, «сходство» между двумя пептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных заменителей одного полипептида с последовательностью второго полипептида. Варианты определяются как включающие пептидные последовательности, отличающиеся от исходной последовательности, предпочтительно отличающиеся от исходной последовательности менее чем на 40% остатков на интересующий сегмент, более предпочтительно отличающиеся от исходной последовательности менее чем на 25% остатков на интересующий сегмент, более предпочтительно отличающиеся менее чем на 10% остатков на интересующий сегмент, наиболее предпочтительно отличается от исходной белковой последовательности всего несколькими остатками на интересующий сегмент и в то же время достаточно гомологичны исходной последовательности, чтобы сохранить функциональность исходной последовательности и/или способность ингибировать рост опухоли, фиброз или их комбинацию. Настоящее изобретение включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходны или идентичны исходной аминокислотной последовательности. Степень идентичности между двумя пептидами определяется с помощью компьютерных алгоритмов и способов, которые широко известны специалистам в данной области техники. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями предпочтительно определять с помощью алгоритма BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Пептиды по изобретению могут быть подвергнуты посттрансляционной модификации. Например, посттрансляционные модификации, которые входят в объем настоящего изобретения, включают расщепление сигнального пептида, гликозилирование, ацетилирование, изопренилирование, протеолиз, миристоилирование, фосфорилирование, сворачивание белка и протеолитический процессинг и т.д. Некоторые модификации или процессинговые события требуют введения дополнительных биологических механизмов. Например, события процессинга, такие как расщепление сигнального пептида и гликозилирование ядра, исследуют путем добавления

микросомальных мембран собак или экстрактов яиц лягушек *Xenopus* (патент США № 6103489) к стандартной реакции трансляции.

Пептиды по изобретению могут включать неприродные аминокислоты, образованные в результате посттрансляционной модификации или введения
5 неприродных аминокислот во время трансляции. Доступны различные подходы для введения неприродных аминокислот во время трансляции белка.

Пептид или белок по изобретению можно конъюгировать с другими молекулами, такими как белки, для получения слитых белков. Этого можно достичь, например, путем
10 синтеза N-концевых или C-концевых слитых белков при условии, что полученный слитый белок сохраняет функциональность противоопухолевой активности, противofiброзной активности или их комбинацию C-концевых эндостатиновых пептидов по изобретению. В одном варианте осуществления пептид или белок по изобретению могут быть слиты с биотином.

Пептид или белок по изобретению можно фосфорилировать с использованием
15 общепринятых способов, таких как способ, описанный в *in Reedijk et al. (The EMBO Journal 11(4):1365, 1992)*.

Циклические производные пептидов по изобретению также являются частью настоящего изобретения. Циклизация может позволить пептиду принять более благоприятную конформацию для ассоциации с другими молекулами. Циклизация может
20 быть достигнута с использованием методик, известных в данной области техники. Например, дисульфидные связи могут образовываться между двумя компонентами, расположенными на соответствующем расстоянии друг от друга, имеющими свободные сульфгидрильные группы, или амидная связь может образовываться между аминокислотной группой одного компонента и карбоксильной группой другого компонента. Циклизация также может
25 быть достигнута с использованием азобензол-содержащей аминокислоты, как описано *Ulysse, L., et al., J. Am. хим. Соц. 1995, 117, 8466-8467*. Компоненты, образующие связи, могут представлять собой боковые цепи аминокислот, неаминокислотные компоненты или их комбинацию. В одном из вариантов осуществления изобретения циклические пептиды могут содержать бета-поворот в правом положении. Бета-повороты могут быть введены в
30 пептиды по изобретению путем добавления аминокислот Pro-Gly в правое положение.

Может быть желательным получить циклический пептид, который является более гибким, чем циклические пептиды, содержащие соединения пептидных связей, как описано выше. Более гибкий пептид можно получить путем введения цистеинов в правое и левое положение пептида и образования дисульфидного мостика между двумя
35 цистеинами. Два цистеина расположены так, чтобы не деформировать и не перевернуть бета-лист. Данный пептид более гибок из-за длины дисульфидной связи и меньшего количества водородных связей в части бета-листа. Относительная гибкость циклического пептида может быть определена с помощью молекулярно-динамического моделирования.

Настоящее изобретение также относится к пептидам, содержащим аминокислоты С-концевой области белка эндостатина, но не включает полноразмерный белок эндостатин или N-концевую область белка эндостатина, посредством которых пептид может быть слит или интегрирован в целевой белок и/или нацеливающий домен, способный направлять химерный белок к требуемому клеточному компоненту, типу клеток или ткани. Химерные белки могут также содержать дополнительные аминокислотные последовательности или домены. Химерные белки являются рекомбинантными в том смысле, что различные компоненты происходят из разных источников и как таковые не встречаются вместе в природе (т. е. являются гетерологичными).

В одном варианте осуществления нацеливающий домен может представлять собой трансмембранный домен, мембраносвязывающий домен или последовательность, направляющую белок связываться, например, с везикулами или с ядром. В одном варианте осуществления нацеливающий домен может нацеливать пептид на конкретный тип клеток или тканей. Например, нацеливающий домен может представлять собой лиганд клеточной поверхности или антитело против антигенов клеточной поверхности ткани-мишени (например, опухолевого антигена). Нацеливающий домен может нацеливать пептид по изобретению на клеточный компонент.

Пептид по изобретению может быть синтезирован общепринятыми методиками. Например, пептиды или химерные белки могут быть синтезированы химическим синтезом с применением твердофазного синтеза пептидов. В данных способах используется твердофазный или жидкофазный синтез (см. например, J. M. Stewart, and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford Ill. (1984) and G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis Synthesis, Biology* editors E. Gross and J. Meienhofer Vol. 2 Academic Press, New York, 1980, pp. 3-254 for solid phase synthesis techniques; and M Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin 1984, and E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, supra, Vol 1, for classical solution synthesis). В качестве примера, пептид по изобретению может быть синтезирован с использованием твердофазного синтеза с применением 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc) с прямым введением фосфотреонина в качестве производного N-флуоренилметоксикарбонил-О-бензил-L-фосфотреонина.

Белки, слитые на С-конце или N-конце, содержащие пептид или химерный белок по изобретению, конъюгированный с другими молекулами, можно получить путем слияния, используя рекомбинантные методики, N-конца или С-конца пептида или химерного белка и последовательности выбранного белка или селективируемого маркера, обладающего требуемой биологической функцией. Полученные слитые белки содержат С-концевой эндостатиновый пептид или пептид, происходящий из эндостатина, слитый с выбранным белком или маркерным белком, как описано в настоящем документе. Примеры белков, которые можно использовать для получения слитых белков, включают

иммуноглобулины, глутатион-S-трансферазу (GST), гемагглютинин (НА) и усеченный тус. Например, полипептид может быть связан с CH1, CH2 и/или CH3-доменом тяжелой цепи. Если константная область происходит из легкой цепи, она может происходить из легкой цепи каппа или лямбда. Если константная область происходит из тяжелой цепи, она может происходить из антитела, принадлежащего любому из следующих классов антител: IgG, IgA, IgE, IgD и IgM. IgG может представлять собой IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄. Константный домен может представлять собой Fc фрагмент. Константный домен может происходить из антитела млекопитающего, такого как антитело человека. Слитые белки растворимых рецепторов и IgG являются распространенными иммунологическими реагентами, и способы их конструирования известны в уровне техники (см., например, патенты США № 5,225,538, 5,726,044; 5,707,632; 750,375, 5,925,351, 6,406,697 и Bergers et al. Science 1999 284: 808-12). В одном примере иммуноглобулин является константной частью тяжелой цепи человеческого IgG, в частности IgG₁, где димеризация между двумя тяжелыми цепями происходит в шарнирной области. Признано, что включение CH2 и CH3-доменов Fc области в состав слитого полипептида увеличивает период полувыведения *in vivo* полипептида, содержащего Fc область, а также период полувыведения олигомера или димера, содержащего полипептид.

Пептиды по изобретению могут быть сконструированы с использованием биологической системы экспрессии. Использование этих систем позволяет создавать большие библиотеки случайных пептидных последовательностей и осуществлять скрининг этих библиотек на наличие пептидных последовательностей, которые связываются с конкретными белками. Библиотеки можно создавать путем клонирования синтетической ДНК, которая кодирует случайные пептидные последовательности, в соответствующие векторы экспрессии (см. Christian et al. 1992, J. Mol. Biol. 227:711; Devlin et al., 1990 Science 249:404; Cwirla et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378). Библиотеки также могут быть созданы путем совместного синтеза перекрывающихся пептидов (см. патент США № 4708871).

Пептиды и химерные белки по изобретению могут быть превращены в фармацевтические соли путем взаимодействия с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, серная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота и т. д., или с органическими кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, салициловая кислота, бензолсульфоновая кислота и толуолсульфоновые кислоты.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую C-концевой

эндостатин, пептид, происходящий из эндостатина, или его биологически функциональный фрагмент.

В одном варианте осуществления последовательность выделенной нуклеиновой кислоты кодирует С-концевой эндостатин. В различных вариантах осуществления последовательность выделенной нуклеиновой кислоты кодирует пептид, происходящий из эндостатина, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

96: ATGQASSLL (SEQ ID NO:1),

E4-03: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:2),

E4: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT (SEQ ID NO:3),

96-17: ATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:4),

96-87: ATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:5),

91-96: SYCETWRTEAPSATGQASSLL (SEQ ID NO:6),

91-97, SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:7), или ее вариант, или ее фрагмент. В одном варианте осуществления пептид биотинилирован на N-конце, амидирован на С-конце или включает комбинацию перечисленного.

Кроме того, изобретение охватывает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, имеющий существенную гомологию с С-концевым эндостатином или пептидом, происходящим из эндостатина, раскрытыми в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность выделенной нуклеиновой кислоты кодирует С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, обладающий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологией последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ NO: 1-7.

В одном варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая пептид, имеющий существенную гомологию с С-концевым эндостатином или пептидом, происходящим из эндостатина, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, который по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен одному или нескольким пептидам, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27, как показано в таблице 1 примера 4 ниже. В одном варианте осуществления указанная выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, составляющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины одного или нескольких пептидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27. В одном варианте осуществления указанная выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный одному или нескольким пептидам, которые составляют по меньшей мере

75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % или 99% длины одного или нескольких пептидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27. В одном варианте осуществления указанная выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько пептидов, 5 выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-27.

Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующая С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, может быть получена с использованием любого из множества рекомбинантных способов, известных в данной области техники, таких как, например, скрининг библиотек из клеток, экспрессирующих 10 ген, путем получения гена из вектора, который, как известно, включает его, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих его, с использованием стандартных методик. В качестве альтернативы интересующий ген можно получить синтетическим путем, а не клонировать.

Выделенная нуклеиновая кислота может включать нуклеиновую кислоту любого 15 типа, включая, помимо прочего, ДНК и РНК. Например, в одном варианте осуществления композиция содержит выделенную молекулу ДНК, включая, например, выделенную молекулу кДНК, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или его функциональный фрагмент. В одном варианте осуществления композиция содержит выделенную молекулу РНК, кодирующую С-концевой эндостатин 20 или пептид, происходящий из эндостатина, или его функциональный фрагмент.

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно модифицировать для улучшения стабильности в сыворотке или в ростовой среде клеточных культур. Можно добавить модификации для улучшения стабильности, функциональности и/или специфичности и для минимизации иммуностимулирующих 25 свойств молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению. Например, для того чтобы улучшить стабильность, 3'-остатки можно стабилизировать от деградации, например, их можно выбрать так, чтобы они состояли из пуриновых нуклеотидов, в частности аденозиновых или гуанозиновых нуклеотидов. В альтернативном варианте, замена пиримидиновых нуклеотидов модифицированными аналогами, например, замена уридина 30 на 2'-дезокситимидин, допускается и не влияет на функцию молекулы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотидный аналог. Например, концы можно стабилизировать путем включения модифицированных аналогов нуклеотидов.

35 Неограничивающие примеры нуклеотидных аналогов включают рибонуклеотиды, модифицированные по сахару и/или остову (т.е. включают модификации фосфатно-сахарного остова). Например, фосфодизфирные связи природной РНК могут быть модифицированы для включения по меньшей мере одного гетероатома азота или серы. В

предпочтительных рибонуклеотидах с модифицированным остовом фосфоэфирная группа, соединяющаяся с соседними рибонуклеотидами, замещена модифицированной группой, например, фосфотиоатной группой. В предпочтительных рибонуклеотидах с модифицированным сахаром 2'-ОН-группа замещена группой, выбранной из H, OR, R, галогена, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ или ON, где R представляет собой C₁-C₆ алкил, алкенил или алкинил, а галоген представляет собой F, Cl, Br или I.

Другими примерами модификаций являются рибонуклеотиды с модифицированными азотистыми основаниями, т.е. рибонуклеотиды, содержащие по меньшей мере одно азотистое основание неприродного происхождения вместо встречающегося в природе азотистого основания. Основания могут быть подвергнуты модификации для блокирования активности аденозиндезаминазы. Типичные модифицированные азотистые основания включают, помимо прочего, уридин и/или цитидин, модифицированные в 5-положении, например, 5-(2-амино)пропилуридин, 5-бромурин; аденозин и/или гуанозины, модифицированные в положении 8, например, 8-бромгуанозин; деаза-нуклеотиды, например, 7-деаза-аденозин; O-и N-алкилированные нуклеотиды, например, N6-метиладенозин, являются подходящими. Следует отметить, что приведенные выше модификации могут комбинироваться.

В некоторых случаях молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну из следующих химических модификаций: 2'-H, 2'-O-метил или 2'-ОН модификация одного или нескольких нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может обладать повышенной устойчивостью к нуклеазам. Для повышения устойчивости к нуклеазам молекула нуклеиновой кислоты может включать, например, 2'-модифицированные рибозные звенья и/или фосфоротиоатные связи. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована или заменена рядом различных «окси» или «дезоксигенных» заместителей. Для повышения устойчивости к нуклеазам молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут включать 2'-O-метил, 2'-фтор, 2'-O-метоксиэтил, 2'-O-аминопропил, 2'-амино и/или фосфоротиоатные связи. Включение закрытых нуклеиновых кислот (LNA), этилен-нуклеиновых кислот (ENA), например, нуклеиновых кислот с 2'-4'-этиленовым мостиком, и определенных модификаций азотистых оснований, таких как 2-амино-А, 2-тио (например, 2-тио-У), модификации G-фиксирующего основания, также могут повышать аффинность связывания с мишенью.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает 2'-модифицированный нуклеотид, например, 2'-дезоксигенный, 2'-дезоксигенный-2'-фтор, 2'-O-метил, 2'-O-метоксиэтил (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропил (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-O-N-метилацетиламино (2'-O-NMA). В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает по меньшей мере один 2'-O-метил-

модифицированный нуклеотид, а в некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды молекулы нуклеиновой кислоты включают модификацию 2'-О-метилом.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению предпочтительно обладает одним или несколькими из следующих свойств:

5 Обсуждаемые в данном документе НК-агенты включают в себя немодифицированные РНК и ДНК, а также РНК и ДНК, которые были модифицированы, например, для повышения эффективности, а также полимеры заменителей нуклеозидов. Немодифицированная РНК относится к молекуле, в которой компоненты нуклеиновой кислоты, а именно сахара, основания и фосфатные фрагменты, являются такими же или
10 по существу такими же, как компоненты, которые встречаются в природе, предпочтительно, которые естественным образом встречаются в организме человека. В данной области техники редкие или необычные, но встречающиеся в природе РНК называются модифицированными РНК, см., например, Limbach et al. (Nucleic Acids Res., 1994, 22:2183-2196). Такие редкие или необычные РНК, часто именуемые
15 модифицированными РНК, обычно являются результатом посттранскрипционной модификации и подпадают под термин «немодифицированная РНК», используемый в данном документе. Модифицированная РНК, используемая в контексте данного документа, относится к молекуле, в которой один или несколько компонентов нуклеиновой кислоты, а именно сахара, основания и фосфатные фрагменты, отличаются от
20 компонентов, которые встречаются в природе, предпочтительно отличаются от компонентов, которые встречаются в организме человека. Хотя их и относят к «модифицированным РНК», они, разумеется, вследствие модификации будут включать молекулы, которые, строго говоря, не являются РНК. Заменители нуклеозидов представляют собой молекулы, в которых рибофосфатный остов заменен
25 нерибофосфатной конструкцией, которая позволяет основаниям находиться в правильном пространственном отношении, так что гибридизация по существу аналогична той, что наблюдается с рибофосфатным остовом, например, незаряженные имитаторы рибофосфатного остова.

Модификации нуклеиновой кислоты по изобретению могут находиться на одном
30 или более из фосфатной группы, сахарной группы, остова, N-конца, C-конца или азотистого основания.

Настоящее изобретение также включает вектор, в который вставлена выделенная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению. В данной области техники имеется множество подходящих векторов, которые могут быть использованы в настоящем
35 изобретении.

Вкратце, экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих C-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, обычно достигается за счет функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей C-

концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или ее частей, с промотором и включения конструкции в экспрессионный вектор. Используемые векторы подходят для репликации и, возможно, для интеграции в эукариотические клетки. Типичные векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии 5 требуемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Векторы по настоящему изобретению также можно использовать для иммунизации нуклеиновыми кислотами и генной терапии, используя стандартные протоколы доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники, см., например, 10 патенты США № 5399346, 5580859, 5589466, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления изобретения предложен вектор для генной терапии.

Выделенная нуклеиновая кислота по изобретению может быть клонирована в различные типы векторов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, 15 включающий, помимо прочего, плазмиду, фагемиду, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают экспрессионные векторы, репликационные векторы, векторы для генерации зондов и векторы для секвенирования. Вектор по настоящему изобретению включает любой вектор, подходящий для экспрессии в эукариотах, включая растения, животных и грибы, и в прокариотах, включая архей и 20 бактерий.

Кроме того, вектор может быть введен в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, например, в Sambrook et al. (2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, 25 которые можно использовать в качестве векторов, включают, помимо прочего, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функциональную по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, удобные сайты для рестриктаз и один или несколько селективируемых 30 маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193).

Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно вставить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с использованием методик, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный 35 вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта либо *in vivo*, либо *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. В данной области техники

известен ряд аденовирусных векторов. В одном из вариантов осуществления используются лентивирусные векторы.

Например, векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную, стабильную интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество перед векторами, полученными из онко-ретровирусов, таких как вирусы мышинного лейкоза, которое состоит в том, что они могут осуществлять трансдукцию непролиферирующих клеток, таких как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом, заключающимся в низкой иммуногенности. В одном варианте осуществления композиция включает вектор, полученный из аденоассоциированного вируса (AAV). Аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы стали мощными инструментами доставки генов для лечения различных расстройств. AAV векторы обладают рядом особенностей, которые делают их идеально подходящими для генной терапии, включая отсутствие патогенности, минимальную иммуногенность и способность стабильно и эффективно трансдуцировать постмитотические клетки. Экспрессию конкретного гена, содержащегося в AAV векторе, можно специфически нацелить на один или несколько типов клеток путем выбора подходящей комбинации серотипа AAV, промотора и способа доставки.

В одном варианте осуществления можно использовать репликативно-дефектный аденовирус. В другом варианте осуществления можно использовать репликативно-дефектный аденовирус серотипа 5.

В некоторых вариантах осуществления вектор также включает общепринятые регуляторные элементы, которые функционально связаны с трансгеном так, чтобы обеспечить его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, продуцируемым по изобретению. В настоящем документе «функционально связанные» последовательности включают как последовательности контроля экспрессии, которые прилегают к представляющему интерес гену, так и последовательности контроля экспрессии, которые действуют в транс-положении или на расстоянии, контролируя интересующий ген. Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации транскрипции, промоторные последовательности и энхансерные последовательности; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, усиливающие секрецию кодируемого продукта. В данной области

техники известно и может быть использовано большое количество последовательностей контроля экспрессии, включая промоторы, которые представляют собой нативные, конститутивные, индуцибельные и/или тканеспецифичные промоторы.

Дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области от 30 до 110 п.о. выше сайта инициации, хотя недавно было показано, что ряд промоторов содержат функциональные элементы и ниже сайта инициации. Расстояние между промоторными элементами часто изменчиво, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе гена тимидинкиназы (tk) расстояние между промоторными элементами может быть увеличено до 50 п.н. друг от друга, прежде чем активность начнет снижаться. Представляется, что в зависимости от промотора отдельно взятые элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

Одним из примеров подходящего промотора является промоторная последовательность гена немедленного раннего ответа цитомегаловируса (CMV). Данная промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную обеспечивать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально с ней связанной. Другим примером подходящего промотора является элонгационный фактор роста-1 α (EF-1 α). Однако также можно использовать другие конститутивные промоторные последовательности, включая, помимо прочего, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор вируса мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), промотор вируса птичьего лейкоза, промотор немедленного раннего развития вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, изобретение не должно ограничиваться применением конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Использование индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцибельных промоторов включают, помимо прочего, металлотиониновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

Энхансерные последовательности, обнаруживаемые в векторе, также регулируют экспрессию содержащегося в нем гена. Как правило энхансеры связаны с белковыми факторами для усиления транскрипции гена. Энхансер может располагаться выше или

ниже гена, который он регулирует. Эхансеры также могут быть тканеспецифичными для усиления транскрипции в определенном типе клеток или тканей. В одном варианте осуществления вектор по настоящему изобретению содержит один или несколько эхансеров для усиления транскрипции гена, присутствующего в векторе.

5 Для того, чтобы оценить экспрессию С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, экспрессионный вектор, который необходимо ввести в клетку, также может содержать либо селектируемый маркерный ген, либо репортерный ген, либо оба указанных гена, чтобы облегчить идентификацию и отбор экспрессирующих
10 клеток из популяции клеток, применяемых для трансфекции или заражения вирусными векторами. В других аспектах селектируемый маркер может быть нанесен на отдельный участок ДНК и использован в процедуре совместной трансфекции. Как селектируемые маркерные гены, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Полезные селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к
15 антибиотикам, такие как нео и тому подобные.

Репортерные гены применяются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует и не экспрессируется организмом-реципиентом или тканью-реципиентом и
20 который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко обнаруживаемым свойством, например, ферментативной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al.,
25 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методик или получены коммерческим путем. В общем, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор.
30 Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности агентов модулировать транскрипцию, запускаемую промотором.

Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области техники. В контексте экспрессионного вектора, вектор можно легко ввести в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым
35 способом, известным в данной области техники. Например, экспрессионный вектор можно перенести в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими средствами.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию,

электропорацию и тому подобное. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области. См., например, (2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является кальций-фосфатная трансфекция.

Биологические способы введения интересующего полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование ДНК и РНК-векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом вставки генов в клетки млекопитающих, например, человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса I простого герпеса, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п., см., например, патенты США № 5350674 и 5585362.

Химические средства введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, шарики и системы на основе липидов, включая эмульсии типа «масло в воде», мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичной коллоидной системой для использования в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула).

В случае использования невирусной системы доставки типичным средством доставки является липосома. Предполагается использование липидных препаратов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водную внутреннюю часть липосомы, рассеяна внутри липидного бислоя липосомы, прикреплена к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена липосомой, может образовывать комплекс с липосомой, может быть диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, комбинирована с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или образовывать комплекс с мицеллой или иным образом быть связана с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессионным вектором, не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре в виде мицелл или в «свернутой» структуре. Они также могут быть просто рассеяны в растворе, возможно, образуя агрегаты, неоднородные по размеру и форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут иметь природное происхождение или быть синтетическими липидами. Например, липиды включают жирные капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

Липиды, пригодные для использования, можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») можно приобрести у компании Sigma, Сент-Луис, Миссури; дицетилфосфат («DCP») можно приобрести у компании K&K Laboratories (Плейнвью, Нью-Йорк); холестерин («Choi») можно приобрести у Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно приобрести у Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре примерно -20°C. В качестве единственного растворителя используется хлороформ, поскольку он легче испаряется, чем метанол. «Липосома» представляет собой общий термин, охватывающий множество однослойных и многослойных липидных носителей, образующихся в результате генерации закрытых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы характеризуются тем, что они имеют пузырьчатую (везикулярную) структуру с мембраной из двойного фосфолипидного слоя и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируются в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперегруппировке до образования закрытых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Однако также включены композиции, которые имеют в растворе структуру, отличную от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также включены комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина, для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине, можно проводить различные анализы. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как Саузерн- и Нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР, ОТ-кПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение наличия или отсутствия конкретного пептида, например, с помощью иммунологических методов (ELISA и вестерн-блоттинг) или с помощью анализов, описанных в настоящем документе, для идентификации агентов, подпадающих под объем изобретения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложено средство доставки, содержащее С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина. Типичные средства доставки включают, помимо прочего, микросферы, микрочастицы, наночастицы, полимеросомы, липосомы и мицеллы. Например, в некоторых вариантах осуществления средство доставки загружено С-концевым эндостатином или пептидом, происходящим из эндостатина, или молекулой

нуклеиновой кислоты, кодирующей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина. В некоторых вариантах осуществления средство доставки обеспечивает контролируемое высвобождение, отсроченное высвобождение или непрерывное высвобождение загруженного груза. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит нацеливающий фрагмент, который нацеливает средство доставки на место лечения.

В соответствии с настоящим изобретением также предложена каркасная композиция или субстратная композиция, содержащая С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, клетку, продуцирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина или их комбинацию. В другом варианте осуществления С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, клетка, продуцирующая С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или их комбинация наносятся на поверхность каркаса. Каркас по изобретению может быть любого типа, известного в данной области техники. Неограничивающие примеры такого каркаса включают гидрогель, электропряденый каркас, пенопласт, сетку, лист, пластырь и губку.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены фармацевтические композиции, включающие одну или несколько композиций, описанных в данном документе. Композиции могут быть использованы в смесях с обычными вспомогательными веществами, т.е. фармацевтически приемлемыми органическими или неорганическими веществами-носителями, подходящими для введения в рану или место лечения. Фармацевтические композиции можно стерилизовать и при желании смешивать со вспомогательными веществами, например, смазочными веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для воздействия на буферы осмотического давления, красителями и/или ароматизаторами и т.п. При желании их также можно комбинировать с другими активными агентами, например, с другими анальгетиками.

Введение композиций по настоящему изобретению можно осуществлять, например, парентерально, внутривенно, внутриопухолево, подкожно, внутримышечно, интратрахеально или интратрахеально, ингаляционно, посредством инфузии или любым другим приемлемым системным способом.

Используемые в настоящем документе «дополнительные ингредиенты» включают, помимо прочего, один или несколько из следующего: вспомогательные вещества; поверхностно-активные вещества; диспергирующие агенты; инертные разбавители; гранулирующие и разрыхляющие агенты; связующие агенты; смазочные агенты; красители; консерванты; физиологически разлагаемые композиции, такие как желатин;

водные носители и растворители; маслянистые средства и растворители; суспендирующие агенты; диспергирующие или смачивающие агенты; эмульгаторы, средства, уменьшающие раздражение; буферы; соли; загустители; наполнители; эмульгаторы; антиоксиданты; антибиотики; противогрибковые средства; стабилизаторы; и
5 фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы. Другие "дополнительные ингредиенты", которые могут быть включены в фармацевтические композиции по изобретению, известны в данной области техники и описаны, например, в Genaro, ed. (1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA), который включен в настоящий документ посредством ссылки.

10 Композиция по изобретению может содержать консервант в количестве примерно от 0,005% до 2,0% от общей массы композиции. Консервант используется для предотвращения порчи в случае воздействия загрязняющих веществ в окружающей среде. Примеры консервантов, полезных в соответствии с изобретением, включают, среди прочего, консерванты, которые выбраны из группы, состоящей из бензилового спирта,
15 сорбиновой кислоты, парабенов, имидамочевины и их комбинаций. Особенно предпочтительным консервантом является комбинация примерно от 0,5% до 2,0% бензилового спирта и от 0,05% до 0,5% сорбиновой кислоты.

В одном варианте композиция включает антиоксидант и хелатирующий агент, который ингибирует распад одного или нескольких компонентов композиции.
20 Предпочтительными антиоксидантами для некоторых соединений являются ВНТ, ВНА, альфа-токоферол и аскорбиновая кислота в предпочтительном диапазоне примерно от 0,01% до 0,3% и более предпочтительно ВНТ в диапазоне от 0,03% до 0,1% по массе от общей массы композиции. Предпочтительно хелатирующий агент присутствует в количестве от 0,01% до 0,5% по массе от общей массы композиции. Особенно
25 предпочтительные хелатирующие агенты включают эдетатные соли (например, динатрий эдетат) и лимонную кислоту в массовом диапазоне примерно от 0,01% до 0,20% и более предпочтительно в диапазоне от 0,02% до 0,10% по массе от общей массы композиции. Хелатирующий агент полезен для хелатирования ионов металлов в композиции, что может отрицательно повлиять на срок годности препарата. Хотя ВНТ и динатрия эдетат
30 являются особенно предпочтительными антиоксидантом и хелатирующим агентом соответственно для некоторых соединений, другие подходящие и эквивалентные антиоксиданты и хелатирующие агенты могут быть заменены, как известно специалистам в данной области.

Жидкие суспензии могут быть приготовлены с использованием общепринятых
35 способов для получения суспензии композиции по изобретению в водном или маслянистом носителе. Водные носители включают, например, воду и изотонический солевой раствор. Маслянистые носители включают, например, миндальное масло, жирные сложные эфиры, этиловый спирт, растительные масла, такие как арахисовое,

оливковое, кунжутное или кокосовое масло, фракционированные растительные масла, рыбий жир и минеральные масла, такие как жидкий парафин. Жидкие суспензии могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, помимо прочего, суспендирующие, диспергирующие или смачивающие агенты, эмульгаторы, средства, уменьшающие раздражение, консерванты, буферы, соли, ароматизаторы, красители и подсластители. Маслянистые суспензии могут дополнительно содержать загуститель. Известные суспендирующие агенты включают, помимо прочего, сироп сорбита, гидрогенизированные пищевые жиры, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь, аравийскую камедь и производные целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза. Известные диспергирующие или смачивающие агенты включают, помимо прочего, фосфатиды природного происхождения, такие как лецитин, продукты конденсации оксида алкилена с жирной кислотой, с длинноцепочечным алифатическим спиртом, с частичным сложным эфиром, полученным из жирной кислоты и гексита, или с частичным сложным эфиром, полученным из жирной кислоты и гекситолангидрида (например, полиоксиэтиленстеарат, гептадеэтиленоксицетанол, моноолеат полиоксиэтиленсорбита и моноолеат полиоксиэтиленсорбитана соответственно). Известные эмульгаторы включают, помимо прочего, лецитин и аравийскую камедь. Известные консерванты включают, помимо прочего, метил, этил или н-пропилпарагидроксибензоаты, аскорбиновую кислоту и сорбиновую кислоту.

Способы лечения опухолей

В одном варианте осуществления С-концевой эндостатин или происходящий из эндостатина пептид по настоящему изобретению снижает продукцию белков внеклеточного матрикса фибробластами в фиброзированных легких и коже. Ассоциированные с раком фибробласты (CAF) также вызывают фиброз. Следовательно, в различных вариантах осуществления С-концевой эндостатин или происходящий из эндостатина пептид по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предупреждения рака, фиброзных заболеваний или их комбинации.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом. Типичные состояния, которые лечат или предупреждают с помощью настоящего изобретения, включают, среди прочего, опухоли легких, молочной железы, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, костей, яичников, кожи, почек, пазух, толстой кишки, кишечника, желудка, прямой кишки, пищевода, крови, головного мозга и его оболочек, спинного мозга и его оболочек, мышц, соединительной ткани, надпочечников, околощитовидной железы, щитовидной железы, матки, яичек, гипофиза,

репродуктивных органов, печени, желчного пузыря, глаз, уха, носа, горла, миндалин, ротовой полости, лимфатических узлов и лимфоидной системы и других органов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложены способы предупреждения метастазирования злокачественных опухолей или других раковых клеток, а также снижения скорости роста опухоли. Способы включают введение эффективного количества одного или нескольких раскрытых соединений субъекту, у которого диагностирована злокачественная опухоль или раковые клетки, или субъекту, имеющему опухоль или раковые клетки. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления эндостатиновые пептиды по изобретению используются для лечения или предупреждения рака легких или рака кожи. Однако изобретение не ограничивается лечением рака легких. Ниже приведены неограничивающие примеры раковых заболеваний, которые можно лечить или предупреждать с помощью раскрытых способов и композиций: острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарцинома, рак аппендикса, базальноклеточная карцинома, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, опухоли головного и спинного мозга, глиома ствола головного мозга, опухоль головного мозга, рак молочной железы, опухоли бронхов, лимфома Беркитта, карциноидная опухоль, атипичная тератоидная/рабдоидная опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, лимфома центральной нервной системы, мозжечковая астроцитома, церебральная астроцитома/злокачественная глиома, церебральная астроцитома/злокачественная глиома, рак шейки матки, опухоль зрительного пути у детей, хордома, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз, хронические миелолиферативные расстройства, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиома, рак кожи, кожная Т-клеточная лимфома, рак эндометрия, эпендимобластома, эпендимома, рак пищевода, семейство опухолей Юинга, экстракраниальный рак, экстрагонадная герминогенная опухоль, рак внепеченочных желчных протоков, внепеченочный рак, рак глаз, грибовидный микоз, рак желчного пузыря, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), герминогенная опухоль, гестационный рак, гестационная трофобластическая опухоль, глиобластома, глиома, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак (рак печени), гистиоцитоз, лимфома Ходжкина, гипофарингеальный рак, глиома гипоталамуса и зрительных путей, опухоль гипоталамуса, внутриглазной рак (рак глаза), внутриглазная меланома, опухоли островков поджелудочной железы, саркома Капоши,

рак почки (почечноклеточный) рак, рак клеток Лангерганса, гистиоцитоз клеток Лангерганса, рак гортани, лейкоз, рак губ и полости рта, рак печени, рак легких, лимфома, макроглобулинемия, злокачественная фиброзная гистиоцитома кости и остеосаркома, медуллобластома, медуллоэпителиома, меланома, карцинома клеток Меркеля, мезотелиома, метастатический плоскоклеточный рак шеи с нелокализуемым первичным поражением, рак полости рта, синдром множественных эндокринных неоплазий, множественная миелома, микозы, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, миелолейкоз, миелома, миелопролиферативные расстройства, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легкого, рак ротовой полости, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитома, остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитома кости, яичников, рак яичников, эпителиальный рак яичников, герминогенная опухоль яичников, опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности, рак поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиома, рак паразитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитомы, паренхиматозные опухоли шишковидной железы промежуточной дифференцировки, пинеобластома и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, злокачественное новообразование плазматических клеток, злокачественное новообразование плазматических клеток /множественная миелома, плевроролечная бластома, первичный рак центральной нервной системы, первичная лимфома центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак (рак почки), рак почечной лоханки и мочеточника, карцинома дыхательных путей с участием гена *nut* на 15 хромосоме, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак слюнной железы, саркома, синдром Сезари, рак кожи (меланома), рак кожи (немеланома), карцинома кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, саркома мягких тканей, плоскоклеточная карцинома, плоскоклеточный рак шеи, рак желудка, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластома, Т-клеточная лимфома, рак яичка, рак горла, тимома и карцинома тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластическая опухоль, рак уретры, рак матки, саркома матки, рак влагалища, глиома зрительных путей и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемия Вальденстрема и опухоль Вильмса.

35

Способы лечения фиброза

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения фиброза, связанного с фиброзом заболевания или

расстройства или сердечно-сосудистого заболевания или расстройства, включающий введение субъекту композиции, содержащей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как описано в

5 настоящем документе. В одном из вариантов осуществления заболевания или расстройства, связанные с фиброзом, включают, помимо прочего, фиброз сердца, интерстициальные заболевания легких, идиопатический фиброз легких, интерстициальный фиброз легких, семейный фиброз легких, фиброз легких, вызванный радиацией, пневмокониоз работников угольной промышленности, асбестоз,

10 блеомициновое поражение легких, саркоидоз, силикоз, острое повреждение легких, ОРДС, заболевания или нарушения заживления ран, гипертрофические рубцы, келоидные рубцы, цирроз печени, системная склеродермия, локализованная склеродермия, включая, помимо прочего, морфеа, сосудистый фиброз, фиброз почек, фиброз как результат болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), субэпителиальный

15 фиброз, эндомиокардиальный фиброз, фиброз матки, миелофиброз, забрюшинный фиброз, нефрогенный системный фиброз, рубцевание после хирургического вмешательства, астма, гломерулонефрит, мультифокальный фибросклероз, диабетическая нефропатия, ревматоидный артрит, атеросклероз, фиброз, вызванный радиацией, фиброз, вызванный химиотерапией, системный склероз, гепатит и синдром

20 Шегрена.

В одном из вариантов осуществления заболевание или расстройство, связанное с фиброзом, включает, помимо прочего, фиброз сердца. В одном варианте осуществления фиброз сердца возникает в результате повреждения сердца. Например, в одном

25 варианте осуществления фиброз сердца возникает в результате повреждения, включающего, помимо прочего, инфаркт миокарда, стеноз аорты, рестриктивную кардиомиопатию, системную и легочную гипертензию или карциноидное заболевание сердца. В одном варианте осуществления интерстициальные заболевания легких включают, помимо прочего, идиопатический фиброз легких, интерстициальный фиброз легких, пневмокониоз работников угольной промышленности, асбестоз, острое

30 повреждение легких и ОРДС. В одном варианте осуществления заболевания и нарушения заживления ран включают, помимо прочего, гипертрофические рубцы, келоидные рубцы.

В одном варианте осуществления фиброз включает образование или распространение избыточной фиброзной соединительной ткани в органе или ткани в

35 качестве репаративного или реактивного процесса, в отличие от образования фиброзной ткани как нормальной составляющей органа или ткани. Кожа и легкие подвержены фиброзу.

В некоторых случаях фиброзные заболевания характеризуются активацией фибробластов, повышенной продукцией коллагена и фибронектина и трансдифференцировкой в сократительные миофибробласты. Этот процесс обычно происходит в течение многих месяцев и лет и может привести к дисфункции органов или к смерти. Заболевания и расстройства, связанные с фиброзом, представляют собой одну из крупнейших групп заболеваний, для которых не существует эффективной терапии, и, следовательно, они представляют собой серьезную неудовлетворенную медицинскую потребность. Зачастую единственным выходом для пациентов с фиброзом является трансплантация органов; поскольку уровень поставок органов является недостаточным для удовлетворения спроса, пациенты часто умирают, ожидая получения подходящих органов. Фиброз легких как таковой может быть основной причиной смерти при склеродермии, заболеваниях легких, идиопатическом фиброзе легких, фиброзе легких, вызванном лучевой и химиотерапией, а также в условиях, вызванных вдыханием частиц пыли на рабочем месте.

Изобретение можно применять на практике у любого субъекта, у которого диагностирован фиброз или имеется риск его развития. Фиброз ассоциирован со многими заболеваниями и расстройствами. У субъекта может быть диагностировано или может иметься риск развития интерстициального заболевания легких, включая идиопатический фиброз легких, склеродермию, фиброз легких, вызванный облучением, блеомициновое поражение легких, саркоидоз, силикоз, семейный фиброз легких, аутоиммунное заболевание или любое расстройство, при котором происходит одно или более из следующего: отложение молекул фибропролиферативного матрикса, усиленное накопление патологического коллагена, апоптоз и разрыв альвеолярной перегородки с образованием «пчелиных сот». У субъекта может быть выявлен фиброз или риск развития фиброза из-за воздействия асбеста, молотого камня, кремнезема и металлической пыли, из-за приема лекарств, таких как блеомицин, бусульфон, феитоин и нитрофурантоин, которые являются факторами риска развития фиброза или из-за радиации, например, у пациентов с раком головы и шеи, у которых развивается фиброз слюнных желез. Также предполагается, что композиции и способы по изобретению можно использовать при лечении фиброза органов, обусловленного аллогенной трансплантацией органов, например, фиброза трансплантата. Неограничивающие примеры включают фиброз трансплантата почки, фиброз трансплантата сердца, фиброз трансплантата печени и т.д.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются для лечения множества фиброзных или связанных с фиброзом заболеваний или расстройств, основные причины которых включают инфаркт миокарда, цирроз печени, гепатит и т.д.

Изобретение можно применять на практике у любого субъекта, у которого диагностирована склеродермия или имеется риск ее развития. Склеродермия представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся фиброзом (или затвердеванием), сосудистыми изменениями и образованием аутоантител. Выделяют две основные формы: ограниченную системную склеродермию и диффузную системную склеродермию. Кожные симптомы ограниченной системной склеродермии поражают руки, кист рук и лицо. У пациентов с данной формой склеродермии часто имеется одно или несколько из следующих осложнений: кальциноз, феномен Рейно, дисфункция пищевода, склеродактиль, фиброз внутренних органов и телеангиэктазии.

Диффузная системная склеродермия быстро прогрессирует и поражает большую площадь кожи и один или несколько внутренних органов, чаще всего почки, пищевод, сердце и/или легкие. Локализованная склеродермия, такая как линейная склеродермия и морфеа, поражает кожу, но не внутренние органы.

Склеродермия поражает мелкие кровеносные сосуды, известные как артериолы, во всех органах. Сначала эндотелиальные клетки артериол отмирают через апоптоз вместе с гладкомышечными клетками. Эти клетки заменяются коллагеном и другим волокнистым материалом. Воспалительные клетки, особенно Т-хелперы CD4+, проникают в артериолы и вызывают дальнейшее повреждение.

Кожные проявления склеродермии могут быть болезненными, могут негативно отражаться на использовании пораженного участка (например, использование рук, пальцев рук, ног, ступней и т. д.) и могут обезображивать. Может возникнуть изъязвление кожи, и такие язвы могут быть подвержены инфекции или даже гангрене. Кожа с изъязвлениями может с трудом или медленно заживать. Трудности заживления кожных изъязвлений могут особенно усугубляться у пациентов с нарушением кровообращения, например, с феноменом Рейно. Поражение легких является основной причиной смерти больных склеродермией, характеризующейся высокой заболеваемостью и смертностью. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению используются для лечения склеродермии, например, кожных симптомов склеродермии. В некоторых вариантах осуществления лечение склеродермии включает лечение кожных изъязвлений, таких как язвы на пальцах. Введение С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, по настоящему изобретению можно использовать для ослабления фиброзных и/или воспалительных симптомов склеродермии в пораженных тканях и/или органах.

Помимо кожных симптомов/проявлений, склеродермия может также поражать сердце, почки, легкие, суставы и пищеварительный тракт. В некоторых вариантах осуществления лечение склеродермии включает лечение симптомов заболевания в

любой одной или нескольких из указанных тканей, например, путем уменьшения фиброзных и/или воспалительных симптомов.

Проблемы с легкими являются одними из наиболее серьезных осложнений склеродермии и являются причиной большей части смертей, связанных с данным заболеванием. Двумя преобладающими легочными состояниями, связанными со склеродермией, являются легочный фиброз и легочная гипертензия. Пациент с поражением легких может иметь одно или оба состояния. Легочный фиброз, связанный со склеродермией, представляет собой один из примеров легочного фиброза, который можно лечить с помощью пептидов по изобретению.

Склеродермия, поражающая легкие, вызывает рубцевание (легочный фиброз). Такой легочный фиброз встречается примерно у 70% пациентов со склеродермией, хотя его прогрессирование, как правило, медленное, а симптомы сильно варьируются по тяжести у разных пациентов. У пациентов, у которых есть симптомы, связанные с легочным фиброзом, данные симптомы включают сухой кашель, одышку и снижение способности двигаться. Примерно у 16% пациентов с той или иной степенью легочного фиброза развивается тяжелый легочный фиброз. У пациентов с тяжелым легочным фиброзом наблюдается значительное ухудшение функции легких и альвеолит.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают применение пептидов по настоящему изобретению для лечения склеродермии, например, легочного фиброза, ассоциированного со склеродермией. Введение пептидов по изобретению можно применять для уменьшения фиброзных симптомов склеродермии в легких. Например, способы можно применять для улучшения функции легких и/или для снижения риска смерти из-за склеродермии. Например, С-концевой эндостатин или происходящий из эндостатина пептид по настоящему изобретению можно применять для лечения интерстициального заболевания легких, ассоциированного со склеродермией.

Поражение почек также часто встречается у больных склеродермией. Фиброз почек, ассоциированный со склеродермией, представляет собой пример фиброза почек, который можно лечить введением С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления для лечения склеродермии, например, фиброза почек, ассоциированного со склеродермией, используются способы по настоящему изобретению. Введение С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина по изобретению, может быть использовано для уменьшения фиброзных симптомов склеродермии в почках. Например, эти методы можно применять для улучшения функции почек, снижения содержания белка в моче, снижения артериальной гипертензии и/или снижения риска почечного криза, который может привести к смертельной почечной недостаточности.

В одном варианте осуществления способ включает уменьшение фиброза в клетке или субъекте путем введения композиции, содержащей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления данный способ включает восстановление или деградацию белка внеклеточного матрикса в клетке или субъекте путем введения композиции, содержащей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как описано в настоящем документе.

Способы лечения острого повреждения легких

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения острого повреждения легких, включающий введение субъекту композиции, содержащей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления острое повреждение легких включает, помимо прочего, острое повреждение легких, вызванное вирусом ОРДС, тяжёлый острый респираторный синдром (ТОРС), COVID-19, острое повреждение легких, вызванное гриппом, острое повреждение легких вследствие сепсиса, пневмонии, аспирации, травмы, переливания крови, дыма, панкреатита от вдыхания токсичных газов, передозировки лекарствами, ожогов и других повреждений легких или острых респираторных дистресс-синдромов, включая ассоциированное с ИВЛ повреждение легких, проявляющееся воспалением.

Острое повреждение легких связано с повышенным уровнем IL-6 в легочной ткани, что способствует развитию цитокинового шторма. Введение пептидов по изобретению может применяться для уменьшения вызванных цитокинами симптомов острого повреждения легких. Например, эти способы можно применять для улучшения функции легких и/или снижения риска смерти из-за острого повреждения легких. Например, С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, по изобретению можно применять для лечения повышенных уровней IL-6 в легочной ткани, ассоциированных с цитокиновым штормом и повреждением легких. В одном варианте осуществления способ включает снижение уровней IL-6 в клетке или субъекте путем введения композиции, содержащей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как описано в настоящем документе.

Введение

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение эффективного количества композиции, описанной в настоящем документе, субъекту, у которого диагностировано или подозревается наличие или риск развития рака, состояние, ассоциированное с ростом опухоли, фиброз, заболевание или расстройство, ассоциированное с фиброзом, или острое повреждение легких. В некоторых аспектах композицию приводят в контакт с клеткой или тканью, в которой присутствует или существует риск развития опухоли, фиброза или острого повреждения легких. В одном варианте композиция вводится субъекту систематически.

Композиция по изобретению может быть введена пациенту или субъекту, нуждающемуся в этом, самыми разными способами. Способы введения включают пероральное введение, ингаляционное, интраоперационно-внутривенное, внутрисосудистое, внутримышечное, подкожное, внутримозговое, внутрибрюшинное, инъекционное введение в мягкие ткани, введение хирургическим путем, введение артроскопическим путем и чрескожное введение, например, прямую инъекцию, канюляцию или катетеризацию. Любое введение может представлять собой однократное применение композиции по изобретению или несколько применений. Введение может осуществляться в один участок или в более чем один участок у индивидуума, подлежащего лечению. Множественные введения могут происходить по существу одновременно или разделены во времени.

В некоторых вариантах осуществления композицию по изобретению вводят во время хирургической резекции или уменьшения объема опухоли или пораженной ткани (например, фиброзной ткани). Например, субъектам, подвергающимся хирургическому лечению пораженной ткани или опухоли, композицию можно вводить в указанное место для дальнейшего лечения опухоли, фиброза, острого повреждения легких или их комбинации.

В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту каркаса, содержащего С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или клетки, модифицированной для экспрессии С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина.

Субъекты, которым предполагается введение композиций и фармацевтических композиций по изобретению, включают, помимо прочего, людей и других приматов, млекопитающих, включая коммерчески значимых млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, и собаки.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, подходящим для лечения (или предупреждения) заболевания. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние субъекта, а также тип и тяжесть заболевания субъекта, хотя подходящие дозы могут быть определены путем клинических испытаний.

Когда указано «терапевтическое количество», точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащих введению, может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, типе заболевания, степени заболевания и состоянии пациента (субъекта).

5 Введение рассматриваемых композиций можно осуществлять любым удобным способом, включая ингаляцию, инъекцию, проглатывание, переливание, имплантацию или трансплантацию. Описанные в данном документе композиции можно вводить пациенту перорально, подкожно, внутривожно, внутриопухолево, интранодально (внутри узла),
10 интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно (в/в) или внутрибрюшинно. В одном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению вводят пациенту путем внутривожной или подкожной инъекции. В другом варианте осуществления композиции по настоящему изобретению предпочтительно вводят путем внутривенной (в/в) инъекции.

Раскрытые соединения могут применяться для предупреждения, ослабления, минимизации, контроля и/или уменьшения пролиферации или метастазирования опухоли
15 у людей и животных. Раскрытые соединения также могут применяться для замедления темпов роста первичной опухоли. Раскрытые соединения при введении субъекту, нуждающемуся в лечении, могут быть применяться остановки распространения раковых клеток. Как таковые соединения, раскрытые в настоящем документе, можно вводить в составе комбинированной терапии с одним или несколькими лекарственными средствами
20 или другими фармацевтическими агентами. При использовании в составе комбинированной терапии снижение уровня метастазирования или уменьшение роста первичной опухоли, обеспечиваемое раскрытыми соединениями, позволяет более эффективно и действенно применять любую фармацевтическую или лекарственную терапию, используемую для лечения пациента. Кроме того, контроль метастазирования с
25 помощью раскрытых соединений дает субъекту большую возможность сконцентрировать заболевание в одном месте.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения роста или метастазирования рака, включающий лечение субъекта с помощью дополнительной терапии рака, такой как хирургическое
30 вмешательство, химиотерапия, химиотерапевтическое средство, лучевая терапия или гормональная терапия, или их комбинация до, одновременно или после лечения С-концевым эндостатином или пептидом, происходящим из эндостатина, или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина.

35 Химиотерапевтические средства включают цитотоксические агенты (например, 5-фторурацил, цисплатин, карбоплатин, метотрексат, даунорубин, доксорубин, винкристин, винбластин, оксорубин, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), цитарабин USP, циклофосфамид, эстрамуцинфосфат натрия, альтретамин, гидроксимочевина,

ифосфамид, прокарбазин, митомицин, бусульфан, циклофосфамид, митоксантрон, карбоплатин, цисплатин, интерферон альфа-2а рекомбинантный, паклитаксел, тенипозид и стрептозоцин), цитотоксические алкилирующие агенты (например, бусульфан, хлорамбуцил, циклофосфамид, мелфалан или этилсульфоновая кислота), алкилирующие агенты (например, азалей, AZQ, BCNU, бусульфан, бисульфан, карбоксифталатоплатина, CBDCA, CCNU, CNIP, хлорамбуцил, хлорзотоцин, цис-платина, кломезон, цианоморфолинодоксорубицин, циклодизон, циклофосфамид, диангидрогалактитол, фтордопан, гепсульфам, гикантон, ифосфамид, мелфалан, метил CCNU, митомицин С, митозоламид, азотистый иприт, PCNU, пиперазин, пиперазиндион, пипоброман, порфирамицин, спирогидантоин иприт, стрептозотоцин, тероксирон, тетраплатин, тиотепа, триэтиленмеламин, урациловый азотистый иприт и Yoshi-864), антимитотические агенты (например, аллоколхицин, галихондрин М, колхицин, производные колхицина, доластатин 10, майтанзин, ризоксин, производные паклитаксела, паклитаксел, тиоколхицин, тритилцистеин, винбластин сульфат и винкристина сульфат), растительные алкалоиды (например, актиномицин D, блеомицин, L-аспарагиназа, идарубицин, винбластин сульфат, винкристина сульфат, митрамицин, митомицин, даунорубицин, VP-16-213, VM-26, навелбин и таксотер) биологические препараты (например, альфа-интерферон, БЦЖ, Г-КСФ, ГМ-КСФ и интерлейкин-2), ингибиторы топоизомеразы I (например, камптотецин, производные камптотецина и морфолинодоксорубицин), ингибиторы топоизомеразы II (например, митоксантрон, амонафид, м-AMCA, производные антрапиразола, пиразолоакридин, бисантрен HCL, даунорубицин, дезоксидоксорубицин, меногарил, N,N-добензилдауномицин, оксантразол, рубидазон, VM-26 и VP-16) и синтетические вещества (например, гидроксимочевина, прокарбазин, о,р'-DDD, дакарбазин, CCNU, BCNU, цис-диаминдихлорплатин, митоксантрон, CBDCA, левамизол, гексаметилмеламин, полностью транс-ретиноевая кислота, глиадель и порфирин натрия).

Антипролиферативные агенты представляют собой соединения, которые уменьшают пролиферацию клеток. Антипролиферативные агенты включают алкилирующие агенты, антиметаболиты, ферменты, модификаторы биологического ответа, различные агенты, гормоны и антагонисты, ингибиторы андрогенов (например, флутамид и ацетат лейпролида), антиэстрогены (например, цитрат тамоксифена и его аналоги, торемифен, дролоксифен и ролоксифен). Дополнительные примеры конкретных антипролиферативных агентов включают, помимо прочего, левамизол, нитрат галлия, гранисетрон, сарграмостим, хлорид стронция-89, филграстим, пилокарпин, дексразоксан и ондансетрон.

Эндостатиновые пептиды или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эндостатиновые пептиды, по изобретению, можно вводить отдельно или в комбинации с другими противоопухолевыми агентами, включая цитотоксические/antineoplastические

агенты и антиангиогенные агенты. Цитотоксические/ антинеопластические агенты определяются как агенты, которые атакуют и уничтожают раковые клетки. Некоторые цитотоксические/ антинеопластические агенты являются алкилирующими агентами, которые алкилируют генетический материал в опухолевых клетках, например, цисплатин, циклофосфамид, азотистый иприт, триметилтиофосфорамид, кармустин, бусульфан, хлорамбуцил, белюстин, урациловый иприт, хлорафазин и дакабазин.

Другие цитотоксические/антинеопластические агенты представляют собой антиметаболиты для опухолевых клеток, например, цитозинарабинозид, фторурацил, метотрексат, меркаптопуирин, азатиоприм и прокарбазин. Другие цитотоксические/антинеопластические агенты представляют собой антибиотики, например, доксорубицин, блеомицин, дактиномицин, даунорубицин, митрамицин, митомицин, митомицин С и дауномицин. Существует множество липосомальных препаратов, коммерчески доступных для данных соединений. Другие цитотоксические/антинеопластические агенты представляют собой ингибиторы митоза (алкалоиды барвинка). К ним относятся винкристин, винбластин и этопозид. Прочие цитотоксические/ антинеопластические агенты включают таксол и его производные, L-аспарагиназу, противоопухолевые антитела, дакарбазин, азацитидин, амсакрин, мелфалан, VM-26, ифосфамид, митоксантрон и виндезин.

Антиангиогенные агенты хорошо известны специалистам в данной области. Подходящие антиангиогенные агенты для использования в способах и композициях по настоящему изобретению включают антитела против VEGF, включая гуманизированные и химерные антитела, аптамеры против VEGF и антисмысловые олигонуклеотиды. Другие известные ингибиторы ангиогенеза включают ангиостатин, эндостатин, интерфероны, интерлейкин 1 (включая альфа и бета), интерлейкин 12, ретиноевую кислоту и тканевые ингибиторы металлопротеиназы-1 и -2 (ТИМП-1 и -2). Также можно использовать малые молекулы, включая топоизомеразы, такие как разоксан, ингибитор топоизомеразы II с антиангиогенной активностью.

Другие противораковые средства, которые могут применяться в комбинации с раскрытыми соединениями, включают, среди прочего: ацивицин; акларубицин; акодازола гидрохлорид; акронин; адозелезин; альдеслейкин; альтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; аминоклутетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; асперлин; азацитидин; азетеп; азотомицин; батимастат; бензодепа; бикалутамид; бисантрена гидрохлорид; биснафида димезилат; бизелезин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфан; кактиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустин; карубицина гидрохлорид; карцелезин; цедефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; кринатола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; дексормаплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазиквон; доцетаксел; доксорубицин;

доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромастанолон пропионат; дуазомицин; эдатрексат; эфлорнитина гидрохлорид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромат; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эзорубицина гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустина натрия фосфат; этанидазол; этопозид;

5 этопозида фосфат; этоприн; фадрозола гидрохлорид; фазарабин; фенретинид; флоксуридин; флударабина фосфат; фторурацил; фторцитабин; фоскидон; фостриецин натрия; гемцитабин; гемцитабина гидрохлорид; гидроксимочевина; идарубицина гидрохлорид; ифосфамид; илмофозин; интерлейкин II (включая рекомбинантный

10 интерлейкин II или rIL2), интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n1; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма-1 b; ипроплатин; иринотекана гидрохлорид; ланреотида ацетат; летрозол; лейпролида ацетат; лиарозола гидрохлорид; лометрексол натрия; ломустин; лосоксантрона гидрохлорид; масопрокол;

15 майтанзин; мехлорэтамина гидрохлорид; мегестрола ацетат; меленгестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуредепа; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомальцин; митомицин; митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофеноловая кислота;

20 нокодазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; паклитаксел; пегаспаргаза; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфат; пироксантрона гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфимер натрия; порфиروмицин; преднимустин; прокарбазина гидрохлорид; пуромицин; пуромицина гидрохлорид;

25 пиразофурин; рибоприн; роглетимид; сафингол; сафингола гидрохлорид; семустин; симтразен; спарфосат натрия; спарсомицин; спирогермания гидрохлорид; спирумустин; спироплатин; стрептонигрин; стрептозоцин; сулофенур; талисомицин; текогалан натрия; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон;

30 тиамиприн; тиогуанин; тиотепа; тиазофурин; тирапазамин; цитрат торемифена; трестолон ацетат; трицирибина фосфат; триметрексат; триметрексат глюкуронат; трипторелин; тубулозола гидрохлорид; урациловый иприт; уредепа; вапреотид; вертепорфин; винбластина сульфат; винкристина сульфат; виндезин; виндезина сульфат;

35 винопидина сульфат; винглицината сульфат; винлейрозина сульфат; винорелбина тартрат; винрозидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностатин; зорубицина гидрохлорид. Другие противораковые лекарственные средства включают, помимо прочего: 20-эпи-1,25 дигидроксивитамин D3; 5-этинилурацил; абиратерон;

акларубицин; ацилфульвен; адеципенол; адозелезин; альдеслейкин; антагонисты ALL-ТК; альтретамин; амбамустин; амидокс; амифостин; аминоклевулиновая кислота; амрубицин;

амсакрин; анагрелид; анастрозол; андрографолид; ингибиторы ангиогенеза; антагонист D; антагонист G; антареликс; анти-дорсализующий морфогенетический белок-1; антиандроген, карцинома предстательной железы; антиэстроген; антинеопластон;

антисмысловые олигонуклеотиды; глицинат афидиколина; модуляторы генов апоптоза;

регуляторы апоптоза; апуриновая кислота; ара-CDP-DL-PTBA; аргининдезаминаза; асулакрин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азасетрон; азатоксин; азатирозин; производные баккатина III; баланол; батимастат; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроспорин; производные бета-лактамов; бета-алетин; бетакламицин В; бетулиновая кислота; ингибитор bFGF; бикалутамид; бисантрен; бисазиридирилспермин; биснафид; бистратен А; бизелезин; брефлат; бропиримин; будотитан; бутионинсульфоксимин; кальципотриол; кальфостин С; производные камптотецина; IL-2 канарипокса; капецитабин; карбоксамид-аминотриазол; карбоксиамидотриазол; CaRest M3; CARN 700; ингибитор хрящевого происхождения; карцелезин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин В; цетрореликс; хлорины; хлорхиноксалинсульфонамид; цикапрост; цис-порфирин; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллизмицин А; коллизмицин В; комбретастатин А4; аналог комбретастатина; конагенин; крамбесцидин 816; криснатол; криптофицин 8; производные криптофицина А; курацин А; циклопентантрахиноны; циклоплатам; ципемидин; цитарабин окфосфат; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин; дегидродидемнин В; дезлорелин; дексаметазон; дексифосфамид; дексразоксан; дексверапамил; диазиквон; дидемнин В; дидокс; диэтилнорспермин; дигидро-5-азацитидин; 9-дигидротаксол; диоксамидин; дифенилспиромустин; доцетаксел; докозанол; доласетрон; доксифлуридин; дролоксифен; дронабинол; дуокармицин SA; эбселен; экомустин; эдельфозин; эдреколомаб; эфлорнитин; элемен; эмитефур; эпирубицин; эпистерид; аналог эстрамустина; агонисты эстрогена; антагонисты эстрогена; этанидазол; этопозида фосфат; эксеместан; фадрозол; фазарабин; фенретинид; филграстим; финастерид; флавопиридол; флезеластин; флуастерон; флударабин; фтордауноруцина гидрохлорид; форфенимекс; форместан; фостриецин; фотемустин; гадолиний тексафирин; нитрат галлия; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; херегулин; гексаметиленбисацетамид; гиперидин; ибандроновая кислота; идарубицин; идоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; имидазоакридоны; имиквимод; иммуностимулирующие пептиды; ингибитор рецептора инсулиноподобного фактора роста-1; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; иобенгуан; йододоксорубицин; 4-ипомеанол; ироплакт; ирсогладин; изобенгазол; изогомогаликондрин В; итазетрон; ясплакинолид; кахалалид F; ламеллярина-N триацетат; ланреотид; лейнамицин; ленограстим; лентинана сульфат; лептолстатин; летрозол; лейкемия-ингибирующий фактор; лейкоцитарный альфа-интерферон; лейпролид+эстроген+прогестерон; лейпрорелин; левамизол; лиарозол; аналог линейного полиамина; липофильный дисахаридный пептид; липофильные соединения платины; лиссоклинамид 7; лобаплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лосоксантрон; ловастатин; локсорибин; луртотекан; лютеций тексафирин; лизофиллин; литические

пептиды; майтансин; манностагин А; маримастат; масопротол; маспин; ингибиторы матрилизина; ингибиторы матриксных металлопротеиназ; меногарил; мербарон; метерелин; метионидаза; метоклопрамид; фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF); мифепристон; милтефозин; миримостим; двухцепочечная РНК с ошибочно спаренными основаниями; митогуазон; митолактол; аналоги митомицина; митонафид; митотоксиновый фактор роста фибробластов-сапорин; митоксантрон; мофаротен; молграмостим; моноклональное антитело, хорионический гонадотропин человека; монофосфориллипид А+ск клеточной стенки микобактерии; мопидамол; ингибитор гена множественной лекарственной устойчивости; терапия на основе множественных онкосупрессоров 1; противораковое средство на основе иприта; микапероксид В; экстракт клеточной стенки микобактерий; мирапорон; N-ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпин; нартограстим; недаплатин; неморубицин; неридроновая кислота; нейтральная эндопептидаза; нилутамид; низамицин; модуляторы оксида азота; нитроксидный антиоксидант; нитруллин; Об-бензилгуанин; октреотид; оксиценон; олигонуклеотиды; онапристон; ондансетрон; ондансетрон; орацин; пероральный индуктор цитокинов; ормаплатин; осатерон; оксалиплатин; оксауномицин; паклитаксел; аналоги паклитаксела; производные паклитаксела; палауамин; пальмитоилризоксин; памидроновая кислота; панакситриол; паномифен; парабактин; пазеллиптин; пегаспаргаза; пельдезин; пентозанполисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатазы; пицибанил; пилокарпина гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; платин В; ингибитор активатора плазминогена; платиновый комплекс; соединения платины; платино-триаминовый комплекс; порфимер натрия; порфирамицин; преднизолон; пропил-бис-акридон; простагландин J2; ингибиторы протеасом; иммуномодулятор на основе белка А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С, микроводоросли; ингибиторы протеинтирозинфосфатазы; ингибиторы пуриннуклеозидфосфорилазы; пурпурины; пиразолоакридин; конъюгат пиридокселированного гемоглобина и полиоксиэтилена; антагонисты *raf*; ралтитрексед; рамосетрон; ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы *ras*; ингибиторы *ras*; ингибитор *ras*-GAP; ретеллиптин деметилированный; этидронат рения Re 186; ризоксин; рибозимы; ретинамид RII; роглетимид; рохитукин; ромуртид; роквинимекс; рубигинон В1; рубоксил; сафингол; сентопен; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; миметики Sdi 1; семустин; ингибитор 1, происходящий из стареющих клеток; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы сигнальной трансдукции; модуляторы сигнальной трансдукции; одноцепочечный антигенсвязывающий белок; сизофуран; собузоксан; борокапнат натрия; фенилацетат натрия; сольверол; соматомедин-связывающий белок; сонермин; спарфосовая кислота; спикамицин D; спирумустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; ингибитор стволовых клеток; ингибиторы

деления стволовых клеток; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; сверхактивный антагонист вазоактивного кишечного пептида; сурадиста; сурамин; свайнсонин; синтетические гликозаминогликаны; таллимустин; тамоксифен метидид; тауромустин; тазаротен; текогалан натрия; тегафур; теллурапирилий; ингибиторы

5 теломеразы; темопорфин;

темозоломид; тенипозид; тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиокоралин; тромбозетин; миметик тромбозетина; тималфазин; агонист рецептора тимозетина; тимотринан; тиреотропный гормон; олова этилэтиопурпурин; тирапазамин; титаноцена бихлорид; топсентин; торемифен; фактор тотипотентных стволовых клеток;

10 ингибиторы трансляции; третиноин; триацетилюридин; трицирибин; триметрексат; трипторелин; трописетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназы; тирфостины; ингибиторы UBC; убенимекс; ингибирующий рост фактор, происходящий из урогенитального синуса; антагонисты рецепторов урокиназы; вапреотид; вариолин В; векторная система, эритроцитарная генная терапия; веларезол; верамин; вердинс;

15 вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб; и циностаин стималамер. В одном варианте осуществления противораковое лекарственное средство представляет собой 5-фторурацил, таксол или лейковорин.

В некоторых вариантах осуществления способы лечения фиброза или связанных с

20 фиброзом заболеваний или расстройств включают введение С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как часть терапевтической схемы наряду с одним или несколькими другими лекарственными средствами, биологическими препаратами или терапевтическими вмешательствами,

25 подходящими для лечения фиброза. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное, биологическое или терапевтическое вмешательство подходит для конкретных симптомов, связанных с фиброзом. Например, С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина по изобретению, может быть введен как часть терапевтической схемы вместе с одним или несколькими

30 иммуносупрессивными агентами, такими как метотрексат, циклофосфамид, азатиоприн, пирфенидон, нинтеданиб и микофенолат мофетил. В качестве дополнительного примера, С-концевой эндостатин или происходящий из эндостатина пептид по изобретению можно вводить как часть терапевтической схемы вместе с одним или несколькими агентами,

35 предназначенными для усиления кровотока, например, притока крови к пальцам с изъязвлениями (например, нифедипин, амлодипин, дилтиазем, фелодипин или никардипин). В качестве еще одного примера С-концевой эндостатин или происходящий из эндостатина пептид по изобретению можно вводить как часть терапевтической схемы вместе с одним или несколькими агентами, предназначенными для уменьшения фиброза

кожи, такими как d-пеницилламин, колхицин, ПУВА, релаксин и циклоспорин. В качестве еще одного примера С-концевой эндостатин или происходящий из эндостатина пептид по изобретению может можно вводить как часть терапевтической схемы вместе со стероидными средствами или бронхолитиками.

5 В некоторых вариантах осуществления способы лечения острого повреждения легких включают введение С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, как часть терапевтической схемы наряду с одним или несколькими другими лекарственными средствами, биологическими
10 препаратами или терапевтическими вмешательствами, подходящими для лечения острого повреждения легких. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство, биологический препарат или терапевтическое вмешательство подходит для конкретных симптомов, связанных с острым повреждением легких. Лечение острого повреждения легких ограничено и включает в себя положение лёжа на животе,
15 вентиляцию легких, ингаляционные вазодилататоры, такие как эпопростенол или оксид азота, ЭКМО, нервно-мышечные блокаторы для облегчения защитной вентиляции легких и стероиды.

Изобретение включает введение С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей С-
20 концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, для лечения или профилактики заболеваний и расстройств. Для того, чтобы осуществлять на практике способы по настоящему изобретения, специалист в данной области, основываясь на раскрытии, представленном в настоящем документе, поймет, как приготовить и ввести соответствующую композицию по изобретению субъекту. Настоящее изобретение не
25 ограничено каким-либо конкретным способом введения или схемой лечения.

В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, каркаса, содержащего С-
концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина, или клетки, модифицированной для экспрессии С-концевого эндостатина или пептида,
30 происходящего из эндостатина.

Дозирование и приготовление составов (фармацевтических композиций)

В соответствии с настоящим изобретением предложено лечение заболевания или расстройства, например рака, фиброза, заболевания или расстройства, связанного с
35 фиброзом, острого повреждения легких и т.п., у млекопитающего путем введения терапевтического агента, например С-концевого эндостатина или пептида, происходящего из эндостатина, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей С-концевой эндостатин или пептид, происходящий из эндостатина.

Введение терапевтического агента в соответствии с настоящим изобретением может быть непрерывным или прерывистым, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, является ли введение терапевтическим или профилактическим, а также от других факторов, известных практикующим специалистам.

5 Введение агентов по изобретению может быть по существу непрерывным в течение заданного периода времени или может осуществляться серией отдельных доз. Предполагается как местное, так и системное введение. Вводимое количество будет варьироваться в зависимости от различных факторов, включая, среди прочего, выбранную композицию, конкретное заболевание, массу тела, физическое состояние и
10 возраст млекопитающего, а также от того, что необходимо обеспечить: профилактику или лечение. Такие факторы могут быть легко определены клиницистом, использующим модели на животных или другие тест-системы, хорошо известные в данной области техники.

Одна или несколько подходящих стандартных лекарственных форм, содержащих
15 терапевтический(ие) агент(ы) по изобретению, которые, как обсуждается ниже, необязательно могут быть приготовлены для замедленного высвобождения (например, с использованием микрокапсулирования, см. WO 94/07529 и патент США № 4962091, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки), можно вводить в пораженную ткань различными путями, включая парентеральный, в том числе
20 внутривенный, внутрибрюшинный, ингаляционный и внутримышечный пути, а также путем прямой инъекции. Например, терапевтический агент или модифицированная клетка могут быть инъецированы непосредственно в опухоль. При необходимости препараты могут быть в целях удобства представлены в лекарственных формах, состоящих из дискретных единиц, и могут быть приготовлены любым из способов, хорошо известных в
25 фармацевтике. Такие способы могут включать стадию объединения терапевтического агента с жидкими носителями, твердыми матрицами, полутвердыми носителями, тонкоизмельченными твердыми носителями или их комбинациями, а затем, при необходимости, введение или придание формы продукту в требуемую систему доставки.

В различных вариантах осуществления фармацевтические композиции, полезные
30 в способах по настоящему изобретению, можно вводить, например, системно, парентерально или местным путем, например, в виде пероральных препаратов, ингаляционных препаратов, включая твердые или аэрозольные, а также препаратами для местного или другого аналогичного применения. Помимо самой соответствующей терапевтической композиции, такие фармацевтические композиции могут содержать
35 фармацевтически приемлемые носители и другие ингредиенты, которые, как известно, усиливают и облегчают введение лекарственного средства. Другие возможные препараты, такие как наночастицы, липосомы, запечатанные эритроциты-носители и

иммунологические системы, также могут быть использованы для введения соответствующего модулятора согласно способам по изобретению.

Когда терапевтические агенты по изобретению готовят для введения, их предпочтительно комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем для получения фармацевтического препарата или стандартной лекарственной формы. Общее количество активных ингредиентов в таких препаратах включает от 0,1 до 99,9 масс.% препарата. «Фармацевтически приемлемый» представляет собой носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и/или соль, которые совместимы с другими ингредиентами препарата и не наносят вред их реципиенту. Активный ингредиент для введения может присутствовать в виде порошка или гранул; в виде раствора, суспензии или эмульсии.

Фармацевтические препараты, содержащие терапевтические агенты по изобретению, могут быть приготовлены способами, известными в данной области техники, с использованием хорошо известных и легкодоступных ингредиентов. Терапевтические агенты по изобретению также могут быть приготовлены в виде растворов, подходящих для парентерального введения, например, внутримышечным, подкожным или внутривенным путем.

Фармацевтические композиции терапевтических средств по изобретению также могут иметь форму водного или безводного раствора или дисперсии или, альтернативно, форму эмульсии или суспензии.

Таким образом, терапевтический агент может быть приготовлен для парентерального введения (например, путем инъекции, например, болюсной инъекции или непрерывной инфузии) и может быть представлен в виде дозированной лекарственной формы в ампулах, предварительно заполненных шприцах, контейнерах для инфузии небольшого объема или в многодозовых контейнерах с добавлением консерванта. Активные ингредиенты могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В качестве альтернативы, активные ингредиенты могут быть в форме порошка, полученного путем асептического выделения стерильного твердого вещества или лиофилизации из раствора для разведения подходящим носителем, например, стерильной, апиrogenной водой, перед применением.

В некоторых вариантах осуществления композицию по изобретению вводят путем ингаляции. В некоторых вариантах осуществления изобретение удобно доставлять посредством инсуффлятора, небулайзера или упаковки под давлением или других удобных средств доставки аэрозольного распылителя. Упаковки под давлением могут содержать подходящий пропеллент, такой как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ. В случае аэрозоля

под давлением единицу дозирования можно определить путем установки клапана для подачи отмеренного количества. В некоторых вариантах осуществления изобретение может иметь форму сухой порошковой композиции, например, порошковой смеси соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

5 Порошковая композиция может быть представлена в дозированной лекарственной форме, например, в капсулах или картриджах или, например, в желатиновых или блистерных упаковках, из которых порошок можно вводить с помощью ингалятора или инсуффлятора. Порошкообразные или аэрозольные препараты при диспергировании предпочтительно имеют средний размер частиц или капель в диапазоне от примерно 0,1
10 нанометра до примерно 2000 микрометров и могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе.

Следует понимать, что единичное содержание активного ингредиента или ингредиентов, содержащихся в отдельной аэрозольной дозе каждой лекарственной формы, само по себе не обязательно должно составлять эффективное количество для
15 лечения конкретного показания или заболевания, поскольку необходимое эффективное количество может быть достигнуто путем введения множества дозированных единиц. Более того, эффективное количество может быть достигнуто при использовании дозы, меньшей дозы в дозированной лекарственной форме, либо отдельно, либо в виде серии введений.

20 Фармацевтические препараты по настоящему изобретению могут включать в качестве опциональных ингредиентов фармацевтически приемлемые носители, разбавители, солюбилизующие или эмульгирующие агенты и соли того типа, которые хорошо известны в данной области техники. Конкретные неограничивающие примеры носителей и/или разбавителей, которые можно использовать в фармацевтических
25 препаратах по настоящему изобретению, включают воду и физиологически приемлемые фосфатно-буферные солевые растворы, такие как фосфатно-буферные солевые растворы с pH 7,0-8,0.

Агенты по настоящему изобретению могут быть приготовлены и введены для лечения различных заболеваний любым способом, обеспечивающим контакт активного
30 ингредиента с местом действия агента в организме. Их можно вводить любыми общепринятыми способами, доступными для использования в сочетании с фармацевтическими препаратами, либо в виде отдельных терапевтически активных ингредиентов, либо в виде комбинации терапевтически активных ингредиентов. Их можно вводить отдельно, но обычно их вводят с фармацевтическим носителем, выбранным
35 исходя из выбранного пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Как правило, вода, подходящее масло, солевой раствор, водная декстроза (глюкоза) и родственные растворы сахаров и гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоли, являются подходящими носителями для парентеральных растворов.

Растворы для парентерального введения содержат действующее вещество, подходящие стабилизирующие агенты и, при необходимости, буферные вещества. Подходящими стабилизирующими агентами являются антиоксиданты, такие как бисульфат натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота, взятые по отдельности или в комбинации.

5 Также используются лимонная кислота и ее соли и этилендиаминтетрауксусная кислота натрия (ЭДТА). Кроме того, растворы для парентерального введения могут содержать консерванты, такие как хлорид бензалкония, метил- или пропилпарабен и хлорбутанол. Подходящие фармацевтические носители описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, являющимся стандартным справочным документом в данной области.

10 Активные ингредиенты по изобретению могут быть суспендированы в фармацевтически приемлемой композиции, подходящей для применения у млекопитающих и, в частности, у людей. Такие препараты включают использование адъювантов, таких как производные мурамилдипептида (MDP) или аналогов, которые описаны в патентах США № 4082735; 4082736; 4101536; 4185089; 4235771; и 4406890.

15 Другие полезные адъюванты включают квасцы (Pierce Chemical Co.), липид А, димиколат трегалозы и бромид диметилдиоктадециламмония (DDA), адъювант Фрейнда и IL 12. Другие компоненты могут включать блок-полимер полиоксипропилен-полиоксиэтилена (Pluronic®), неионное поверхностно-активное вещество и метаболизируемое масло, такое как сквален (патент США № 4606918).

20 Кроме того, для контроля продолжительности действия можно использовать стандартные фармацевтические способы. Они хорошо известны в данной области техники и включают препараты с контролируемым высвобождением и могут включать соответствующие макромолекулы, например, полимеры, полиэфиры, полиаминокислоты, поливинил, пиролитон, этиленвинилацетат, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу
25 или сульфат протамина. Концентрацию макромолекул, а также способы введения можно регулировать, чтобы контролировать высвобождение. Кроме того, агент может быть включен в частицы полимерных материалов, таких как полиэфиры, полиаминокислоты, гидрогели, сополимеры полимолочной кислоты или этиленвинилацетата. Помимо
30 включения, эти агенты также можно использовать для улавливания соединения в микрокапсулы.

Соответственно, для достижения конкретного эффекта фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена различными путями и в различные участки организма млекопитающего (см., например, Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1991a; Jaffe et al., 1991a; Jaffe et al., см. выше; Berkner, см. выше).
35 Специалист в данной области техники поймет, что, хотя для введения можно использовать более одного пути, конкретный путь может обеспечить более немедленную и более эффективную реакцию, чем другой путь. Местную или системную доставку можно осуществлять путем введения, включающего нанесение или инстилляцию препарата в

полость тела, ингаляцию или вдувание аэрозоля, пероральное введение или парентеральное введение, включающее внутримышечное, внутривенное, перитонеальное, подкожное, внутрикожное, а также местное введение.

Активные ингредиенты по настоящему изобретению могут быть предоставлены в лекарственной форме с однократной дозировкой, где каждая единица дозы, например, чайная ложка, таблетка, раствор или суппозиторий, содержит заданное количество композиции, отдельно или в соответствующей комбинации с другими активными агентами. Термин «лекарственная форма с однократной дозировкой», используемый в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве разовых дозировок для человека и млекопитающих, причем каждая единица содержит заданное количество композиций по настоящему изобретению, отдельно или в сочетании с другими активными агентами, рассчитанное в количестве, достаточное для достижения желаемого эффекта, в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем, где это необходимо. Лекарственных форм с однократной дозировкой по настоящему изобретению зависят от конкретного эффекта, которого необходимо достичь, и конкретной фармакодинамики, связанной с фармацевтической композицией у конкретного хозяина.

Эти способы, описанные в данном документе, ни в коем случае не являются всеобъемлющими, и рядовым специалистам в данной области будут очевидны дополнительные способы, подходящие для конкретного применения. Более того, эффективное количество композиций можно дополнительно определить по аналогии с соединениями, которые, как известно, оказывают желаемый эффект.

ПРИМЕРЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Настоящее изобретение будет далее подробно описано со ссылкой на следующие примеры экспериментов. Данные примеры представлены исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, настоящее изобретение никоим образом не следует истолковывать как ограничивающееся следующими примерами, а, скорее, его следует истолковывать как охватывающее любые и все вариации, которые становятся очевидными в результате идей, представленных в данном документе.

Без дальнейшего описания считается, что любой специалист в данной области техники может, используя предшествующее описание и следующие иллюстративные примеры, создать и использовать настоящее изобретение и реализовать на практике заявленные способы. Поэтому следующие рабочие примеры конкретным образом указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и не должны рассматриваться как каким-либо образом ограничивающие остальную часть описания.

Пример 1. Эндостатиновые пептиды для лечения опухолей

Оценивали способность эндостатиновых пептидов блокировать рост опухоли. Пептиды биотинилировали на N-конце и амидировали на C-конце.

- 5 Оцениваемые в экспериментах пептиды были следующими:
 Последовательность Bio96: Биотин-NH₂-ATGQASSLL-CONH₂ (SEQ ID NO:1),
 Последовательность BioE4-03: Биотин-NH₂-
 SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA-CONH₂ (SEQ ID NO:2), и
 Последовательность BioE4: Биотин-NH₂-
 10 SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT-CONH₂ (SEQ ID
 NO:3).

Статистические способы

- Для каждого из проводимых экспериментов описательные статистические данные
 15 (средние значения и стандартные отклонения) для объемов опухолей рассчитывали в динамике для каждой экспериментальной группы (т.е. эксперимент 1: контроль в сравнении с BioE4 (фиг. 1); эксперимент 2: PBS, Bio96 и BioE4-03) (фиг.5)). Поскольку рост опухоли имеет тенденцию быть нелинейным, были созданы общие линейные смешанные модели (GLMM) для оценки кривых роста во времени, специфичных для
 20 лечения, а также для сравнения между лечением пептидами и контролем. Для каждого эксперимента были построены отдельные GLMM, и каждая GLMM включала случайные эффекты для каждой мыши, чтобы контролировать тот факт, что повторные измерения объема у заданной мыши коррелируют друг с другом. Объем опухоли служил зависимой переменной в каждой модели, а время (в сутках), время², лечение, лечение x время и
 25 лечение x время² были включены в качестве независимых переменных. Используя данные модели, сравнивали расчетные средние значения объемов опухолей в конкретные выбранные моменты времени и среднюю скорость изменения объемов опухолей в конкретные выбранные моменты времени. Если опухоль мыши становилась слишком большой, ее умерщвляли; однако все объемы опухолей, измеренные до
 30 умерщвления, были включены в процесс моделирования. Для проведения всех анализов использовали SAS v9.4 (Институт SAS, Кэри, Северная Каролина). Все проверки гипотез были двусторонними, а значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты экспериментов приведены ниже.

35

Анализ влияния эндостатиновых пептидов на рост опухоли предстательной железы

Двум группам мышей C57BL6 дикого типа из Jax Labs инъецировали клетки опухоли предстательной железы мыши TRAMP C-2 в правый бок. Когда объем опухоли достиг примерно 150 мм^3 , начинали лечение. Лечение состояло в применении пептида (Bio E4), растворенного в воде, или воды в качестве контрольного носителя, введившихся
 5 два раза в неделю в объеме 100 мкл через желудочный зонд в дозе 50 мкг/дозу. Опухоли измеряли 3 раза в неделю.

Были проведены прямые сравнения между BioE4 и контролем в отношении средних объемов опухолей на 15-е сутки и средней скорости изменения объемов опухолей на 15-е сутки (фиг. 1-фиг. 3). Оценки, основанные на модели, представлены на
 10 фиг. 4. На 15-е сутки средний объем опухоли был значительно ($p = 0,0001$) больше в контрольной группе по сравнению с группой, получавшей BioE4, и средняя скорость увеличения объема на 15-е сутки также была значительно ($p=0,02$) выше в контрольной группе по сравнению с группой, получавшей BioE4.

15 Анализ влияния эндостатиновых пептидов на рост опухоли аденокарциномы толстой кишки

Трансгенным мышам, толерантным к sMIC (штамм MB481) (Liu et al., Нарушение периферического гомеостаза NK-клеток ускоряет метастазирование рака простаты. J. Clin. Invest. 123:4410, 2013) вводили 1×10^5 опухолевых клеток аденокарциномы толстой
 20 кишки mc-38 посредством подкожной инъекции. Когда размер опухоли достиг примерно 75 мм^3 , начинали лечение. Начать лечение в четвертой группе. Bio96 в дозе 100 мкг/мышь, BioE4-03 в дозе 100 мкг/мышь вводили через желудочный зонд в объеме 100 мкл. В качестве контрольного носителя использовали PBS (100 мкл). Пептиды и носитель вводили два раза в неделю. Объем опухоли измеряли 3 раза в неделю.

25 Были проведены прямые сравнения между контролем PBS и Bio96, а также между PBS и BioE4-03 в отношении средних объемов опухолей на 21-е сутки и в отношении средней скорости изменения объемов опухолей на 21-е сутки (фиг.5-фиг.7). Оценки, основанные на модели, представлены на фиг. 8. На 21-е сутки средний объем опухоли был значительно больше в контрольной группе PBS по сравнению с группой, получавшей
 30 Bio96 ($1492,1 \text{ мм}^3$ в сравнении с $871,4 \text{ мм}^3$, $p = 0,003$), и средний объем опухоли было значительно больше в контрольной группе PBS по сравнению с группой, получавшей BioE4-03 ($1492,1 \text{ мм}^3$ в сравнении с $767,7 \text{ мм}^3$, $p=0,0009$). На 21-е сутки средняя скорость роста объема опухоли была значительно выше в контрольной группе PBS по сравнению с группой, получавшей Bio96 ($151,1 \text{ мм}^3$ в сутки в сравнении с $90,6 \text{ мм}^3$ в сутки $p=0,004$), и
 35 средняя скорость роста объема опухоли была значительно выше в контрольной группе PBS по сравнению с группой, получавшей BioE4-03 ($151,1 \text{ мм}^3$ в сутки в сравнении с $76,0 \text{ мм}^3$ в сутки, $p=0,0008$). Хотя эти значения p не были скорректированы для множественных

сравнений, они бы оставались статистически значимыми, если бы, например, была сделана коррекция по Бонферрони.

Гистологический анализ опухолей

5 Был проведен гистологический анализ опухолей, обработанных только носителем или пептидами BioE4-03 или Bio96. В опухолях мышей, обработанных Bio-E4-03, имелся заметный некроз (H&E) (фиг. 9). Опухоли мышей, обработанных Bio-E4-03 или Bio96, имели более рыхлое расположение клеток (H&E) (фиг. 9). В опухолях мышей, которых обрабатывали BioE4-03 или Bio96, коллагеновые волокна были более тонкими по
10 сравнению с опухолями мышей, обработанных носителем (окраска трихромом по Массону) (Фиг. 10).

Влияние BioE4-03 на опухолевые клетки человека

15 Для того, чтобы определить потенциальный механизм, с помощью которого пептиды, происходящие из эндостатина, могут уменьшать рост опухоли, было протестировано воздействие BioE4-03 на опухолевые клетки человека.

 Экспрессию нескольких генов, участвующих в онкогенезе, ангиогенезе и обновлении раковых стволовых клеток, измеряли в различных типах опухолей и органах. Результаты указывают на то, что пептид E4-03, происходящий из эндостатина, уменьшает
20 рост опухоли за счет регуляции множества генов, участвующих в онкогенезе и ангиогенезе в раковых клетках человека, протестированных ниже.

Клетки A549 (клетки аденокарциномы легких человека):

 Опухолевые клетки обрабатывали 10 мкг/мл BioE4-03 в течение 48 часов. РНК
25 экстрагировали и анализировали с помощью ПЦР в реальном времени. N= 6-8 независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с использованием парного t-критерия. Экспрессия uPA, uPAR, PAI-I, LOX, PDGF-A, VEGF-A и IL-6 была значительно снижена под действием BioE4-03 (фиг. 11).

Клетки HCT116T (клетки карциномы легких и толстой кишки человека):

 Опухолевые клетки обрабатывали 10 мкг/мл BioE4-03 в течение 48 часов. РНК
30 экстрагировали и анализировали с помощью ПЦР в реальном времени. N=3-4 независимых эксперимента (за исключением uPAR, где n=2). Экспрессия uPA, uPAR, PAI-I, PDGF-A, VEGF-A и IL-6 была значительно снижена под действием BioE4-03 (фиг. 12).

35

Влияние эндостатинового пептида на рост опухоли

 На фигуре 26 показано влияние E4, введенного через желудочный зонд, на размер опухоли у мышей (ось Y). Сутки лечения показаны на оси X. Пептид вводили два раза в

неделю. Красная линия обозначает мышей с необработанными опухолями, а синяя - мышей, которые получали E4.

Клетки MM.1S BzR (клетки множественной миеломы, устойчивые к бортезомибу):

5 Иммунодефицитным мышам NOD-*scid* IL2R γ ^{null} вводили клетки множественной миеломы, устойчивые к бортезомибу (MM.1S BzR), в количестве 1×10^6 , через латеральную хвостовую вену. Через 14 суток было начато лечение пептидом BioE4, который вводили перорально в дозе 10 мг/кг два раза в неделю. Осуществляли ежесуточный мониторинг мышей на предмет качественных показателей

10 прогрессирования заболевания. Инфильтрацию костного мозга плазматическими клетками CD138+ миеломы оценивали на 49-е сутки для измерения количества плазматических клеток CD138+ миеломы как индикатора опухолевой нагрузки и эффективности пептида (фиг. 27).

15 Пример 2: Тестирование доменов эндостатиновых пептидов

Варианты эндостатиновых пептидов Bio-E4-03 и Bio96 оценивали на предмет того, как они влияют на экспрессию генов в различных клетках. В некоторых экспериментах пептиды были биотинилированы на N-конце и амидированы на C-конце.

20 Пептиды, оцениваемые в экспериментах, представляли собой следующие:

E4-03: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:2)

96-17: ATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA (SEQ ID NO:4)

96-87: ATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:5)

91-96: SYCETWRTEAPSATGQASSLL (SEQ ID NO:6)

25 91-87: SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQ (SEQ ID NO:7)

Экспрессия генов в нормальных фибробластах легких

Нормальные фибробласты легких обрабатывали носителем в качестве контроля (VC) или TGF- β (T) в присутствии или в отсутствие 10 мкг/мл различных пептидных

30 фрагментов. Белки внеклеточного матрикса, коллаген 1A1 и фибронектин (FN), анализировали с помощью иммуноблоттинга. E4-03 и 96-17 были эффективны в снижении уровней FN и Col1A1, индуцированных TGF- β , тогда как 96-87, 91-96 и 91-87 не были эффективными (фиг. 13).

Фибробласты обрабатывали TGF- β вместе с пептидом Bio96-17 или без него в

35 течение 48 часов. Экстрагировали РНК и измеряли уровни гладкомышечного альфа-актина (SMA) с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Обработка с использованием Bio96-17 привела к значительному снижению уровней SMA, индуцированных TGF- β , и, следовательно, к дифференцировке миофибробластов в

фибробласты из легочных тканей нормальных доноров (фиг. 14). Кроме того, Bio96-17 приводит к значительному снижению уровней SMA и Coll1A2 в фибробластах легких пациентов с системным склерозом (SSc) (фиг. 15).

5 SSc фибробласты обрабатывали 10 мкг/мл BioE4-03 в течение 72 часов. РНК экстрагировали и использовали для измерения SMA и коллагена 1A2. BioE4-03 приводит к значительному снижению уровней SMA и Coll1A2 в фибробластах легких пациентов, страдающих SSc (фиг. 16). Кроме того, BioE4-03 приводит к тенденции снижения уровней SMA и Coll1A2 в фибробластах легких пациентов с идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ) (фиг. 17).

10 Нормальные фибробласты легких обрабатывали TGF β без или с использованием возрастающих концентраций для 96-87. Проводили оценку супернатантов на уровни фибронектина через 72 часа после обработки. 96-87 не оказывал влияния на TGF β -индуцированную продукцию FN даже при увеличении концентрации с 10 мкг/мл до 80 мкг/мл (фигура 18).

15

Тестирование органной культуры *ex vivo*

Ткани легких при системном склерозе с легочным фиброзом разделяли на столбики одинакового размера. Ткани легких в органной культуре обрабатывали различными пептидными фрагментами, происходящими из эндостатина, в конечной концентрации 10 мкг/мл в присутствии TGF β в течение 120 часов. Индукцию матричной металлопротеазы (MMP)-1 (также известной как коллагеназа) в средах, кондиционированных тканями легких, исследовали как меру способности пептида уменьшать фиброз и способствовать деградации внеклеточного матрикса. Два домена эндостатиновых пептидов, E4-03 и 96-17, индуцировали продукцию MMP-1, тогда как 91-25 96 и 91-87 не оказывали никакого эффекта (фиг. 19).

BioE4-03 приводит к значительному снижению уровней гидроксипролина в тканях легких пациентов с системным склерозом (фиг. 20) и с ИЛФ (фиг. 21), поддерживаемых в органной культуре в течение 72 часов. Кроме того, как BioE4-03 (фиг. 22), так и Bio96-17 (фиг. 23) приводят к значительному снижению уровней гидроксипролина в тканях легких нормальных доноров после индукции фиброза с использованием TGF β . Bio96-17 также приводит к значительному снижению уровней секретируемого белка Col1A1 в тканях легких нормальных доноров, культивируемых в течение 120 часов после индукции фиброза с использованием TGF β (фиг. 24). BioE4-03 дополнительно снижает экспрессию генов Col1A1 и фибронектина (FN) в тканях кожи доноров, у которых фиброз был индуцирован TGF β (фиг. 25).

35

Пример 3: эндостатиновые пептиды для лечения острого повреждения легких

Острое повреждение легких, такое как ОРДС и повреждение легких, связанное с COVID-19, ассоциировано с повышенным уровнем IL-6 в легочной ткани, что способствует развитию цитокинового шторма. Следовательно, существует потребность в терапии, которая может снизить уровень IL-6 для ослабления вызванных цитокинами симптомов острого повреждения легких.

Уровни мРНК IL-6 измеряли с помощью кПЦР в клетках аденокарциномы легкого человека (A549), обработанных в течение 48 часов пептидом BioE4-03. Клетки, обработанные пептидом, имели значительно сниженную экспрессию мРНК IL-6 по сравнению с контрольными носителями (фиг. 28А). Для сравнения был проведен параллельный эксперимент с использованием небитинилированного E4-03. E4-03 также снижал экспрессию мРНК IL-6 через 48 часов (фигура 28В). Кроме того, уровни белка IL-6 в супернатанте клеток A549 измеряли с помощью ELISA через 72 часа после обработки пептидом E4-03. Уровни белка IL-6 были значительно снижены в клетках, обработанных пептидом, по сравнению с контрольными носителями (фиг. 28В).

Пример 4: расщепляемые пепсином пептидные фрагменты эндостатина в качестве терапевтических вариантов

Пептиды, происходящие из эндостатина, терапевтически применимы при пероральном лечении. Поэтому, чтобы определить, какие пептидные фрагменты являются наиболее распространенными и, следовательно, наиболее терапевтически релевантными после естественного расщепления, расщепление пепсином проводили на битинилированном на N-конце (длинноцепочечном) и амидированном на C-конце E4-03 (BioE4-03):

Биотин-NH₂-LC-SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHA-CONH₂ (SEQ ID NO: 2).

Образцы пептида готовили путем растворения BioE4-03 в 0,1% муравьиной кислоте. Пептид расщепляли пепсином в соотношении пепсин:пептид 1:100 в течение 0 минут (аликвоту отбирали сразу после добавления пепсина), 15 минут и 45 минут. Перед расщеплением (в качестве отрицательного контроля) и после расщепления аликвоты по 20 мкл отбирали с помощью наконечников для пипеток Millipore® ZipTip® с использованием 0,6 мкл смолы C₁₈ для удаления пепсина. Затем каждый элюат растворяли в 7 мкл смеси 2% ацетонитрила/0,2% муравьиной кислоты перед введением в орбитальную ловушку Orbitrap Elite для анализа ЖХ-МС/МС. MS1 были обнаружены в орбитальной ловушке Orbitrap. MS2 (включая +1 предшественник) были обнаружены в ионной ловушке посредством диссоциации, индуцированной столкновениями.

Анализировали пять отдельных групп с помощью ЖХ-МС/МС: группа А (E4-03) представляла собой нерасщепленный BioE4-03, разведенный в 0,1% муравьиной кислоте; группа В представляла собой аликвоту нерасщепленного BioE4-03, разведенного

в 0,1% муравьиной кислоте, отобранную с помощью ZipTip (NC); группа C представляла собой аликвоту BioE4-03, отобранную сразу после добавления пепсина (T0; расщепление в течение 0 минут); группа D представляла собой аликвоту BioE4-03, отобранную через 15 минут после расщепления пепсином (T15); группа E представляла собой аликвоту BioE4-03, отобранную через 45 минут после расщепления пепсином (T45).

В таблице 1 ниже представлены 20 лучших пептидов с наибольшим числом совпадений пептидных спектров (от англ. "peptide spectrum matches", PSM), отсортированных по MH+ молекулярной массе в дальтонах от наибольшей к наименьшей. N-концевые остатки, обозначенные строчными буквами, обозначают NHS-LC-биотиновую модификацию, тогда как C-концевые остатки, обозначенные строчными буквами, обозначают амидированную модификацию. Эти результаты также представлены на графическом изображении на фиг. 29.

Таблица 1. Наилучшие расщепляемые пепсином пептиды BioE4-03, отсортированные по MH+ молекулярной массе в Дальтонах								
SE Q ID NO:	Последовательность	PSM	E4-03	N C	T 0	T1 5	T4 5	MH+ [Da]
8	sYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHa	54	14	29	10	1	0	4041,93
9	SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHa	35	7	16	11	1	0	3702,77
10	CETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHa	173	0	30	37	53	53	3452,67
11	WRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHa	126	1	2	74	31	18	3119,57
12	CETWRTEAPSATGQASSLLGGRL	54	0	1	0	13	40	2391,19
13	WRTEAPSATGQASSLLGGRL	14	0	0	2	6	6	2171,17
14	WRTEAPSATGQASSLLGGRL	114	0	0	4	39	71	2058,08
15	CETWRTEAPSATGQASSLL	20	0	0	0	2	18	2007,95
16	ASSLLGGRLLGQSAASCHHa	11	1	1	2	3	4	1935,01
17	CETWRTEAPSATGQASSL	166	0	9	2	62	93	1894,87
18	SSLLGGRLLGQSAASCHHa	11	1	2	1	2	5	1863,97
19	SLLGGRLLGQSAASCHHa	17	1	3	3	3	7	1776,94
20	LLGGRLLGQSAASCHHa	66	1	1	10	21	33	1689,90
21	WRTEAPSATGQASSLL	33	0	0	1	5	27	1674,85
22	TWRTEAPSATGQASSL	10	0	0	2	3	5	1662,82
23	LGGRLLGQSAASCHHa	12	0	0	4	4	4	1577,81
24	LGGRLLGQSAASCHHa	170	1	5	23	60	81	1576,82
25	WRTEAPSATGQASSL	39	0	1	2	7	29	1561,77
26	GGRLLGQSAASCHHa	26	0	4	7	10	5	1463,74
27	GRLLGQSAASCHHa	11	0	3	3	2	3	1406,71

На фиг. 29 представлены ЖХ-МС/МС результаты расщепления пепсином BioE4-03 (SEQ ID NO: 2). Ось X каждой диаграммы, отмеченная как SEQ ID NO, как описано в Таблице 1, обозначает число совпадений пептидного спектра для каждой группы лечения, изображенной на оси Y: «Поставленный» (англ. "supplied") обозначает нерасщепленный BioE4-03, разведенный 0,1% муравьиной кислотой, «WKSL» обозначает аликвоту нерасщепленного BioE4-03, разведенного в 0,1% муравьиной кислоте, отобранную с помощью ZipTip®, T0 обозначает аликвоту BioE4-03, отобранную сразу после добавления пепсина (расщепление в течение 0 минут), T15 обозначает аликвоту BioE4-03, отобранную через 15 минут после расщепления пепсином, и T45 означает аликвоту BioE4-03, отобранную через 45 минут после расщепления пепсином (T45).

Пептиды, описанные в данном документе, содержание которых увеличивается после расщепления пепсином, тестируются на противоопухолевую и/или противофиброзную активность с применением, например, анализов, описанных в примерах 1-3 выше. Не будучи связанным научной теорией, полагают, что один или несколько пептидов, полученных из эндостатина, расщепленных пепсином, будут обладать противоопухолевой активностью, противофиброзной активностью или их комбинацией для применения при лечении рака или одного или нескольких фиброзных заболеваний или связанного с фиброзом заболевания или расстройства, как описано выше.

Раскрытие каждого патента, заявки на патент и публикации, цитируемых здесь, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В то время как настоящее изобретение было раскрыто со ссылкой на конкретные варианты осуществления, очевидно, что другие примеры осуществления и варианты этого изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области техники без отклонения от истинной сущности и объема настоящего изобретения. Предполагается, что приложенная формула изобретения включает все такие варианты осуществления и эквивалентные варианты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая терапевтический агент, обладающий активностью, выбранной из группы, состоящей из противоопухолевой активности, противофиброзной активности и их комбинации, причем указанный агент представляет собой пептид, происходящий из С-концевого эндостатина, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из одной из последовательностей SEQ ID NO: 8-27 и их вариантов, производных, мутантов или фрагментов; или выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий из С-концевого эндостатина, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из одной из последовательностей SEQ ID NO: 8-27 и их вариантов, производных, мутантов или фрагментов.

2. Терапевтический агент по п. 1, где пептид, происходящий из С-концевого эндостатина, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из одной из последовательностей SEQ ID NO: 8-27, их фрагментов и их вариантов.

3. Терапевтический агент по п. 2, где вариант пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, содержит не более 5 аминокислотных замен.

4. Терапевтический агент по п. 2, где фрагмент пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, содержит по меньшей мере 8 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 8-27.

5. Терапевтический агент по п. 1, дополнительно включающий второй агент, причем указанный второй агент выбран из группы, состоящей из противоракового агента и противофиброзного агента.

6. Способ лечения или предупреждения заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, содержащей агент, причем указанный агент представляет пептид, происходящий из С-концевого эндостатина, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из одной из последовательностей SEQ ID NO: 8-27 и их вариантов, производных, мутантов или фрагментов; или выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий из С-концевого эндостатина, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из одной из

последовательностей SEQ ID NO: 8-27 и их вариантов, производных, мутантов или фрагментов.

7. Способ по п. 6, где пептид, происходящий из С-концевого эндостатина, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из одной из последовательностей SEQ ID NO: 8-27, их фрагментов и их вариантов.

8. Способ по п. 7 где вариант пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, содержит не более 5 аминокислотных замен.

9. Способ по п. 7, где фрагмент пептида, происходящего из С-концевого эндостатина, содержит по меньшей мере 8 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 8-27.

10. Способ по п. 6, где заболевание или расстройство представляет собой рак.

11. Способ по п. 10, где рак выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака печени, рака яичников, рака эндометрия, рака мочевого пузыря, рака толстой кишки, лимфомы, рака кожи, рака поджелудочной железы, рака желудка, миеломы и глиомы.

12. Способ по п. 10, дополнительно включающий введение второго агента, причем указанный второй агент представляет собой противораковый агент.

13. Способ по п. 6, где заболевание или расстройство является фиброзным или связанным с фиброзом заболеванием или расстройством.

14. Способ по п. 13, где фиброзное или связанное с фиброзом заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из следующего: фиброз сердца, идиопатический легочный фиброз, интерстициальный легочный фиброз, семейный легочный фиброз, индуцированный облучением легочный фиброз, пневмокониоз, обусловленный воздействием угольной пыли (пневмокониоз угольщиков), асбестоз, блеомициновое легкое, саркоидоз, силикоз, острое повреждение легких, ОРДС, гипертрофические рубцы, келоидные рубцы, цирроз печени, системная склеродермия, локализованная склеродермия, морфея, сосудистый фиброз, фиброз почек, фиброз в результате реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), субэпителиальный фиброз, эндомиокардиальный фиброз, фиброз матки, миелофиброз, ретроперитонеальный

фиброз, нефрогенный системный фиброз, рубцевание после хирургического вмешательства, астма, гломерулонефрит, мультифокальный фибросклероз, диабетическая нефропатия, ревматоидный артрит, атеросклероз, индуцированный облучением фиброз, фиброз, индуцированный химиотерапией, системный склероз, гепатит и синдром Шегрена.

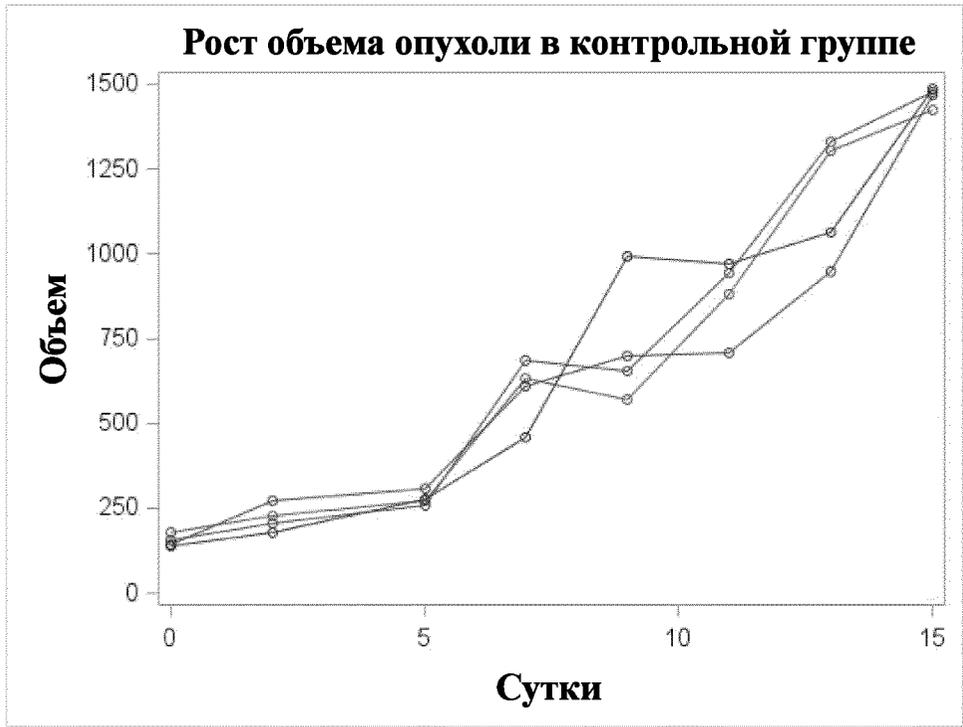
15. Способ по п. 13, дополнительно включающий введение второго агента, где указанный второй агент является противомышечным агентом.

16. Способ по п. 16, где заболевание или расстройство представляет собой острое повреждение легких.

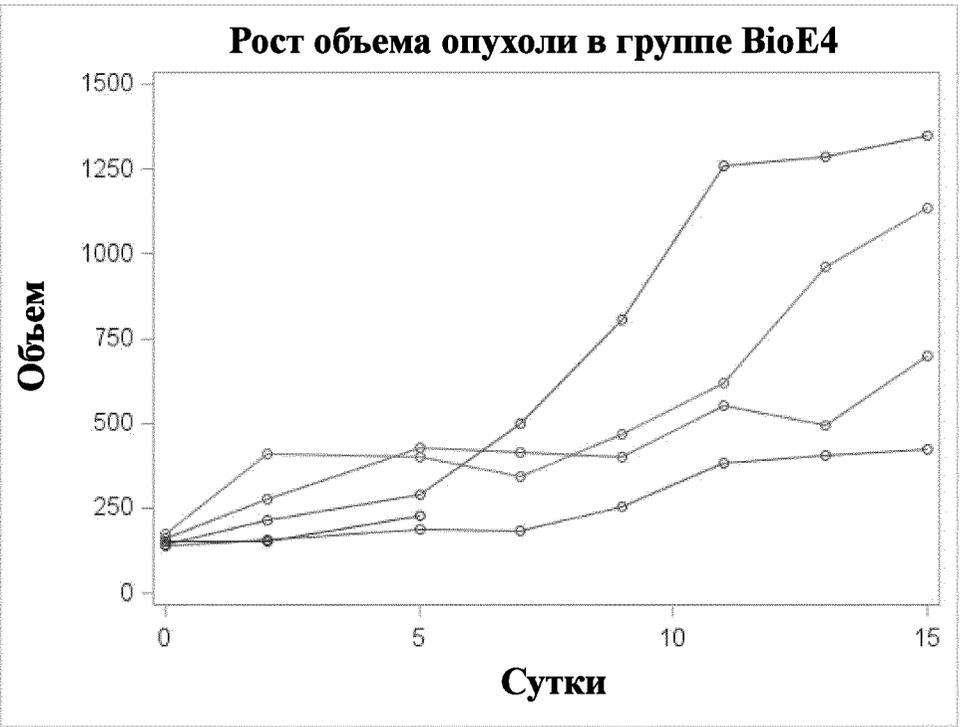
17. Способ по п. 16, где острое повреждение легких выбрано из группы, состоящей из следующего: острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), индуцированное вирусом острое поражение легких, тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), коронавирусная инфекция COVID-19, острое повреждение легких, вызванное гриппом, острое повреждение легких, обусловленное сепсисом, острое повреждение легких, обусловленное пневмонией, острое повреждение легких, обусловленное аспирацией, острое повреждение легких, обусловленное травмой, острое повреждение легких, обусловленное переливанием крови, острое повреждение легких, обусловленное дымом, острое повреждение легких, обусловленное вдыханием токсичных газов, острое повреждение легких, обусловленное панкреатитом, острое повреждение легких, обусловленное передозировкой лекарственными средствами, острое повреждение легких из-за ожога и повреждение легких, связанное с искусственной вентиляцией легких, проявляющееся воспалением.

Варианты лечения	Сутки	N	Среднее	Среднее стандартн. отклонение	Минимум	Максимум
БиоЕ4	0	5	154.1	12.7	140.6	173.1
	2	5	241.9	106.9	152.1	410.1
	5	5	307.5	105.0	188.2	429.9
	7	4	359.7	133.7	184.0	499.4
	9	4	482.9	234.9	252.4	807.9
	11	4	703.1	383.6	384.7	1259.4
	13	4	786.3	412.0	407.1	1285.3
	15	4	902.0	418.0	422.5	1347.3
	Контроль	0	4	154.8	17.9	140.3
2		4	221.5	39.9	178.4	272.9
5		4	278.4	21.2	257.0	307.6
7		4	595.9	96.7	458.7	684.3
9		4	730.0	184.2	571.5	994.4
11		4	875.8	117.3	708.6	970.3
13		4	1162.6	184.9	950.3	1331.3
15		4	1464.1	27.1	1425.6	1488.0

ФИГ. 1



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

ФИГ. 2

Эффект	Оценка	Стандартная ошибка	DF	t значение	Pr > t
Итнерсепт	153.58	97.7400	7	1.57	0.1601
Сутки	18.4949	23.5118	54	0.79	0.4349
Сутки *Сутки	4.5909	1.4558	54	3.15	0.0026
ВюЕ4	0.8204	131.15	7	0.01	0.9952
Сутки x ВюЕ4	6.1624	32.0055	54	0.19	0.8480
Сутки ² x ВюЕ4	-2.9196	1.9987	54	-1.46	0.1499

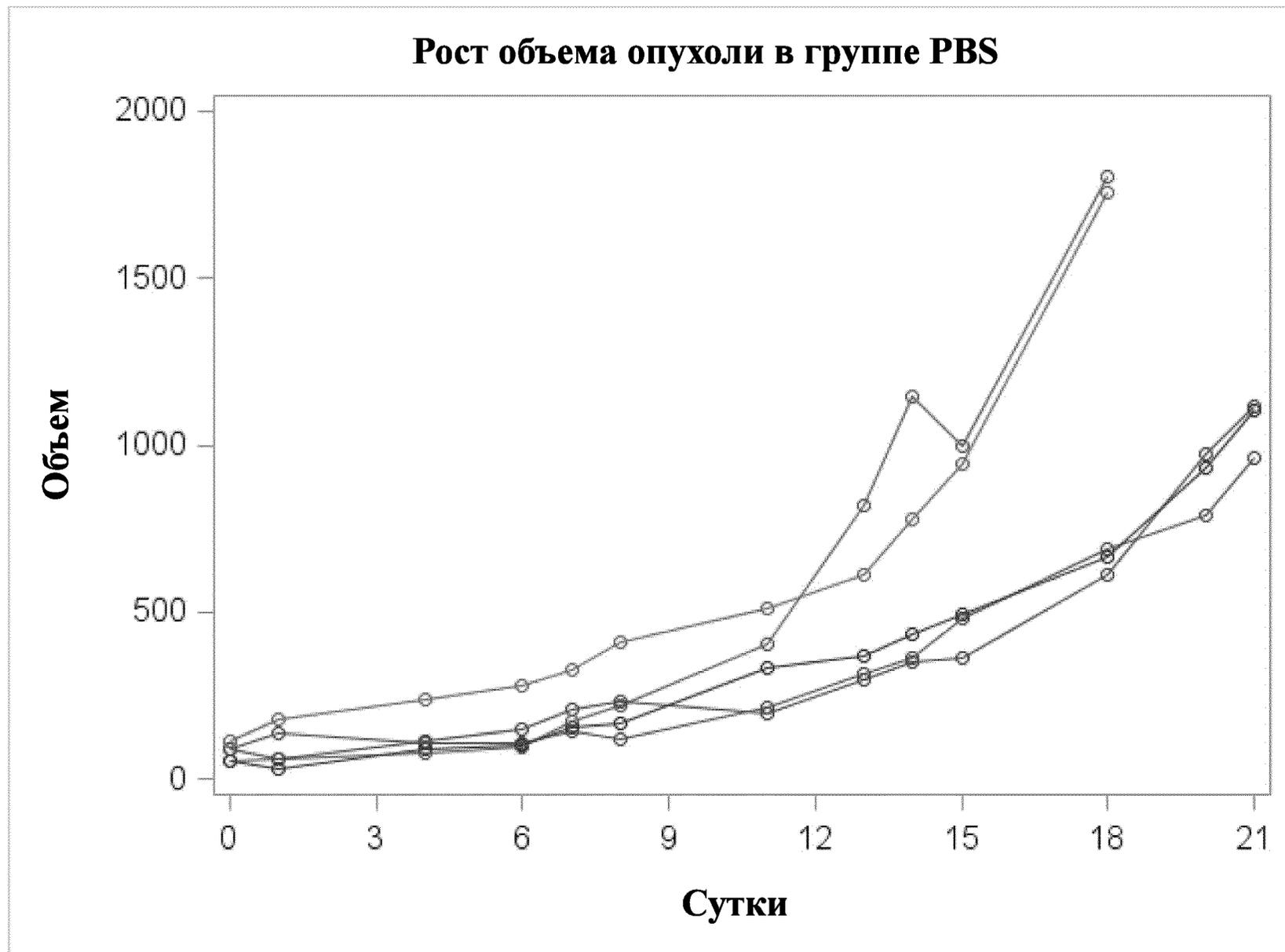
ФИГ. 3

	Основанная на модели оценка среднего объема на 15-е сутки	Стандартная ошибка	95% доверительный интервал для среднего
Контрольная группа	1464.0 мм ³	97.7	(1268.0, 1659.9)
Группа BioE4	900.3 мм ³	97.4	(705.1, 1095.6)
Разница (контроль – BioE4)	563.7 мм ³	138.0	(287.0, 840.3)
	Основанная на модели оценка средней скорости увелич-я объема на 15-е сутки	Стандартная ошибка	95% доверительный интервал для среднего
Контрольная группа	156.2 мм ³ в сутки	23.5	(109.0, 203.4)
Группа BioE4	74.8 мм ³ в сутки	22.6	(29.5, 120.1)
Разница (контроль – BioE4)	81.4 мм ³ в сутки	32.6	(16.0, 146.9)

ФИГ. 4

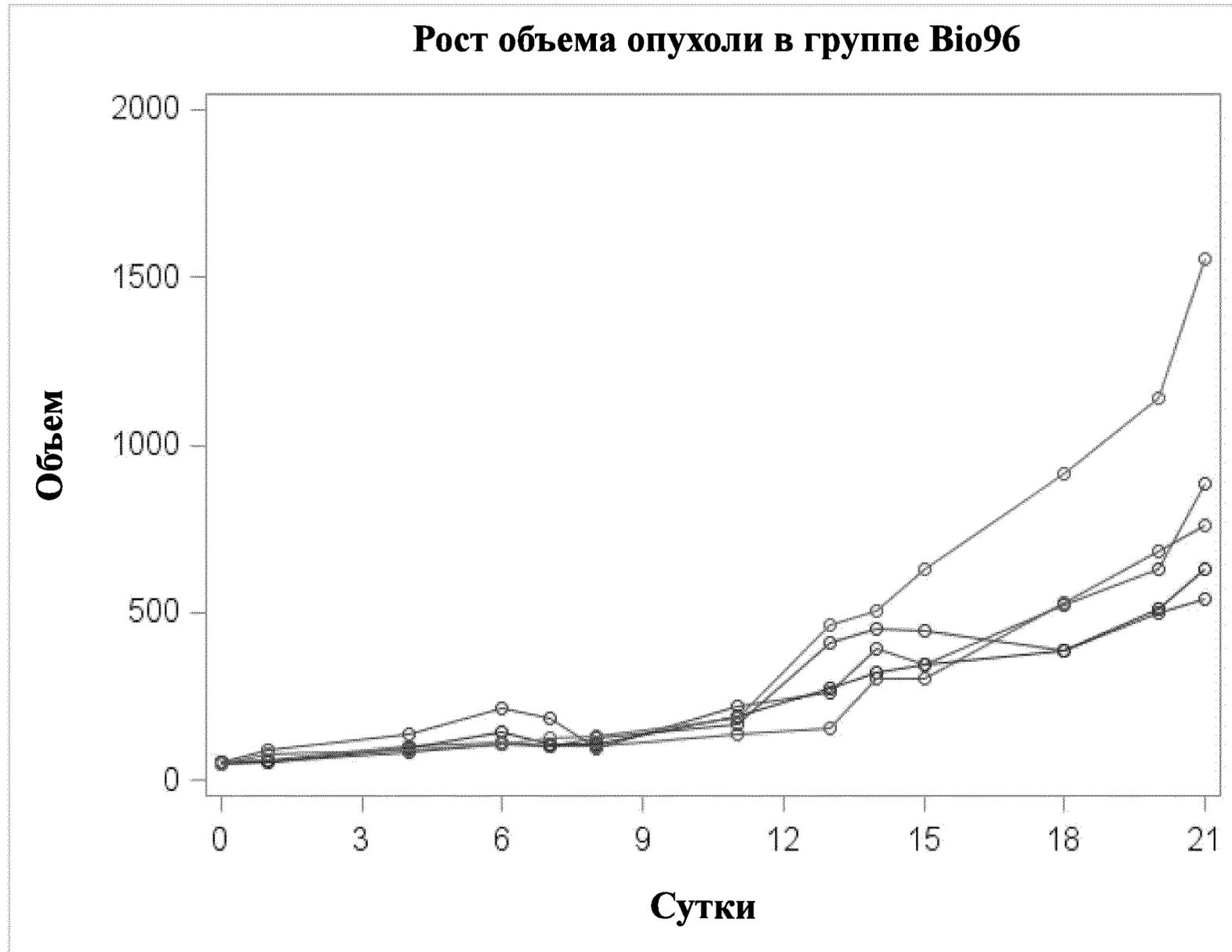
	PBS (n=5)		Bio96 (n=5)		BioE4-03 (n=4)	
Сутки	Среднее	Стандартн. отклонение	Среднее	Стандартн. отклонение	Среднее	Стандартн. отклонение
0	80.8	28.1	52.6	1.9	60.1	15
1	92.7	61.1	67.3	14.7	49.6	32.4
4	125.1	64.6	103.4	20.4	99.6	58.7
6	147.2	77.3	136.9	46.2	122.9	78
7	200.9	73.1	124.3	34.6	132.9	91.5
8	230.3	110.3	112.1	15.9	138.3	94.3
11	333.1	131.3	180.1	31.4	182.4	98.9
13	483.2	227.7	313.6	122.9	269	159.1
14	615.3	343.6	394.3	86.1	289.1	169.1
15	656.3	292.6	413.6	130.8	408.2	278.6
18	1104.2	617.2	548.2	215.5	547.3	310
20	900.8	96.4	693.9	262.4	620.9	362.7
21	1061.7	87.6	872.8	401.9	768.4	458.4

ФИГ. 5



ФИГ. 6А

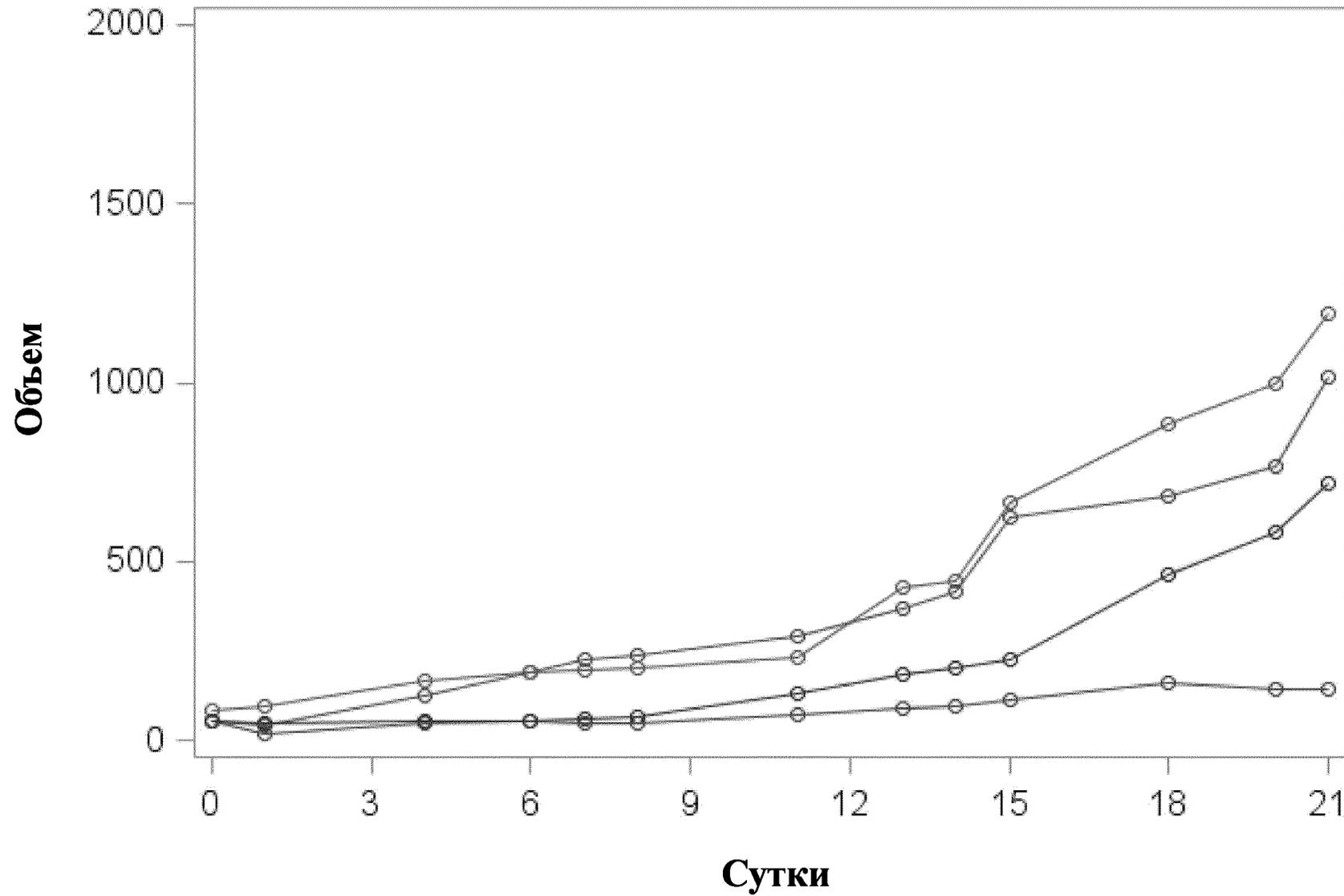
ФИГ. 6



ФИГ. 6В

Продолжение ФИГ. 6

Рост объема опухоли в группе ВioE4-03



ФИГ. 6С

Продолжение ФИГ. 6

Эффект	Лечение	Оценка	Стандартная ошибка	DF	t значение	Pr > t
Интерсепт		81.4676	139.95	11	0.58	0.5722
Сутки		-16.7560	14.3377	158	-1.17	0.2443
Сутки ²		3.9965	0.6391	158	6.25	<.0001
Лечение	Bio96	-27.5298	197.92	11	-0.14	0.8919
Лечение	BioE4-03	-20.6341	209.93	11	-0.10	0.9235
Лечение	PBS	0
Сутки *Лечение	Bio96	4.0356	20.0487	158	0.20	0.8407
Сутки*Лечение	BioE4-03	8.0387	21.2378	158	0.38	0.7056
Сутки*Лечение	PBS	0
Сутки ² x Лечение	Bio96	-1.5371	0.8737	158	-1.76	0.0804
Сутки ² x Лечение	BioE4-03	-1.9786	0.9230	158	-2.14	0.0336
Сутки ² x Лечение	PBS	0

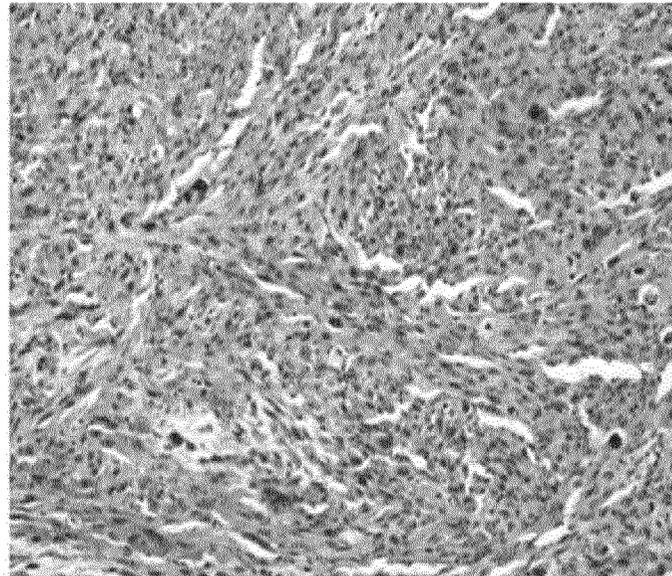
ФИГ. 7

	Основанная на модели оценка среднего объема на 21-е сутки	Стандартная ошибка	95% доверительный интервал для среднего
Контрольная группа	1492.1 мм ³	145.3	1205.1, 1779.0
Группа Bio96	871.4 мм ³	140.0	595.0, 1147.8
Группа BioE4-03	767.7 мм ³	156.5	458.6, 1076.7
Разница (Контроль– Bio96)	620.7 мм ³	201.7	222.2, 1019.1
Разница (Контроль – BioE4-03)	724.4 мм ³	213.5	302.7, 1146.1
	Основанная на модели оценка средней скорости увелич-я объема на 21-е сутки	Стандартная ошибка	95% доверительный интервал для среднего
Контрольная группа	151.1 мм ³ в сутки	15.5	120.4, 181.8
Группа Bio96	90.6 мм ³ в сутки	14.0	62.9, 118.3
Группа BioE4-03	76.0 мм ³ в сутки	15.7	45.1, 107.0
Разница (Контроль – Bio96)	60.5 мм ³ в сутки	20.9	19.2, 101.8
Разница (Контроль– BioE4-03)	75.1 мм ³ в сутки	22.1	31.5, 118.6

ФИГ. 8

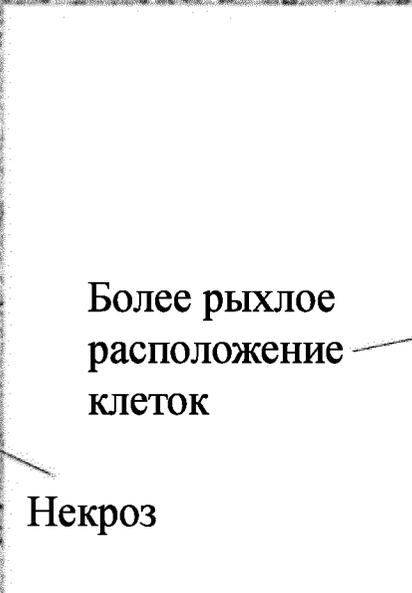
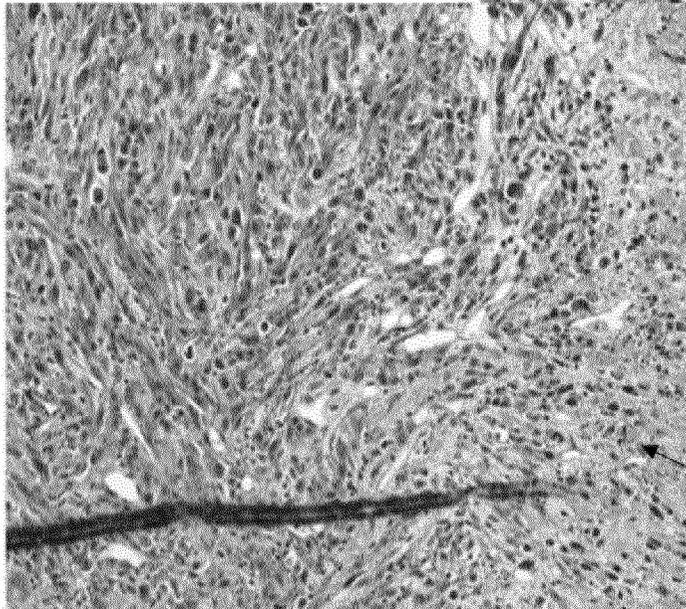
H&E

Носитель



BioE4-03

Bio96



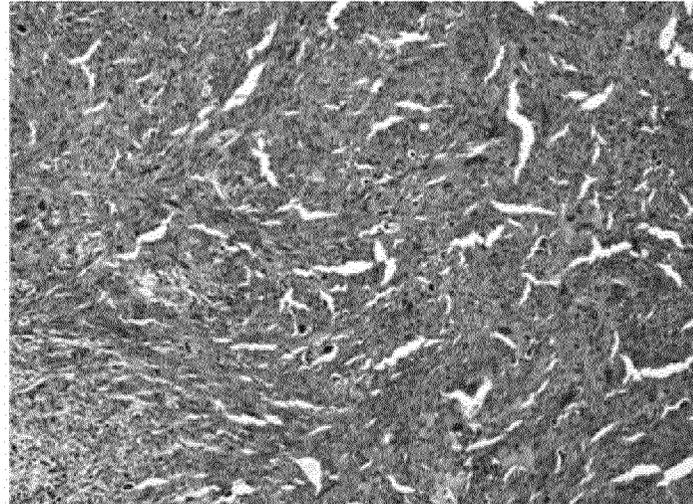
Более рыхлое
расположение
клеток

Некроз

ФИГ. 9

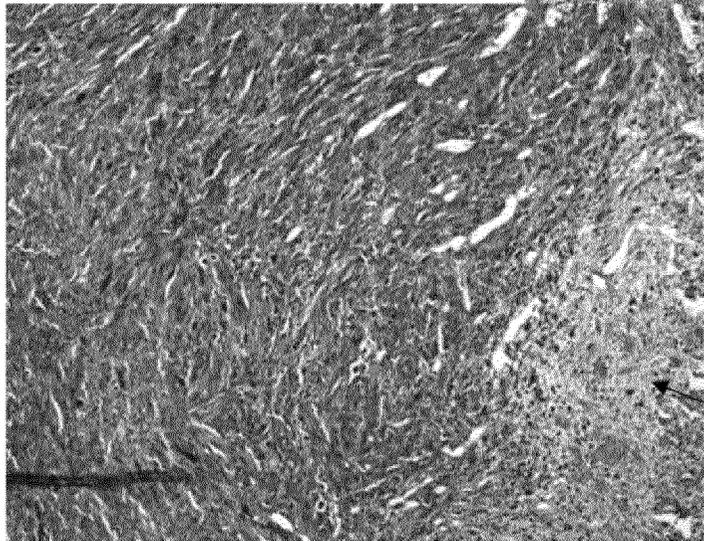
Окраска трихром
по Массону

Более тонкие
коллагеновые волокна
BioE4-03

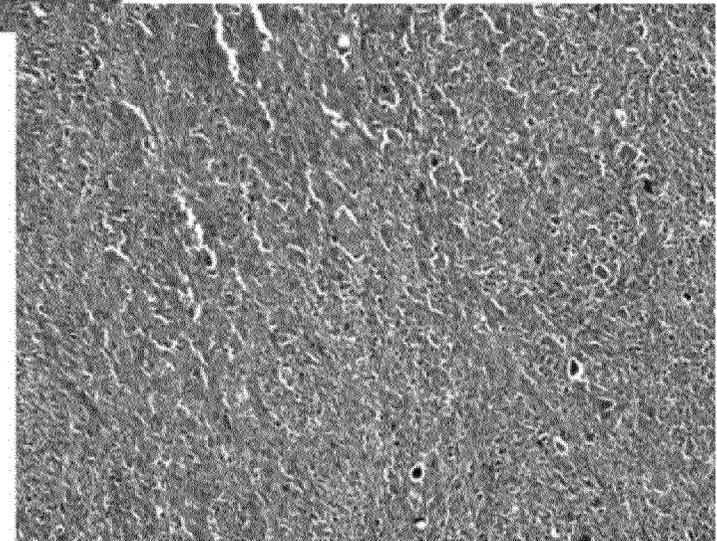


Более толстые
коллагеновые волокна
Носитель

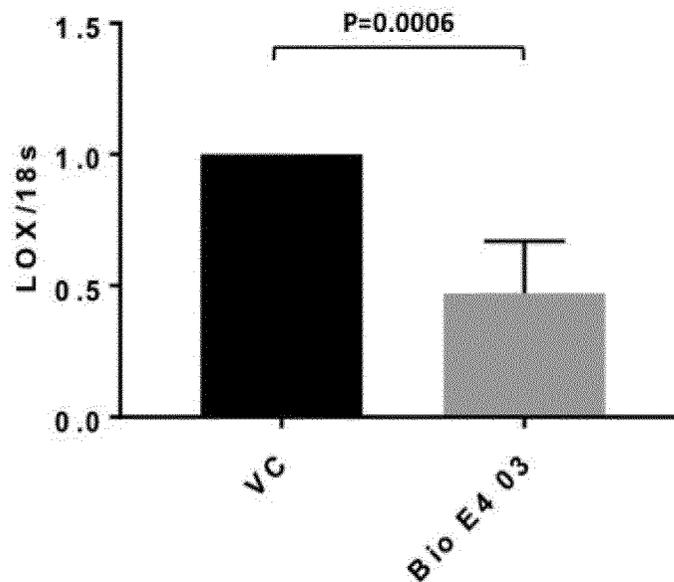
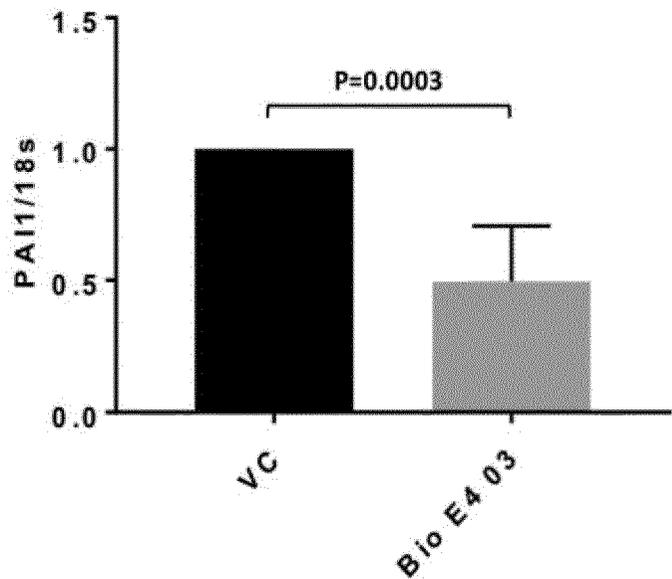
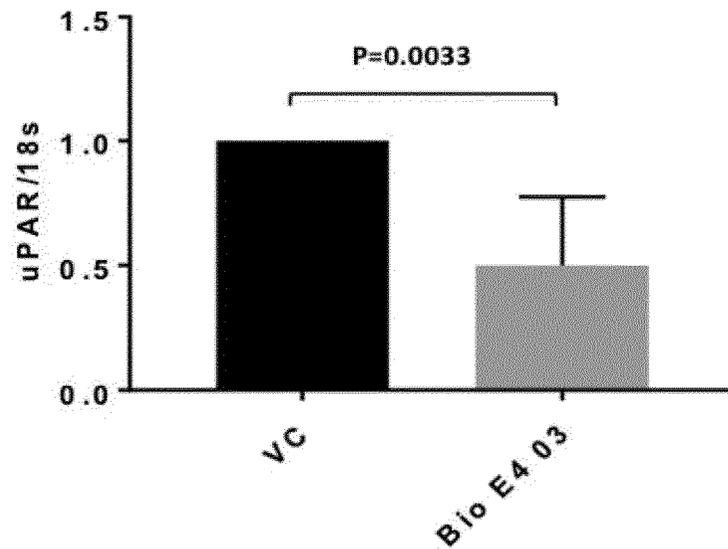
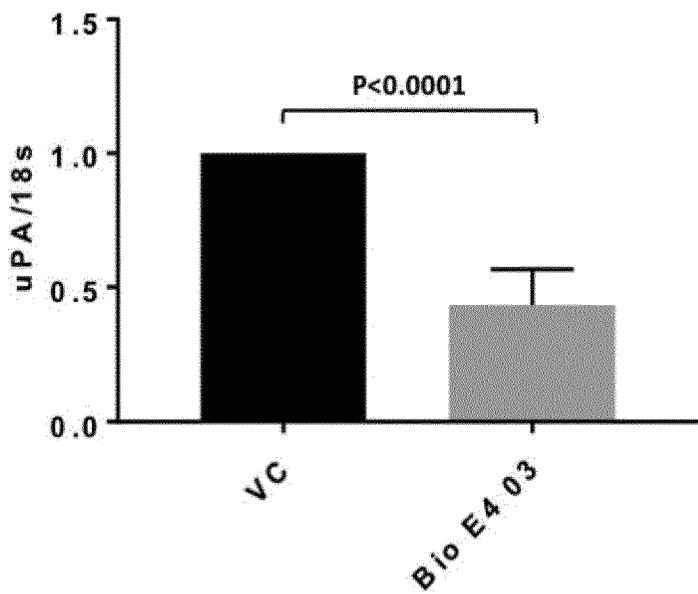
Коллагеновые волокна
толще, чем в группе
BioE4-03, но тоньше,
чем в группе носителя
Bio96



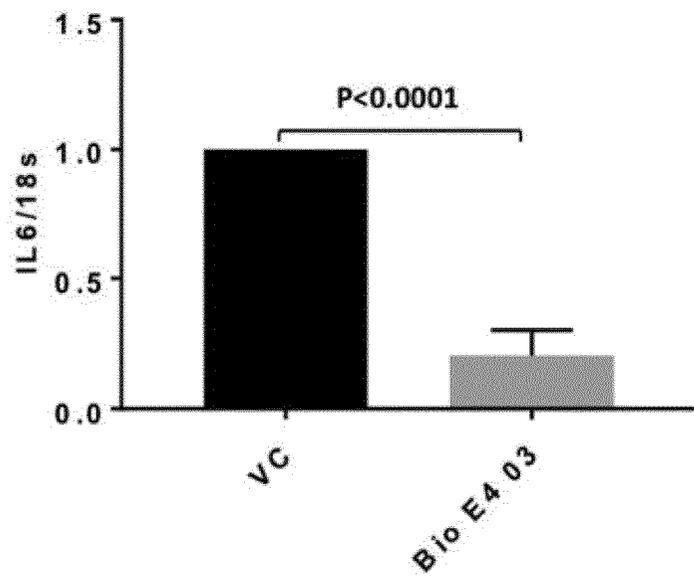
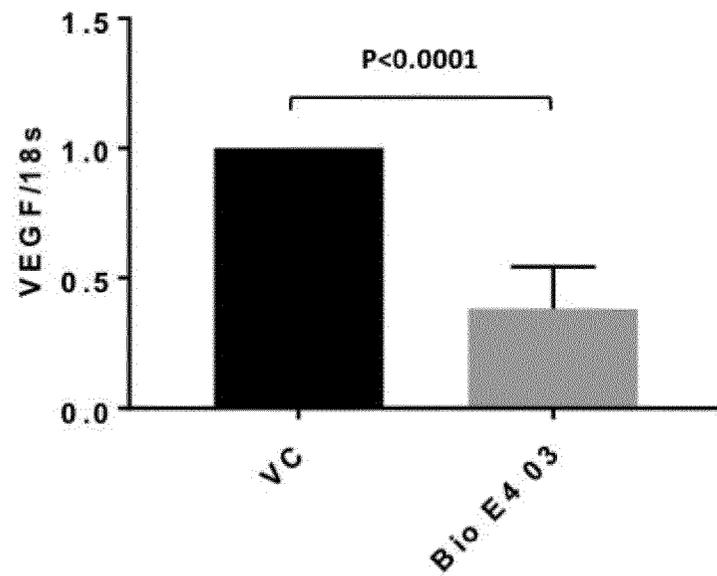
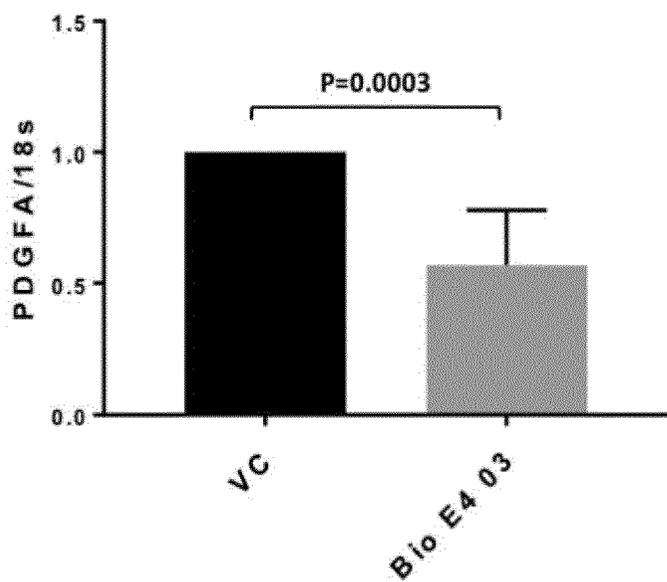
Некроз



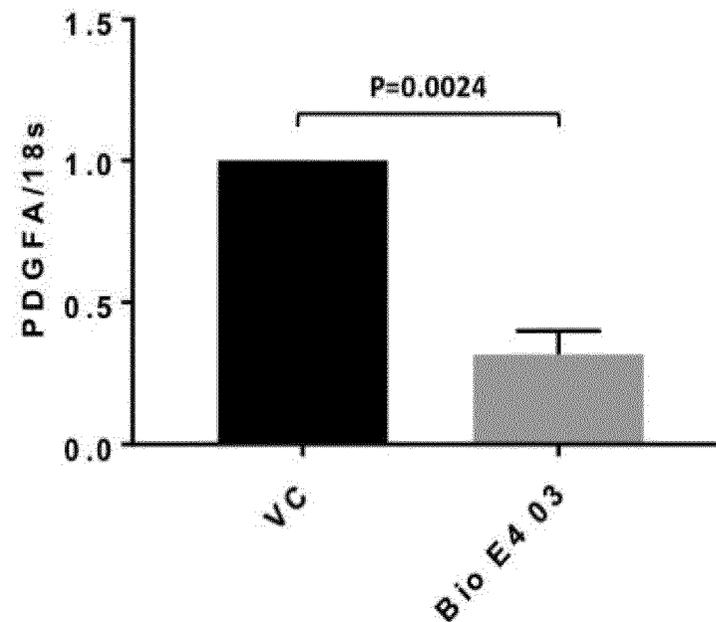
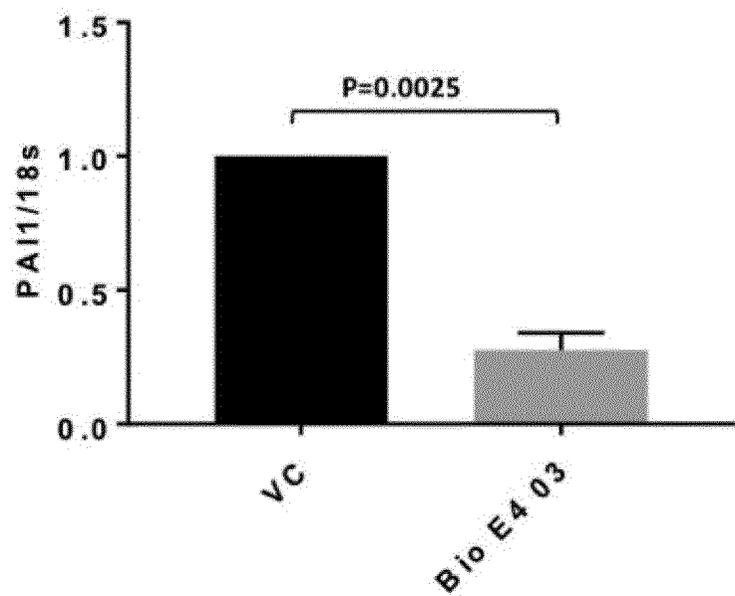
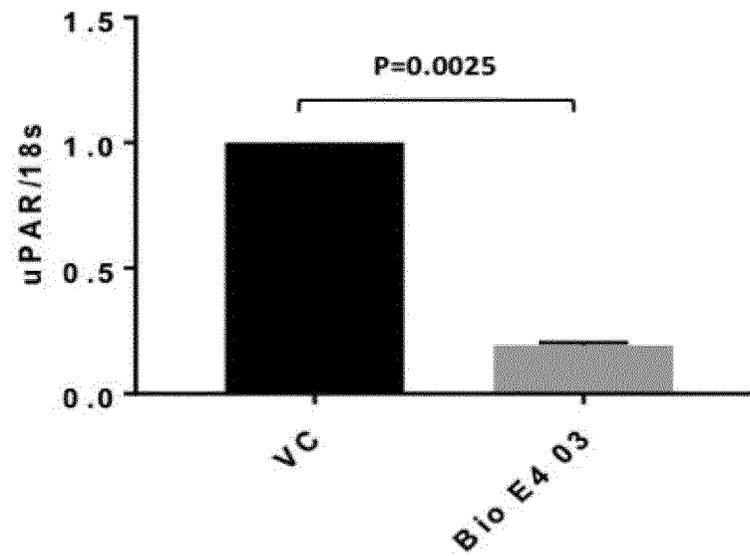
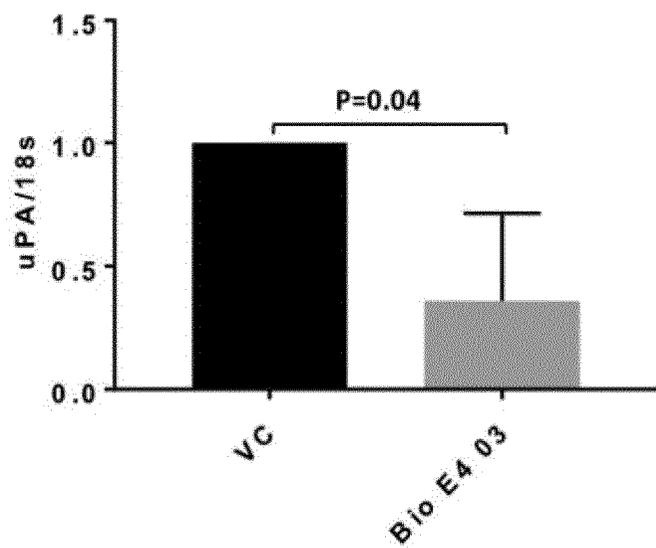
ФИГ. 10



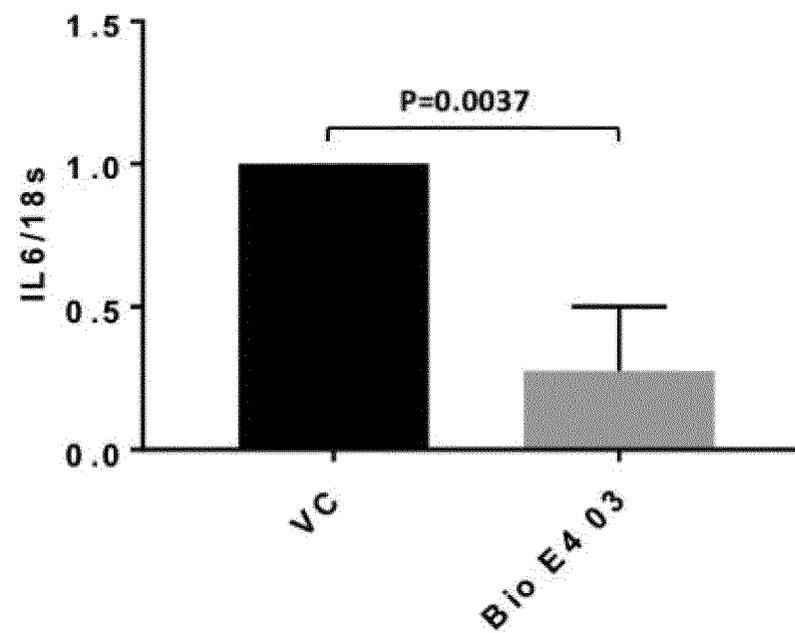
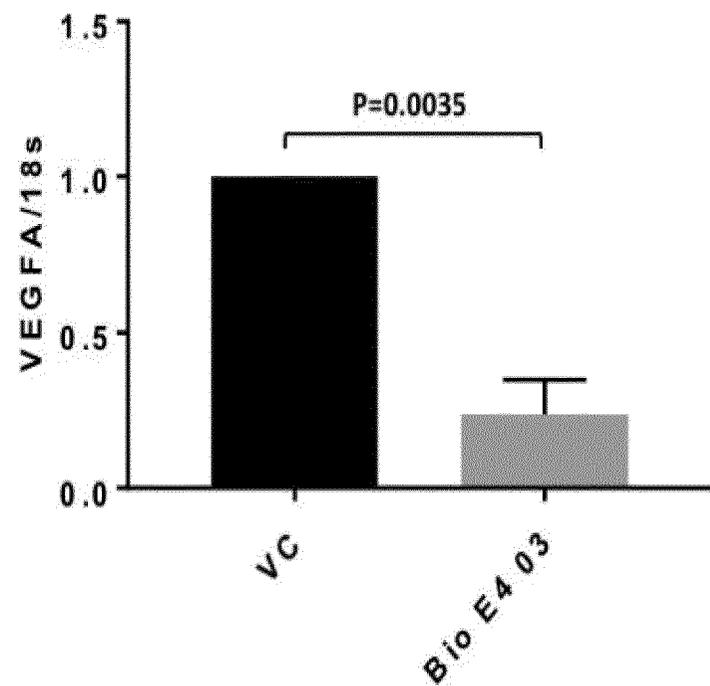
ФИГ. 11



ФИГ. 11 (продолжение)

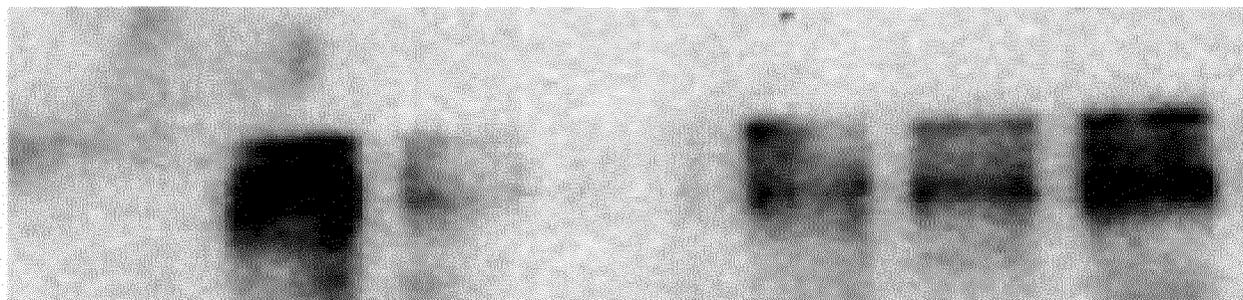


ФИГ. 12



ФИГ. 12 (продолжение)

FN



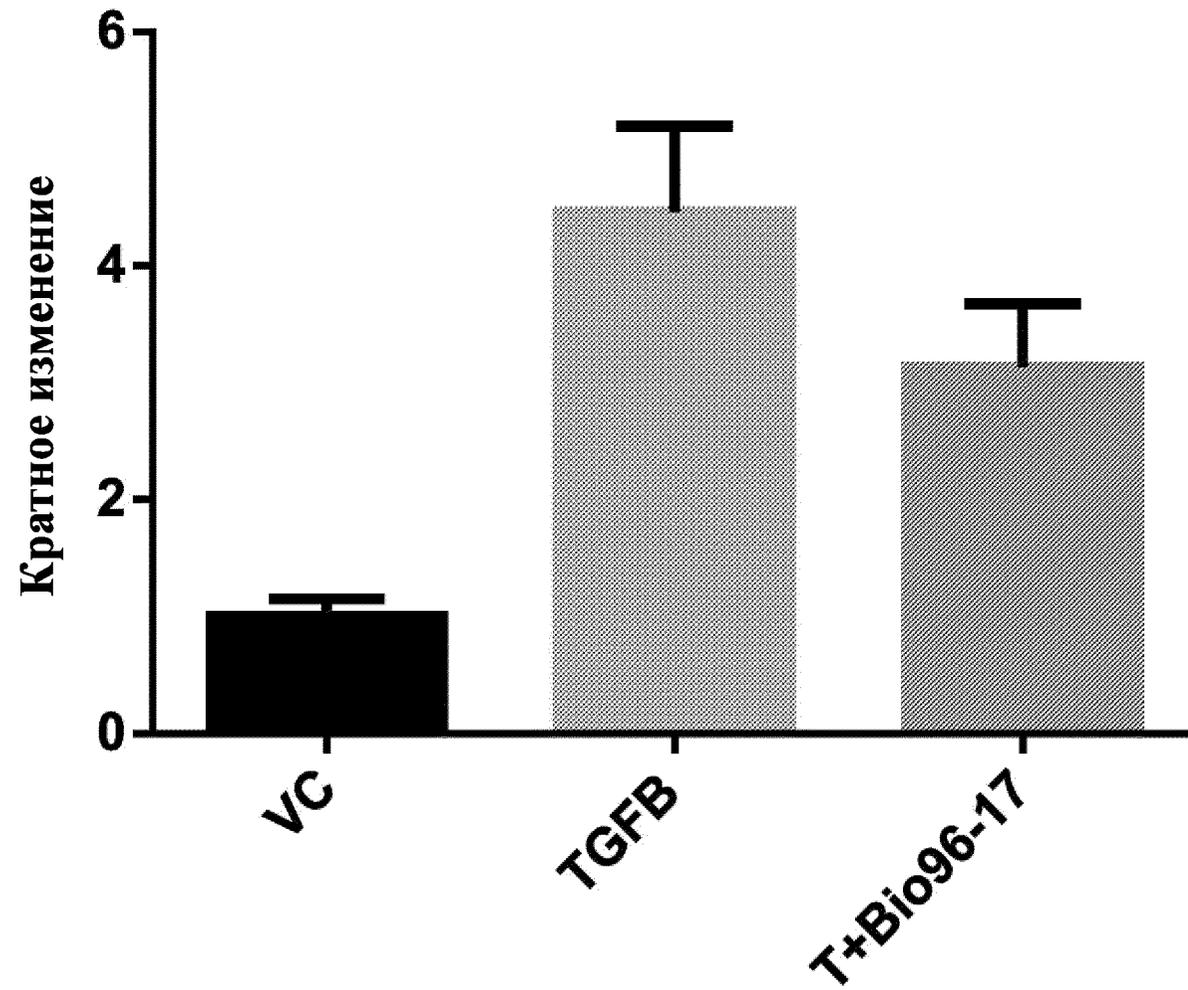
Coll1A1



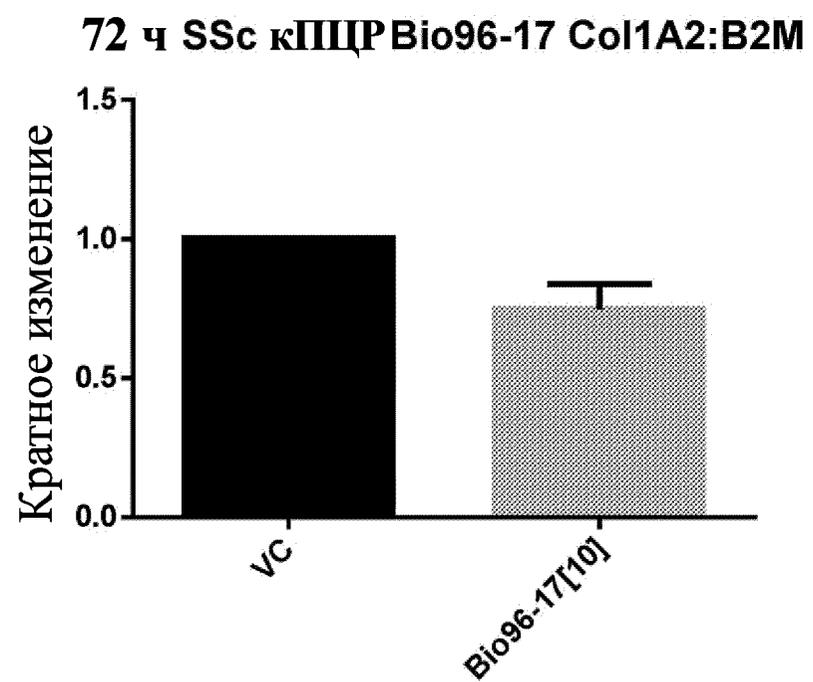
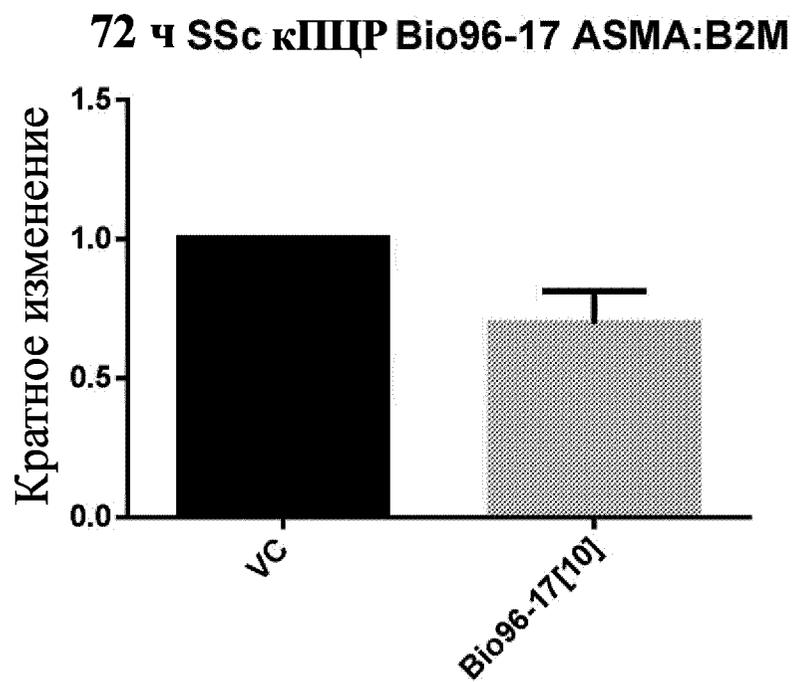
VC
T[10]
T+E4-03
T+96-17
T+96-87
T+91-96
T+91-87

ФИГ. 13

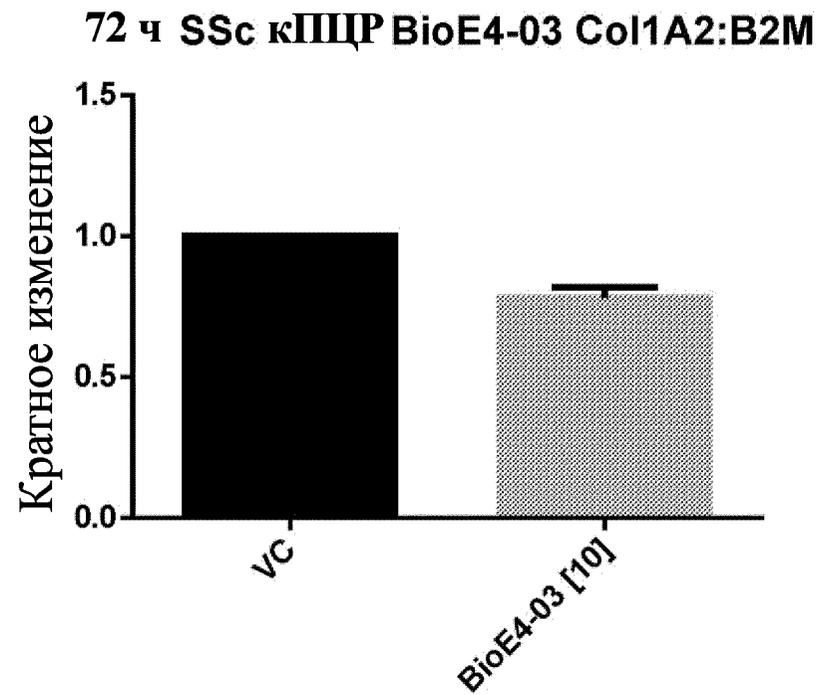
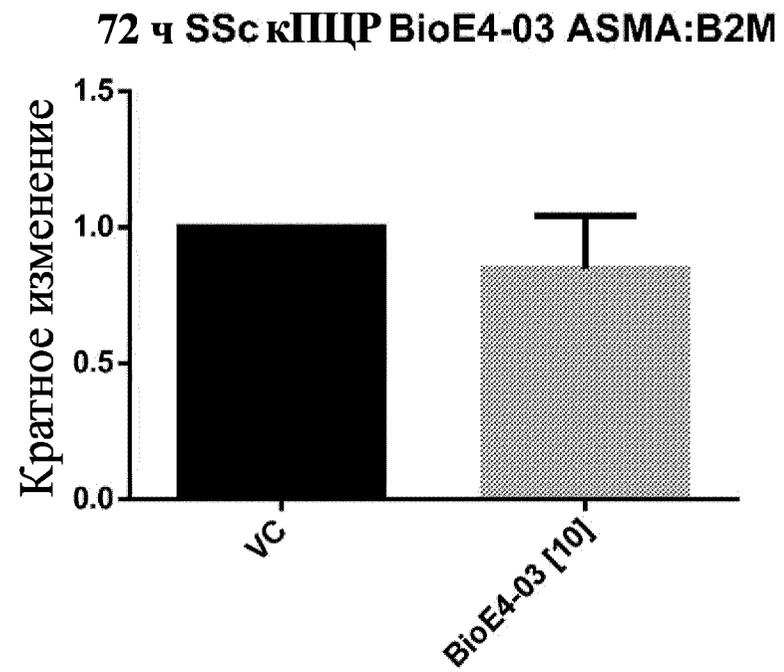
кПЦР aSMA в фибробластах после 48 ч



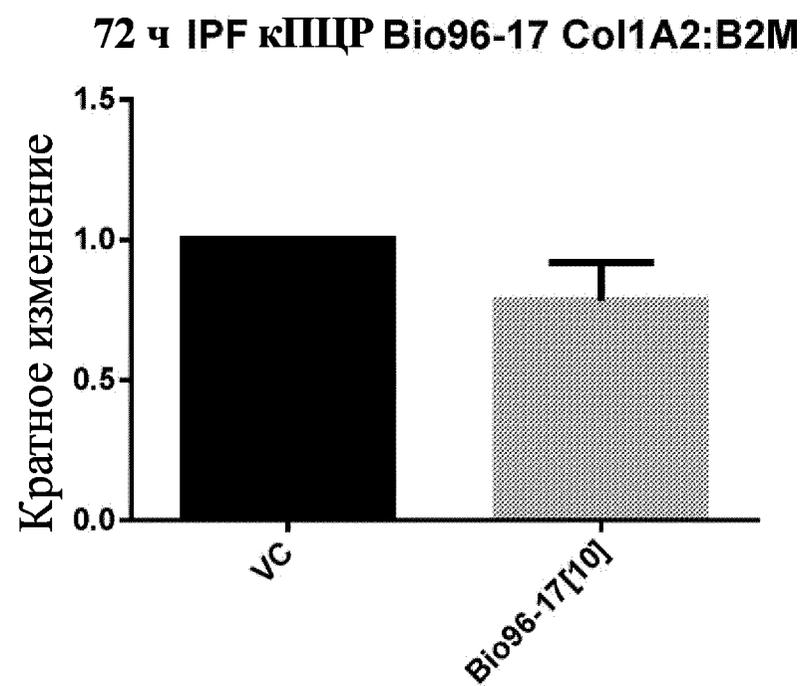
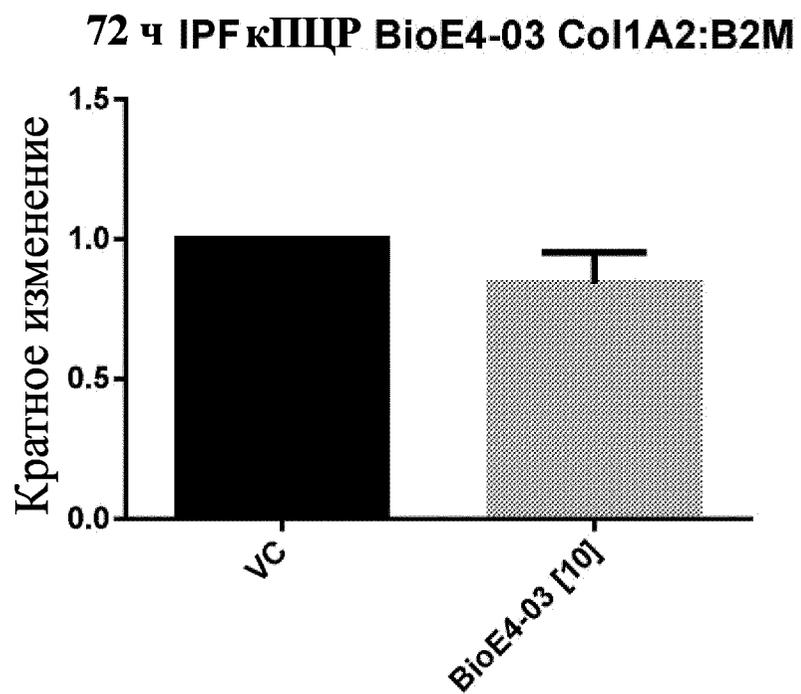
ФИГ. 14



ФИГ. 15

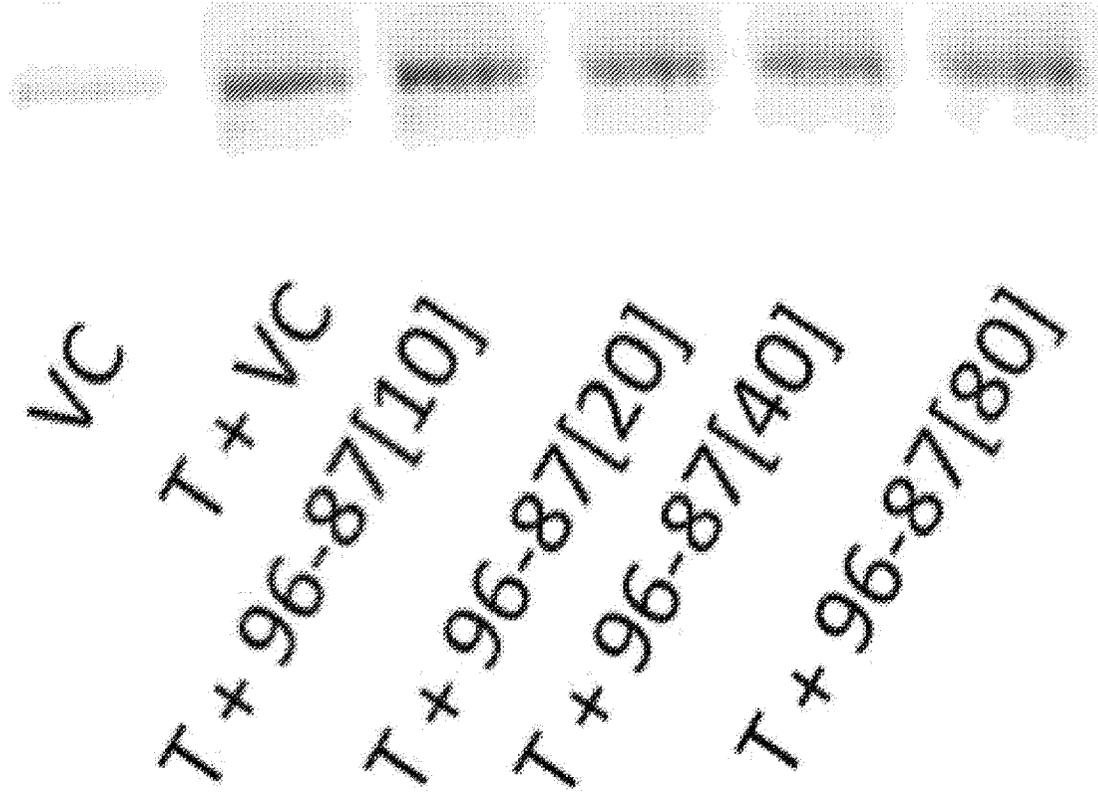


ФИГ. 16



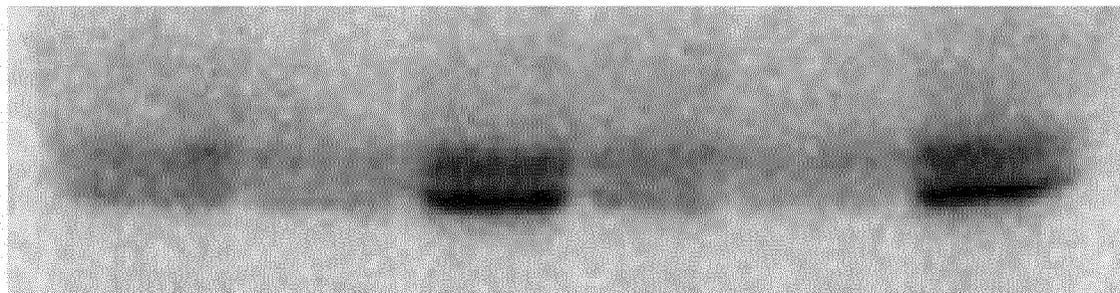
ФИГ. 17

FN



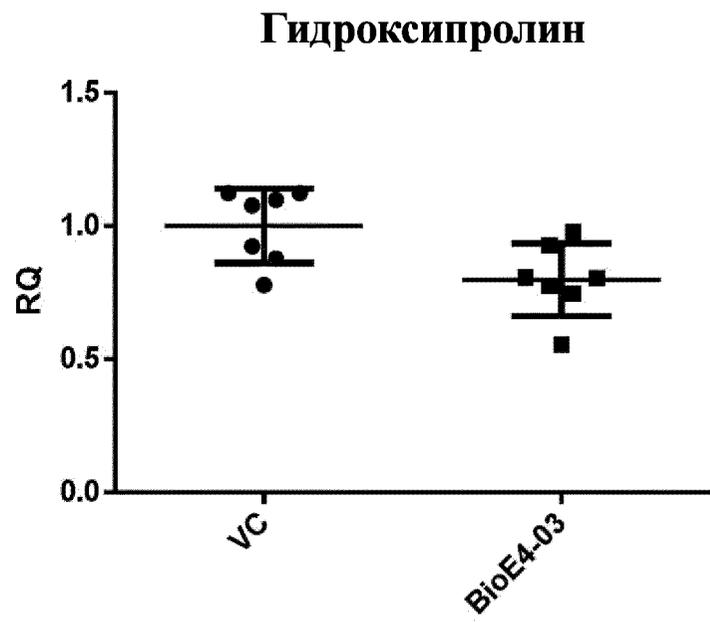
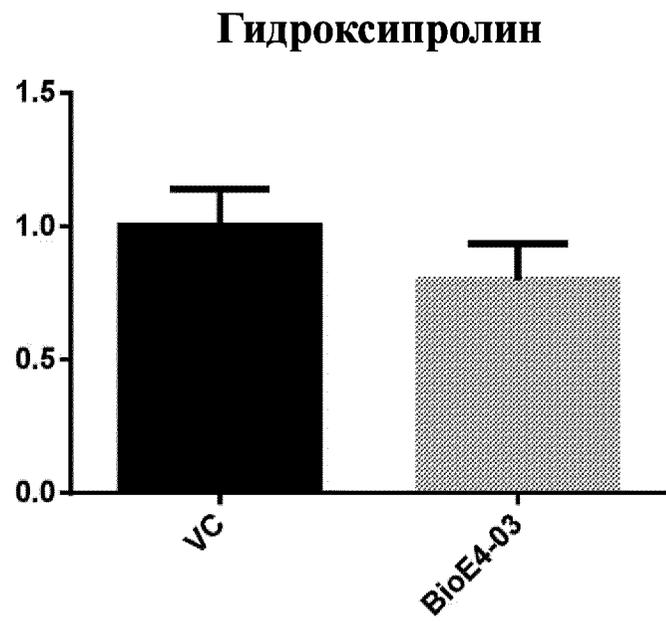
ФИГ. 18

MMP-1

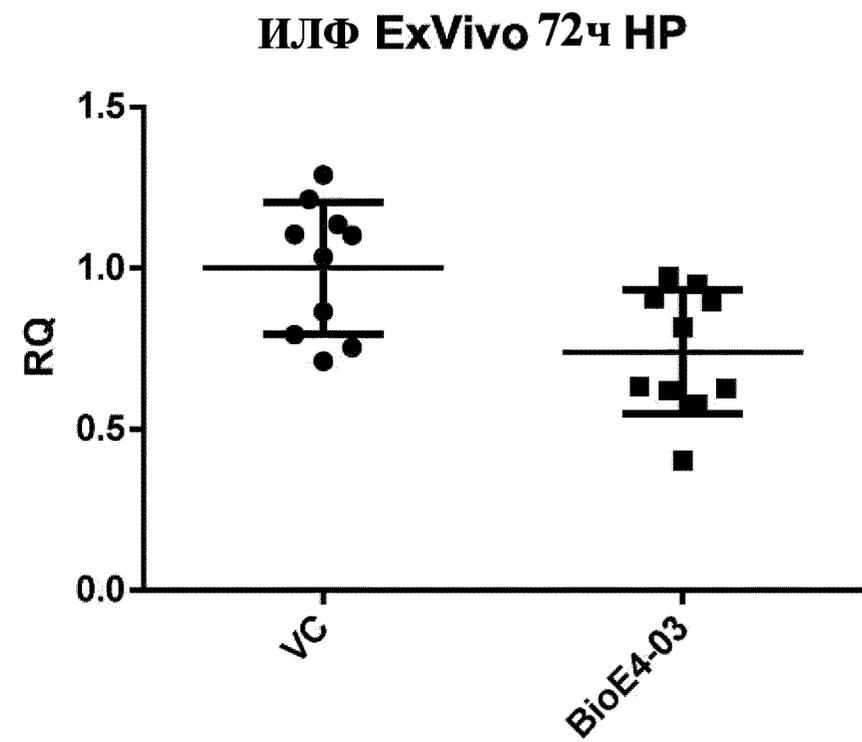
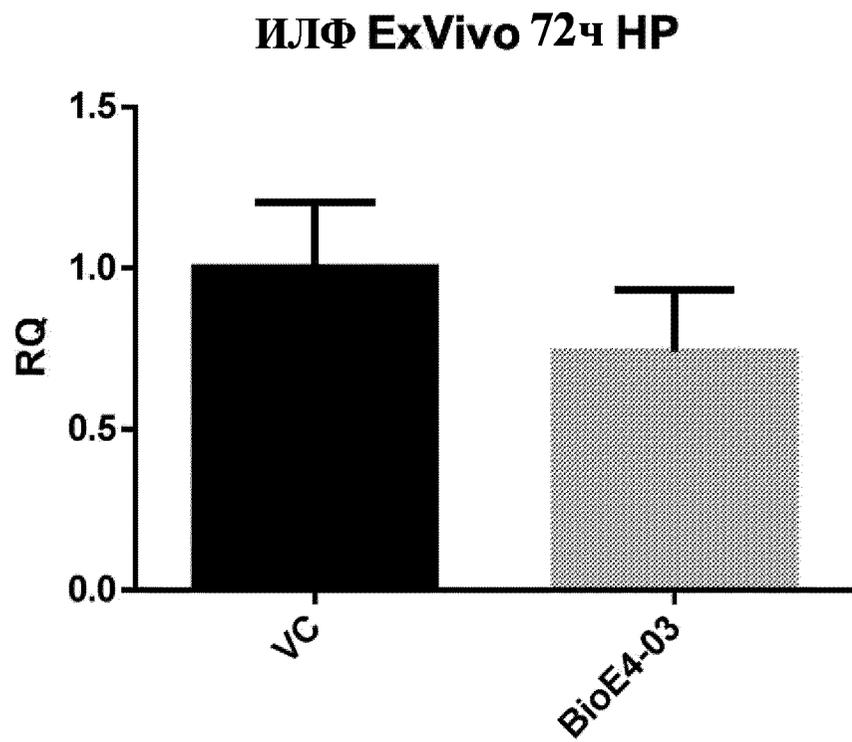


VC
T + BioScr
T + E4-03
T + 91-96
T + 91-87
T + 96-17

ФИГ. 19

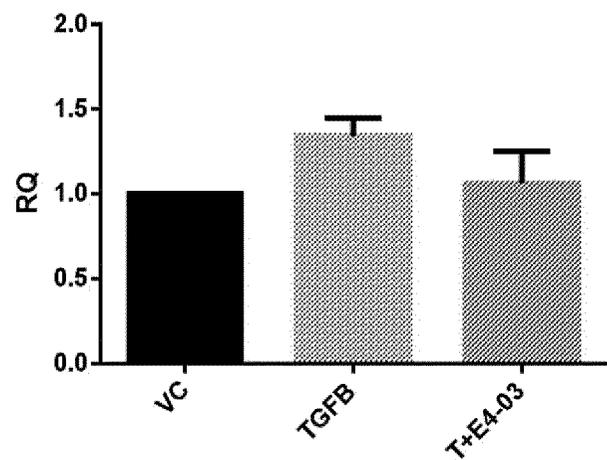


ФИГ. 20

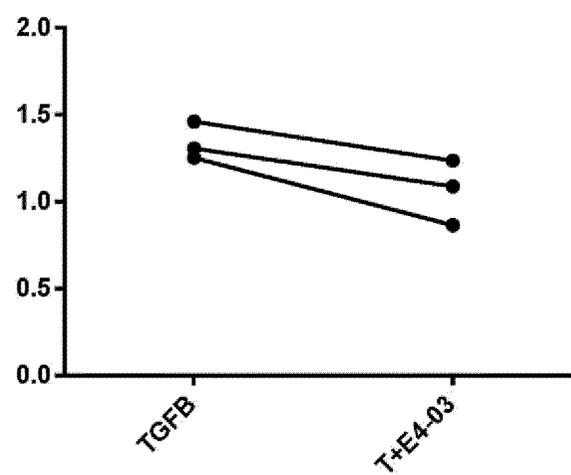


ФИГ. 21

**Сводные данные по гидроксипролину
в НЛ ExViVo средн. E4-03**

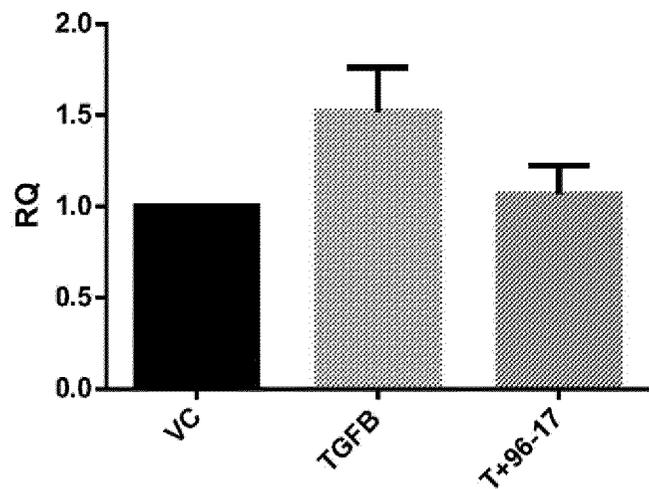


**Сводные данные по гидроксипролину
в НЛ ExViVo средн. E4-03**

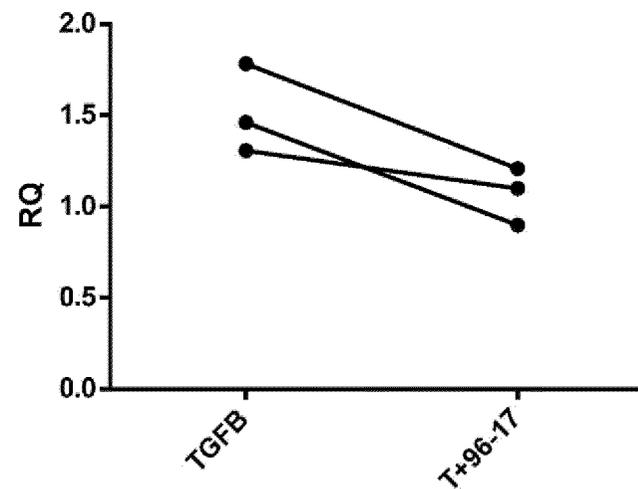


ФИГ. 22

Сводные данные по гидроксипролину
в НЛ ExViVo средн. 96-17

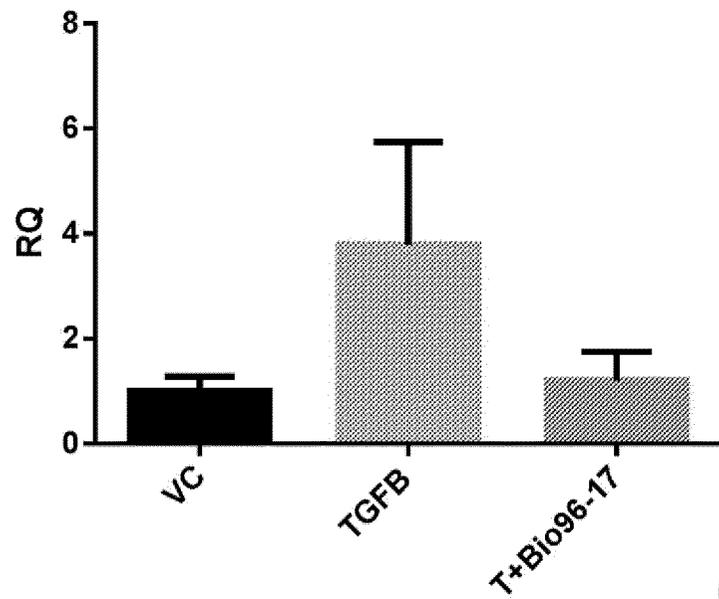


Сводные данные по гидроксипролину
в НЛ ExViVo средн. 96-17



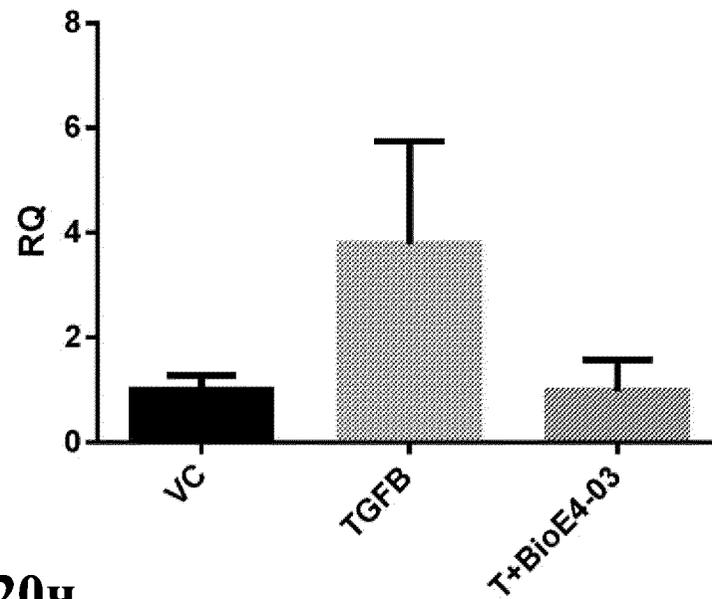
ФИГ. 23

NL-93 ExVivo Sups WB денситометрия



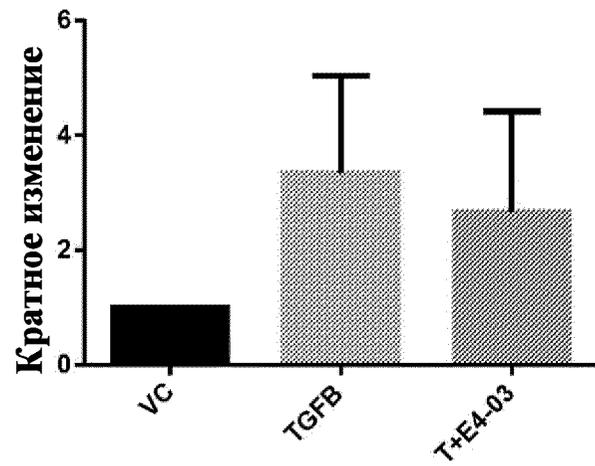
Col1A1 120ч

NL-93 ExVivo Sups WB денситометрия

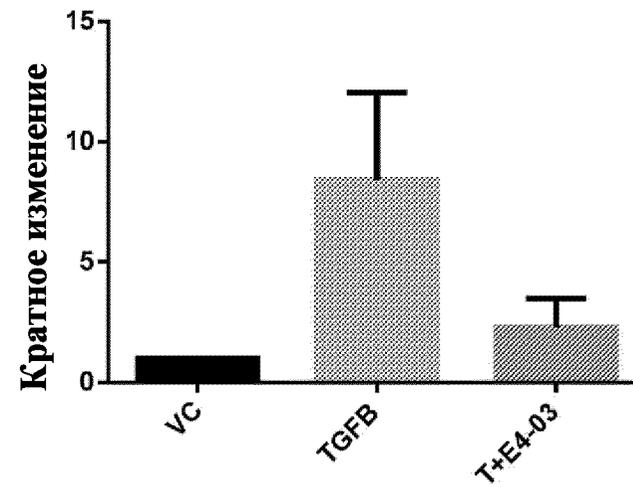


ФИГ. 24

Сводные данные по
кПЦР Col1A1:GAPDH NS ExVivo E4-03

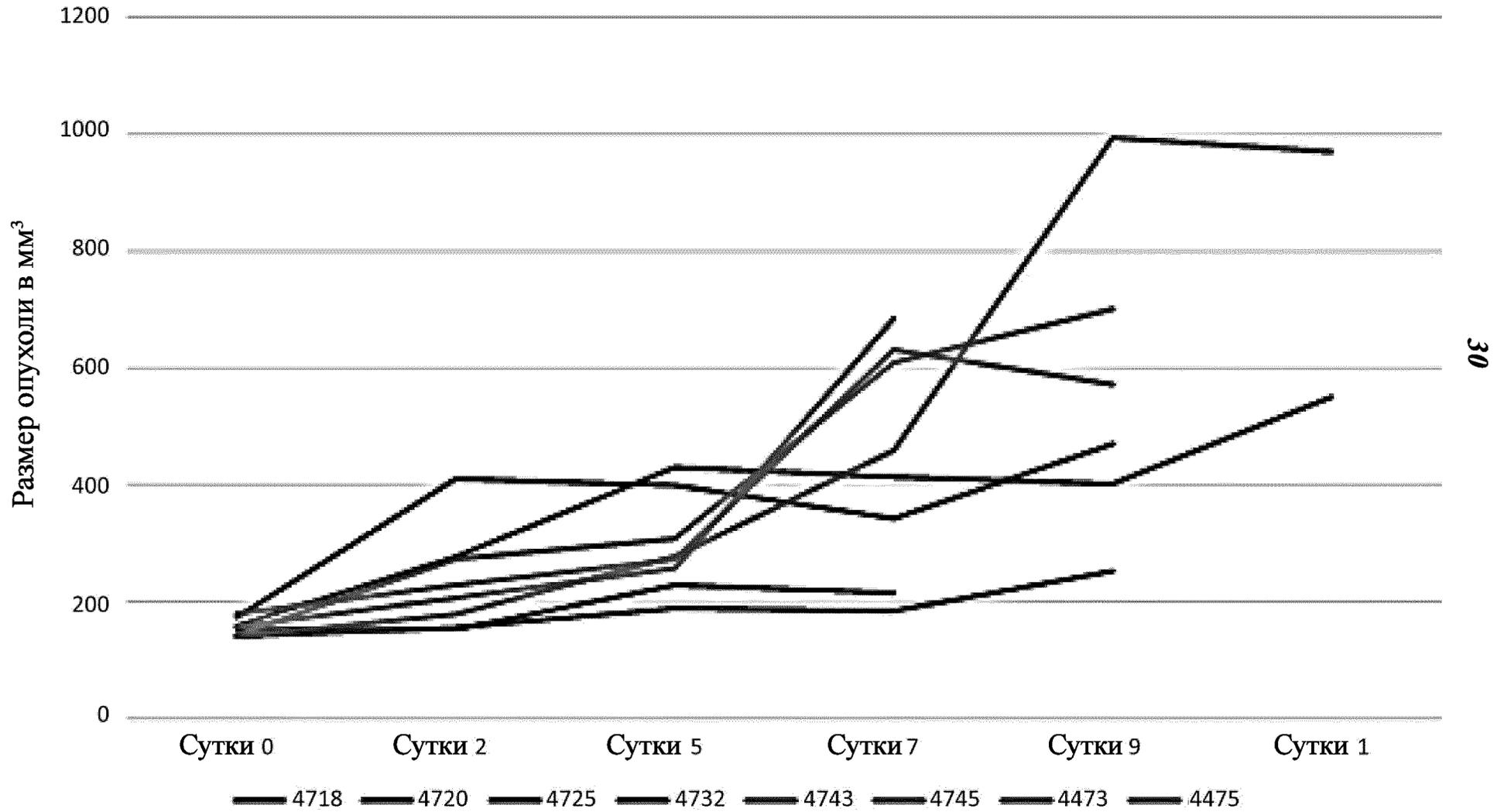


Сводные данные по
кПЦР FN:GAPDH NS ExVivo E4-03

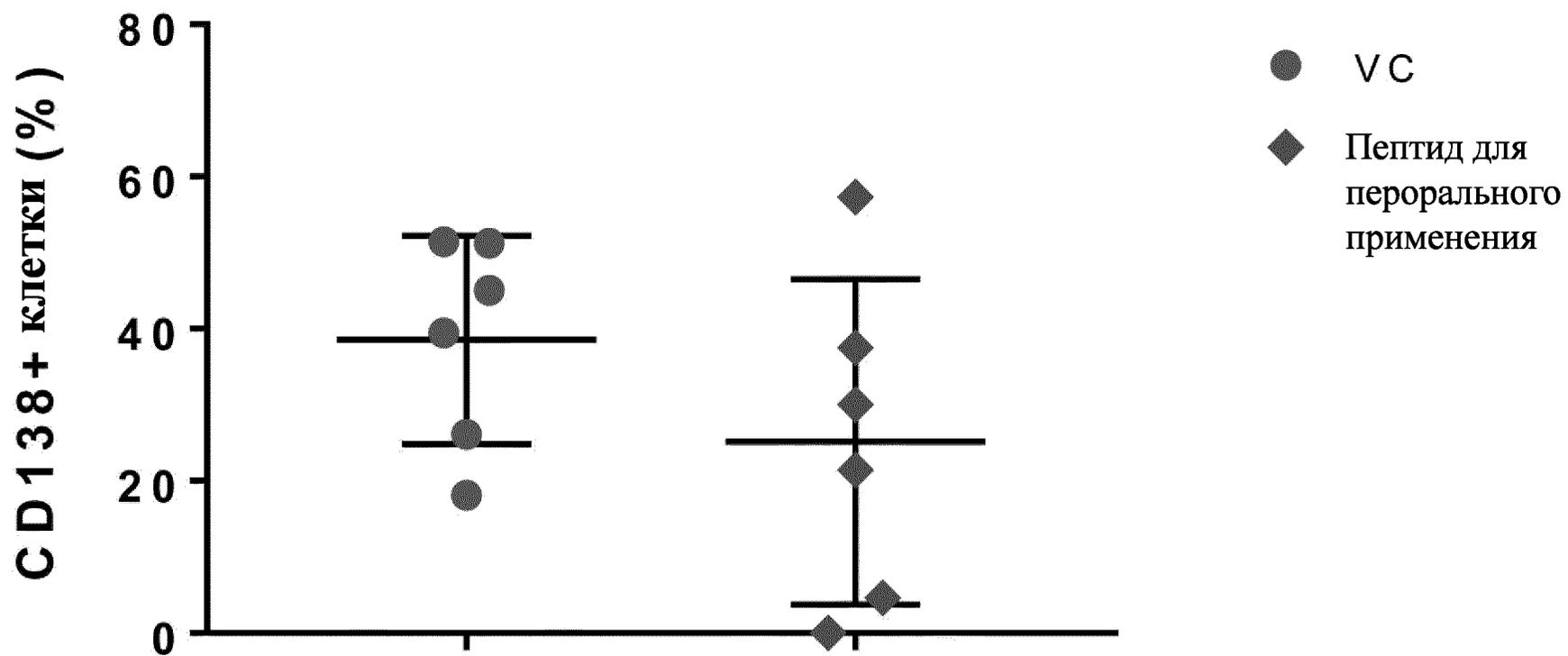


ФИГ. 25

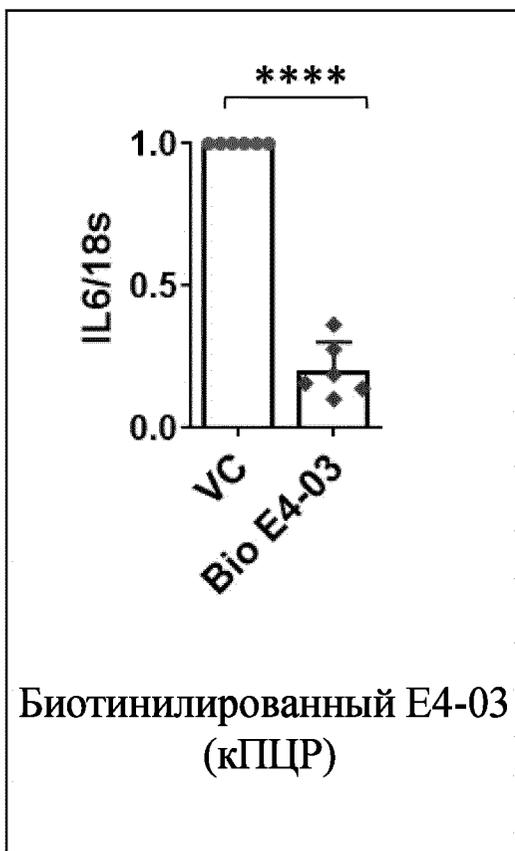
Рост опухоли



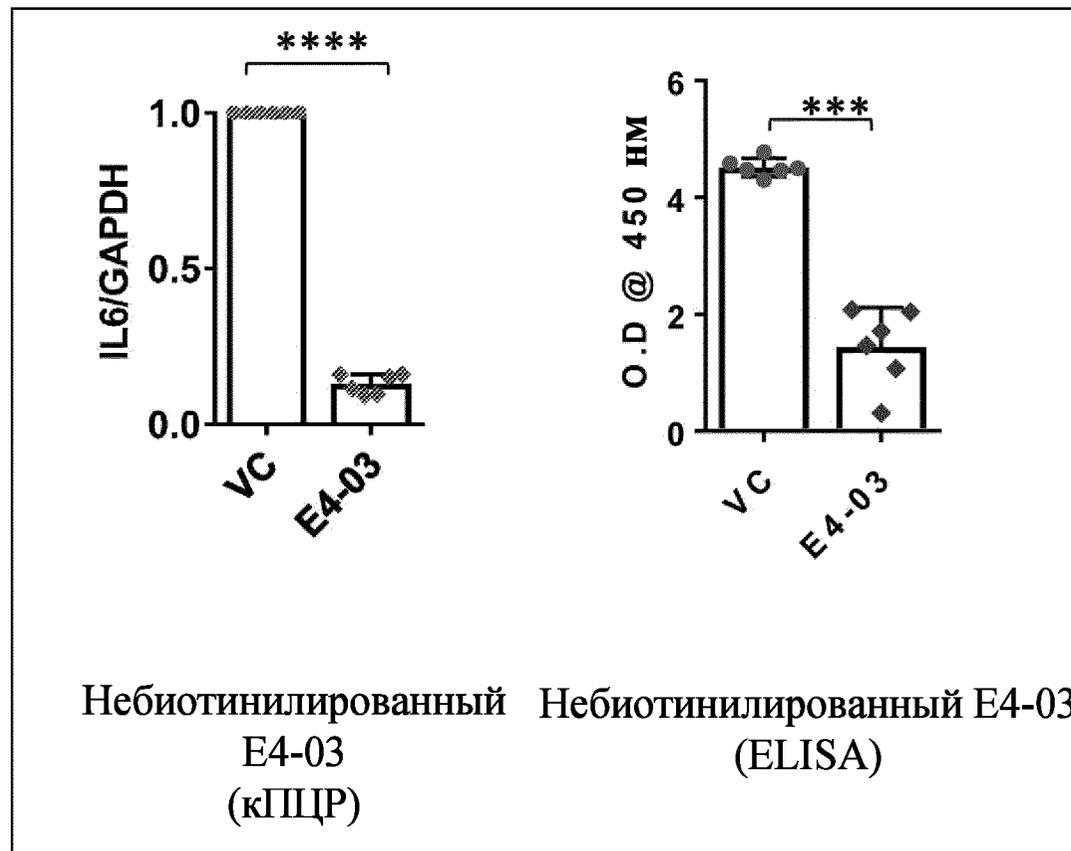
ФИГ. 26



ФИГ. 27

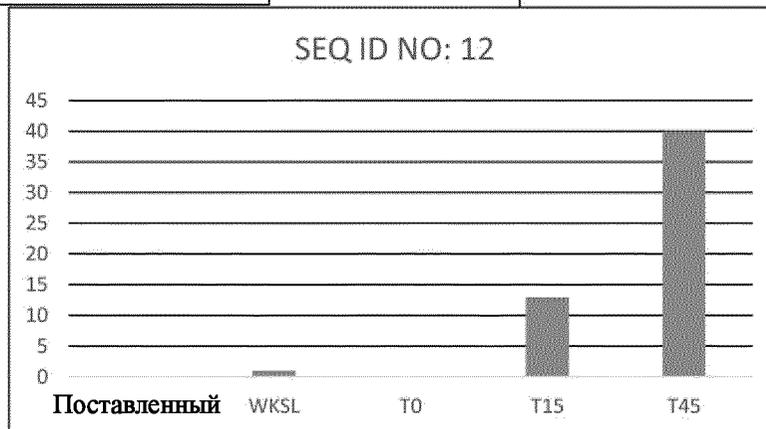
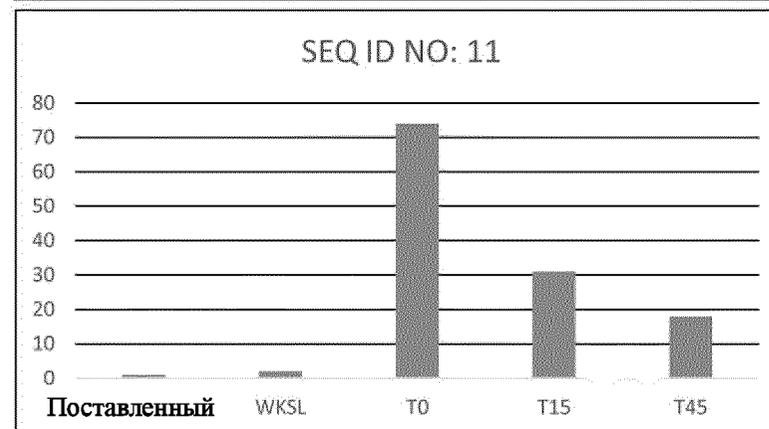
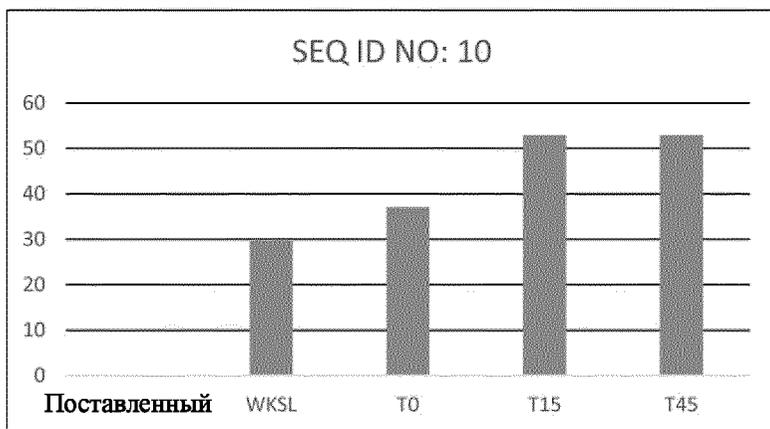
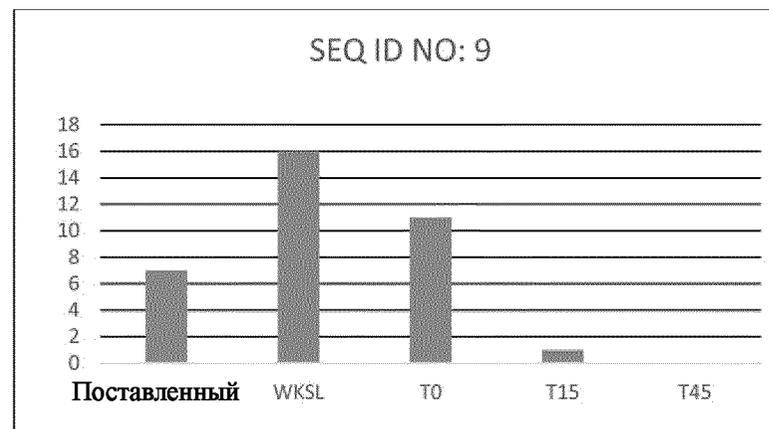
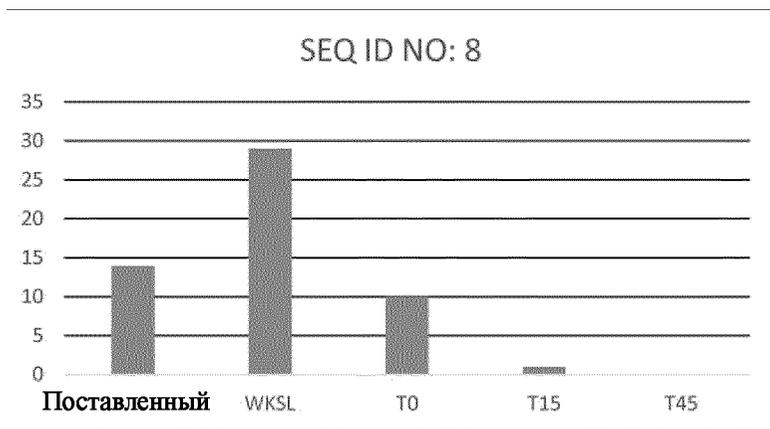


ФИГ. 28А

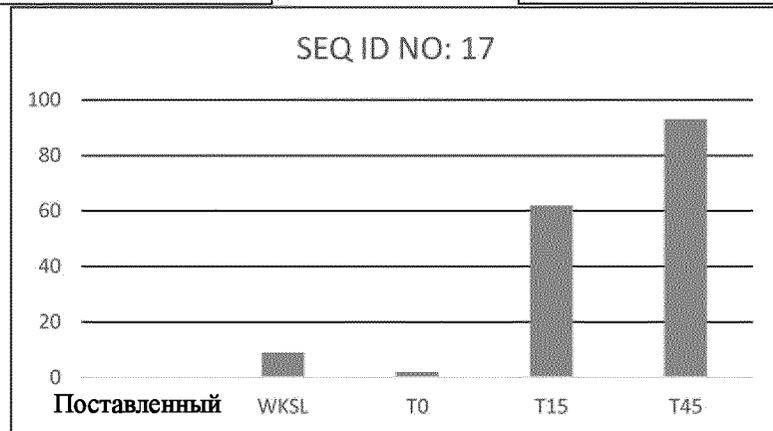
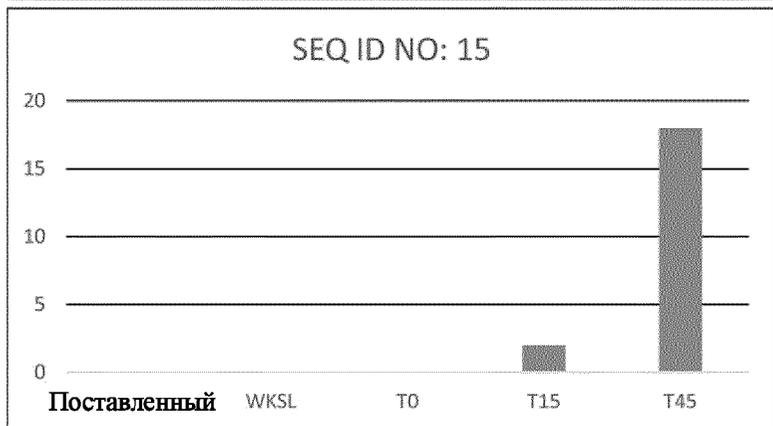
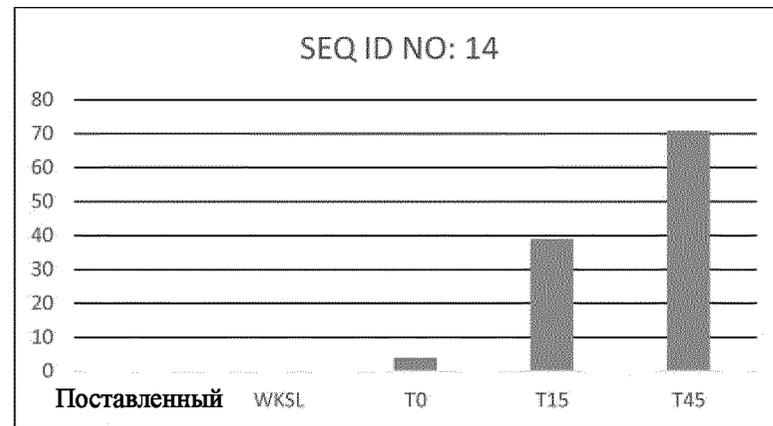
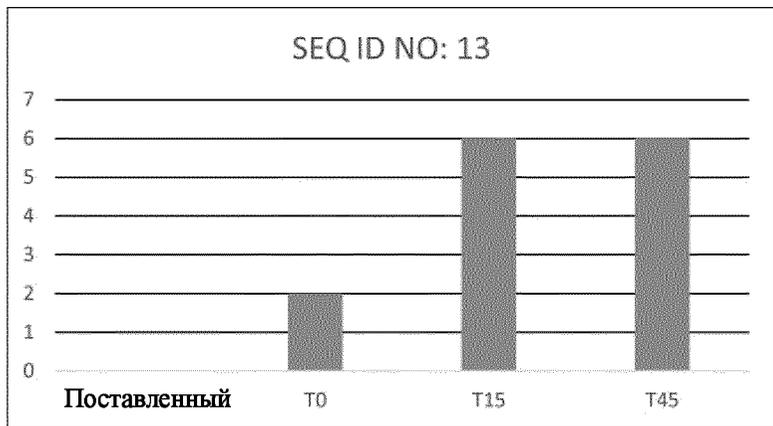


ФИГ. 28В

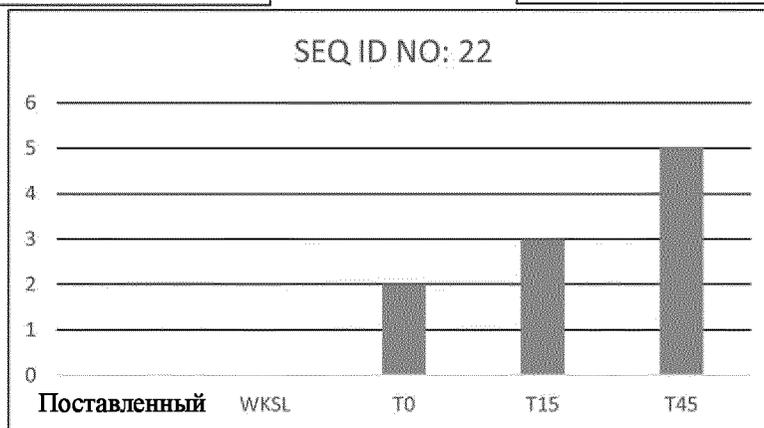
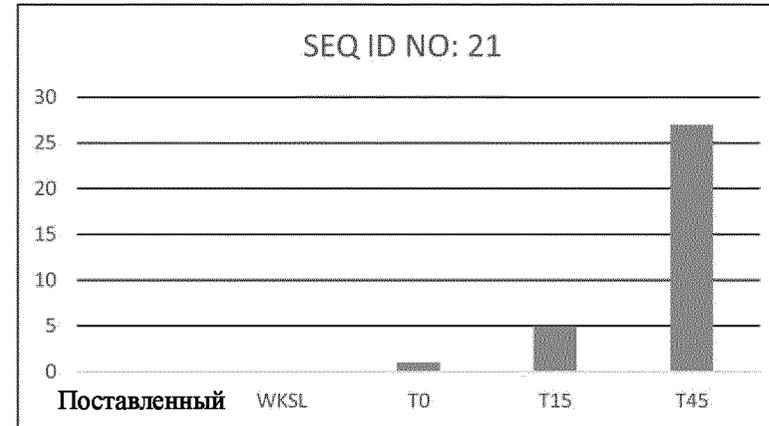
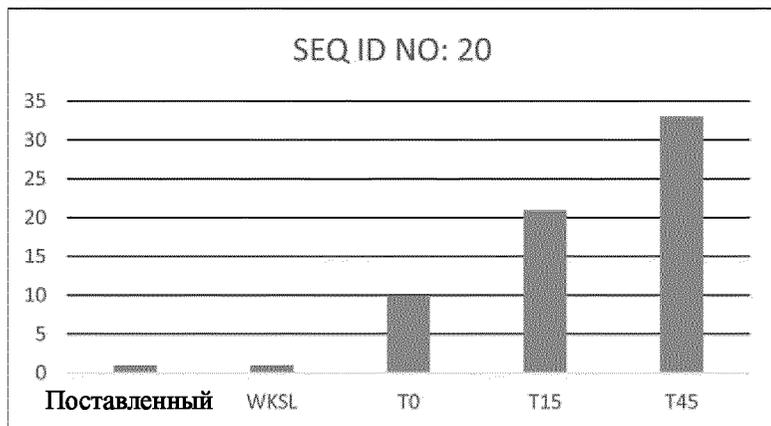
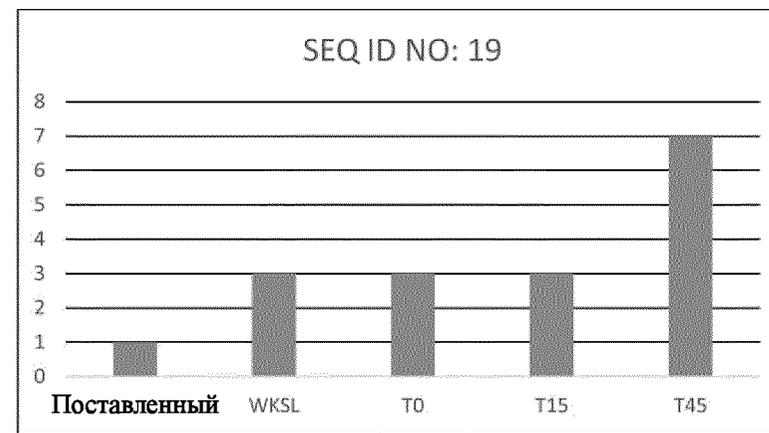
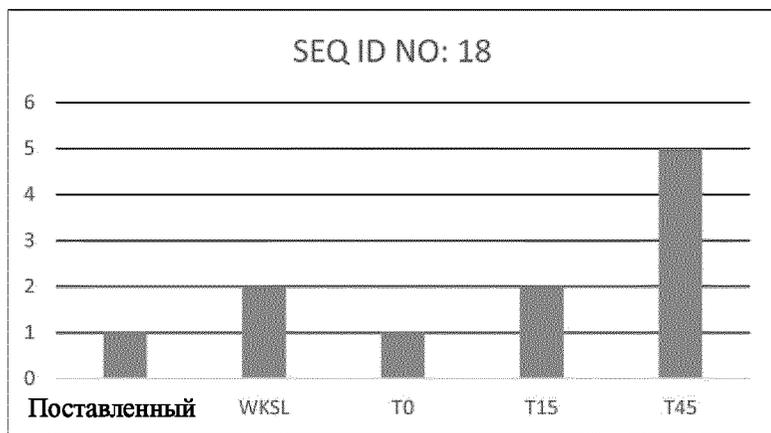
ФИГ. 28



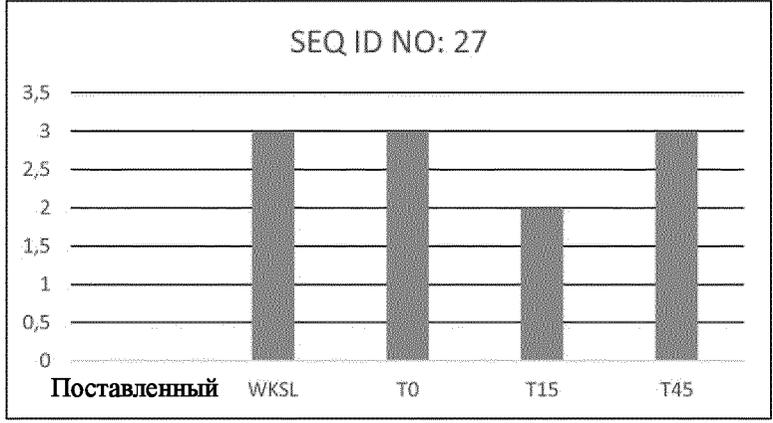
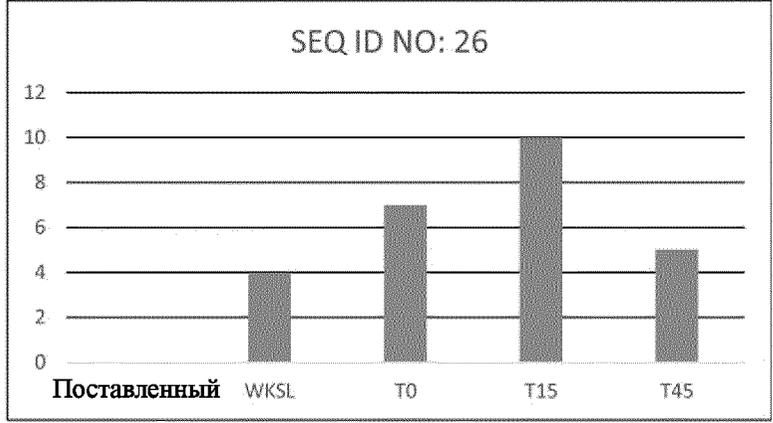
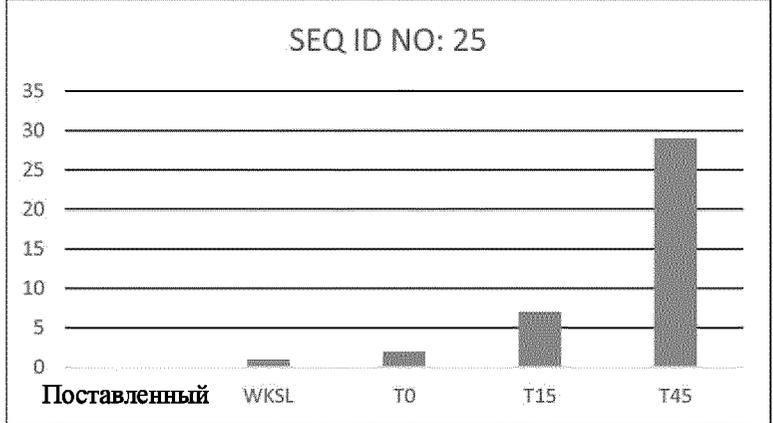
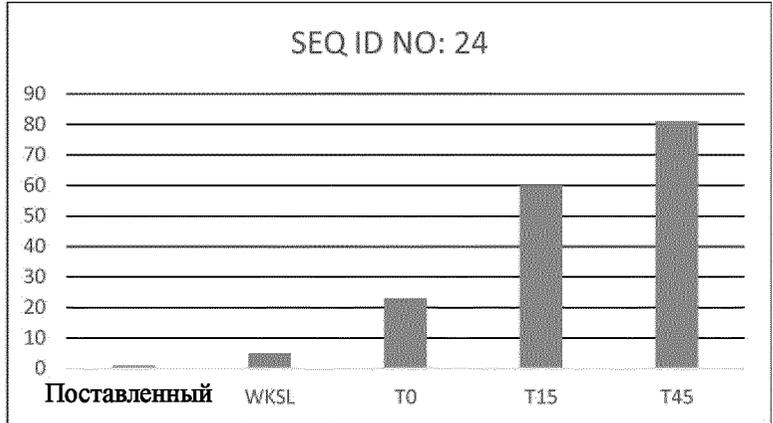
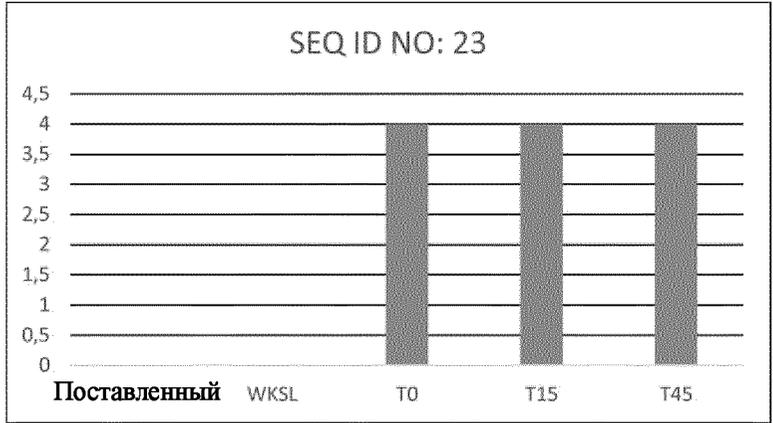
ФИГ. 29



ФИГ. 29 (продолжение)



ФИГ. 29 (продолжение)



ФИГ. 29 (продолжение)