

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
24 ноября 2022 (24.11.2022)



(10) Номер международной публикации
WO 2022/245249 A1

(51) Международная патентная классификация:

C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2022/000157

(22) Дата международной подачи:
13 мая 2022 (13.05.2022)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2021113908 17 мая 2021 (17.05.2021) RU

(71) Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ) (FEDERAL STATE AUTONOMOUS EDUCATIONAL INSTITUTION OF HIGHER EDUCATION I.M. SECHENOV FIST MOSCOW STATE MEDICAL UNIVERSITY OF THE MINISTRY OF HEALTH OF THE RUSSIAN FEDERATION (SECHENOV UNIVERSITY)) [RU/RU]; ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2 Москва, 119991, Moscow (RU).

(72) Изобретатели: ЗАМЯТНИН, Андрей Александрович (ZAMYATNIN, Andrey Aleksandrovich); Ленинский проспект, д. 44, кв. 107 Москва, 119334, Moscow (RU). СУНД, Суриндер Мохан (SOOND, Surinder Mohan); ул. Озерная, вл. 2А, кв. 638 Москва, 119361, Moscow (RU). САВВАТЕЕВА, Людмила Владимировна (SAVVATEEVA, Lyudmila Vladimirovna); ул. Ташкентская, д. 19, кв. 69 Москва, 109444, Moscow

(RU). ТАРАСОВ, Вадим Владимирович (TARASOV, Vadim Vladimirovich); Хорошевское шоссе, д. 58, кв. 22 Москва, 123007, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международной поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))

(54) Title: PEPTIDE COMPOUNDS FOR INDUCING APOPTOSIS IN A CANCER CELL

(54) Название изобретения: ПЕПТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКЕ

(57) Abstract: The invention relates to the field of the pharmaceutical industry and can be used as a therapeutic agent for treating diseases related to defective expression of cathepsin S and/or to BCL-2 family proteins. A peptide compound according to the present invention contains a sequence selected from pro-apoptotic BH3 domain-containing proteins and is characterized by an ability to induce apoptosis in a cancer cell. The invention also relates to the use of a peptide compound to induce apoptosis in a cancer cell and to prepare a drug for inducing apoptosis in a cancer cell, and further relates to a pharmaceutical composition for inducing apoptosis in a cancer cell, which contains the claimed peptide compound and a pharmaceutically acceptable carrier.

(57) Реферат: Изобретение относится к области фармацевтической промышленности, и может быть использовано в качестве терапевтического средства для лечения заболеваний, связанных с нарушенной экспрессией катепсина S и/или белками семейства BCL-2. Пептидное соединение, согласно изобретению, содержит последовательность, выбранную из проапоптотических BH3-домен-содержащих белков и характеризуется способностью индуцировать апоптоз в опухолевой клетке. Изобретение относится также к применению пептидного соединения для индукции апоптоза в опухолевой клетке, для приготовления лекарственного средства, вызывающего индукцию апоптоза в опухолевой клетке, а также к фармацевтической композиции для индукции апоптоза в опухолевой клетке, содержащей указанное пептидное соединение и фармацевтически приемлемый носитель.



WO 2022/245249 A1

ПЕПТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В ОПУХОЛЕВОЙ
КЛЕТКЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области фармацевтической промышленности, и
5 может быть использовано в качестве терапевтического средства для лечения
заболеваний, связанных с нарушенной экспрессией катепсина S и/или белками
семейства BCL-2.

Уровень техники

Три аспекта отличают опухоли человека различных типов и этиологии от
10 нормальных клеток: способность к более быстрой пролиферации, уклонение от
подавления клеточного роста и повышенная чувствительность к цитотоксической
терапии [Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011*
Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230]. Кроме того,
два очень важных процесса дают опухолевым клеткам преимущество в выживании.
15 Во-первых, клетки проявляют химиотерапевтическую устойчивость к
запрограммированному процессу гибели клеток, называемому апоптозом, и, во-
вторых, такие клетки развивают уникальное свойство повышенной подвижности,
что способствует их распространению во время метастазирования [Norouzi S, Gorgi
Valokala M, Mosaffa F, Zirak MR, Zamani P, Behravan J. Crosstalk in cancer resistance
20 *and metastasis. Crit Rev Oncol Hematol. 2018 Dec;132:145-153. doi:*
10.1016/j.critrevonc.2018.09.017. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30447920; Steeg PS.
Targeting metastasis. Nat Rev Cancer. 2016 Apr;16(4):201-18. doi: 10.1038/nrc.2016.25.
PMID: 27009393; PMCID: PMC7055530]. Центральное место в быстрой
пролиферации раковых клеток занимает убиквитин-зависимый протеасомный путь и
25 его потребность в таких ключевых клеточных процессах, как регуляция клеточного
цикла, клеточная дифференцировка и апоптоз. Так, влияние на протеасомы с целью
ингибирования быстрой пролиферации раковых клеток ранее уже рассматривалось в
качестве терапевтической стратегии. Важное значение здесь имеет эффект
блокирования протеасомной деградации убиквитинированных проапоптотических
30 белков и, по-видимому, усиления апоптоза раковых клеток, предположительно за
счет их накопления, как это видно на примере проапоптотического белка BAX [Li B,
Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in
tumor survival and progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11;97(8):3850-5.
doi: 10.1073/pnas.070047997. PMID: 10725400; PMCID: PMC18105]. Несмотря на то,

что точные механизмы протеолитического распада убиквитинированного белка ВАХ недостаточно исследованы, они могут представлять альтернативную стратегию терапевтического действия при раке.

Одной из групп внутриклеточных протеиназ, которые отвечают за
5 регулирование гибели и метастазирования опухолевых клеток, являются
лизосомальные цистеиновые катепсины, которые относятся к суперсемейству
папаин-подобных протеиназ [Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B,
Turk D. *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers.*
Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1824(1):68-88. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002. Epub
10 2011 Oct 12. PMID: 22024571; PMCID: PMC7105208; Soond SM, Kozhevnikova MV,
Townsend PA, Zamyatnin AA Jr. *Cysteine Cathepsin Protease Inhibition: An update on its
Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential in Cancer. Pharmaceuticals (Basel).*
2019 Jun 11;12(2):87. doi: 10.3390/ph12020087. PMID: 31212661; PMCID:
PMC6630828; Soond SM, Kozhevnikova MV, Zamyatnin AA Jr. 'Patchiness' and basic
15 cancer research: unravelling the proteases. *Cell Cycle.* 2019 Aug;18(15):1687-1701. doi:
10.1080/15384101.2019.1632639. Epub 2019 Jun 24. PMID: 31213124; PMCID:
PMC6649598]. Хотя они обычно экспрессируются и находятся в лизосомах, в начале
заболевания или из-за ряда сигналов, связанных с началом заболевания, некоторые
из этих катепсинов секретируются во внеклеточный матрикс (extracellular matrix,
20 ECM) [Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. *Pericellular pH affects distribution and
secretion of cathepsin B in malignant cells. Cancer Res.* 1994 Dec 15;54(24):6517-25.
PMID: 7987851; Kramer L, Turk D, Turk B. *The Future of Cysteine Cathepsins in Disease
Management. Trends Pharmacol Sci.* 2017 Oct;38(10):873-898. doi:
10.1016/j.tips.2017.06.003. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28668224; Reiser J, Adair B,
25 Reinheckel T. *Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. J Clin Invest.*
2010 Oct;120(10):3421-31. doi: 10.1172/JCI42918. Epub 2010 Oct 1. PMID: 20921628;
PMCID: PMC2947230], где они могут беспрепятственно расщеплять компоненты
ECM и, таким образом, способствовать росту опухолевых клеток и их
распространению. Одной из таких протеиназ является катепсин S, который может
30 быть подходящим кандидатом для таргетной терапии [Soond SM, Kozhevnikova MV,
Townsend PA, Zamyatnin AA Jr. *Cysteine Cathepsin Protease Inhibition: An update on its
Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential in Cancer. Pharmaceuticals (Basel).*
2019 Jun 11;12(2):87. doi: 10.3390/ph12020087. PMID: 31212661; PMCID:
PMC6630828; Rudzińska M, Parodi A, Soond SM, Vinarov AZ, Korolev DO, Morozov AO,

Daglioglu C, Tutar Y, Zamyatnin AA Jr. *The Role of Cysteine Cathepsins in Cancer Progression and Drug Resistance. Int J Mol Sci.* 2019 Jul 23;20(14):3602. doi: 10.3390/ijms20143602. PMID: 31340550; PMCID: PMC6678516]. Хотя экспрессия катепсина S в тканях относительно ограничена, было отмечено, что он экспрессируется под действием ряда физиологических условий, связанных с гипоксией в месте опухоли или в условиях химиотерапевтического воздействия. Следовательно, он может проявлять свою активность в качестве индуцибельного фактора, который, в частности, способствует развитию опухоли и, возможно, устойчивости к химиотерапии (Soond, S.M.; Savvateeva, L.V.; Makarov, V.A.; Gorokhovets, N.V.; Townsend, P.A.; Zamyatnin, A.A., Jr. *Cathepsin S Cleaves BAX as a Novel and Therapeutically Important Regulatory Mechanism for Apoptosis. Pharmaceutics* 2021, 13, 339). Кроме того, было обнаружено, что экспрессия катепсина S вносит вклад в развитие сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза [Wu H, Du Q, Dai Q, Ge J, Cheng X. *Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. J Atheroscler Thromb.* 2018 Feb 1;25(2):111-123. doi: 10.5551/jat.RV17016. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28978867; PMCID: PMC5827079], а также участвует в деградации белков во время опосредованной МНС-II презентации опухолевого антигена и дифференцировки опухолевых макрофагов M1-M2 [Yang M, Liu J, Shao J, Qin Y, Ji Q, Zhang X, Du J. *Cathepsin S-mediated autophagic flux in tumor-associated macrophages accelerate tumor development by promoting M2 polarization. Mol Cancer.* 2014 Mar 2;13:43. doi: 10.1186/1476-4598-13-43. PMID: 24580730; PMCID: PMC4015740], что только подчеркивает разнообразную активность катепсина S при различных нормальных и патологических состояниях [Honey K, Rudensky AY. *Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. Nat Rev Immunol.* 2003 Jun;3(6):472-82. doi: 10.1038/nri1110. PMID: 12776207].

Из уровня техники известны цитотоксические средства, в частности, Таксол и его терапевтические аналоги [Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. *The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;44(5):355-61. doi: 10.1007/s002800050989. PMID: 10501907; Weaver BA. *How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Mol Biol Cell.* 2014 Sep 15;25(18):2677-81. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916. PMID: 25213191; PMCID: PMC4161504; Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Allouch A, Law F, Sabino D, De Jong D, Thoreau M, Mintet E, Dugué D, Piacentini M, Gougeon ML, Jaulin F, Bertrand P, Brenner C, Ojcius DM, Kroemer G, Modjtahedi N, Deutsch E, Perfettini JL. *Anticancer*

chemotherapy and radiotherapy trigger both non-cell-autonomous and cell-autonomous death. Cell Death Dis. 2018 Jun 18;9(7):716. doi: 10.1038/s41419-018-0747-y. PMID: 29915308; PMCID: PMC6006149], которые действуют путем ингибирования деполимеризации тубулина и таким образом вызывают остановку цикла ряда быстро пролиферирующих раковых клеток и последующую гибель клеток путем апоптоза. Однако некоторые клетки могут проявлять устойчивость к вызывающим гибель свойствам таких соединений, и эта устойчивость обычно связана с поздними стадиями рака, которые обладают повышенной способностью к метастазированию опухоли [Einzig AI, Gorowski E, Sasloff J, Wiernik PH. Phase II trial of taxol in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cancer Invest. 1991;9(2):133-6. doi: 10.3109/07357909109044223. PMID: 1677827; Sangrajrang S, Fellous A. Taxol resistance. Chemotherapy. 2000 Sep-Oct;46(5):327-34. doi: 10.1159/000007306. PMID: 10965098].

Для поиска потенциальных катепсин-специфических антагонистов, которые могут быть особенно перспективными для лечения рака, определяют различные пептидные последовательности, на основе которых возможна разработка терапевтических средств [Rudzińska M, Parodi A, Maslova VD, Efremov YM, Gorokhovets NV, Makarov VA, Popkov VA, Golovin AV, Zernii EY, Zamyatnin AA. Cysteine Cathepsins Inhibition Affects Their Expression and Human Renal Cancer Cell Phenotype. Cancers (Basel). 2020 May 21;12(5):1310. doi: 10.3390/cancers12051310. PMID: 32455715; PMCID: PMC7281206, Soond SM, Kozhevnikova MV, Townsend PA, Zamyatnin AA Jr. Cysteine Cathepsin Protease Inhibition: An update on its Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential in Cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2019 Jun 11;12(2):87. doi: 10.3390/ph12020087. PMID: 31212661; PMCID: PMC6630828]. В целом, с учетом последних достижений в определении сайтов расщепления субстрата с использованием скрининга пептидных библиотек, появилась более четкая картина механизмов регуляции ингибиторами специфичности и степени взаимодействия катепсин-субстрат. Так, недавно описаны синтетические пептиды (производные фторметилкетонов или хлорметилкетонов тетрапептидов структуры R1-pept-R2, где PEPT – одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE; R1 – одна из защитных групп: ацетильная (Ac), бензилоксикарбонильная (Z) или отсутствует; R2 – производные фторметилкетона (FMK) или хлорметилкетона (CMK)), обладающие высокой аффинностью к каталитической триаде цистеиновых катепсинов и способностью специфически ингибировать протеолитическую

активность цистеиновых катепсинов [Rudzińska, M.; Parodi, A.; Maslova, V.D.; Efremov, Y.M.; Gorokhovets, N.V.; Makarov, V.A.; Popkov, V.A.; Golovin, A.V.; Zernii, E.Y.; Zamyatnin, A.A. Cysteine Cathepsins Inhibition Affects Their Expression and Human Renal Cancer Cell Phenotype. *Cancers* 2020, 12 (5), 1310].

5 Катепсины играют взаимоисключающую роль в развитии, так катепсин S опосредует дифференцировку ассоциированных с опухолью макрофагов M1-M2, в то время как катепсин С требуется для дифференцировки нейтрофилов, индуцированной опухолью N1-N2 [Yang M, Liu J, Shao J, Qin Y, Ji Q, Zhang X, Du J. *Cathepsin S-mediated autophagic flux in tumor-associated macrophages accelerate tumor*
10 *development by promoting M2 polarization. Mol Cancer. 2014 Mar 2;13:43. doi: 10.1186/1476-4598-13-43. PMID: 24580730; PMCID: PMC4015740*]. Следовательно, нацеливание на конкретные субстраты с целью блокирования их способности воздействовать на катепсины может представлять альтернативный подход.

Наиболее близкими к заявляемым пептидам являются «ВН-3 миметики»
15 [Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW, Strasser A. *BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. Cancer Cell. 2018 Dec 10;34(6):879-891. doi: 10.1016/j.ccell.2018.11.004. PMID: 30537511; Walensky LD. Targeting BAX to drug death directly. Nat Chem Biol. 2019 Jul;15(7):657-665. doi: 10.1038/s41589-019-0306-6. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31209350*], где пептидные терапевтические антагонисты
20 определяются из белковых областей взаимодействия между проапоптотическими и антиапоптотическими ВН3-домен-содержащими белками. Например, терапевтический агент АВТ-199 нарушает ингибирующую активность Bcl-2 с белком ВАХ для лечения лейкоза, тем самым позволяя ВАХ олигомеризоваться и индуцировать проницаемость митохондриальной внешней мембраны (MOMP) и
25 гибель клеток через активацию внутреннего пути апоптоза [Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DC, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT, Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park CM, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir
30 SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse RA, Rosenberg SH, Elmore SW. *ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat Med. 2013 Feb;19(2):202-8. doi: 10.1038/nm.3048. Epub 2013 Jan 6. PMID: 23291630*].

Однако АВТ-199 как селективный ингибитор BCL-2 является доказанно эффективным только в отношении гематологических злокачественных опухолей, тогда как ингибирование определенных катепсинов, расщепляющих проапоптотические белки, например, BAX, могут индуцировать гибель злокачественных клеток различного типа и с наибольшим эффектом.

В последнее время возник большой интерес к идентификации катепсинов, способных расщеплять и дезактивировать проапоптотические BНЗ-белки, с целью выявления тех ферментов, на которые можно будет терапевтически воздействовать. Некоторые катепсины могут расщеплять цитоплазматические -BAX, -BID, -Bcl-x1 и -Mcl-x1 [Cao X, Deng X, May WS. *Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. Blood. 2003 Oct 1;102(7):2605-14. doi: 10.1182/blood-2003-01-0211. Epub 2003 Jun 19. PMID: 12816867; Appelqvist H, Johansson AC, Linderöth E, Johansson U, Antonsson B, Steinfeld R, Kågedal K, Ollinger K. *Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. Ann Clin Lab Sci. 2012 Summer;42(3):231-42. PMID: 22964611; Cirman T, Oresić K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, Salvesen GS, Turk B. *Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. J Biol Chem. 2004 Jan 30;279(5):3578-87. doi: 10.1074/jbc.M308347200. Epub 2003 Oct 27. PMID: 14581476; Cirman T, Oresić K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, Salvesen GS, Turk B. *Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. J Biol Chem. 2004 Jan 30;279(5):3578-87. doi: 10.1074/jbc.M308347200. Epub 2003 Oct 27. PMID: 14581476]. Поэтому необходимо обеспечить стабилизацию проапоптотических BНЗ-белков (таких как BAX) посредством ингибирования катепсина, позволяя этим BНЗ-белкам вызывать апоптоз в отсутствие ингибирующего действия антиапоптотических BНЗ-белков (таких как Bcl-x1). Как правило для этого может потребоваться разработка, по крайней мере, двух различных терапевтических средств, где первый агент должен быть нацелен на катепсин (что позволяет стабилизировать BAX), второй - на BAX (или Bcl-2 / Bcl-x1), тем самым нарушая их ингибирующее взаимодействие и позволяя преобладать проапоптотической активности BAX. Хотя этот подход действительно имеет хороший потенциал для индивидуального нацеливания белок-связывающих партнеров, недостатки заключаются в том, что такой подход потребует****

значительного количества времени для определения эффективности отдельных терапевтических средств и того, насколько эффективным может быть каждый из них при совместном действии. Следовательно, необходимо изучить альтернативные стратегии для разработки схемы, в которой может быть осуществлено нацеливание
5 не только на катепсин, но и его производные проапоптотические субстраты (путем отделения его от антиапоптотического регулятора), которые в совокупности являются важными посредниками в гибели раковых клеток через апоптоз.

Технической проблемой, на решение которой направлено изобретение, является создание новых пептидных последовательностей, способных индуцировать
10 апоптоз в опухолевой клетке, а также ингибировать функциональную (протеолитическую) активность катепсина S, с перспективой использования в разработке противоопухолевых терапевтических средств.

Раскрытие сущности изобретения

Техническим результатом изобретения является создание специфических пептидов (пептидных соединений), способных подавлять активность катепсина S и
15 индуцировать апоптоз за счет ингибирования взаимодействия ингибиторного белка Bcl-x1 (или Bcl-2) с BAX, стабилизации мономерного BAX, а также ингибирования катепсин S-опосредованный протеолиз полиубиквитинированного производного BAX (p120BAX).

Технический результат достигается за счет синтеза специфического пептидного соединения, содержащего последовательность, выбранную из проапоптотических ВНЗ-домен-содержащих белков, характеризующегося
20 способностью индуцировать апоптоз в опухолевой клетке.

В одном из частных вариантов реализации изобретения пептидное
25 соединение содержит аминокислотную последовательность FFSFGGAL или аминокислотную последовательность, имеющую гомологичность по меньшей мере 50% с данной последовательностью. В другом частном варианте реализации изобретения пептидное соединение содержит аминокислотную последовательность WFGFTGSL или аминокислотную последовательность, имеющую гомологичность с
30 ней по меньшей мере 50%, например, аминокислотную последовательность KLNRRWWFGFTGSL.

Изобретение также включает фармацевтическую композицию для индукции апоптоза в опухолевой клетке, содержащую указанное пептидное соединение и фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, изобретение относится к

применению указанного пептидного соединения для индукции апоптоза в опухолевой клетке и приготовлению лекарственного средства, вызывающего индукцию апоптоза в опухолевой клетке.

Заявляемые соединения могут воздействовать не только на катепсин S, но и на его последующий проапоптотический / антиапоптотический белковый комплекс-мишень, т.е. являются едиными терапевтическими агентами, обладающими двойной специфичностью. Главное преимущество такого агента (агентов) состоит в том, что он обладает способностью специфически воздействовать на более чем один белковый промежуточный продукт как часть главного регуляторного белкового комплекса, специфичного для пути передачи сигналов, имеющего ключевое значение для развития и прогрессирования рака.

Частные варианты пептидов, являющихся производными от Pit2 и имеющих последовательности FFSFGGAL (далее CS-PEP1), WFGFTGSL (CS-PEP3); KLNRRWWFGFTGSL (CS-PEP4), а также пептидные производные последовательностей ВНЗ-домен-содержащих белков подходят для любого терапевтического применения, которое включает действие катепсина S (или других катепсинов), проапоптотические белки, содержащие ВНЗ-домен, или антиапоптотические белки, содержащие ВНЗ-домен, ответственные за регуляцию апоптоза (Фиг. 1).

20 **Краткое описание чертежей**

Изобретение поясняется иллюстрациями, где на Фиг. 1 представлена схема ингибирующего действия заявляемых пептидов (желтый круг). LMP- проницаемость лизосомальной мембраны; MOMP - проницаемость наружной мембраны митохондрий.

25 На Фиг.2 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие, что катепсин S опосредует расщепление BAX *in vitro* и в клетках млекопитающих.

На Фиг.3 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие, что CS-PEP1 ингибирует опосредованное катепсином S расщепление BAX *in vitro*.

30 На Фиг.4 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие, что CS-PEP1 ингибирует расщепление Bcl-x1, но дестабилизирует его *in vitro* и в клетках млекопитающих.

На Фиг.5 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие, что CS-PEP1 стабилизирует белок BAX при экспрессии катепсина S.

На Фиг.6 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие, что CS-PEP1, 3 и 4 стабилизируют уровни эндогенного белка BAX, тогда как CS-PEP1 и 3 - дополнительно стабилизируют уровень эндогенного белка BAX в присутствии экспрессии катепсина.

5 На Фиг.7 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие, что обработка клеток CS-PEP1 ингибирует опосредованное катепсином S расщепление полиубиквитинированного производного p120BAX BAX.

На Фиг. 8 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие, что CS-PEP1 вызывает апоптоз и активацию каспазы-3.

10 **Осуществление изобретения**

Ниже представлено более детальное описание реализации заявляемого изобретения, которое не ограничивает объем притязаний заявляемого изобретения, а демонстрирует возможность осуществления изобретения с достижением заявляемого технического результата.

15 Изобретение иллюстрируется с использованием пептидных соединений CS-PEP1, 3, 4, имеющих последовательности FFSFGGAL, WFGFTGSL, KLNRRWWFGFTGSL соответственно.

Исходно было определено, что проапоптотический белок BAX и антиапоптотический белок Bcl-x1 являются субстратами для катепсина S. Катепсины также могут регулироваться белками-ингибиторами (цистатинами) человека, которые предотвращают чрезмерную активацию нежелательной протеолитической активности катепсинов [Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1824(1):68-88. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002. Epub 2011 Oct 12. PMID: 22024571; PMCID: PMC7105208*].

20 Была идентифицирована пептидная область, которая берет свое начало от ингибитора протеиназы, имеющего сходство с антиапоптотическим белком Bcl-x1. Для этой цели был использован растительный белок-ингибитор папаин-подобных протеиназ с последовательностью Pit2 [Misas Villamil JC, Mueller AN, Demir F, Meyer U, Ökmen B, Schulze Hüynck J, Breuer M, Dauben H, Win J, Huesgen PF, Doehlemann G. *A fungal substrate mimicking molecule suppresses plant immunity via an inter-kingdom conserved motif. Nat Commun. 2019 Apr 5;10(1):1576. doi: 10.1038/s41467-019-09472-8. PMID: 30952847; PMCID: PMC6450895*]. С использованием платформы BLAST при
30 поиске по базе данных NCBI

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), параметры поиска: expected threshold=10, Matrix BLOSUM45, Gap Costs Existence 15; Extensions:2), был идентифицирован ряд пептидов из аминокислотной последовательности ингибитора Pit2, которые также присутствуют практически со 100% идентичностью в α -5 спиральной петле Bcl-xl (и имеют последовательности FFSFGGAL (обозначен CS-PEP1); WFGFTGSL (обозначен CS-PEP3); KLNRRWWFGFTGSL (обозначен CS-PEP4)). Эта петля α -5 антиапоптотического белка Bcl-xl взаимодействует с ВНЗ доменом проапоптотического BAX и это взаимодействие является ключевым этапом, ответственным за Bcl-xl-опосредованное ингибирование белка BAX во время активации апоптоза [Renault TT, Dejean LM, Manon S. *A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2. Mech Ageing Dev. 2017 Jan;161(Pt B):201-210. doi: 10.1016/j.mad.2016.04.007. Epub 2016 Apr 23. PMID: 27112371*].

Пептиды были синтезированы компанией Peptech Inc (Санкт-Петербург, Российская Федерация) методом твердофазного пептидного синтеза, при котором пептиды получают путем соединения различных аминокислот друг с другом с последующей химической модификацией для введения функциональных групп. Способы химического синтеза пептидов широко известны и хорошо описаны с помощью известных в данной области техники методов [US 6015881; Mergler и др., *Tetrahedron Letters* 29, 1988, сс.4005-4008; Mergler и др., *Tetrahedron Letters* 29, 1988, сс.4009-4012; *Peptides, Chemistry and Biology*, под ред. Kamber и др., изд-во ESCOM, Leiden, 1992, сс.525-526; Riniker и др., *Tetrahedron Letters* 49, 1993, сс.9307-9320; Lloyd-Williams и др., *Tetrahedron Letters* 49, 1993, сс.11065-11133, и Andersson и др., *Biopolymers* 55, 2000, сс.227-250]. Чистоту продукта определяли, используя MALDI-TOF, после чего пептиды лиофилизировали для коммерческого использования.

Для работы с любым из указанных пептидов был приготовлен 10 мМ стоковый раствор пептида в диметилсульфоксиде (ДМСО, со степенью чистоты, пригодной для работы с клеточными культурами (Sigma)), который хранили при 4°C. Последующие разведения выполняли в ДМСО и непосредственно использовали для обработки клеточных линий, выращенных на специальных культуральных средах *in vitro*, или для добавления к катепсину S в экспериментах по расщеплению белков BAX / Bcl-xl *in vitro* при значениях pH 5 или 7.

Свойства заявляемых пептидов оценивали *in vitro* биохимическими методами и на опухолевых линиях клеток.

Помимо BAX среди проаптогических BH3-домен-содержащих белков могут быть использованы Bak, Mtd/Bok, Bcl-xs [Kelekar A, Thompson CB. *Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. Trends Cell Biol. 1998 Aug;8(8):324-30. doi: 10.1016/s0962-8924(98)01321-x. PMID: 9704409*]. Кроме того, представленные

5 пептидные последовательности могут иметь некоторые аминокислотные замены, не приводящие к существенным изменениям физико-химических свойств и проверенных с использованием молекулярного докинга (например, серин/треонин, аланин/валин/лейцин, изолейцин, серин/треонин, лизин/аргинин, аспарагин/глутамин и др.).

10 Изобретение также включает фармацевтические композиции, в которых использованы пептиды CS-PEP1, 3, 4, имеющие последовательности FFSFGGAL, WFGFTGSL, KLNRRWWFGFTGSL или пептиды, имеющие аминокислотные последовательности с гомологичностью по меньшей мере 50% CS-PEP1, 3, 4, или пептиды, имеющие аминокислотные замены в последовательностях CS-PEP1, 3, 4,

15 существенно не влияющие на свойства пептидов. Фармацевтические композиции могут быть применены в отношении заболеваний и нарушений, связанных с нарушенной экспрессией катепсина S и/или белками семейства BCL-2.

Фармацевтическая композиция включает пептид CS-PEP1 (или 3, или 4), или их модификации с 50% гомологичностью или заменами аминокислот и любой

20 известный из уровня техники фармацевтически приемлемый носитель в виде инертного нетоксичного материала, который не реагирует с активным ингредиентом, а также обеспечивает доставку и проникновение активного ингредиента в целевую ткань. Носитель подбирают по физико-химическим параметрам (растворимость, реакционная способность по отношению к пептидам, способ и условия введения

25 состава).

Настоящее изобретение поясняется конкретными примерами выполнения, демонстрирующими возможность достижения требуемого технического результата.

Пример 1. Определение способности катепсина S расщеплять BAX in vitro и в клетках (Фиг. 2А).

30 В настоящее время механизмы регуляции катепсина S (CS) при расщеплении BAX неизвестны. Чтобы выявить эту взаимосвязь, рекомбинантный (полученный из *E.coli*) биологически активный CS был коинкубирован с очищенным белком BAX (Abscam) и наблюдали дозозависимое расщепление BAX (Фиг. 2А). Равные количества экспрессируемого бактериями белка BAX p21 подвергали действию

активного CS при pH7, и анализировали реакцию расщепления BAX путем вестерн-блоттинга с использованием антител против BAX (Abcam). Фильтры были затем исследованы для обнаружения CS (нижние панели, SCB). Клетки 769P и HEK293 котрансфицировали pBAX-НА и плазмидами экспрессии pCS-FLAG (в возрастающих дозах, μg) в течение 24 часов, предварительно стимулированных носителем (левые панели) или 2 мкМ сирамезином (правые панели) в течение 1 часа; далее в клеточных экстрактах анализировали уровни экспрессии p21 BAX, CS и актина. В этом случае также наблюдали дозозависимое расщепление BAX (Фиг. 2 В и С). Уровни белка p21 BAX анализировали в условиях стимуляции циклогексимидом (Фиг. 2 D) после того, как клетки в течение 24 часов трансфицировали только pBAX-НА (0,25 мкг) или pCS-FLAG (0,75 мкг). Уровни экспрессии p21 BAX были количественно определены, стандартизованы для уровней экспрессии актина в клетках, стимулированных при $T = 0$ ч до $T = 6$ ч. Синяя и красная кривые показывают уровни p21 BAX или p21 BAX при коэкспрессии с CS (соответственно), а линии тренда показаны черным. Таким образом дестабилизирующие эффекты экспрессии CS-flag на BAX-НА были также подтверждены на клетках млекопитающих, где период полужизни белка BAX-НА был значительно снижен по сравнению с экспрессией только BAX (Фиг 2. D, график).

Как видно из Фиг. 2, экспрессия CS приводит к разрушению белка BAX *in vitro* и в клетках млекопитающих.

Пример 2. Оценка ингибирующей активности CS-PEP1 в отношении опосредованного катепсином S расщепления BAX *in vitro* (Фиг. 3 А).

Для того, чтобы оценить ингибирующую активность CS-PEP1 в отношении CS-опосредованного расщепления BAX, совместно инкубировали иммунопреципитированный белок BAX-НА, полученный из клеток млекопитающих (Фиг. 3А) или бактериально экспрессированный BAX (Фиг. 3 В) с активным CS и уменьшающимися дозами ингибитора CS-PEP1. Равные количества иммунопреципитированного белка BAX-НА p21, полученного из 0,25 мкг экспрессии BAX-НА в клетках HEK293, подвергали действию активного CS с уменьшающимся количеством CS-PEP1 при pH 7, а продукты расщепления p21 BAX (или CS) детектировали с помощью вестерн-блоттинга с антителами против BAX (Abcam) или CS (SCB, верхняя и средняя панель). Уровни субстрата p21 BAX были определены количественно, стандартизованы относительно BAX (дорожка 2) и

отображены на нижней панели (Фиг. 3 В). Реакции расщепления BAX при pH 7 инкубировали в присутствии уменьшающихся доз CS-PEP1, и реакции анализировали по продуктам расщепления p21 BAX (верхняя панель) и уровню CS (средняя панель) с использованием анти-BAX (Abcam) или антитела против CS (SCB). Уровни субстрата p21 BAX были определены количественно, стандартизованы относительно BAX (дорожка 2) и отображены на нижней панели. Количественные данные представлены как \pm SEM, и их значимость (где $p < 0,05$) определяется с использованием двустороннего критерия t Стьюдента (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$). Реакция расщепления p21 BAX может быть значительно замедлена в присутствии 10 мкМ-100 нМ CS-PEP1 или 10 мкМ-1 мМ CS-PEP1 для p21 BAX и BAX соответственно *in vitro*

Как видно из Фиг. 3, CS-PEP1 ингибирует опосредованное катепсином S расщепление BAX.

Пример 3. Определение способности CS-PEP1 расщеплять и дестабилизировать Bcl-x1 *in vitro* и в клетках млекопитающих (Фиг. 4 А).

Анализы CS-опосредованного расщепления Bcl-x1 *in vitro* проводили при pH 7 и 5 (верхняя панель) с использованием GST-Bcl-x1 в качестве субстрата в присутствии 10 мкМ CS-PEP1 (или носителя). Уровни субстрата определяли количественно, как показано на нижней панели (белые столбцы с pH 7 и черные столбцы с pH 5), а продукты расщепления определяли с помощью окрашивания кумасси синим (Фиг. 4 В). Клетки НЕК293 стимулировали уменьшающимися дозами CS-PEP1 в присутствии носителя или 5 мкг / мл Раc в течение 24 часов и анализировали на p21 BAX (Abcam), Caspase-3 (Abcam), Bcl-x1 (Abcam), CS (Invitrogen) и актина (Abcam) экспрессии. Количественные данные представлены как \pm SEM, и их значимость (где $p < 0,05$) определяется с использованием двустороннего критерия t Стьюдента (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$).

Как видно из Фиг. 4, CS-PEP1 проявляет ингибирующую активность в отношении CS-опосредованного расщепления Bcl-x1 *in vitro* при pH 7 (Фиг. 4А, дорожка 8) значительно лучше, чем при pH 5 (Фиг. 4А, дорожка 7). Уровни эндогенного белка Bcl-x1 также оставались дестабилизированными в клетках НЕК293 при совместной обработке клеток паклитакселом и 50 мкМ-10 нМ, что позволяет предположить, что CS-PEP1 может препятствовать стабилизации Bcl-x1 в присутствии обычных химиотерапевтических препаратов, которые демонстрируют низкую эффективность в уничтожении клеток рака почки.

Пример 4. Определение способности CS-PEP1 стабилизировать белок BAX при экспрессии катепсина S (Фиг. 5 A).

Клетки 769P совместно стимулировали носителем или 5 мкг / мл Ras, 10 мкМ zVAD-fmk и 10 мкМ CS-PEP1 в течение 24 часов. Растворимые WCL анализировали на экспрессию эндогенного p21 BAX (Abcam), CS (Abcam) и актина (Abcam). Уровни белка p21 BAX были определены количественно, стандартизованы для экспрессии актина и представлены черными полосами как кратные изменения по сравнению с стимуляциями одним носителем (Фиг. 5 B). Уровни эндогенного p21 BAX, CS и актина определяли в лизатах клеток HEK293 с помощью вестерн-блоттинга после 24 часов совместной стимуляции Ras (5 мкг / мл) и CS-PEP1 (10 мкМ) (Фиг. 5 C). Клетки HEK293, котрансфицированные pBAX-NA и pCS-FLAG или pBAX-NA и pCS-C25A-FLAG, стимулировали носителем или 10 мкМ CS-PEP1 в течение 24 часов и циклогексимидом в течение следующих 6 часов. В указанные моменты времени клетки лизировали и клеточные лизаты (WCL) анализировали на p21 BAX, CS и экспрессию актина с использованием вестерн-блоттинга (Фиг. 5 D). Уровни экспрессии для p21 BAX были количественно определены, стандартизованы для актина и выражены по отношению к уровням, наблюдаемым при T = 0 час. Коэкспрессия BAX и CS в присутствии стимуляции CS-PEP1 (синий) и p21 BAX с коэкспрессией CS-C25A (красный) показаны как линии тренда (черные кривые). Количественные данные представлены как \pm SEM, и их значимость (где $p < 0,05$) определяется с использованием двустороннего критерия t Стьюдента (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$).

Наблюдался эффект CS-PEP1 в стабилизации уровней экспрессированного BAX при совместной экспрессии BAX-NA с CS (Фиг. 5A) или эндогенным белком BAX в присутствии индуцированного паклитакселом эндогенного CS (Фиг. 5B). Это было подтверждено наблюдением аналогичных уровней стабильности для BAX-NA, коэкспрессируемого с CS-C25A-Flag, и BAX-NA, коэкспрессированного с CS-Flag и обработанного CS-PEP1 (Фиг. 5C) в течение шестичасового курса, и где соответствующие периоды полураспада белков BAX были почти идентичными (Фиг. 5D).

Аналогичным образом изучили способность CS-PEP3 и CS-PEP4 стабилизировать уровень эндогенного белка BAX в клетках, трансфицированных пустой экспрессионной плазмиды, а также плазмидами для экспрессии CS и каталитически неактивного (мутантного) CS-C25A.

Пример 5. CS-PEP1, 3 и 4 стабилизируют уровни эндогенного белка BAX, тогда как CS-PEP1 и 3 - дополнительно стабилизируют уровень эндогенного белка BAX в присутствии экспрессии катепсина в клетках 769P и HEK293 (Фиг. 6). Клетки 769P и HEK293 трансфицировали 1 мкг пустой экспрессионной плазмиды pCDNA3.1+, pCS-FLAG или PCS-C25A-FLAG в течение 24 часов, а затем обрабатывали 10 мкМ CS-PEPs -1, -3 или -4 еще в течение 24 часов. Клетки собирали, готовили лизаты и анализировали на предмет эндогенной экспрессии BAX (анти-BAX), катепсина S (с использованием анти-CS антител) и β -актина (анти- β -актин).

10 Как видно из Фиг. 6, обработка CS-PEP3 интактных клеток 769P (левый блот, полоса 3) стабилизировала уровень белка BAX по сравнению с клетками 769P, обработанной только носителем (левый блот, полоса 10; при стандартизации по уровню β -актина). Обработка CS-PEP4 клеток 769P стабилизировала уровень эндогенного белка BAX при трансфекции клеток пустым вектором и стимуляции в
15 одиночку (левый блот, полоса 1), а также при наличии сверхэкспрессии CS (левый блот, полоса 2) по сравнению с клетками, стимулированной только носителем (левый блот, полоса 10). В контрольных экспериментах экспрессия CS дестабилизировала эндогенные уровни BAX (левый блот, полоса 9), а доминантно-ингибирующая экспрессия CS-C25A отменила этот эффект (левый блот, полоса 8).
20 При использовании клеток HEK293 эндогенные уровни BAX заметно повышались при обработке CS-PEP1 (средний блот, полоса 6) и CS-PEP3 (средний блот, полоса 10), и менее эффективно - при обработке CS-PEP4 (правый блот, полоса 9). При экспрессии CS уровни BAX кажутся повышенными (с учетом того, что уровни β -актина ниже базальных по сравнению с контрольными условиями (см. полосы 3 и 4, средний блот). В HEK293 обработка PVLE не оказала заметного влияния на уровень
25 эндогенного белка BAX ни с экспрессией CS (правый блот, полоса 7), ни с доминантно-ингибирующей экспрессией C25A (правый блот, полоса 8). В совокупности такие результаты свидетельствуют о том, что CS-PEP -1, -3 и -4 стабилизируют уровень BAX (когда клетки обрабатываются только ингибиторами),
30 тогда как только CS-PEP -1 и -4 стабилизируют уровень BAX в присутствии экспрессии CS в клетках 769P. В клетках HEK293 CS-PEP -1, -3, -4 стабилизируют эндогенные уровни экспрессии BAX, причем при экспрессии CS CS-PEP-1 и -3 стабилизируют эндогенные уровни BAX.

Пример 6. Определение способности CS-PEP1 ингибировать опосредованное катепсином S расщепление полиубиквитинированного производного p120BAX BAX (Фиг. 7).

Клетки НЕК293, коэкспрессирующие CS-Flag или pCS-C25A-Flag с BAX и НА-убиквитином, в течение 6 часов дополнительно обрабатывали в течение 24 часов 10 мкМ CS-PEP1 и очищали лизаты целых клеток, иммунопреципитированные с использованием антител против НА. Иммунные комплексы анализировали на наличие белка BAX с помощью вестерн-блоттинга при длительном (верхняя панель) и кратковременном воздействии (нижняя панель). Красной стрелкой выделено полиубиквитинированное производное BAX, p120BAX.

Как видно из Фиг. 7, обработка клеток CS-PEP1 также приводит к накоплению полиубиквитинированного производного BAX с массой 120 кДа (Пример 6), особенно в присутствии неактивного мутанта CS-C25A-Flag, что подразумевает, что CS может принимать участие в протеолитическом расщеплении убиквитинированного BAX и, следовательно, может играть важную роль в протеасомной деградации уровней белка BAX.

Пример 7. Определение способности CS-PEP1 вызывать апоптоз и активацию каспазы-3.

Клетки НЕК293 (Фиг. 8А) или 769Р (Фиг. 8С), соответственно, совместно стимулировали CS-PEP1 (10 мкМ), пероксидом водорода (Н₂О₂, 5 мкМ) или паклитакселом (Рас, 5 мкг / мл) в течение 24 часов; апоптотические клетки окрашивали с помощью TUNEL и определяли их количество. Растворимые лизаты цельных клеток (WCL), полученные из клеток, обработанных таким же образом, как на панелях А и С, анализировали на экспрессию каспазы-3 (Casp-3) и актина (Фиг. 8С). Уровни экспрессии каспазы-3 были количественно определены и стандартизированы для экспрессии актина по отношению к клеткам, стимулированным одним носителем (Фиг. 8D, график). Количественные данные представлены как \pm SEM, и их значимость (где $p < 0,05$) определяется с использованием двустороннего критерия t Стьюдента (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$).

Обработка 10 мкМ CS-PEP1 клеток НЕК293 или 769Р индуцировала их апоптоз примерно на 6-58% и 1-43%, соответственно (Фиг. 8А). CS-PEP1 может также усилить индуцирующие апоптоз эффекты обработки 769 клеток перекисью водорода или паклитакселом с 11% до 93% и от 55% до 64%,

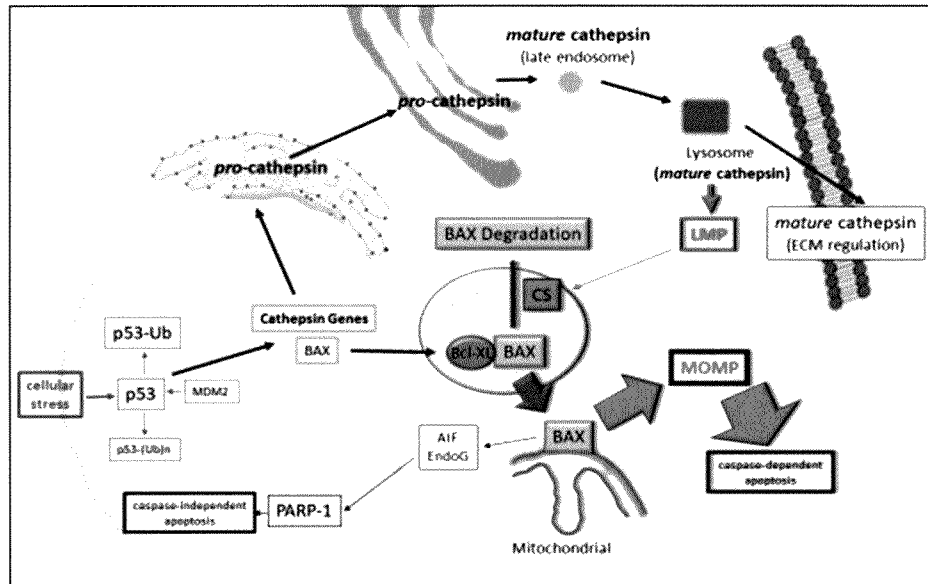
соответственно (Фиг. 8С). Обнаружение промежуточного соединения каспазы-3 с массой 18 кДа наблюдалось в качестве контроля - индикатора активации апоптоза (Фиг. 8В, D). Таким образом CS-PEP1 вызывает апоптоз и активацию каспазы-3.

5 Таким образом заявляемые пептиды обладают рядом ценных терапевтических свойств, поскольку они могут усиливать BAX-опосредованный апоптоз за счет следующих способностей:

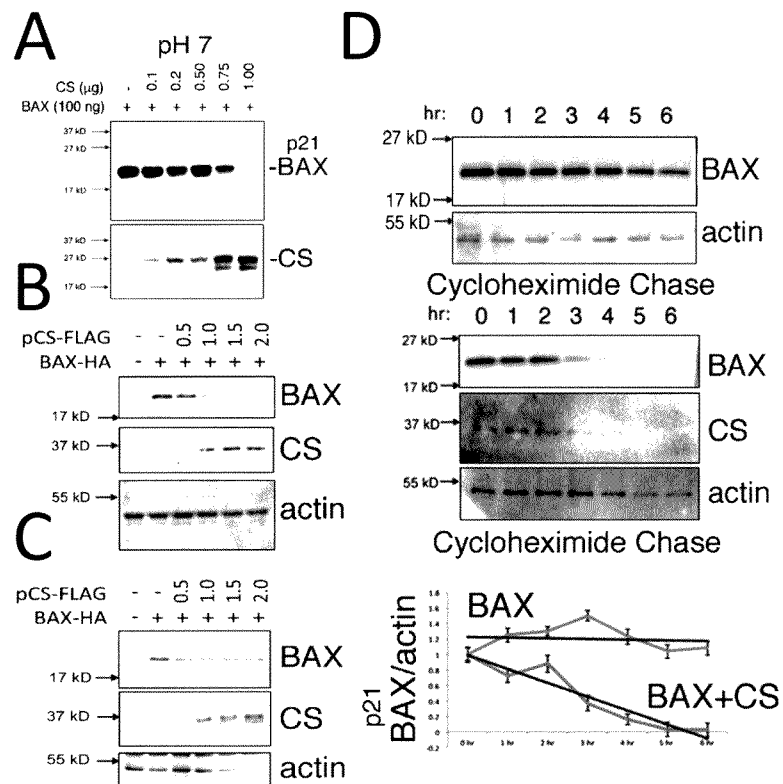
1. Подавлять активность катепсина S (так же, как ингибитор протеиназы Pit2 ингибирует растительные папаин-подобные протеиназы).
- 10 2. Ингибировать взаимодействие ингибиторного белка Bcl-x1/BAX (благодаря тому, что они являются производными от гидрофобного кармана Bcl-x1, который связывает ВНЗ-домен BAX).
- 15 3. Подавлять белковые взаимодействия BAX/BAX и образование олигомеров (благодаря тому, что они являются производными от гидрофобного кармана Bcl-x1, который связывает BAX), тем самым стабилизируя мономерный BAX (и который все еще может вызывать апоптоз [*Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. FEBS J. 2018 Feb;285(3):416-431. doi: 10.1111/febs.14186. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28755482*]).
- 20 4. Ингибировать катепсин S-опосредованный протеолиз полиубиквитинированного производного BAX (p120BAX).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

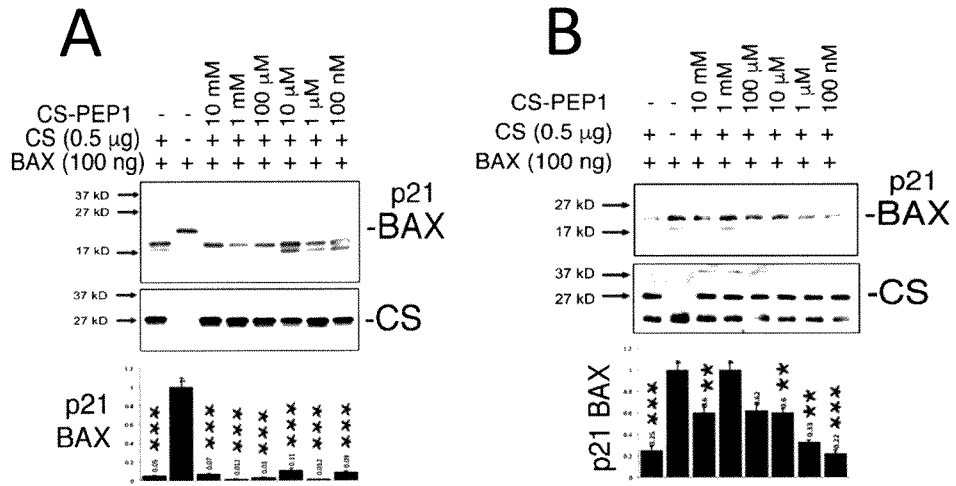
- 5 1. Пептидное соединение, содержащее последовательность, выбранную из проапоптотических ВНЗ-домен-содержащих белков, характеризующееся способностью индуцировать апоптоз в опухолевой клетке.
- 10 2. Пептидное соединение по п.1, содержащее аминокислотную последовательность FFSFGGAL или аминокислотную последовательность, имеющую гомологичность по меньшей мере 50% с последовательностью FFSFGGAL.
- 15 3. Пептидное соединение по п.1, содержащее аминокислотную последовательность WFGFTGSL или аминокислотную последовательность, имеющую гомологичность по меньшей мере 50% с последовательностью WFGFTGSL.
- 20 4. Пептидное соединение по п.3, содержащее аминокислотную последовательность KLNRRWWFGFTGSL.
- 5 5. Применение пептидного соединения по п.1 для индукции апоптоза в опухолевой клетке.
- 20 6. Применение пептидного соединения по п.1 для приготовления лекарственного средства, вызывающего индукцию апоптоза в опухолевой клетке.
- 25 7. Фармацевтическая композиция для индукции апоптоза в опухолевой клетке, содержащая пептидное соединение по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.



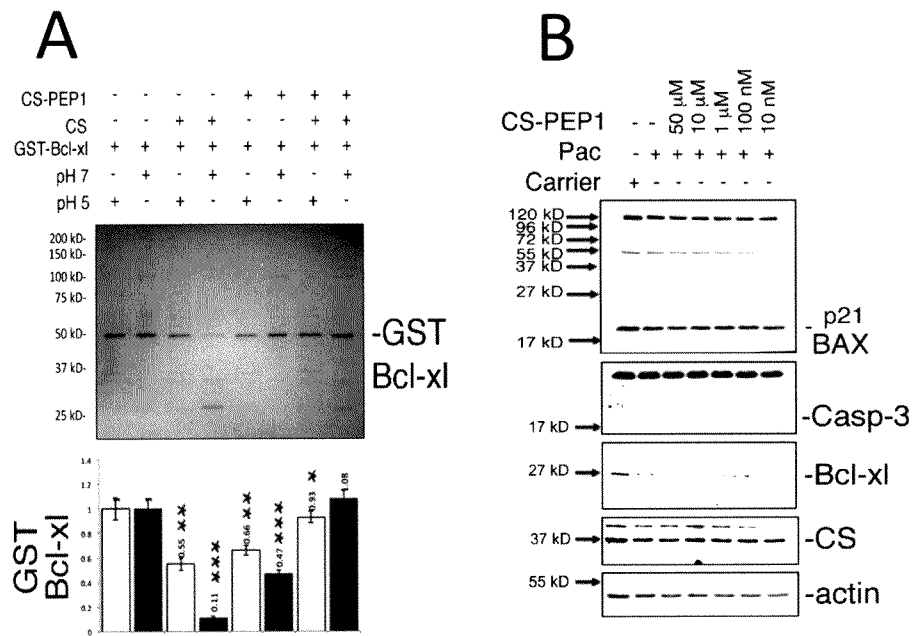
ФИГ.1



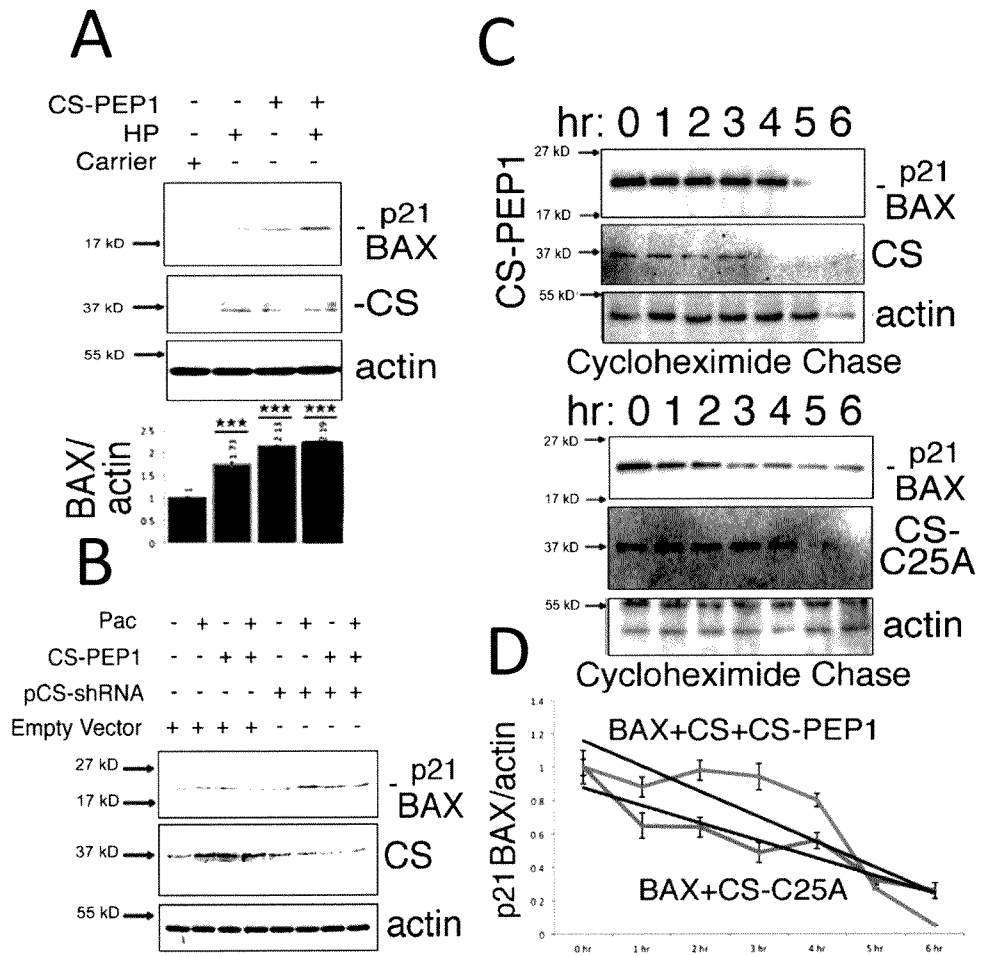
ФИГ.2



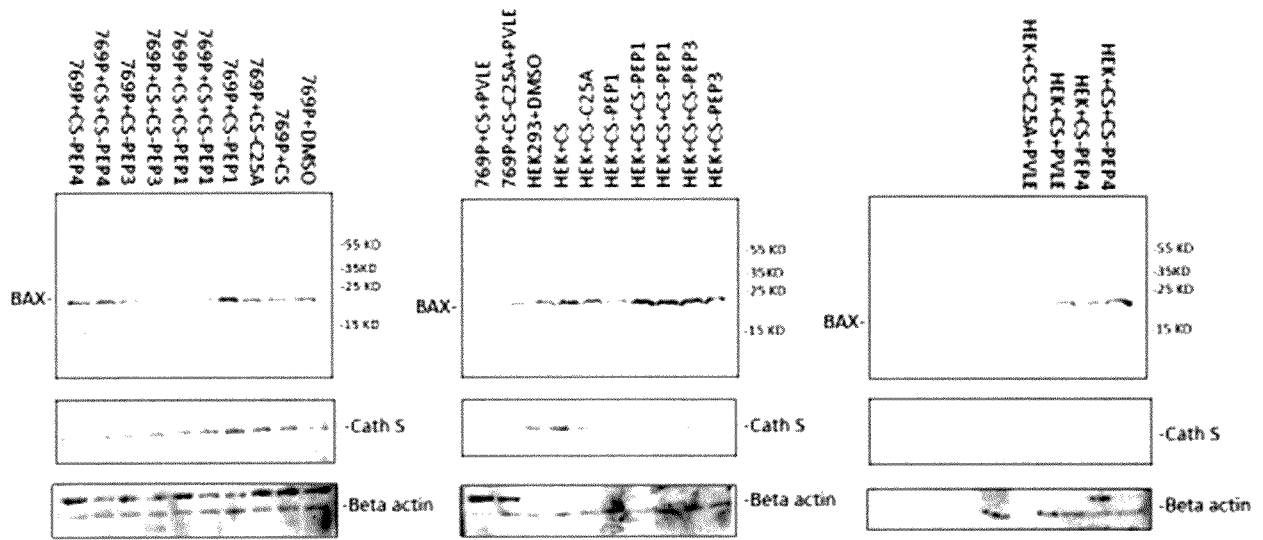
ФИГ.3



ФИГ.4

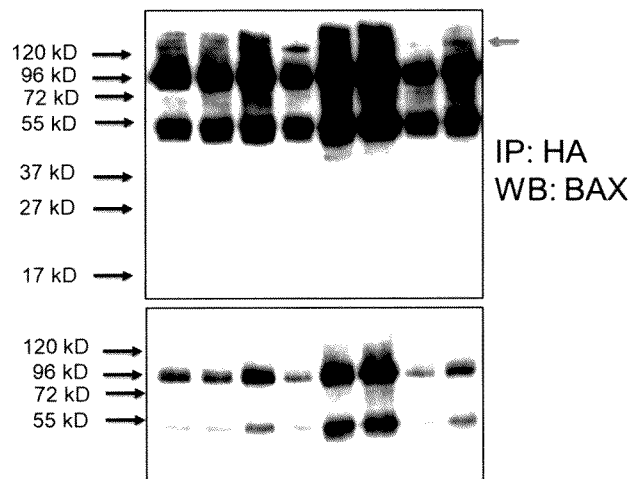


ФИГ.5

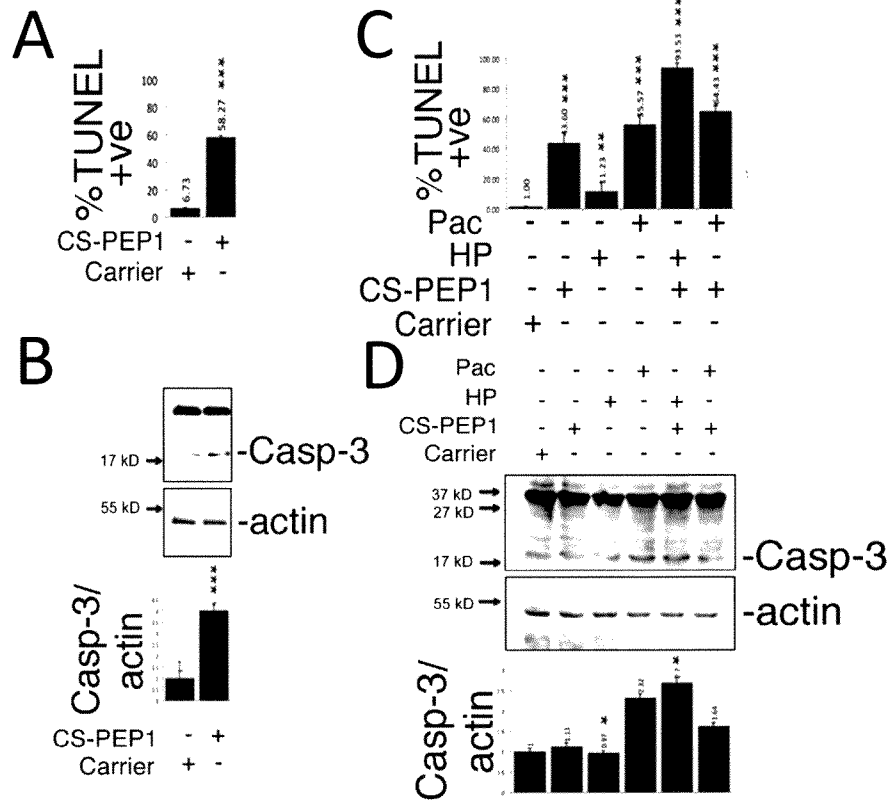


ФИГ.6

CS-PEP1	-	+	-	+	-	+	-	+
pCS-C25A-FLAG	-	-	-	-	-	-	+	+
pCS-FLAG	-	-	-	-	+	+	-	-
pBAX	-	-	+	+	+	+	+	+
pHA-Ubiquitin	+	+	+	+	+	+	+	+
pCDNA3.1+	+	+	+	+	-	-	-	-



ФИГ.7



ФИГ.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/000157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (see supplemental sheet)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Reaxys, Espacenet, USPTO, PatSearch		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SURINDER M. SOOND et al. Cathepsin S Cleaves BAX as a Novel and Therapeutically Important Regulatory Mechanism for Apoptosis, <i>Pharmaceutics</i> 2021, 13, 339, 05.03.2021, the abstract, p.2, 3-4th paragraphs	1-2, 5-7
X	US 2011/0318380 A1 (DAKO AS), 29.12.2011, the claims of the invention, SEQ ID Nos: 109773, 116019, 116018, 110030, 110145, 110842, 110580, 110518, 110514, 110506, 110488, 110484, 110476, 110212, 110164	1-2, 5-7
X	RU 2367468 C2 (MERK PATENT GMBH), 20.09.2009, the claims of the invention, p.17, first paragraph, SEQ ID No 49	1-2, 5-7
X	US 7521548 B2 (JOHN S. REED RANCHO), 21.04.2009, column 8 fourth paragraph, SEQ ID No 23	1-2, 5-7
X	WO 2020/241800 A1 (KAO CORP), 03.12.2020, SEQ ID No 77, table 18, c.36	1, 3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 August 2022 (02.08.2022)		Date of mailing of the international search report 15 August 2022 (15.08.2022)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/000157

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UniParc - UPI0005B663D6, [online] [retrieved on 2022-08-01]. Naideno iz bazy dannykh UniParc, www.uniprot.org/uniparc/UPI0005B663D6?sort=score ; UniProtKB/Swiss-Prot A0A0D1EAR7 2019-07-31	1, 3-4

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/000157

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (см. дополнительный лист)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																							
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p>C07K, A61K, A61P</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p>Reaxys, Espacenet, USPTO, PatSearch</p>																							
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SURINDER M. SOOND et al. Cathepsin S Cleaves BAX as a Novel and Therapeutically Important Regulatory Mechanism for Apoptosis, <i>Pharmaceutics</i> 2021, 13, 339, 05.03.2021, реферат, с.2 3-4 й абзацы</td> <td>1-2, 5-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2011/0318380 A1 (DAKO AS), 29.12.2011, формула изобретения, SEQ ID Nos: 109773, 116019, 116018, 110030, 110145, 110842, 110580, 110518, 110514, 110506, 110488, 110484, 110476, 110212, 110164</td> <td>1-2, 5-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>RU 2367468 C2 (МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ), 20.09.2009, формула изобретения, с.17 первый абзац, SEQ ID No 49</td> <td>1-2, 5-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 7521548 B2 (JOHN C. REED RANCHO), 21.04.2009, колонка 8 четвертый абзац, SEQ ID No 23</td> <td>1-2, 5-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020/241800 A1 (KAO CORP), 03.12.2020, SEQ ID No 77, таблица 18, с.36</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>UniParc - UPI0005B663D6, [онлайн] [найдено 2022-08-01]. Найдено из базы данных UniParc, www.uniprot.org/uniparc/UPI0005B663D6?sort=score; UniProtKB/Swiss-Prot A0A0D1EAR7 2019-07-31</td> <td>1, 3-4</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	X	SURINDER M. SOOND et al. Cathepsin S Cleaves BAX as a Novel and Therapeutically Important Regulatory Mechanism for Apoptosis, <i>Pharmaceutics</i> 2021, 13, 339, 05.03.2021, реферат, с.2 3-4 й абзацы	1-2, 5-7	X	US 2011/0318380 A1 (DAKO AS), 29.12.2011, формула изобретения, SEQ ID Nos: 109773, 116019, 116018, 110030, 110145, 110842, 110580, 110518, 110514, 110506, 110488, 110484, 110476, 110212, 110164	1-2, 5-7	X	RU 2367468 C2 (МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ), 20.09.2009, формула изобретения, с.17 первый абзац, SEQ ID No 49	1-2, 5-7	X	US 7521548 B2 (JOHN C. REED RANCHO), 21.04.2009, колонка 8 четвертый абзац, SEQ ID No 23	1-2, 5-7	X	WO 2020/241800 A1 (KAO CORP), 03.12.2020, SEQ ID No 77, таблица 18, с.36	1, 3	X	UniParc - UPI0005B663D6, [онлайн] [найдено 2022-08-01]. Найдено из базы данных UniParc, www.uniprot.org/uniparc/UPI0005B663D6?sort=score; UniProtKB/Swiss-Prot A0A0D1EAR7 2019-07-31	1, 3-4
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																					
X	SURINDER M. SOOND et al. Cathepsin S Cleaves BAX as a Novel and Therapeutically Important Regulatory Mechanism for Apoptosis, <i>Pharmaceutics</i> 2021, 13, 339, 05.03.2021, реферат, с.2 3-4 й абзацы	1-2, 5-7																					
X	US 2011/0318380 A1 (DAKO AS), 29.12.2011, формула изобретения, SEQ ID Nos: 109773, 116019, 116018, 110030, 110145, 110842, 110580, 110518, 110514, 110506, 110488, 110484, 110476, 110212, 110164	1-2, 5-7																					
X	RU 2367468 C2 (МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ), 20.09.2009, формула изобретения, с.17 первый абзац, SEQ ID No 49	1-2, 5-7																					
X	US 7521548 B2 (JOHN C. REED RANCHO), 21.04.2009, колонка 8 четвертый абзац, SEQ ID No 23	1-2, 5-7																					
X	WO 2020/241800 A1 (KAO CORP), 03.12.2020, SEQ ID No 77, таблица 18, с.36	1, 3																					
X	UniParc - UPI0005B663D6, [онлайн] [найдено 2022-08-01]. Найдено из базы данных UniParc, www.uniprot.org/uniparc/UPI0005B663D6?sort=score; UniProtKB/Swiss-Prot A0A0D1EAR7 2019-07-31	1, 3-4																					
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>																							
<p>* Особые категории ссылок документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</p> <p>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> <p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p>																							
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p>02 августа 2022 (02.08.2022)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p>15 сентября 2022 (15.09.2022)</p>																					
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18</p>		<p>Уполномоченное лицо: Николаева Т.В. Телефон № (8-499) 240-25-91</p>																					

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ
Классификация предмета изобретения

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/000157

C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)