



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006137699/13, 25.04.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.04.2005(30) Конвенционный приоритет:
28.04.2004 US 60/566,455

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2008

(45) Опубликовано: 27.12.2009 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 03/006492 A, 23.01.2003. DE 10133576
A1, 30.01.2003. RU 2172322 C1, 20.08.2001.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 25.10.2006(86) Заявка РСТ:
EP 2005/004419 (25.04.2005)(87) Публикация РСТ:
WO 2005/105832 (10.11.2005)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ВОНГ Вай Мин (CN),
ЛЭМ Кун (CN)

(73) Патентообладатель(и):

СиЭмЭс ПЕПТАЙДЗ ПЭЙТЕНТ
ХОЛДИНГ КОМПАНИ ЛИМИТЕД (VG)

(54) **БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПЕПТИДА VAREENPTLLTEAPLNPK**

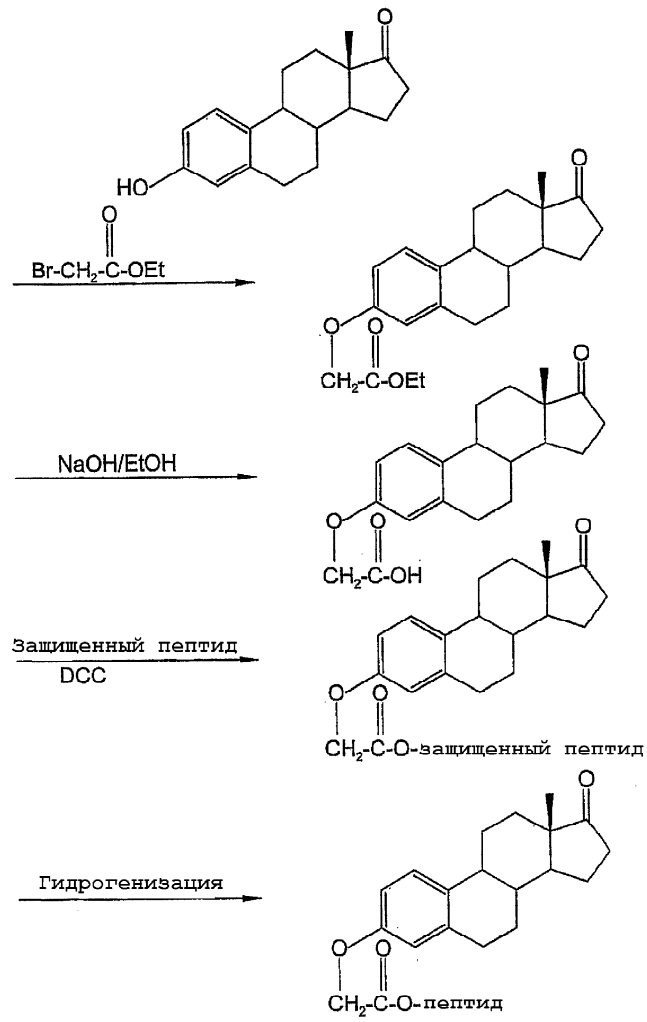
(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой по существу чистый пептид для модулирования иммунной системы, характеризуемый аминокислотной последовательностью VAREENPTLLTEAPLNPK, а также фармацевтическую композицию, содержащую

указанный пептид. Изобретение позволяет модулировать иммунную активность, выбранную из группы, состоящей из подавления трансформации Т-лимфоцитов, подавления активности НК-клеток и подавления образования антител. 4 н. и 3 з.п. ф-лы, 5 ил., 15 табл.

RU 2 377 249 C2

RU 2 377 249 C2



ФИГ. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2006137699/13, 25.04.2005**(24) Effective date for property rights:
25.04.2005(30) Priority:
28.04.2004 US 60/566,455(43) Application published: **27.04.2008**(45) Date of publication: **27.12.2009 Bull. 36**(85) Commencement of national phase: **25.10.2006**(86) PCT application:
EP 2005/004419 (25.04.2005)(87) PCT publication:
WO 2005/105832 (10.11.2005)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):
**VONG Vaj Min (CN),
LEhM Kun (CN)**(73) Proprietor(s):
**SiEhmEhs PEPTAJDZ PEhJTENT KhOLDING
KOMPANI LIMITED (VG)****(54) BIOLOGICALLY ACTIVE DERIVATIVES OF PEPTIDE VAPEEHPTLLTEAPLNPK**

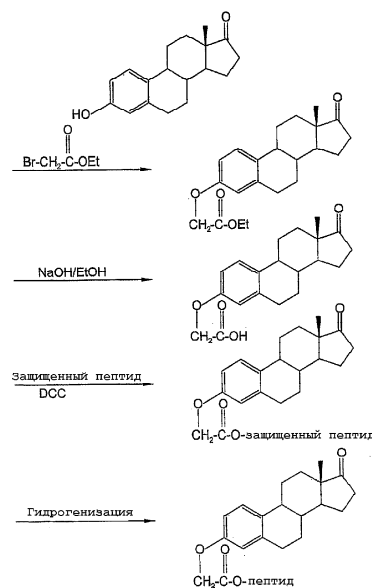
(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention is related to biotechnology and represents substantially pure peptide for modulation of immune system, which is characterised with aminoacid sequence VAPEEHPTLLTEAPLNPK, and also pharmaceutical composition, which includes specified peptide.

EFFECT: possibility to modulate immune activity selected from the group that consists of suppression of T-lymphocytes transformation, suppression of activity of NK-cells and suppression of antibodies production.

7 cl, 5 dwg, 15 tbl, 12 ex



Фиг. 1

Предпосылки изобретения

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к коротким пептидам и к их применению. В частности, настоящее изобретение относится к коротким пептидам с различными видами биологической активности.

Описание уровня техники

Пептиды известны в области лечения заболеваний и в качестве фармацевтических композиций. Например, в патенте США № 6191113 описан пептид с активностью в качестве ингибитора роста гладкомышечных клеток и, следовательно, приемлемый для профилактики и лечения ассоциированных с ростом гладкомышечных клеток патологических состояний, таких как атеросклероз, рестеноз после ангиопластики, сужение просвета после трансплантации кровеносных сосудов и гладкомышечная саркома. В патенте США 6184208 описан другой пептид, для которого обнаружено, что он модулирует физиологические процессы, такие как увеличение активности зоны эпителиального роста и роста волос. Кроме того, в публикации РСТ № WO 03/006492 и в патентной заявке США № 10/237405 выдвигают предположение, что определенные пептиды и их фармацевтические композиции являются биологически активными и способны модулировать иммунные ответы.

Таким образом, целью настоящего изобретения является предоставление короткого пептида или пептидов с биологической активностью.

Сущность изобретения

Один из аспектов настоящего изобретения относится к пептидам, полученным из пептида CMS-010, содержащего 18 аминокислот (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (SEQ ID № 1), у которого обнаружено наличие биологической активности, где указанные пептиды не содержат последовательность пептида CMS-010. С целью тестирования образцы этих пептидов химически синтезировали из L-аминокислот. Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к выделенному или очищенному пептиду, содержащему выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящую или состоящую из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010 (SEQ ID № 1). Другой аспект относится к по существу чистым пептидам, содержащим выбранные из SEQ ID № 2-31 пептиды, где указанные пептиды не содержат последовательность пептида CMS-010.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой введение пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящую или состоящую из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, где воздействия указанного введения выбраны из группы, состоящей из подавления трансформации иммунных клеток, подавления активности НК-клеток, увеличения активности НК-клеток, подавления образования антител *in vivo*, подавления клеточной пролиферации, подавления роста опухоли, ослабления нефрита и уменьшения протеинурии. В некоторых вариантах осуществления подавление трансформации иммунных клеток представляет собой подавление трансформации Т-лимфоцитов посредством ConA *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления подавление трансформации иммунных клеток представляет собой подавление трансформации Т-лимфоцитов *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления подавление клеточной пролиферации представляет собой подавление развития клеток саркомы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления ослабление нефрита представляет собой

ослабление нефрита, обусловленного антителами к почечным эпитомам.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к пептиду, содержащему выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящую или состоящую из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где 5
указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, состоящего из L-аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид, содержащий выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящий или состоящий из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид 10
не содержит последовательность пептида CMS-010, находится по существу в чистой форме.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, содержащим пептид, который содержит выбранную из SEQ ID № 2-31 15
последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность CMS-010. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие пептид, который содержит выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, содержат 20
состоящие из L-аминокислот пептиды.

Еще одним аспектом настоящего изобретения являются способы получения фармацевтической композиции, предусматривающие получение пептида, который 25
содержит выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и смешивание пептида с фармацевтически приемлемым носителем.

Еще одним аспектом настоящего изобретения являются способы уменьшения 30
воздействий заболевания человека, включающие введение фармацевтически эффективных доз пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010. В некоторых вариантах осуществления указанный человек страдает от клеточно-пролиферативного и/или иммунологического нарушения. В некоторых 35
вариантах осуществления клеточно-пролиферативное нарушение представляет собой злокачественную опухоль, саркому и/или опухоль.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является способ 40
модулирования иммунной системы индивидуума, включающий введение фармацевтически эффективной дозы пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010.

Другим аспектом настоящего изобретения является применение пептида, 45
содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, в качестве фармацевтического препарата. В некоторых вариантах осуществления пептид применяют для лечения болезненного состояния в форме клеточно-пролиферативного нарушения и/или иммунологического нарушения. В некоторых вариантах осуществления 50
подвергаемым лечению клеточно-пролиферативным нарушением является саркома.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является применение пептида, 55
содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, в качестве модулятора иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления модулирование иммунной системы представляет собой увеличение или подавление активности NK-клеток.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является применение пептида,

содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, в качестве питательной добавки.

Другим аспектом настоящего изобретения является молекула, содержащая улучшенное производное пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, содержащее улучшающую молекулу, функционально связанную с указанным пептидом, где улучшающая молекула увеличивает терапевтическую эффективность указанного пептида и где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010.

Краткое описание чертежей

Каждая из пяти фигур иллюстративно демонстрирует химические реакции связывания пептидов со стероидными молекулами.

На фигуре 1 представлен ряд химических реакций связывания ковалентной связью пептида с молекулой эстрогена.

На фигуре 2 представлен второй альтернативный ряд реакций для получения таких же связей, что и на фигуре 1.

Фигура 3 включает ряд химических реакций, предназначенных для связывания ковалентной связью пептида с молекулой эстрадиола.

Фигура 4 включает второй ряд химических реакций для получения таких же связей, что и на фигуре 3.

На фигуре 5 представлен способ связывания ковалентной связью пептида с молекулой гидрокортизона.

Подробное описание предпочтительного варианта осуществления

I. ВВЕДЕНИЕ

Обнаружено, что пептид CMS-010 (SEQ ID № 1) с последовательностью VAREENPTLLTEAPLNPK обладает биологической иммунорегулирующей активностью (U.S. Patent Application №10/178684) и имеет терапевтический потенциал для применения у человека. Настоящее изобретение относится к фрагментам и производным CMS-010 с биологической активностью. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фрагментам и производным с последовательностями, представленными как SEQ ID № 2-31. В некоторых вариантах осуществления фрагменты могут иметь заместители и/или дополнительные молекулярные группы или могут быть функциональными производными VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010). Применения фрагментов и производных CMS-010 включают регуляцию клеток и тканей. Фрагменты и производные CMS-010 могут быть включены в состав фармацевтических препаратов и питательных добавок.

Понятно, что в качестве другого способа практического осуществления настоящего изобретения возможно добавление дополнительных аминокислот к N-концу или C-концу пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональных производных. В таких вариантах осуществления пептид, содержащий выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящий или состоящий из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность CMS-010, и его функциональные производные сохраняют одно или несколько описанных здесь терапевтических или функциональных свойств. Например, в некоторых вариантах осуществления к описанному пептиду может быть добавлена одна или две

аминокислоты без влияния на его биологическую функцию. В некоторых вариантах осуществления молекулы меньших размеров, содержащие некоторую часть VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010), содержат единственный фрагмент последовательности, полученный из VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010). В других вариантах осуществления молекулы меньших размеров, содержащие некоторую часть VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010), содержат два или более фрагментов последовательности, полученных из отдельных, несмежных фрагментов VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010). Например, в некоторых вариантах осуществления молекулы меньших размеров, содержащие некоторую часть VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010), содержат последовательность, находящуюся вблизи N-конца VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010), а также последовательность, находящуюся вблизи C-конца VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010) без какой-либо промежуточной последовательности, находящейся между этими последовательностями в VAPEENPTLLTEAPLNPK (CMS-010). В дополнительных вариантах осуществления возможно добавление трех или четырех аминокислот с сохранением функции пептида, выбранного из группы, состоящей из фрагментов CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010) и его функциональных производных. Все они относятся к вариантам одного и того же пептида. Кроме того, для практического осуществления другого аспекта настоящего изобретения можно использовать производные пептида, такие как производные с консервативной заменой одной аминокислоты на другую из того же функционального класса. Например, в пептидах с неполярными или гидрофобными боковыми цепями возможна замена одной боковой группы на другую без снижения биологической активности. В некоторых вариантах осуществления из последовательности фрагмента пептида CMS-010 можно удалить одну, две или более аминокислот, и, несмотря на это, все еще сохранится активность исходного пептидного фрагмента. Например, фрагмент пептида CMS-010 длиной десять аминокислот ресинтезируют без 5-й аминокислоты с N-конца последовательности. Таким образом, в полученном варианте длиной 9 аминокислот 4-я аминокислота с N-конца ковалентно связана с 6-й аминокислотой с N-конца исходной последовательности, и в то же время он обладает той же активностью, что и исходный фрагмент пептида из десяти аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, где две или более аминокислоты удалены из последовательности фрагмента пептида CMS-010, удаленные аминокислоты в исходной последовательности фрагмента пептида являются соседними друг с другом. В других вариантах осуществления, где из последовательности фрагмента пептида CMS-010 удалены две или более аминокислоты, аминокислоты не являются в исходной последовательности фрагмента пептида соседними друг с другом, а точнее отделены друг от друга в исходной последовательности аминокислотами, которые сохраняются в укороченном варианте пептида. В дополнительных вариантах осуществления, где из фрагмента пептида CMS-010 удалены три или более аминокислоты, некоторые удаленные из исходной последовательности аминокислоты являются соседними друг с другом, в то время как одна или несколько аминокислот, удаленных из первоначальной последовательности, не являются соседними с какими-либо другими удаленными из исходной последовательности аминокислотами. В дополнительных вариантах осуществления этого изобретения в пептид для формирования вариантов может быть встроена последовательность линкера/спейсера, но варианты все еще сохраняют активную функциональную группу как в исходном пептиде, используемом в этом исследовании.

Они также являются рассматриваемыми вариантами пептидов. Как применяют здесь, аналог пептида включает пептиды с молекулами аминокислот, имитирующими структуру природных аминокислот, например аналог с отличающейся структурой основной цепи, или замещенный D-аминокислотами. В качестве дополнительного примера, хотя аминокислоты, которые применяют для синтеза пептидов, находятся в их оптической изомерной L-форме, пептиды с одной или несколькими аминокислотами в последовательности, замещенными D-формами, могут обладать сходными видами биологической активности. Как используют в формуле изобретения, термин "функциональное производное" включает фрагменты, варианты, аналоги или химические производные пептида.

"По существу чистый пептид" относится к пептидам со степенью очистки, по меньшей мере, 10% мас./мас., более предпочтительно 20%, еще более предпочтительно 60% и значительно более предпочтительно более чем на 90% очищенным. В самом предпочтительном варианте осуществления степень очистки составляет более чем 99%. По существу, чистый пептид можно использовать для получения фармацевтических и питательных препаратов, которые, как описано далее, могут представлять собой комплексные смеси.

"Модулирование" относится к воздействию на клетки, обусловленному введением или воздействием пептидов по настоящему изобретению, где введение или воздействие пептидов на клетки приводит к изменениям активности клеток. Изменения могут представлять собой увеличение или подавление активности клетки. Увеличение или подавление активности клетки может представлять собой увеличение или подавление скорости деления клетки и репликации, увеличение или подавление реакции клетки на другие факторы и/или увеличение или подавление уровня продукции и/или секреции клеткой белков или веществ.

"Клеточная пролиферация" относится к увеличению количества существующих клеток и может быть следствием трансформации или иммортализации клетки. Нарушения клеточной пролиферации включают в качестве неограничивающих примеров злокачественные опухоли, доброкачественные опухоли, опухоли и саркомы и могут включать любое количество клеток. "Иммунологические нарушения" относятся к нарушению функции или повреждающей функции иммунных клеток или другой части иммунной системы. Такие нарушения могут быть вызваны подавлением активности клетки или молекулы или увеличением активности клетки или молекулы.

Применение в фармацевтических препаратах пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональных производных, можно использовать в качестве возможного лечения иммунологических нарушений или заболеваний. Препараты могут содержать пептид, содержащий выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящий или состоящий из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональные производные, смешанные с другими активными или неактивными компонентами, включая другие пептиды, например, к тому же препарату можно добавить от двух до нескольких (например, 3-5) пептидов с другими ингредиентами или без других ингредиентов. Альтернативно, пептид, содержащий выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящий или состоящий из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность

пептида CMS-010, и его функциональные производные можно использовать для получения препарата совместно с не перечисленными здесь пептидами. Они могут быть введены внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно или интрадермально. Способ введения также может представлять собой
5 внутриартериальную инъекцию, которая ведет непосредственно к пораженному органу. Другими способами введения являются трансдермальный, ингаляционный в виде порошка или аэрозоля и другие формы доставки, известные специалистам в данной области. Препараты также можно принимать перорально, и они могут
10 содержать носители, которые можно использовать для предотвращения переваривания пептида в желудке после перорального применения, или любые другие носители, известные в данной области (носители для трансдермальной доставки, например, такие как липосомы).

Как применяют здесь, термин "гибридный пептид" используют в отношении пептидов, содержащих дополнительные пептиды, встроенные в исходный биологически активный пептид с указанной выше последовательностью или его функциональные производные, но все еще сохраняющих по существу сходную активность. Дополнительные пептиды включают лидерные пептиды, например,
15 содержащие аминокислотную последовательность, которую узнают одна или несколько прокариотических или эукариотических клеток в качестве сигнала для секреции гибридного белка во внешнюю среду или в клетку. Секреция может быть прямой или не прямой посредством секреторных везикул.

Как применяют здесь, терминология "по существу состоящий из" относится к пептиду или полипептиду, содержащему выбранную из SEQ ID № 2-31
25 последовательность, по существу состоящую или состоящую из выбранной из SEQ ID

№ 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональным производным с дополнительными
30 аминокислотами на С-конце и/или N-конце и которые сохраняют один или несколько видов активности указанных пептидов, приведенных здесь. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, где активность пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу, состоящего или состоящего из
выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит
35 последовательность пептида CMS-010, и его функциональных производных относится к лечению и/или профилактике клеточно-пролиферативных или иммунологических нарушений или заболеваний, пептид или полипептид, "по существу состоящий" из пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу,
40 состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональных производных, обладает активностью в отношении лечения и/или профилактики нарушений или заболеваний, как представлено здесь в отношении этого пептида, и сам по себе не обладает какими-либо характеристиками (т.е. до
45 модификации посредством присоединения одной или нескольких биологически активных молекул), которые существенно снижают способность пептида или полипептида к лечению или профилактике клеточно-пролиферативных или иммунологических нарушений или которые приводят к существенным изменениям
50 основных и новых характеристик пептида в качестве лечебного и/или профилактического средства для указанных выше нарушений или заболеваний. Таким образом, в предыдущем примере природный полноразмерный полипептид, который обладает исходной активностью, отличной от лечения и/или профилактики

клеточно-пролиферативных или иммунологических нарушений, и который где-либо содержит выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу, состоит или состоит из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (но не содержит последовательность CMS-010), и его функциональные производные не являются пептидом или полипептидом "по существу состоящим из" пептида, который содержит выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоит или состоит из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, и его функциональных производных, последовательность которого содержит природный полноразмерный полипептид. Также в предыдущем примере полученный способами генетической инженерии пептид или полипептид, который обладает исходной активностью, отличной от лечения или профилактики клеточно-пролиферативных или иммунологических нарушений, но включает аминокислотную последовательность пептида, который где-либо содержит выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоит или состоит из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (но не содержит последовательность CMS-010), и его функциональных производных, не будет являться пептидом или полипептидом "по существу состоящим из" пептида, который содержит выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоит или состоит из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (но не содержит последовательность CMS-010), и его функциональных производных, последовательность которых входит в полученный способами генетической инженерии пептид или полипептид.

Специалисты в данной области легко могут определить, состоит ли пептид или полипептид по существу из пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональных производных по указанным выше определениям посредством измерения активности пептида или полипептида с применением анализов лечения или профилактики клеточно-пролиферативных или иммунологических нарушений, которые предоставлены здесь в отношении фрагментов и производных пептида VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010).

В предпочтительном варианте осуществления терминология "по существу состоящий из" также может относиться к пептидам или полипептидам, которые имеют менее 5 аминокислотных остатков дополнительно к пептиду, содержащему выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящему или состоящему из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональным производным. В более предпочтительном варианте осуществления указанная выше терминология относится к пептидам с 2 аминокислотными остатками дополнительно к пептиду, содержащему выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящему или состоящему из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональным производным. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанная выше терминология относится к пептиду с одним аминокислотным остатком дополнительно к пептиду, содержащему выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящему или состоящему из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональным производным.

Фармацевтический препарат может включать любой из известных фармацевтических носителей. Примеры приемлемых носителей включают любой из известных специалистам в данной области стандартных фармацевтически приемлемых носителей. Они включают в качестве неограничивающих примеров физиологический солевой раствор, воду, эмульсии, включая смеси масла и воды или триглицеридные эмульсии, и другие типы средств, наполнителей, покрытых оболочкой таблеток и капсул. Приемлемый носитель можно выбирать на основании способа введения фармацевтической композиции.

Пептид, выбранный из группы, содержащей выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящей или состоящей из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональные производные можно вводить посредством внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции и подкожной имплантации. Также пептид можно вводить в любой форме для перорального введения, такой как таблетка, капсула, суспензия, раствор, и т.д., в обычной форме без модификации или в форме с замедленным высвобождением, или с желудочно-кишечной защитой или без нее. Кроме того, пептид можно применять в любой форме для местного применения, такой как мазь, крем, гель и т.д., с любым вспомогательным устройством для трансдермального применения или без него. Пептид можно также представить в виде его генетической последовательности и клонировать в экспрессирующую систему отдельно или в сочетании с последовательностями других пептидов для получения молекулы конечного пептида для использования активности пептида, как описано здесь.

Доза каждого пептида может составлять 1 нг - 10 г на кг массы тела.

Предпочтительной для инъекционного способа введения является доза 10 нг - 10 мг на кг, а более предпочтительно 1 мкг - 1 мг на кг. Однако эффективная доза может составлять ниже 1 нг на кг массы тела вследствие того, что один или несколько пептидов могут действовать через рецепторы, которые индуцируют каскад нормального физиологического ответа. Альтернативно, один или несколько пептидов могут непосредственно быть инициаторами целого каскада реакций. Для перорального приема количество может составлять 1 нг - 10 г на кг массы тела в сутки, более предпочтительно 0,1 мкг - 1 г на кг массы тела в сутки и еще более предпочтительно 1 мкг - 10 мг в сутки.

II. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

Генную терапию на основе указанных выше последовательностей пептидов осуществляют посредством конструирования последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует один из этих пептидов. Нуклеиновую кислоту можно химически синтезировать и функционально лигировать с промотором, и клонировать в экспрессирующий вектор. Затем для экспрессии в клетках человека в качестве формы генной терапии экспрессирующий вектор вводят в организм человека. Как применяют здесь, термин "генетические векторы" включает эти экспрессирующие векторы. Векторы, которые можно использовать для генной терапии, включают аденоассоциированный вирус (Mizuno, M. et al. (1998). Jpn J Cancer Res 89, 76-80), векторы LNSX (Miller, A. D. et al. (1993) Methods Enzymol 217, 581-599) и лентивирус (Goldman, M. J. et al. (1997) Hum Gene Ther 8, 2261-2268).

Другие носители для доставки пептида включают векторы, кодирующие желательный пептид, которые можно перенести в организм, способный к репликации в организме хозяина, которому хотят ввести пептид, без значительных вредных

воздействий на здоровье организма хозяина. Например, экспрессирующие векторы можно перенести в организм, который не является патогенным для организма хозяина, которому хотят ввести пептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор продуцирует желательный пептид в бактериальном или
5 грибовом организме, который не обладает значительными вредными воздействиями на здоровье организма хозяина, которому вводят пептид. Например, экспрессирующим вектором, кодирующим желательный пептид, может быть экспрессирующий вектор, который продуцирует желательный пептид в организме, таком как лактобактерия, *E. Coli* или дрожжи. В одном варианте осуществления экспрессирующий вектор продуцирует желательный пептид в микроорганизме, который в норме находится в кишечнике млекопитающих или микроорганизме, к которому толерантен пищеварительный тракт млекопитающих. Некоторые виды бактерий, в которых желательный пептид может быть экспрессирован, включают в
15 качестве неограничивающих примеров виды *Lactobacillus*, такие как *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* или другие; виды *Bifidobacterium*, такие как *B. adolescentis*, *B. animalus*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* или другие; *Enterococcus faecalis* или *Ent. faecium*; *Sporolactobacillus inulinus*; *Bacillus subtilis* или *Bacillus cereus*; *Escherichia coli*; *Propionibacterium freudenreichii*; или *Saccharomyces cerevisiae* или *Saccharomyces boulardii*.

Химически синтезированные или полученные другими способами, включающими в качестве неограничивающих примеров обратную транскрипцию мРНК с получением
25 молекул кДНК, последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют любой из пептидов по настоящему изобретению, известными специалистам в данной области способами генетической инженерии встраивают в экспрессирующий вектор для переноса гена в желательные организмы. Экспрессирующие векторы могут представлять собой ДНК-векторы или РНК-векторы. Например, экспрессирующие
30 векторы могут быть основаны на плазмидных или вирусных генетических элементах. Экспрессирующие векторы могут представлять собой векторы, которые реплицируются экстрахромосомно, или векторы, которые встраиваются в хромосому.

Экспрессирующие векторы содержат промотор, функционально связанный с
35 нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид по настоящему изобретению. Промотор может представлять собой регулируемый промотор, такой как индуцируемый промотор, или конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления для получения желательного уровня экспрессии пептида промотор можно выбирать. Кроме того, если необходимо, экспрессирующие векторы могут содержать другие
40 последовательности для обеспечения продукции, презентации и/или секреции пептидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по настоящему изобретению, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая направляет секрецию пептида. Например, нуклеиновая
45 кислота, кодирующая пептид по настоящему изобретению, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнальный пептид.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы, сконструированные для кодирования пептидов по настоящему изобретению, могут
50 представлять собой экспрессирующие векторы, адаптированные для экспрессии пептида по настоящему изобретению в составляющих нормальную флору кишечника млекопитающих бактериальных видах, таких как виды *Lactobacillus* и *Bacillus subtilis*. Примеры таких экспрессирующих векторов можно найти в патентах США № 6100388,

выданном Casas, и № 5728571, выданном Bellini соответственно. Таким образом, эти документы специально включены сюда в качестве ссылок в полном объеме. Следует понимать, что можно использовать любой экспрессирующий вектор, который облегчает экспрессию пептида по настоящему изобретению в организме, который не является вредным для здоровья организма хозяина, которому вводят пептид.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы, которые сконструированы для кодирования пептидов по настоящему изобретению, могут представлять собой экспрессирующие векторы, адаптированные для экспрессии пептида по настоящему изобретению в высокоустойчивых в кишечнике млекопитающих дрожжевых видах, таких как *Saccharomyces cerevisiae*; или предпочтительно *Saccharomyces boulardii*, которые могут колонизировать кишечник человека и которые применяют для лечения определенных форм диареи. Можно применять дрожжевые экспрессирующие векторы, которые конститутивно экспрессируют гетерологичные белки и пептиды, являются высокостабильными, поэтому хорошо переносятся в дочерние клетки при митозе и мейозе и могут содержать кодирующий сигнал пептид или пептиды последовательность, обеспечивающую высокий уровень секреции рекомбинантного белка. Пример такого дрожжевого вектора приведен в патенте США № 6391585, выданном Jang et al., который таким образом специально включен сюда в качестве ссылки в полном объеме.

Экспрессирующие векторы, кодирующие пептиды по настоящему изобретению, можно вводить в организм, предназначенный для экспрессии пептидов, посредством известных в данной области способов. Эти способы включают традиционные способы трансформации бактерий, дрожжей или других микроорганизмов с применением, например, компетентных вследствие применения химического способа бактериальных клеток, трансформации посредством электропорации или ацетата лития (для дрожжей), а также современных достижений в области трансформации бактериальных видов, устойчивых к таким процедурам. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы вводят в лактобактерии, известные как устойчивые к трансформации, с применением способа, описанного Leer et al. (WO 95/35389), описание которого включено сюда в качестве ссылки в полном объеме. Введенные последовательности могут встраиваться в хромосомную ДНК микроорганизмов или могут оставаться в качестве внехромосомных ДНК-элементов.

Затем для осуществления непрерывной иммунотерапии такие полученные способами генной инженерии микроорганизмы, содержащие экспрессирующий вектор, можно инокулировать в пищеварительный тракт, влагалище, трахею и т.д. В некоторых вариантах осуществления организмы, экспрессирующие пептиды по настоящему изобретению, принимают внутрь в неактивной форме или предпочтительно в живой форме. В кишечнике эти микроорганизмы продуцируют указанные пептиды, высвобождают их в просвет посредством секреции или лизиса микроорганизма или другим способом предоставляют пептиды хозяину, после чего пептиды осуществляют предназначенное для них действие в отношении организма хозяина. В других вариантах осуществления пептиды предоставляются хозяину на слизистых оболочках носовых ходов, влагалища или тонкого кишечника.

Другой способ лечения представляет собой применение липосом в качестве способа доставки конкретной нуклеиновой кислоты в клетки организма человека. Нуклеиновую кислоту (такую как экспрессирующий вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, содержащий выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящий или

состоящий из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида SMS-010, и его функциональные производные) помещают в среду, которая облегчает клеточное узнавание и встраивание в хромосому, как описано в Gao, X. and Huang, L. (1995) Gene Ther 2, 710-722 и патенте США 6207456. Альтернативно, сам пептид можно инкапсулировать в липосому и доставлять непосредственно с применением способа, описанного в патенте США 6245427. Все указанные выше научные публикации и патенты включены сюда в качестве ссылок в полном объеме.

Последовательности нуклеиновых кислот, приемлемые для генной терапии и способа лечения, указанных выше, включают последовательности, кодирующие эти пептиды и их функциональные производные. Любую из многочисленных последовательностей нуклеиновых кислот можно применять для кодирования этих пептидов и их производных на основании вырожденности системы кодонов.

Следующие ниже ссылки включены сюда в качестве ссылок в полном объеме.

1. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:134-135 Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 1991, 1221-1234.

2. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:140.

3. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. The study on MTT reduction method of testing NK cell activity. China Immunology Journal. 1996, 1(6):356-358.

4. Quan Wang. Modern medical experiment method. People's Health Publishing House. 1998, 482-483.

5. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:141.

6. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:132-133.

7. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:128-129.

8. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 137-138.

9. Jiatai Li, clinical pharmacology (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 1338-1339.

III. ПЕПТИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ И ПРЕПАРАТЫ С ПЕПТИДАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ВЫБРАННУЮ ИЗ SEQ ID № 2-31 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, ПО СУЩЕСТВУ СОСТОЯЩИМИ ИЛИ СОСТОЯЩИМИ ИЗ ВЫБРАННОЙ ИЗ SEQ ID № 2-31 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ (ГДЕ УКАЗАННЫЕ ФРАГМЕНТЫ НЕ СОДЕРЖАТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПЕПТИДА SMS-010), И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ

Для обеспечения дополнительного эффекта или использования, или для увеличения терапевтической эффективности биологически активные пептиды по настоящему изобретению можно конъюгировать с другими биологически эффективными или пригодными молекулами. В данной области известно множество возможных молекул для конъюгации, их биологические эффекты и способы конъюгации молекул с пептидами. Для других кандидатов в партнеры по конъюгации химические реакции конъюгации с ними этих пептидов могут быть выведены специалистом в данной области без излишнего экспериментирования. Эффективные молекулы описаны ниже. Описаны конкретные примеры того, как различные пептиды по настоящему

изобретению можно конъюгировать с эффективными молекулами, и биологические свойства продукта, полученного в результате конъюгации. Понятно, что для других пептидов по настоящему изобретению также можно осуществлять конъюгацию посредством сходных реакций.

5 Фрагменты пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональных производных могут оказывать различные
10 терапевтические воздействия на конкретные типы клеток или тканей. Одной из существенных целей конъюгации молекул с пептидным лекарственным веществом является направление пептида в конкретную область или отдел организма индивидуума, подвергаемого лечению. Таким образом, пептидное лекарственное средство и его эффекты можно концентрировать в области тех типов клеток или
15 тканей, на которые направлено терапевтическое воздействие. Это может усилить эффект, которым обладало бы сходное молярное количество свободного, неконъюгированного пептида. Напротив, дозирование конъюгированного пептидного лекарственного средства, направляемого в область его терапевтической активности, может быть значительно меньшим по сравнению с необходимым для
20 получения того же терапевтического эффекта дозированием свободной неконъюгированной формы лекарственного средства.

Другим благоприятным эффектом направления пептидного лекарственного средства в область, где его активность наиболее желательна, является снижение
25 нежелательных побочных эффектов. Пептидное лекарственное средство, которое вводят с целью вызвать изменение в конкретных типах клеток или тканей, также может действовать в других отделах организма индивидуума, иногда с неблагоприятными последствиями. Посредством направления пептида в желательную
30 область активности посредством конъюгации с направляющей молекулой можно снизить концентрацию пептида в других отделах организма индивидуума и соответствующие побочные эффекты.

Для направления в различные области по всему организму индивидуума пептиды, содержащие выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящие
35 или состоящие из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности, где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010, и его функциональные производные можно конъюгировать со множеством молекул. Для любого пептида по настоящему изобретению для направления пептида в желательную область можно
40 использовать любой из способов конъюгации, описанных ниже, а также другой способ конъюгации, известный специалистам в данной области. Например, была показана селективная доставка лекарственного средства против гепатита В в клетки печени (Fiume et al., Ital J Gastroenterol Hepatol, 29(3): 275, 1997, включенная сюда в качестве ссылки в полном объеме). В этом исследовании исследователи
45 конъюгировали аденинарабинозидмонофосфат (ara-AMP), фосфорилированный нуклеозидный аналог, активный в отношении вируса гепатита В, с лактозаминированным человеческим альбумином, макромолекулой, оканчивающейся галактозиллом. Гепатоциты экспрессируют рецепторный белок, взаимодействующий с терминальным галактозильным остатком с высокой аффинностью. Посредством
50 связывания с рецептором конъюгированное лекарственное средство селективно захватывается гепатоцитами. После поглощения конъюгированное лекарственное средство доставляется в лизосомы, где расщепляется связь между двумя

компонентами конъюгированного лекарственного средства с высвобождением ага-АМР в его активной форме. В указанном выше исследовании конъюгированное лекарственное средство оказалось таким же эффективным для лечения пациентов с хроническим инфекционным гепатитом В, как и свободный ага-АМР, но не приводило к клиническим побочным эффектам, таким как нейротоксичность, к которой приводило введение свободного ага-АМР. Такой подход можно применять к любому из пептидов по настоящему изобретению.

В исследовании, связанном с указанным выше исследованием той же исследовательской группы (Di Stefano et al., *Biochem. Pharmacol.*, 61 (4): 459, 2001), в целях направления соединения в печень и лечения микрометастазов в печени химиотерапевтическое средство против злокачественной опухоли 5-фтор-2-дезоксифторидин (FUdR) конъюгировали с лактозаминированным поли-L-лизинном. Лекарственное средство селективно захватывается клетками печени, которые расщепляют связь между FUdR и направляющей молекулой. Затем часть свободного FUdR покидает клетки печени и создает локальную терапевтическую концентрацию средства против злокачественной опухоли. Эта концентрация является достаточной для фармацевтической активности в отношении клеток метастазов, инфильтрирующих печень. Вследствие селективного концентрирования в печени лекарственного средства дозировка конъюгированного лекарственного средства может быть значительно меньшей по сравнению с наименьшей фармацевтически активной дозой свободного неконъюгированного соединения. Эту стратегию можно использовать по отношению к любому из пептидов по настоящему изобретению. Например, конъюгация лактозаминированного поли-L-лизина с пептидом, содержащим выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящим или состоящим из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональными производными может значительно уменьшить дозирование, необходимое для лечения или профилактики клеточно-пролиферативных нарушений с вовлечением тканей печени.

Направление соединений в конкретные типы тканей или клеток организма достигнуто для множества различных типов тканей или клеток. Например, клетки опухоли часто экспрессируют на своей поверхности аномально высокие уровни рецепторов для пептидных гормонов, таких как бомбезин, лютеинизирующий релизинг-гормон и соматостатин. В одном исследовании соединение против злокачественной опухоли паклитаксел (таксол) селективно направляли к секретирующим гормон клеткам опухоли, с высокой плотностью экспрессирующим рецепторы для соматостатина, посредством конъюгации лекарственного вещества с октреотидом, аналогом соматостатина. Конъюгированный с октреотидом таксол был таким же эффективным, как и свободный таксол, но обладал сниженной токсичностью по отношению к нормальным клеткам. (Huang et al., *Chem. Biol.*, 7(7): 453, 2000). Посредством применения способов по Huang et al. для конъюгации пептидов по настоящему изобретению с аналогами агонистов рецептора пептидного гормона можно создать способ лечения, направленный конкретно против клеток, экспрессирующих высокие уровни данного конкретного рецептора пептидного гормона. Этот подход можно адаптировать для клеток-мишеней с повышенной экспрессией любого количества рецепторов пептидных гормонов. В другом примере направление лекарственного средства в конкретный тип ткани, для направления высвобождения конкретно к клеткам толстого кишечника в качестве

молекулы-носителя применяли поли-L-аспарагиновую кислоту (Leopold et al., J. Pharmacokinet. Biopharm., 23(4): 397, 1995).

Кроме конкретного направления пептидного лекарственного средства к конкретному типу клеток или ткани конъюгация пептидов, содержащих выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящих или состоящих из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанные пептиды не содержат последовательность пептида CMS-010), и их функциональных производных с молекулами-носителями может обеспечить другие пути улучшения доставки пептидных лекарственных средств, таким образом усиливая или иным образом улучшая их терапевтические эффекты. Для любого из пептидов по настоящему изобретению можно применять любую из описанных ниже технологий, а также другие технологии, известные специалистам в данной области. Эффективность любого из лекарственных средств снижается, если соединение не доставить эффективно к его мишени. Лекарственное средство можно транспортировать к области его действия активно или другим способом без существенного снижения активности вследствие метаболического преобразования или деградации. Пептидные лекарственные средства подвержены действию пептидаз и в случае сильно заряженных молекул могут быть неспособными к транспортировке через липидные клеточные мембраны и мембраны клеток эндотелия, такие как гематоэнцефалический барьер. Конъюгация с другими молекулами относится к способу защиты пептидов от деградации и усиления всасывания пептидного лекарственного средства в клетки или анатомические отделы, в которые соединения в обычных условиях не проникают.

Делая возможным доступ пептидов в области организма, в которые они в обычных условиях не проникают, способы конъюгации могут делать доступными новые способы введения лекарственного средства. В статье Patel et al., Bioconjugate Chem., 8 (3): 434, 1997, химизм которой подробно описан ниже в примере 5 и которая включена сюда в качестве ссылки в полном объеме, исследователи конъюгировали пептидное лекарственное средство, известное в качестве сильного болеутоляющего средства, гептапептид дельторфин с органической молекулой, которую разработали конкретно для того, чтобы придать способности пептиду проникать через гематоэнцефалический барьер. Это позволило вводить лекарственное средство внутривенно вместо интрацеребровентрикулярного введения.

В дополнение к приданию пептиду способности проникать через барьер молекула-носитель в Patel et al. была разработана для конкретного направления в эндотелиальные клетки, входящие в состав гематоэнцефалического барьера. Мембраны эндотелиальных клеток всего организма, включая гематоэнцефалический барьер, являются гетерогенными в отношении специфичности последовательности и концентрации мембраносвязанных эндопептидаз, которые находятся на их поверхностях. При разработке молекул используют эти характеристики, чтобы сделать возможным направление молекулы-носителя и ее груза. Молекула содержит три цепи жирных кислот, свободные концы которых оканчиваются дипептидом Arg-Pro, который предпочтительно взаимодействует с эндопептидазами гематоэнцефалического барьера. Осуществления транспорта заряженной молекулы пептидного лекарственного средства можно достичь посредством липофильных цепей жирных кислот. Таким образом, триглицеридная молекула, оканчивающаяся дипептидом, позволяет осуществить и направление, и транспорт через гематоэнцефалический барьер.

Также посредством способов конъюгации улучшают кинетику активности

пептидного лекарственного средства. В отношении пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных для улучшения кинетики активности пептида можно применять любую из описанных ниже технологий конъюгации, а также другие технологии конъюгации, известные специалистам в данной области. Patel et al. обнаружили, что конъюгированные формы болеутоляющего пептида не только способны проникать из кровотока в мозг, но и обладают большей продолжительностью действия по сравнению со свободным пептидом. При внутривенном введении требуется больше времени для достижения терапевтического эффекта, но эффект длится дольше и ослабляется медленнее, чем эффект от свободного пептида, введенного интракраниально. Исследователи обнаружили, что конъюгированная пептидная молекула в значительной степени стабильна в сыворотке, тем не менее не обладает эффектом при интрацеребровентрикулярном введении, что указывает на то, что молекула-носитель, вероятно, деградируется и удаляется в процессе ее транспорта из кровотока в мозг. Они предположили, что причиной изменения кинетики является время, необходимое для транспорта конъюгата и деградации молекулы-носителя. Независимо от механизма задержки, в условиях клиники внутривенная стабильность конъюгированной пептидной молекулы и более длительное начало и активность эффектов лекарственного средства может означать, что его можно вводить менее часто. Менее частый и таким образом более удобный режим дозирования увеличивает практическую полезность лекарственного средства в качестве средства лечения.

Специалистам в данной области ясно, что способы и процедуры Patel et al. являются легко адаптируемыми для доставки любых пептидов, которые попадают в ограниченный диапазон размеров, включая любой из пептидов по настоящему изобретению. Например, для лечения и/или профилактики клеточно-пролиферативных или иммунологических нарушений пептид по настоящему изобретению, такой как фрагмент VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010), можно конъюгировать с указанными выше молекулами, которые применяли Patel et al. При лечении индивидуума с инфекцией, которая поражает мозг, конъюгируемая молекула может способствовать проникновению фрагментов VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010) из кровотока в мозг и способствовать воздействию фрагментов VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010) на клетки или ткани мозга. Для таких индивидуумов модификации для изменения направления действия молекулы-носителя также очевидны. Направляющее свойство молекулы-носителя является функцией особенности двух аминокислот, которые составляют дипептидную маску на конце цепей жирных кислот. Дипептид Arg-Pro предпочтительно взаимодействует с областью мембраносвязанных эндопептидаз, обнаруживаемых на поверхности эндотелиальной мембраны гематоэнцефалического барьера. В другие эндотелиальные клетки и мембраны потенциально можно направить посредством других сочетаний дипептидов.

Также исследователи применяли конъюгацию для получения пептидных лекарственных средств, которые могут эффективно всасываться в пищеварительном тракте или трансдермально. Для улучшения всасывания пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных можно применять любую из описанных ниже технологий конъюгации

для улучшения всасывания, а также другие технологии конъюгации, известные специалистам в данной области. Kramer et al. описывают процедуру конъюгации пептидных лекарственных средств с желчными кислотами. Скорость всасывания конъюгированной молекулы после пероральной доставки соединения значительно увеличивается по сравнению с отдельным пептидом (J. Biol. Chem., 269(14): 10621, 1994). Toth et al. (J. Med. Chem., 42(19): 4010, 1999), описывают конъюгацию пептидного лекарственного средства с противоопухолевыми свойствами с липоаминокислотами (LAA) или липосахаридами (LS) в целях увеличения скорости всасывания и улучшения доставки противоопухолевого пептида в область его активности. В их исследовании производное соматостатина, проявляющее сильные антипролиферативные свойства, но обладающее сниженной фармакокинетикой, конъюгировали или с LAA, или с LS. Полученное в результате конъюгированное лекарственное средство обладало улучшенным профилем всасывания через кожу и кишечный эпителий и повышенной устойчивостью к деградации и в то же время было активным против клеток опухоли. Эти способы могут быть особенно полезными для конъюгации с любым из пептидов по настоящему изобретению. Посредством увеличения скорости всасывания молекулы через кишечный эпителий в кровоток может быть доставлено и оказывать воздействие на подвергаемого лечению индивидуума большее количество пептида.

Также конъюгацию можно применять для обеспечения замедленного высвобождения пептидного лекарственного средства. Для обеспечения замедленного высвобождения пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящую или состоящую из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных можно применять любую из описанных ниже технологий конъюгации для обеспечения замедленного высвобождения, а также другие технологии конъюгации, известные специалистам в данной области. Как видно из работы Patel et al., замедленного высвобождения пептидного лекарственного средства можно достичь способами конъюгации. Другим примером является работа Kim et al. (Biomaterials, 23: 2311, 2002), где рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста (rhEGF) перед микроинкапсулированием в биodeградируемые микросферы из сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA) конъюгировали с полиэтиленгликолем (PEG). Для доставки различных факторов роста и морфогенетических белков микроинкапсулирование в PLGA применяли в нескольких группах (Meinelet al., J. Controlled Rel., 70: 193, 2001). Вследствие конъюгации с PEG rhEGF становится устойчивым к формированию нерастворимых в воде агрегатов и к адсорбированию на поверхности раздела вода-органическая фаза в процессе формирования мицеллы с PLGA по сравнению с неконъюгированным, свободным rhEGF. Фармакокинетика препарата с конъюгированным гормоном была улучшенной, демонстрируя более продолжительную, более устойчивую и, в целом, лучшую активность лекарственного средства по сравнению со свободным гормоном, которая, как полагали исследователи, являлась следствием увеличения физической стабильности конъюгированного с PEG гормона. Для любого из пептидов по настоящему изобретению для создания препаратов с замедленным высвобождением можно использовать сходную стратегию. Например, как показано ниже в примере 1, отдельные фрагменты и производные VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010) проявляют выраженные антипролиферативные и иммуномодулирующие эффекты. Посредством

конъюгации PEG с этим пептидом и внесения конъюгированного лекарственного средства в микросферы из PLGA антипролиферативные и иммуномодулирующие эффекты фрагментов и производных VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010) могут быть более длительными и более стабильными, так как дозирование лекарственного средства по мере его высвобождения из конъюгата с PEG является более равномерным и приводит к более стабильной доставке пептидного лекарственного средства в область инфекции.

Замедленное высвобождение пептидного лекарственного средства может значительно увеличить его активность. Для обеспечения пролонгированного высвобождения пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных можно применять любую из описанных ниже технологий конъюгации для обеспечения пролонгированного высвобождения, а также другие технологии конъюгации, известные специалистам в данной области. Oldham et al. (Int. J. Oncology, 16: 125, 2000) сравнивали средство против злокачественной опухоли паклитаксел с новой формой лекарственного средства паклитакселом, конъюгированным с поли-L-глутаминовой кислотой (PG-TXL). Оказалось, что PG-TXL обладает более высокой противоопухолевой активностью по сравнению со свободным паклитакселом, что позволяет предположить, что лекарственное средство обладает улучшенными фармакокинетическими свойствами или, вероятно, даже улучшенным способом воздействия. Тем не менее исследователи обнаружили, что PG-TXL оказывает свое воздействие посредством того же механизма действия, что и свободное лекарственное средство, индуцируя остановку (блокирование) клеточного цикла посредством нарушения полимеризации субчастиц микротрубочек. Экспериментальные данные позволяют предположить, что улучшенная противоопухолевая активность конъюгированного лекарственного средства возникает вследствие продолжительного и устойчивого высвобождения свободного лекарственного средства из конъюгата с сохранением его терапевтической концентрации в течение более продолжительного периода времени по сравнению с введением свободного пептида. Посредством добавления хвоста из поли-L-глутаминовой кислоты к пептиду по настоящему изобретению с противоинфекционными свойствами можно также усилить эти свойства.

Ферментативная деградация пептидов в некоторых случаях может уменьшать эффективность пептидов в качестве лекарственных средств. Для уменьшения ферментативной деградации пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных можно применять любую из описанных ниже технологий конъюгации для уменьшения ферментативной деградации, а также другие технологии конъюгации, известные специалистам в данной области. Исследователи разработали множество подходов для защиты пептидов от секретируемых в просвет кишечника пептидаз, а также от мембраносвязанных пептидаз. Последние находятся на поверхности всех слизистых тканей, проникновение через которые часто является способом проникновения пептидных лекарственных средств. Bernkop-Schurch et al. (J. Drug Target., 7: 55, 1999) сообщили о создании препаратов пептидного лекарственного средства, содержащих ингибиторы пепсина. Аналог пепстатина ковалентно связывали с мукоадгезивными полимерами; такой

новый ингибитор пепсина включали в состав таблеток, содержащих инсулин. После инкубации при лабораторных условиях стимуляции пищеварения весь инсулин из контрольных таблеток был метаболизирован, в то время как приблизительно 50% инсулина из содержащих ингибитор таблеток оказалось защищенным от деградации.

5 В другом исследовании для ингибирования деградации биологически активных пептидов указанная выше группа применяла ингибиторы в дозировках, в обычных условиях приводящих к токсическим побочным эффектам (Bernkop-Schnurch et al., Adv. Drug Del. Rev., 52: 127, 2001). В этом подходе применяли родственный целлюлозе
10 аминополисахарид хитозан, экстрагируемый из хитина, основного структурного полисахарида, обнаруженного у ракообразных и других организмов. Посредством конъюгации ингибиторов протеаз с хитозаном и включения конъюгированной молекулы в состав препарата пептидного лекарственного средства обнаружили
15 значительное ингибирование протеаз пищеварительного тракта с повышением биодоступности пептида без побочных эффектов, которые можно ожидать от введения свободных ингибиторов протеаз. В этом исследовании множество ингибиторов протеаз отдельно и в сочетании применяли для конъюгации с хитозановым носителем. Конъюгат хитозан-ЭДТА также хорошо ингибировал
20 эндогенные протеазы посредством связывания минеральных кофакторов, необходимых для активности определенных протеаз. Специалистам в данной области легко понять, что для придания полезных свойств препарату пептида можно получать большое количество возможных сочетаний между молекулами-носителями и эффекторными участками, любые из которых можно легко адаптировать для
25 применения пептида по настоящему изобретению. При получении препарата для пероральной доставки пептида с применением связанных с хитозаном ингибиторов протеаз пероральную доставку пептида по настоящему изобретению можно применять вместо внутримышечного введения. Этот подход не исключает применения
30 более всасываемого конъюгированного варианта пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных (рассмотренных абзацем выше) для получения еще большего уровня биодоступности
35 этого пептида и его производных.

В дополнение к направлению в область действия другой молекулой пептиды могут служить в качестве направляющей молекулы самостоятельно. Для пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу
40 состоящего или состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных для использования пептида в целях направления молекулы в желательную область можно применять любую из описанных ниже технологий конъюгации, а также другие технологии конъюгации, известные
45 специалистам в данной области. Например, исследователи брали лекарственное средство против злокачественной опухоли диформетилорнитин (DFMO) и в целях направления действия конъюгировали его с пептидом. DFMO представляет собой высокоцитотоксическое вещество, которое эффективно вызывает гибель множества
50 типов опухолевых клеток. Однако вследствие его быстрого выведения из организма его терапевтическая ценность ограничена. В этом исследовании DFMO конъюгировали с отдельным фрагментом α -меланотропина и аналогами фрагмента, содержащими две аминокислотные замены, для которых было показано

предпочтительное связывание с рецепторами меланотропина клеточной линии меланомы человека (Suli-Vargha et al., J. Pharm. Sci., 86: 997, 1997). Для облегчения высвобождения DFMO из пептидных фрагментов посредством аминопептидаз лекарственное средство конъюгировали с N-концом пептидов. Исследователи
5 обнаружили, что конъюгированные лекарственные средства являются более эффективными в отношении гибели клеток меланомы, чем неконъюгированное отдельное лекарственное средство.

Эффекты пептидов по настоящему изобретению могут частично быть следствием
10 присущей самим пептидам направляющей способности. Например, как в случае фрагмента α -меланотропина, отдельный пептид по этому изобретению может связываться с определенным рецептором, находящимся на поверхности клеток различного типа. Посредством применения этого пептида в качестве конъюганта действие лекарственного средства можно направить в область тех клеток организма
15 индивидуума, которые следует лечить.

Пептиды в качестве конъюгатов могут выполнять функции, отличные от направления действия. Для увеличения эффективности пептида, содержащего выбранную из SEQ ID № 2-31 последовательность, по существу состоящего или
20 состоящего из выбранной из SEQ ID № 2-31 последовательности (где указанный пептид не содержит последовательность пептида CMS-010), и его функциональных производных можно применять любую из описанных ниже технологий конъюгации для увеличения терапевтической эффективности пептида, а также другие технологии конъюгации, известные специалистам в данной области. Fitzpatrick et al. улучшили конъюгированное средство против злокачественной опухоли, используя пептидный
25 спейсер между двумя молекулами (Anticancer Drug Design, 10: 1, 1995). Ранее для увеличения усвоения клетками опухоли и активности против клеток опухоли метотрексат конъюгировали с сывороточным альбумином человека (HSA). После поглощения клеткой некоторая часть метотрексата высвобождается из конъюгата посредством лизосомальных ферментов и затем может осуществлять свои
30 цитотоксические эффекты. Посредством встраивания линкерного пептида из четырех аминокислот между метотрексатом и HSA, который легко расщепляется лизосомальными ферментами, повышали уровень полученного из конъюгированной
35 молекулы активного метотрексата в клетках. Пептиды по настоящему изобретению могут осуществлять свои воздействия через конкретное взаимодействие с определенными ферментами. Посредством встраивания пептида по настоящему изобретению в конъюгированную молекулу в качестве линкерного сегмента между
40 лекарственным веществом и его молекулой-носителем или добавления к другому линкерному сегменту можно изменять фармакокинетику. Это позволяет получить предшественник лекарственного средства, который является более устойчивым или более чувствительным к действию протеаз, которые соответственно снижают или
45 увеличивают скорость высвобождения из конъюгата молекул лекарственного средства. Как видно из указанных выше примеров конъюгированных средств для химиотерапии, изменение, которое определяет скорость доставки молекулы лекарственного средства, может значительно увеличить эффективность лекарственного средства.

Воздействия лекарственного средства на конкретную клетку могут изменяться в зависимости от других факторов, таких как уровень активации клетки или наличие других молекулярных сигналов вблизи или внутри клетки. В некоторых случаях для того, чтобы лекарственное средство обладало эффектом, необходимо присутствие

других молекул или сигналов. Damjancic et al. (Exp. Clin. Endocrin., 95: 315, 1990) исследовали воздействие человеческого предсердного натрийуретического фактора (hANP) на пациентов с недостаточным синтезом эндогенных глюкокортикоидов. Пептид давали пациентам при синдроме отмены
5 глюкокортикоидной терапии или при последующем возобновлении терапии с применением дексаметазона. Пациенты отвечали на hANP увеличением диуреза и экскреции натрия только тогда, когда в процессе сопутствующего лечения дексаметазоном им давали пептидный гормон. Лечение посредством hANP при
10 синдроме отмены глюкокортикоидной терапии не имело эффекта. Эффектом сопутствующего введения стероидного гормона также может быть увеличение активности пептида. Согласно сообщению Zhu et al. (Acta Pharm. Sinica, 28: 166, 1993) активность болеутоляющего пептида китторфина (КТР) при конъюгации с
15 гидрокортизоном через короткий линкерный сегмент значительно увеличивалась по сравнению с воздействием отдельного пептида. Не было обнаружено эффекта после введения гидрокортизона отдельно.

Результаты этих исследований иллюстрируют способность стероидных гормонов в качестве молекул для конъюгации или ингредиентов в препарате обеспечивать
20 увеличение активности биологически активных пептидов. Любой из пептидов по настоящему изобретению также можно модулировать или активировать посредством конъюгации или совместного применения со стероидными гормонами. Способы Zhu et al. легко можно адаптировать для конъюгации стероидных молекул с пептидом по
25 настоящему изобретению. На фигурах с 1 до 5 также представлены иллюстративные поэтапные реакции синтеза для связывания стероидных гормонов с любым из пептидов по настоящему изобретению.

Приведенные выше примеры предоставляют иллюстративные способы увеличения пригодности и активности любого из пептидов по настоящему изобретению.

30 Дополнительные разработки в данной области помогут преодолеть препятствия при создании основанных на пептидах эффективных способов клинического лечения. Специалистам в данной области ясно, что способы, реагенты и протоколы, разработанные для применения в биохимии, фармацевтических исследованиях и
35 клинических испытаниях пептида легко применимы для любого из пептидов по настоящему изобретению.

Примеры

ПРЕДПОСЫЛКИ

Можно ожидать, что некоторые аминокислоты из
40 последовательности VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010) могут быть более важными для биологической активности, чем другие. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения посредством обнаружения активного участка/участков в VAREENPTLLTEAPLNPK (CMS-010) можно удалять из последовательности те
45 аминокислоты, которые не участвуют в активности пептида, так что биологически активная молекула может быть более короткой. Также можно осуществлять рекомбинации различных активных частей пептида для получения новых пептидных молекул, обладающих модифицированной биологической активностью. Укорочение биологически активной молекулы пептида может иметь и биологическое и
50 экономическое значение. Вследствие наличия более короткой последовательности биологические свойства пептида модифицированы, и такие модификации могут обладать потенциальными терапевтическими преимуществами, такими как модифицированные период полувыведения из организма, аффинность в отношении

рецептора или профиль побочного действия. Также более короткие пептиды дешевле получать и можно уменьшить стоимость производства.

В целях обнаружения активных участков в VAPEEHPHTLLTEAPLNPK (CMS-010) авторы осуществили ряд экспериментов по усечению. CMS-010 подвергали усечению по каждой из пептидных связей с N-конца и C-конца. Авторы предположили, что, если активный участок окажется отсеченным, биологическая активность полученной пары пептидов снизится, исчезнет или некоторым образом модифицируется (активация/инактивация биологической активности). После определения положения активного участка/участков в CMS-010 посредством сочетания различных активных участков можно сконструировать ряд новых пептидов.

В экспериментах авторы изобретения идентифицировали ряд усеченных или рекомбинантных пептидов, как обладающих биологической активностью, которые обладают потенциалом для терапевтического применения для человека или биологического применения. Этот ряд пептидов приведен ниже в таблице 1. Результаты авторов приведены в примерах после таблицы 1.

Таблица 1		
Усеченные и рекомбинантные пептиды на основе последовательности CMS-010		
Пептид	Последовательность	SEQ ID No.
CMS-010.02	APЕEHPHTLLTEAPLNPK	2
CMS-010.03	VAPEEHPHTLLTEAPLN	3
CMS-010.04	PEEHPHTLLTEAPLNPK	4
CMS-010.05	VAPEEHPHTLLTEAPLN	5
CMS-010.07	VAPEEHPHTLLTEAPL	6
CMS-010.08	VAPEEHPHTLLTEAP	7
CMS-010.09	HPHTLLTEAPLNPK	8
CMS-010.11	HPHTLLTEAPLNPK	9
CMS-010.12	VAPEEHPHTLLTE	10
CMS-010.13	PTLLTEAPLNPK	11
CMS-010.14	VAPEEHPHTLLT	12
CMS-010.15	TLLTEAPLNPK	13
CMS-010.16	VAPEEHPHTLL	14
CMS-010.17	LLTEAPLNPK	15
CMS-010.18	VAPEEHPHTL	16
CMS-010.19	LTEAPLNPK	17
CMS-010.20	VAPEEHP	18
CMS-010.21	TEAPLNPK	19
CMS-010.22	VAPEEHP	20
CMS-010.23	EAPLNPK	21
CMS-010.24	APLNPK	22
CMS-010.25	VAPEEH	23
CMS-010.26	PLNPK	24
CMS-010.27	VAPEE	25
CMS-010.28	LNPK	26
CMS-010.29	VAPE	27
CMS-010.31	NPK	28
CMS-010.32	VA	29
CMS-010.103	VALLT	30
CMS-010.105	VANPK	31

Пример 1

Воздействие пептидов на трансформацию мышечных Т-лимфоцитов, индуцируемую посредством ConA *in vitro*

1.1 Вещества

1.1.1 Пептиды

Все используемые аминокислоты находились в L-форме: CS Bio Co., USA

1.1.2 Контрольные и другие реагенты

Физиологический раствор: OTSUKA Pharmaceutical Co., Ltd, PR China.

5 Культуральная среда RPMI-1640 и эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС): Gibco Co., USA. МТТ и ConA: Sigma Co., USA

1.2 Животные

10 Мыши BALB/c (H-2^d, SPF, возраст 6-8 недель, масса 18-22 г): Military Medical Academy of Science, PR China.

1.3 Способ^[1]

15 Селезенки здоровых мышей в асептических условиях выделяли и вручную диспергировали в растворе 10% ЭТС RPMI-1640 с применением иглы для инъекции. Далее диспергированную суспензию клеток просеивали через сито из нержавеющей стали с диаметром 150 мкм калибра 100. Затем суспензию клеток селезенки доводили до концентрации 4×10^6 в мл и аликвоты распределяли в 96-луночные культуральные планшеты. Пептиды растворяли в простой среде RPMI-1640. Схема распределения по группам приведена ниже.

20 Пептидная группа: 100 мкл рабочего раствора пептида + 75 мкл суспензии клеток селезенки + 25 мкл рабочего раствора ConA.

Контрольная группа с ConA: 100 мкл RPMI-1640 + 75 мкл суспензии клеток селезенки + 25 мкл рабочего раствора ConA.

25 Группа отрицательного контроля: 125 мкл RPMI-1640 + 75 мкл суспензии клеток селезенки.

30 Конечная концентрация ConA в лунке составляла 5 мкг/мл. Конечные концентрации пептидов в лунках составляли 80 мкг/мл, 16 мкг/мл, 3,2 мкг/мл, 0,64 мкг/мл и 0,128 мкг/мл. Каждую пептидную группу помещали в три параллельные лунки, а контрольную группу помещали в восемь или двенадцать лунок. Клетки инкубировали в течение 68 часов при 37°C, 5% CO₂. Для получения значений OD_{570нм} для каждой лунки с контролем при 630 нм применяли способ МТТ на устройстве для считывания ELISA.

1.4 Результаты

Таблица 2 Воздействие пептидов на индуцированную посредством ConA трансформацию мышинных Т-лимфоцитов <i>in vitro</i> .			
Группа	Концентрация	N	OD
40 CMS-010.26	80 мкг/мл	3	0,353±0,016*
CMS-010.26	16 мкг/мл	3	0,356±0,006*
CMS-010.26	3,2 мкг/мл	3	0,332±0,015*
CMS-010.26	0,64 мкг/мл	3	0,348±0,025*
CMS-010.26	0,128 мкг/мл	3	0,354±0,017*
45 CMS-010.105	80 мкг/мл	3	0,407±0,019*
CMS-010.105	0,64 мкг/мл	3	0,386±0,008*
Отрицательный контроль	-	12	0,134±0,011*
Контроль с ConA	5 мкг/мл	12	0,467±0,043
*: по сравнению с положительной контрольной группой с ConA, P<0,05			
Таблица 3 Воздействие пептидов на индуцированную посредством ConA трансформацию мышинных Т-лимфоцитов <i>in vitro</i> .			
Группа	Концентрация	N	OD
50 CMS-010.32	80 мкг/мл	3	0,276±0,034*
CMS-010.32	16 мкг/мл	3	0,273±0,023*
CMS-010.32	3,2 мкг/мл	3	0,309±0,030*

CMS-010.32	0,64 мкг/мл	3	0,321±0,048
CMS-010.32	0,128 мкг/мл	3	0,306±0,033*
Отрицательный контроль	5 мкг/мл	8	0,108±0,012*
Контроль с ConA	-	8	0,358±0,028

*: по сравнению с положительной контрольной группой с ConA, P<0,05

1.5 Вывод

Обнаружено, что CMS-010.26, CMS-010.32 и CMS-010.105 в приемлемых концентрациях по сравнению с положительным контролем с ConA способны со статистической значимостью подавлять индуцированную посредством ConA трансформацию мышинных Т-лимфоцитов *in vitro*, (P<0,05).

Пример 2

Воздействие пептидов на трансформацию мышинных Т-лимфоцитов и активность НК-клеток *in vivo*

2.1 Вещества

2.1.1 Пептиды

Все используемые аминокислоты были в L-форме: CS Bio Co., USA.

2.1.2 Контрольные и другие реагенты

Циклоспорин А: Novartis Pharma AG., Switzerland. Физиологический раствор: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd, PR China. Культуральная среда RPMI-1640 и эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС): GIBCOL, USA. МТТ и ConA: Sigma Co., USA

2.1.3 Животные

Мыши BALB/c (H-2^d, SPF, возраст 6-8 недель, масса 18-22 г, 50% самок и 50% самцов): Military Medical Academy of Science, PR China

2.2 Способ

2.2.1 Разделение животных на группы и введение

Животных случайным образом разделяли на две группы, получавших пептид (200 мкг/кг в сутки и 50 мкг/кг в сутки), группу получавших циклоспорин А (10 мг/кг в сутки) и группу получавших физиологический раствор (0,5 мл в сутки). Каждая группа включала в себя 10 мышей, в которой половина самок и половина самцов. Все тестируемые вещества растворяли в 0,5 мл физиологического раствора и вводили интраперитонеально один раз в сутки в течение 20 суток. Трансформацию Т-лимфоцитов и активность НК-клеток определяли в день последнего введения сразу после введения.

2.2.2 Трансформация Т-лимфоцитов^[1-2]

В день последнего введения тестируемого вещества после введения мышей умерщвляли посредством смещения шейных позвонков. Селезенки выделяли в асептических условиях и вручную диспергировали в растворе 10% ЭТС RPMI-1640 с применением иглы для введения. Далее диспергированную суспензию клеток просеивали через сито из нержавеющей стали с диаметром 150 мкм калибра 100 и доводили до концентрации 4×10⁶/мл. Суспензии клеток добавляли в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 100 мкл на лунку по следующему ниже образцу.

Анализируемые лунки: 100 мкл суспензии клеток + 100 мкл ConA

Контрольные лунки: 100 мкл суспензии клеток + 100 мкл RPMI-1640

Для клеток каждого животного было предназначено четыре аналитические и четыре контрольные лунки. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 68 часов. Затем добавляли МТТ и для планшетов получали значения OD при 570 нм с контролем при 630 нм на устройстве для считывания ELISA. Индекс стимуляции SI (%)

= (OD в анализируемых лунках/OD в контрольных лунках) x 100%.

2.2.3 Воздействие пептидов на активность NK-клеток^[3-5]

Клетки-мишени YAC-1 выращивали до лог-фазы и доводили до количества 1×10^5 /мл. Клетки селезенки мышей, полученные согласно указанному выше разделу 2.2.2, доводили до количества 4×10^6 /мл и применяли в качестве эффекторных клеток. Суспензии клеток добавляли в 96-луночные планшеты следующим ниже образом:

Лунки с эффекторными клетками: 100 мкл суспензии клеток селезенки + 100 мкл RPMI-1640

Аналитические лунки: 100 мкл суспензии клеток селезенки + 100 мкл суспензии клеток YAC-1

Лунки с клетками-мишенями: 100 мкл суспензии клеток YAC-1 + RPMI-1640

На культуральной планшете для клеток, для клеток каждого животного было предназначено три аналитические и три контрольные лунки и было предназначено 12 лунок для клеток-мишеней. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 4 часов, а затем добавляли МТТ и получали значения OD при 570 нм с контролем при 630 нм на устройстве для считывания ELISA. Активность NK-клеток (%) = $1 - [(OD \text{ в анализируемых лунках} - OD \text{ в лунках с эффекторными клетками}) / OD \text{ в лунках с клетками-мишенями}] \times 100\%$.

2.3 Результаты

2.3.1 Эксперимент по трансформации T-лимфоцитов

Группа	Дозирование	N	SI
CMS-010.24	50 мкг/сутки	10	2,40±0,31**
CMS-010.26	200 мкг/сутки	7	2,19±0,59**
CMS-010.28	200 мкг/сутки	9	2,70±0,37**
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	8	3,63±0,69

** : по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,01

Группа	Дозирование	N	SI
CMS-010.25	200 мкг/кг/сутки	10	2,43±0,69*
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	10	3,15±0,83

* : по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,05

Группа	Дозирование	N	SI
CMS-010.04	50 мкг/кг/сутки	8	1,56±0,25**
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	9	2,24±0,52

** : по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,01

Группа	Дозирование	N	SI
CMS-010.12	50 мкг/кг/сутки	10	2,12±0,42**
CMS-010.14	50 мкг/кг/сутки	9	2,12±0,51**
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	10	2,96±0,61

** : по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,01

2.3.2 Эксперимент по активности НК-клеток⁽¹⁾

5

Группа	Дозирование	N	Активность НК-клеток(%)
CMS-010.24	200 мкг/кг/сутки	10	69,0±7,4*
CMS-010.24	50 мкг/кг/сутки	10	56,0±6,0**
CMS-010.26	200 мкг/кг/сутки	9	67,7±5,3**
CMS-010.26	50 мкг/кг/сутки	10	68,5±7,2*
CMS-010.28	200 мкг/кг/сутки	9	70,3±6,7*
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	10	76,0±4,3

*: по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,05: **: по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,01

15

Группа	Дозирование	N	Активность НК-клеток (%)
CMS-010.11	50 мкг/кг/сутки	9	63,5±4,7**
CMS-010.13	50 мкг/кг/сутки	10	70,9±17,5*
CMS-010.14	200 мкг/кг/сутки	8	43,1±13,7*
CMS-010.14	50 мкг/кг/сутки	9	75,3±9,0**
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	10	55,3±6,1

*: по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,05: **: по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,01

25

2.4 Вывод

Обнаружено, что при приемлемом дозировании CMS-010.04, CMS-010.12, CMS-010.14, CMS-010.24, CMS-010.25, CMS-010.26 и CMS-010.28 по сравнению с контролями, получавшими физиологический раствор, подавляют со статистической значимостью трансформацию мышинных Т-лимфоцитов *in vivo* (P<0,05).

Обнаружено, что при приемлемом дозировании CMS-010.24, CMS-010.26 и CMS-010.28 по сравнению с контролями, получавшими физиологический раствор, подавляют со статистической значимостью активность НК-клеток *in vivo* (P<0,05).

Обнаружено, что при соответствующем дозировании CMS-010.11, CMS-010.13 и CMS-010.14 по сравнению с контролями, получавшими физиологический раствор, увеличивают со статистической значимостью активность НК-клеток *in vivo* (P<0,05).

Пример 3

Воздействие пептида на образование антител у мышей *in vivo*

3.1 Вещества

3.1.1 Пептид

Все используемые аминокислоты были в L-форме: CS Bio Co., USA.

3.1.2 Контрольные и другие реагенты

Циклоспорин А: Novartis Pharma AG., Switzerland. Физиологический раствор: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd, PR China

3.1.3 Животные

Мыши BALB/c (H-2^d, SPF, возраст 6-8 недель, масса 18-22 г, 50% самок и 50% самцов): Military Medical Academy of Science, PR China

50

3.2 Способ

3.2.1 Разделение животных на группы и введение тестируемого вещества

Мышей случайным образом разделяли на три группы: получавших пептид (200

мкг/кг в сутки), циклоспорин А (10 мг/кг в сутки) и физиологический раствор (0,5 мл). Каждая группа включала в себя 12 мышей, 6 самок и 6 самцов. Тестируемые вещества растворяли в 0,5 мл физиологического раствора и вводили интраперитонеально один раз в сутки в течение 20 последующих суток.

3.2.2 Увеличение и подсчет количества антител ^[7]

Эритроциты овцы (SRBC) ресуспендировали в физиологическом растворе до 2% (об./об.) и 0,2 мл раствора ресуспендированных клеток вводили интраперитонеально каждой мышце на 16 сутки после введения тестируемого вещества. В день последнего введения тестируемого вещества после последнего введения кровь отбирали из внутреннего угла глазной щели и оставляли при комнатной температуре в течение одного часа для отделения сыворотки. После центрифугирования при 200 g в течение 10 минут сыворотку разбавляли в 200 раз нормальным физиологическим раствором.

Для получения рабочего раствора комплемента к одному объему осажденных посредством центрифугирования SRBC добавляли 10 объемов свежей сыворотки морской свинки. Эту смесь осторожно перемешивали в течение 30 минут при 4°C. Посредством центрифугирования SRBC удаляли при 200 g в течение 10 минут. Для получения рабочего раствора комплемента к супернатанту добавляли десять объемов нормального физиологического раствора.

Для анализа титра мышинных антител 0,2 мл 1% суспензии SRBC добавляли к 1 мл разбавленной ледяной мышинной сыворотки от каждой мыши. Затем добавляли один мл рабочего раствора комплемента и смесь инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Реакцию прекращали посредством охлаждения каждого образца во льду в течение 10 минут. Затем для получения супернатанта образцы центрифугировали при 200 g в течение 10 минут. К 1 мл этого супернатанта добавляли 3 мл раствора Дабкина и оставляли при комнатной температуре на 10 минут и затем измеряли

OD_{540nm} . Значения OD_{540nm} лизиса-50 в контроле определяли в точности согласно процедуре для образца, за исключением замены половины SRBC физиологическим раствором и без удаления посредством центрифугирования нелизированных SRBC. Индекс сыворотки образца (HC_{50}) = OD_{540nm} образца / OD_{540nm} лизиса-50 × 200.

3.3 Результаты

Таблица 10 Воздействие пептида на образование мышинных антител.			
Группа	Дозирование	N	HC_{50}
CMS-010,26	200 мг/кг/сутки	10	141,3±29,3*
Циклоспорин А	10 мг/кг/сутки	12	148,9±21,7*
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	11	167,6±21,5

*: по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,05

3.4 Вывод

Обнаружено, что при приемлемом дозировании CMS 010.26 по сравнению с контрольной группой получавших физиологический раствор подавляет со статистической значимостью образование антител у мышей (P<0,05).

Пример 4

Воздействие пептидов на рост трансплантированных в мышцы КМ клеток саркомы S180 *in vivo*

4.1 Материалы

4.1.1 Пептиды

Все используемые аминокислоты были в L-форме: CS Bio Co., USA.

4.1.2 Контрольные и другие реагенты

Физиологический раствор: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd, PR China. Адриамицин: Zhejiang Haizheng Pharmaceutical Co., Ltd., PR China

4.1.3 Животные

Здоровые мыши КМ (SPF, возраст 6-8 недель, масса 18-22 г): Military Medical Academy of Science, PR China

4.2 Способ

4.2.1 Разделение животных на группы, введение тестируемого вещества и имплантация клеток опухоли^[8]

Клетки саркомы S₁₈₀ трансплантировали интраперитонеально мышам КМ на 6-8 дней и в асептических условиях отбирали асцитную жидкость. Концентрацию клеток доводили до 1×10^7 в мл раствора 10% ЭТС RPMI-1640 и 0,2 мл суспензии клеток вводили в подмышечную впадину каждой мыши КМ для получения модели мышей с саркомой. Мыши с трансплантированными S₁₈₀ случайным образом разделили на пять групп: получавших пептид (две группы: 50 мкг/кг в сутки и 10 мкг/кг/сутки), адриамицин (2 мг/кг в сутки), циклофосфамид (40 мг/кг/сутки) и физиологический раствор (0,5 мл в сутки). Интраперитонеальное введение тестируемых соединений начинали в день трансплантации опухоли сразу после трансплантации и продолжали вводить один раз в сутки в течение 20 последующих дней.

4.2.2 Определение развития саркомы

В день последнего введения тестируемого соединения после введения из мышей удаляли саркомы и взвешивали. Диаметры каждой саркомы измеряли штангенциркулем в трех проекциях (А, В, С). Объем саркомы вычисляли по формуле $V = (1/6)\pi ABC$. Индекс ингибирования роста опухоли определяли по формуле: индекс ингибирования роста опухоли = (масса опухоли в контрольной группе - масса опухоли в группе получивших лечение) / масса опухоли в контрольной группе $\times 100\%$.

4.3 Результаты

Таблица 11
Воздействие пептидов на развитие трансплантированных в мышцы КМ клеток саркомы S₁₈₀ *in vivo*⁽¹⁾.

Группа	Дозирование	N	Масса саркомы
CMS-010.31	50 мкг/кг/сутки	17	1,20±1,60*
CMS-010.31	10 мкг/кг/сутки	14	1,05±1,28*
CMS-010.103	50 мкг/кг/сутки	15	1,48±1,44*
CMS-010.103	10 мкг/кг/сутки	15	1,72±1,53*
Адриамицин	2 мг/кг/сутки	17	1,52±1,75*
Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	12	5,07±5,46

*: по сравнению с группой получавших нормальный физиологический раствор, P<0,05

Таблица 12
Воздействие пептидов на рост трансплантированных в мышцы КМ клеток саркомы S₁₈₀ *in vivo*⁽²⁾

Группа	Дозирование	N	Масса саркомы	Объем саркомы
CMS-010.02	500 мкг/кг/сутки	10	0,97±0,85*	0,65±0,67*
CMS-010.02	250 мкг/кг/сутки	10	0,68±0,72*	0,36±0,40*
CMS-010.03	500 мкг/кг/сутки	10	0,33±0,35* [@]	0,27±0,33* [@]
CMS-010.03	250 мкг/кг/сутки	10	0,68±0,46*	0,31±0,22*
CMS-010.04	500 мкг/кг/сутки	10	0,62±0,44*	0,40±0,28*
CMS-010.04	250 мкг/кг/сутки	10	0,27±0,19* [@]	0,17±0,12* [@]
CMS-010.05	500 мкг/кг/сутки	10	0,47±0,29* [@]	0,34±0,22*

	CMS-010.05	250 мкг/кг/сутки	10	0,56±0,33*	0,23±0,19* [@]
	CMS-010.07	500 мкг/кг/сутки	10	0,52±0,25*	0,37±0,20*
	CMS-010.07	250 мкг/кг/сутки	10	0,32±0,14* [@]	0,24±0,13* [@]
	CMS-010.08	500 мкг/кг/сутки	10	1,05±0,64*	1,01±0,63
5	CMS-010.08	250 мкг/кг/сутки	10	0,38±0,27* [@]	0,20±0,14* [@]
	CMS-010.09	500 мкг/кг/сутки	10	0,85±0,70*	0,84±0,84
	CMS-010.09	250 мкг/кг/сутки	10	0,45±0,38* [@]	0,37±0,44*
	CMS-010.11	500 мкг/кг/сутки	10	1,14±0,74*	0,95±0,54
	CMS-010.11	250 мкг/кг/сутки	10	0,64±0,31*	0,63±0,40*
10	CMS-010.13	500 мкг/кг/сутки	10	0,73±0,43*	0,38±0,23*
	CMS-010.13	250 мкг/кг/сутки	10	0,92±0,56*	0,91±0,59
	CMS-010.14	500 мкг/кг/сутки	9	0,67±0,70*	0,56±0,53*
	CMS-010.14	250 мкг/кг/сутки	10	0,44±0,30* [@]	0,29±0,21*
	CMS-010.15	500 мкг/кг/сутки	10	0,68±0,36*	0,63±0,35*
15	CMS-010.15	250 мкг/кг/сутки	9	0,45±0,35* [@]	0,41±0,37
	CMS-010.16	500 мкг/кг/сутки	10	0,99±0,42*	0,92±0,36
	CMS-010.16	250 мкг/кг/сутки	9	0,63±0,47*	0,61±0,44*
	CMS-010.17	500 мкг/кг/сутки	10	0,91±0,46*	0,55±0,34*
	CMS-010.17	250 мкг/кг/сутки	9	0,65±0,41*	0,40±0,24*
	CMS-010.18	500 мкг/кг/сутки	9	0,59±0,48*	0,58±0,42*
20	CMS-010.18	250 мкг/кг/сутки	9	0,44±0,31* [@]	0,27±0,20* [@]
	CMS-010.19	500 мкг/кг/сутки	9	0,68±0,68*	0,40±0,42*
	CMS-010.19	250 мкг/кг/сутки	10	0,41±0,45* [@]	0,46±0,58*
	CMS-010.20	500 мкг/кг/сутки	10	0,59±0,46*	0,54±0,51*
	CMS-010.20	250 мкг/кг/сутки	9	1,00±0,76*	0,88±0,77
25	CMS-010.21	500 мкг/кг/сутки	10	0,44±0,22* [@]	0,44±0,21*
	CMS-010.21	250 мкг/кг/сутки	10	0,51±0,29*	0,44±0,22*
	CMS-010.22	500 мкг/кг/сутки	10	0,85±0,73*	0,73±0,87
	CMS-010.22	250 мкг/кг/сутки	10	0,28±0,12* [@]	0,24±0,08* [@]
	CMS-010.23	250 мкг/кг/сутки	9	0,27±0,18* [@]	0,21±0,15* [@]
30	CMS-010.24	500 мкг/кг/сутки	10	1,20±0,79*	0,62±0,47*
	CMS-010.24	250 мкг/кг/сутки	10	0,61±0,39*	0,36±0,30*
	CMS-010.25	500 мкг/кг/сутки	10	0,52±0,38*	0,26±0,21* [@]
	CMS-010.25	250 мкг/кг/сутки	9	0,65±0,53*	0,48±0,37*
	CMS-010.27	500 мкг/кг/сутки	9	1,05±0,86*	0,51±0,33*
35	CMS-010.27	250 мкг/кг/сутки	10	0,78±0,68*	0,58±0,58*
	CMS-010.29	500 мкг/кг/сутки	10	0,55±0,41*	0,40±0,11*
	CMS-010.29	250 мкг/кг/сутки	10	1,24±0,72*	1,02±0,66
	CMS-010.31	500 мкг/кг/сутки	10	0,78±0,89*	0,43±0,50*
	CMS-010.31	250 мкг/кг/сутки	10	0,27±0,19* [@]	0,25±0,20* [@]
40	CMS-010.32	500 мкг/кг/сутки	10	0,41±0,35* [@]	0,40±0,31*
	CMS-010.32	250 мкг/кг/сутки	10	0,38±0,24* [@]	0,25±0,14* [@]
	Циклофосфамид	40 мг/кг/сутки	10	1,07±0,80*	0,76±0,66*
	Физиологический раствор	0,5 мл/сутки	10	1,87±0,52	1,20±0,28
45	*: по сравнению с группой получавших нормальный физиологический раствор, P<0,05				
	@: по сравнению с группой получавших циклофосфамид P<0,05				

4.4 Вывод

Обнаружено, что при приемлемом дозировании CMS-010.103, CMS-010.02, CMS-010.03, CMS-010.04, CMS-010.05, CMS-010.07, CMS-010.08, CMS-010.09, CMS-010.11, CMS-010.13, CMS-010.14, CMS-010.15, CMS-010.16, CMS-010.17, CMS-010.18, CMS-010.19, CMS-010.20, CMS-010.21, CMS-010.22, CMS-010.23, CMS-010.24, CMS-010.25, CMS-010.27, CMS-010.29, CMS-010.31 и CMS-010.32 по сравнению с группой получавших нормальный физиологический раствор подавляют со статистической

значимостью развитие трансплантированных в мышцы КМ клеток саркомы S₁₈₀ *in vivo*, (P<0,05).

Пример 5

Воздействие пептидов на нефрит Масуги у кроликов

5.1. Вещества

5.1.1 Пептиды

Все используемые аминокислоты были в L-форме: CS Bio Co., USA.

5.1.2 Контрольные и другие реагенты

Дексаметазона натрия фосфата инъекции: Tianjin Jinyao Aminophenal Ltd., PR China.

Физиологический раствор: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd., PR China. Вакцина БЦЖ:

Beijing Institute of Biological Products, PR China. Ланолин: Tianjin sixth chemical product

factory, PR China. Жидкий парафин: Tianjin sixth chemical product factory, PR China.

Диагностический реагент для сывороточного BUN: BECKMAN 443350, USA.

Диагностический реагент для сывороточного креатинина: BECKMAN 443340, USA.

5.1.3 Животные

Один самец овцы (в возрасте 8 месяцев): Department of Laboratory Animal, Tianjin

Medical University, PR China. Кролики (MDA, самцы, 2-2,5 кг): Beijing Fuhao Breed

Farm, PR China.

5.2 Способы^[9-10]

5.2.1 Получение антисыворотки овцы против коры почек кролика

5.2.1.1 Получение антигена против коры почки кролика

Здорового кролика анестезировали 25% уретаном в количестве 4 мл/кг посредством внутривенного введения в ушную вену и для системной гепаринизации внутривенно вводили гепарин в количестве 1250 Е/кг. Живот кролика вскрывали в асептических условиях и обнажали почечные артерии и вены. Почечные артерии катетеризировали и пересекали почечные вены. Почки промывали физиологическим раствором до тех пор, пока почка не станет серой. Затем почки удаляли. Кору почек отделяли и гомогенизировали в 0,5 объема ледяного физиологического раствора, а затем хранили при -20°C.

5.2.1.2 Получение антисыворотки овцы

7,5 мл гомогената коры почки смешивали с 2,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ланолин в жидком парафине в соотношении 1:5, с 5 мг/мл вакцины БЦЖ). После полного эмульгирования антиген вводили овце в пять различных областей спины, по 1 мл на область, один раз в две недели, всего три цикла введений. Начиная с

четвертой иммунизации, гомогенизировали 5 г коры почки с одним объемом физиологического раствора и вводили овце внутримышечно в 5 областей, по 1 мл на

область, один раз в две недели. Титр овечьих антител против кролика измеряли раз в две недели посредством двойной иммунодиффузии. Когда титр достигал 1:32, антисыворотку овцы отбирали из сонной артерии. Овечью антисыворотку смешивали

с равным объемом эритроцитов кролика и для удаления антител к эритроцитам кролика держали при 4°C в течение 12 часов. Затем для инактивации комплемента и

протеаз антисыворотку отбирали посредством центрифугирования и содержали при 56°C. Антисыворотку хранили при -20°C.

5.2.2 Разделение животных на группы, введение тестируемого вещества и получение модели нефрита Масуги

Двадцать два здоровых кролика случайным образом разделили на 5 групп: получавших пептид (107,3 мкг/кг в сутки и 58,5 мкг/кг в сутки, 4 кролика на группу), дексаметазон (0,1 мг/кг в сутки, 4 кролика), физиологический раствор (1 мл в сутки, 7

кроликов) и нормальные здоровые (3 кролика). За 24 часа до создания болезненного состояния у кроликов осуществляли измерение сывороточного BUN, креатинина и белка в моче. В случае отсутствия отклонений от нормы по этим показателям у экспериментальных животных создавали модель нефрита Масуги посредством внутривенного введения антисыворотки овцы против коры почек кролика в ушную вену, 0,5 мл на инъекцию, одна инъекция каждые 30 минут, всего по 4 инъекции на кролика. Группе нормальных здоровых (контрольных) кроликов вводили физиологический раствор таким же образом. Внутривенное введение тестируемых соединений через ушную вену начинали в день последнего введения антисыворотки после введения, один раз в день, 1 мл на инъекцию, в течение последующих 30 дней.

5.2.3 Мониторинг терапевтического эффекта

5.2.3.1 Определение количества белка в моче

Мочу каждого кролика собирали в течение 24-часового периода времени один раз в неделю и посредством способа с применением сульфосалициловой кислоты определяли количество белка.

5.2.3.2 Анатомио-патологическое исследование

Для наблюдения воздействий пептидов на выведение IgG-антител овцы против коры почек кролика из кроликов с нефритом Масуги в день последнего введения вещества после введения кроликов умерщвляли посредством удушения и удаляли правую почку, замораживали, делали срез и затем метили иммунофлуоресцентной меткой на наличие IgG овцы. Считали флуоресцентно-положительные области каждой гломерулы. Исследовали тридцать гломерул на кролика и вычисляли среднее количество положительных областей на гломерулу.

5.2.3.3 Статистика.

Статистическую значимость определяли посредством t-теста программного обеспечения SPSS.

5.3 Результаты

Таблица 13

Группа	Дозирование/сутки	N	Неделя 0	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4
CMS-010,26	107,3 мкг/кг	4	9,84±4,29	187±184	114±145	26±24*	28±32*
CMS-010,26	58,5 мкг/кг	4	9,53±4,64	77±62	150±123	20±12*	36±16*
Дексаметазон	0,1 мг/кг	4	9,48±8,46	29±12	13,6±6,3*	13,7±3,1*	25±19
Получавшие физиологический раствор	0,5 мл	7	11,72±3,18	122±91	160±138	145±33	157±71
Нормальные здоровые	-	3	23,43±18,42	7,7±2,0*	-	6,9±4,5*	24±7*

*: по сравнению с группой получавших нормальный физиологический раствор, P<0,05

Таблица 14

Воздействие пептида на выведение IgG-антител овцы против коры почек кролика из кроликов с нефритом Масуги

Группа	Дозирование/сутки	N	Количество положительных областей на гломерулу
CMS-010,26	107,3 мкг/кг	5	5,6±1,2**
CMS-010,26	58,5 мкг/кг	4	6,3±1,4**
Дексаметазон	0,1 мг/кг	4	7,5±1,0
Получавшие физиологический раствор	0,5 мл	7	8,7±0,9
Нормальные здоровые	-	3	-

** : по сравнению с группой получавших нормальный физиологический раствор, P<0,01

5.4 Вывод

Обнаружено, что CMS-010.26 по сравнению с контрольной группой получавших физиологический раствор способен со статистической значимостью уменьшать тяжесть протеинурии и стимулировать выведение антител овцы против коры почек кролика у кроликов с нефритом Масуги *in vivo*, P<0,05.

Пример 6Воздействие пептидов на крыс с нефритом Хеймана *in vivo*6.1 Вещества6.1.1 Пептид

5 Все используемые аминокислоты были в L-форме: CS Bio Co., USA.

6.1.2 Контрольные и другие реагенты

Инъекции дексаметазона натрия фосфата: Tianjin Jinyao Aminophenal Ltd., PR China.
 Физиологический раствор: OTSUKA Pharmaceutical Co. Ltd., PR China. Вакцина БЦЖ:
 10 Beijing Institute of Biological Products. Ланолин: Tianjin sixth factory of chemical product, PR
 China. Жидкий парафин: Tianjin sixth factory of chemical product, PR China.
 Диагностический реагент для сывороточного BUN: BECKMAN 443350, USA.
 Диагностический реагент для сывороточного креатинина: BECKMAN 443340, USA.

6.1.3 Животные

15 Крысы Вистар (SPF, возраст 6-8 недель, масса 150-200 г): Beijing Vital River
 Laboratory Animal Co., Ltd., PR China.

6.2 Способы^[11-12]6.2.1 Получение гомогената почки крысы

20 Животы здоровых крыс Вистар вскрывали в асептических условиях. Обнажали
 порталную вену и нижнюю полую вену. Портальную вену катетеризировали и
 пересекали нижнюю полую вену. Почки промывали физиологическим раствором до
 тех пор, пока кора почек не становилась серой. Почки удаляли и отделяли кору почек.
 Затем кору почек гомогенизировали во льду и хранили при -20°C.

6.2.2 Получение антигена коры почек

25 Ланолин смешивали с жидким парафином в соотношении 1:2 об./об, нагревали до
 70°C при перемешивании и автоклавировали. Для получения полного адьюванта
 Фрейнда к смеси ланолин/парафин добавляли достаточное для получения
 30 концентрации 3 мг/мл количество вакцины БЦЖ. Гомогенат коры почек, полный
 адьювант Фрейнда и физиологический раствор перемешивали в соотношении 1:1:2 в
 ступке до полного эмульгирования.

6.2.3 Разделение животных на группы и получение модели

35 20 здоровых крыс Вистар случайным образом разделяли на две группы:
 получающих пептид (200 мкг/кг в сутки) и физиологический раствор (2 мл в сутки). Два
 мл антигена интраперитонеально вводили каждой крысе, один раз каждые две недели,
 всего 5 циклов введения. Введение тестируемого соединения посредством
 интраперитонеальной инъекции начинали в день третьей иммунизации после
 40 иммунизации, один раз в сутки до конца эксперимента.

6.2.4 Мониторинг эффективности6.2.4.1 Определение количества белка в моче

45 Определение количества белка в моче начинали на третьей неделе создания модели.
 Образцы мочи собирали от каждой крысы в течение 24-часового периода времени
 один раз каждые две недели и определяли содержание белка в моче посредством
 способа с применением сульфосалициловой кислоты.

6.2.5 Статистика

50 Значения для каждого образца сравнивали посредством t-теста с применением
 программного обеспечения SPSS.

6.3 Результаты

Таблица 15

Эффект введения пептида на концентрацию белка в моче (мг/дл) в течение 24 ч у крыс с нефритом Хеймана

Группа	N	Неделя 3	Неделя 5	Неделя 7	Неделя 9
CMS-010.26	10	6,2±2,3	3,1±1,4	3,9±1,6*	3,8±2,2*
Получавшие физиологический раствор	10	4,1±1,3	3,1±0,8	10,9±2,8	12,6±1,2

*: по сравнению с группой получавших физиологический раствор, P<0,05

5

6.4 Вывод

Обнаружено, что при приемлемом дозировании CMS-010.26 по сравнению с группой получавших физиологический раствор уменьшал со статистической значимостью тяжесть протеинурии у крыс с нефритом Хеймана *in vivo*, (P<0,05).

10

Ссылки для примеров 1-6

1. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1426-1428.

2. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:134-135.

15

3. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1429.

4. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. The study on MTT reduction method of testing NK cell activity. China Immunology Journal. 1996, 1(6):356-358.

20

5. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:128-129.

6. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 137-138.

25

7. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1429.

8. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:137-139.

9. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:96.

30

10. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1227-1228.

11. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:97.

12. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1227.

35

Пример 7

Доставка пептидов посредством полученных способами генетической инженерии бактериальных видов *Lactobacillus*

40

Следующий ниже способ относится к иллюстративному способу доставки пептидов по этому изобретению хозяину, как описано выше. Последовательность ДНК, кодирующую пептид, выбранный из группы, состоящей из фрагментов CMS-010 (VAREENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат

последовательность CMS-010) и их функциональных производных, синтезировали химическими способами и эту последовательность ДНК встраивали в

45

экспрессирующий вектор с применением известных специалистам в данной области стандартных способов генетической инженерии. Выбранный экспрессирующий вектор содержит конститутивный функциональный в *Lactobacilli* промотор, полилинкер для встраивания последовательностей ДНК в конкретной ориентации от 5' к 3', а также селективный маркерный ген, который придает устойчивость к антибиотику (для облегчения процедур клонирования) и может содержать другие последовательности, способствующие выработке и/или секреции пептидов, такие как последовательности сигнальных пептидов. Пример такого вектора представлен в патенте США № 5592908,

50

выданном Pavla, который включен сюда в качестве ссылки в полном объеме. В кратком изложении, в данном патенте описано несколько промоторов, функционирующих в видах *Lactobacillus*, а также способ разработки новых промоторов в указанных бактериях, любой из которых для экспрессии пептида в *Lactobacilli* может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид по настоящему изобретению. Нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальный пептид, такой как пептиды, которые являются активными в *Lactobacillus lactis*, содержащие от 16 до 35 по большей части гидрофобных аминокислот, описанные в изложенном выше патенте США № 5529908, встраивали между промотором и нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид по настоящему изобретению так, чтобы кодирующая сигнальный пептид нуклеиновая кислота находилась в одной рамке считывания с нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид по настоящему изобретению.

В дополнение к кодирующей пептид последовательности, синтезируемая последовательность ДНК может содержать последовательности, способствующие лигированию и клонированию указанной ДНК в экспрессирующий вектор. Например, участки узнавания фермента рестрикции, которые соответствуют участкам, находящимся в полилинкере вектора, можно встраивать в синтезируемую ДНК с 5' и 3' концов последовательности, так чтобы последовательность можно было клонировать в вектор в правильной ориентации. И вектор, и синтезированную ДНК расщепляли определенными ферментами рестрикции, а затем очищали. После реакций лигирования вектора и синтезированной ДНК осуществляли трансформацию в приемлемый штамм *E. Coli*. Трансформированные бактерии помещали в среду, содержащую антибиотик, к которому вектор придает устойчивость. Колонию трансформированных бактерий отбирали для выращивания культур и процедур получения плазмид; подтверждали наличие синтезированной ДНК в правильной ориентации.

Затем этот экспрессирующий вектор трансформировали в бактериальную клетку-хозяина вида *Lactobacillus*, такую как *L. acidophilus*. Трансформированные клетки выбирали на основании находящегося в последовательности вектора селективного маркера, а секреция пептида может быть подтверждена проведением вестерн-блота, проведением гель-электрофореза пептидов, находящихся в среде для выращивания, или другими стандартными способами. Выбирали трансформированную колонию бактерий и использовали для получения крупномасштабных культур, полученных способами генетической инженерии бактерий. Культуру полученных способами генетической инженерии бактерий, экспрессирующих желательный пептид, выращивали и, по меньшей мере, часть из них вводили в пищеварительный тракт, влагиалище, трахею или другую область организма хозяина, в которой бактерия способна к репликации. Если желательно, бактериальные культуры можно обрабатывать различными способами для получения добавки для энтерального потребления хозяином. Эти виды обработки включают лиофилизацию или другие способы консервации бактерий, в дополнение к комбинированию бактерий с носителями, такими как растворы, растворители, дисперсионные среды, замедлители, эмульсии и сходные с ними. Применение этих средств для получения добавок хорошо известно в данной области. Например, бактерии можно применять для получения кисломолочных продуктов или других продуктов питания для потребления человеком, так чтобы организм, экспрессирующий пептид, колонизировал кишечник организма хозяина. Ряд различных способов для включения конкретных штаммов молочно-кислых бактерий в состав продуктов питания, такие как йогурт, кимчи, сыр и масло, описаны в патенте США № 6036952, выданном Oh, который включен сюда в

качестве ссылки в полном объеме. При потреблении бактерий любым из ряда способов полученные способами генетической инженерии организмы могут колонизировать кишечник и способствовать предоставлению и/или всасыванию пептидов по этому изобретению через слизистый слой кишечника.

Пример 8

Доставка пептидов посредством полученных способами генетической инженерии форм *Bacillus subtilis*

Следующее ниже относится к другому иллюстративному способу доставки указанного выше хозяину пептидов по этому изобретению. Последовательность ДНК, кодирующую пептид, выбранный из группы, состоящей из фрагментов CMS-010 (VAREENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010), и их функциональных производных, синтезировали химическими способами, и эту последовательность ДНК встраивали в экспрессирующий вектор посредством способов генетической инженерии, где все способы известны в данной области. Выбранный экспрессирующий вектор содержит "челночный" вектор, такой как pTZ18R (Pharmacia, Piscataway, NJ), способный размножаться и в *E. Coli* и в *B. Subtilis* и содержащий ген устойчивости к антибиотику для селекции колоний трансформированных бактерий. Этот вектор может содержать конститутивный промотор, активный в *B. subtilis*, такой как промотор, полученный из гена Sac B *B. subtilis*, а также нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, активный в *B. subtilis*, который обеспечивает эффективный экспорт экспрессирующихся гетерологичных белков из бактериальной клетки. Пример такого вектора описан в патенте США № 6268169, выданном Fahnestock, описание которого включено сюда в качестве ссылки в полном объеме. В кратком изложении, как подробно описано выше, ДНК, кодирующую пептид по этому изобретению, синтезировали с участками для ферментов рестрикции и/или другими последовательностями для облегчения клонирования ДНК способами, известными специалистам в данной области. После трансформации в *E. Coli*, посева на чашку Петри, селекции и размножения плазмид для получения плазмидного материала плазмиду трансформировали в *B. Subtilis* и трансформированные клетки выделяли на основании устойчивости к антибиотику в среде для выращивания на чашке Петри.

Продукцию пептида в полученной способами генетической инженерии *B. subtilis* и секрецию из полученной способами генетической инженерии *B. subtilis* подтверждали с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области, таких как введение радиоактивной метки в пептиды для автордиографического определения после анализа SDS-PAGE или вестерн-блоттинга.

Культуру полученных способами генетической инженерии бактерий выращивали и, по меньшей мере, часть их вводили в пищеварительный тракт, влагалище, трахею или другие области организма хозяина, в которых бактерии способны реплицироваться.

Пример 9

Доставка пептидов посредством полученных способами генетической инженерии видов дрожжей *Saccharomyces*

Следующее ниже относится к другому иллюстративному способу доставки пептидов по этому изобретению описанному выше хозяину. Последовательность ДНК такого пептида, выбранного из группы, состоящей из фрагментов CMS-010 (VAREENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010), и его функциональных производных синтезировали химическими способами и эту последовательность ДНК встраивали в

экспрессирующий вектор посредством способов генетической инженерии, где все способы известны в данной области. Выбранный экспрессирующий вектор содержит стабильно поддерживающийся дрожжевой экспрессирующий белки вектор, содержащий конститутивный дрожжевой промотор, такой как рADHI, участки для репликации вектора в дрожжах и в *E. Coli*, ген или гены, которые в целях селекции придают способность ауксотрофным дрожжевым мутантам к прототрофному типу питания, полилинкер (MCS) и, если желательно, кодирующую сигнальный пептид последовательность. Векторы, такие как этот, коммерчески доступны и хорошо известны в данной области или могут быть легко сконструированы с применением стандартных способов. После встраивания синтезированной ДНК в дрожжевой вектор, трансформации в *E. Coli*, выращивания на чашке Петри трансформированных *E. Coli* на селективной среде, селекции трансформированной бактериальной колонии и получения плазмидной ДНК из выращенной из указанной колонии культуры бактерий вектор трансформировали в *Saccharomyces cerevisiae* посредством хорошо известных способов, таких как трансформация с ацетатом лития или электропорация. Выбранный для трансформации штамм *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой мутантный ауксотрофный штамм, которому для роста на чашках с минимальной средой требуется присутствие гена в плазмиде. Трансформированные дрожжевые колонии выделяли посредством выращивания дрожжей в чашках на среде для выращивания, лишенной продукта гена, находящегося на векторе. Только те дрожжи, которые получили вектор и его ген для селекции и экспрессируют продукт этого гена, способны вырастать в колонии на минимальной среде. Подтверждение секреции пептида можно получить, проведя вестерн-блот, проведя гель-электрофорез пептидов, находящихся в среде для выращивания, или других стандартных способов.

Трансформированную колонию дрожжей отбирали и применяли для получения крупномасштабных культур. Культуру полученных способами генетической инженерии дрожжей, экспрессирующих желательный пептид, выращивали и, по меньшей мере, часть ее вводили в пищеварительный тракт, влагалище, трахею или другие области организма хозяина, в которых бактерии способны реплицироваться. Если желательно, дрожжевые культуры можно обрабатывать различными способами для получения добавки для энтерального потребления хозяином. Эти виды обработки включают в себя лиофилизацию или другие способы консервации дрожжей, в дополнение к комбинированию бактерий с носителями, такими как растворы, растворители, дисперсионные среды, замедлители, эмульсии и сходные с ними. Применение этих средств для получения добавок хорошо известно в данной области. В другом варианте осуществления трансформированные дрожжи применяли для создания продуктов питания, таких как кисломолочные продукты, такие как йогурт или кефир, посредством способов, известных специалистам в данной области. Как в случае с живыми молочнокислыми бактериальными культурами, в таких продуктах питания трансформированные дрожжи колонизируют кишечник, по меньшей мере, временно и служат для презентации пептидов хозяину в просвете кишечника.

Пример 10

Направление пептида в конкретную область

Следующее ниже относится к иллюстративному способу селективной доставки пептида по этому изобретению в конкретный отдел, орган, тип клеток или область организма. В этом случае клеточно-пролиферативное нарушение лечили посредством направления пептида, выбранного из группы, состоящей из фрагментов CMS-010 (VAREENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат

последовательность CMS-010), и его функциональных производных в ткани почек индивидуума. Например, фрагменты CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010) и их функциональные производные ковалентно связывали посредством известных в данной области химических реакций, с низкомолекулярным (LMW) лизоцимом, коммерчески доступным участком белка, концентрирующимся конкретно в почечной ткани. Способы для достижения конъюгации молекул с LMW лизоцимом описаны в документации (Folger et al., Br. J. Pharmacology, 136: 1107, 2002). Основные способы конъюгации белков или пептидов друг с другом также указаны в литературе в данной области (Fischer et al., Bioconj. Chem., 12: 825, 2001). Вновь полученный конъюгированный образец пептида затем очищали от применяемых для процесса конъюгации химических реагентов посредством способов хроматографии, таких как катионообменная FPLC, и/или градиентного центрифугирования. После очистки конъюгированный пептид вводили индивидууму, нуждающемуся в терапии клеточно-пролиферативного нарушения почек. В целях их антипролиферативной активности действие фрагментов CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010) и их функциональных производных предпочтительно направляли в почечную ткань посредством связывания между ними и LMW лизоцимом, который селективно концентрируется в почечной ткани вследствие аффинности LMW лизоцима к клеткам проксимальных трубочек почки. Такая предпочтительная доставка позволяет достичь большего антипролиферативного эффекта по сравнению с эффектом эквивалентного количества молей отдельных фрагментов CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010) и их функциональных производных. Наоборот, она может уменьшить количество пептидного лекарственного средства, необходимого для достижения определенного уровня антипролиферативной активности.

Пример 11

Увеличение доставки пептида к области его активности

Следующее ниже представлено в качестве иллюстративного способа увеличения доставки нейроактивного пептида в мозг. Пептид по настоящему изобретению, который оказывает свои воздействия на нейроны мозга, синтезировали известными специалистам в данной области химическими способами. Альтернативно, он может быть экспрессирован в полученных способами генетической инженерии микроорганизмах и выделен из культуры таких организмов, как подробно изложено в указанных выше примерах. После получения в очищенной форме пептид используют в ряде органических химических реакций для получения конъюгированной с триглицеридным сложным эфиром группы, присоединенной к пептиду. Конъюгированная группа состоит из четвертичного замещенного углеродного центра, соединенного с пептидом по настоящему изобретению посредством амидной связи с С-концевым углеродом пептида. Другие три группы, соединенные с четвертичным углеродным центром, состоят из углеродных сложноэфирных связей с состоящими из 16 углеродных остатков цепями жирных кислот. Сами цепи жирных кислот заканчиваются концевой дипептидной группой, известной в качестве пептидной маски, которая делает цепи более гидрофильными и направляет их конкретно к эндотелиальным клеткам гематоэнцефалического барьера. Процедура этого синтеза подробно описана в Patel et al., Bioconjugate Chem., 8(3): 434, 1997, и в ней используют обычные реагенты и оборудование, известные специалистам в данной

области.

После введения индивидууму в периферическую область соединение перемещается по телу через систему кровообращения, взаимодействуя с эндотелиальными мембранами гематоэнцефалического барьера. Последовательная деградация дипептидной маски и липидных цепей в процессе транспорта молекулы через эпителиальный слой гематоэнцефалического барьера приводит к высвобождению пептида по настоящему изобретению в область мозга. Там пептид может взаимодействовать с рецепторами на поверхности нейронов для осуществления его воздействия на функцию мозга. Время, необходимое для достижения лекарственным средством мозга с сопутствующей деградацией носителя, изменяет кинетику активности лекарственного средства, создавая более стабильный и более продолжительный эффект по сравнению с интрацеребровентрикулярным введением свободного пептида.

Пример 12

Получение препаратов пептида, устойчивых к ферментативной деградации

Следующее ниже относится к иллюстративному способу получения препарата биологически активного пептида для перорального введения, устойчивого к активности протеаз и пептидаз, находящихся на всем протяжении поверхности пищеварительного тракта. В этом примере пептид, выбранный из группы, состоящей из фрагментов CMS-010 (VAREENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010), и его функциональные производные используют для получения фармацевтического препарата для перорального введения пациенту. Как описано в Larionova et al. (Int. J. Pharma. , 189: 171, 1999), пептид применяли для получения микрочастиц с растворимым крахмалом и ингибитором протеаз апротинином, являющимся сильным ингибитором множества секретируемых в просвет и связанных с мембраной щеточной каемки протеаз. В кратком изложении, растворимый крахмал, ингибитор протеаз апротинин и пептид по настоящему изобретению растворяли в водном буфере. Соотношение растворимого крахмала, апротинина и пептида определяли экспериментальными способами, известными специалистам в данной области; например, для определения соотношения и получения наиболее эффективных условий для белка Larionova et al. в своих исследованиях применяли анализ стимуляции пищеварения *in vitro*. Водный раствор эмульгировали при механическом перемешивании в циклогексане (соотношение 1:3 об./об.), содержащем 5% Span-80 и неионный сурфактант. Раствор хлорида терефталоида в хлороформе добавляли к эмульсии и продолжали перемешивание в течение 30 минут, в течение которых молекулы крахмала поперечно сшивались с апротинином и пептидом. Микрочастицы, полученные в этом процессе, промывали последовательно циклогексаном, 95% этанолом с 2% об./об. детергента Tween 85, 95% этанолом и водой. Микрочастицы ресуспендировали в воде и лиофилизировали.

Лиофилизированное соединение можно поместить в желатиновые капсулы для пероральной доставки индивидууму, нуждающемуся в лечении.

После применения внутрь соединение высвобождается после растворения желатиновой капсулы. Микрочастицы разрушаются в тонком кишечнике под действием α амилазы на молекулы крахмала, что приводит к постепенному высвобождению апротинина и пептида по этому изобретению. Одновременное высвобождение сильного ингибитора протеаз апротинина в то же время и в том же месте, что и пептид, снижает ферментативную деградацию пептида и увеличивает долю неповрежденного пептида, доступного для всасывания через мембрану

кишечника.

Несмотря на то что настоящее изобретение было описано с применением в некоторых случаях указанных выше способов и данных и конкретных примеров фрагментов пептида CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) и его функциональных производных, понятно, что это только пример и не следует понимать это как ограничение настоящего изобретения. Также должно быть понятно, что фрагменты CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010), и их функциональные производные представляют собой конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, и указанные выше принципы по настоящему изобретению можно также применять в отношении других функционально эквивалентных пептидов, модифицированных без нарушения биологической функции фрагментов CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательности CMS-010) и их функциональных производных. Например, эквиваленты пептидных фрагментов CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательности CMS-010) и их функциональных производных включают в себя такие пептидные фрагменты, которые имеют консервативные аминокислотные замены (т.е. любую из V, A, P, E, H, L, A, N, K или T замещают другой аминокислотой, имеющей остаток такого же биохимического типа, такой как гидрофобная, гидрофильная, положительно или отрицательно заряженная группы). Другим примером пептида, эквивалентного пептидным фрагментам CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010) и их функциональным производным, является немного более длинный пептид, такой как пептид, удлинённый на одну или две аминокислоты, который сохраняет указанные выше виды биологической активности. Кроме того, хотя описанное выше заболевание или нарушение для терапевтического применения фрагментов CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательности CMS-010) и их функциональных производных конкретно отнесены к клеточно-пролиферативным и иммунологическим нарушениям и/или заболеваниям, эти терапевтические применения используют только в качестве неограничивающих примеров, и они не предназначены для ограничения объема формулы изобретения. Понятно, что существуют другие возможные/предполагаемые применения фрагментов CMS-010 (VAPEENPTLLTEAPLNPK) (где указанные фрагменты не содержат последовательность CMS-010) и их функциональных производных, такие как применение в качестве добавок для лечебного питания для модулирования иммунной системы здорового индивидуума или пациента с любыми иммунными и/или клеточно-пролиферативными нарушениями или заболеваниями. Любое из таких применений также входит в объем настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. По существу, чистый пептид для модулирования иммунной системы, характеризуемый аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:24.
2. Пептид по п.1, где указанная модуляция иммунной системы представляет собой активность, выбранную из группы, состоящей из подавления трансформации Т-лимфоцитов, подавления активности NK-клеток и подавления образования антител.
3. Фармацевтическая композиция для модулирования иммунной системы, содержащая, по существу, чистый пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24, и фармацевтически приемлемый носитель.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, где указанная модуляция иммунной системы представляет собой модуляцию, выбранную из группы, состоящей из подавления трансформации Т-лимфоцитов, подавления активности НК-клеток и подавления образования антител.

5. Способ получения фармацевтической композиции для модулирования иммунной системы, предусматривающий получение пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24, и смешивание указанного пептида с фармацевтически приемлемым носителем.

10 6. Применение, по существу, чистого пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24 в производстве лекарственного средства для модулирования иммунной системы.

15 7. Применение по п.6, где указанная модуляция выбрана из группы, состоящей из подавления трансформации Т-лимфоцитов, подавления активности НК-клеток и подавления образования антител.

20

25

30

35

40

45

50

Список последовательностей

<110> PEPHARM R&D LIMITED
SENIOR, ALAN MURRAY

<120> БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПЕПТИДА VAREEHPRTLLEAPLNPK

<130> N.94504 SER

<150> US 60/566,455
<151> 2004-04-28

<160> 31

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>

<400> 1
Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
1 5 10 15
Pro Lys

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 2
Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro
1 5 10 15
Lys

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 3
Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
1 5 10 15
Pro

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 4
 Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 5
 Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 6
 Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 7
 Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro
 1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 8

Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5 10

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 9
 His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 10
 Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu
 1 5 10

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 11
 Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 12
 Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 13

Thr	Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys
1				5					10	

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 14

Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Thr	Leu	Leu
1				5					10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 15

Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys
1				5					10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 16

Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Thr	Leu
1				5				

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 17

Leu	Thr	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys
1				5				

<210> 18

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 18
 Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr
 1 5

 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 19
 Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5

 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 20
 Val Ala Pro Glu Glu His Pro
 1 5

 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 21
 Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys
 1 5

 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая пептидная последовательность

 <400> 22
 Ala Pro Leu Asn Pro Lys

1

5

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 23
Val Ala Pro Glu Glu His
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 24
Pro Leu Asn Pro Lys
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 25
Val Ala Pro Glu Glu
1 5

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 26
Leu Asn Pro Lys
1

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 27
Val Ala Pro Glu
1

<210> 28
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 28
Asn Pro Lys
1

<210> 29
<211> 2
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 29
Val Ala
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

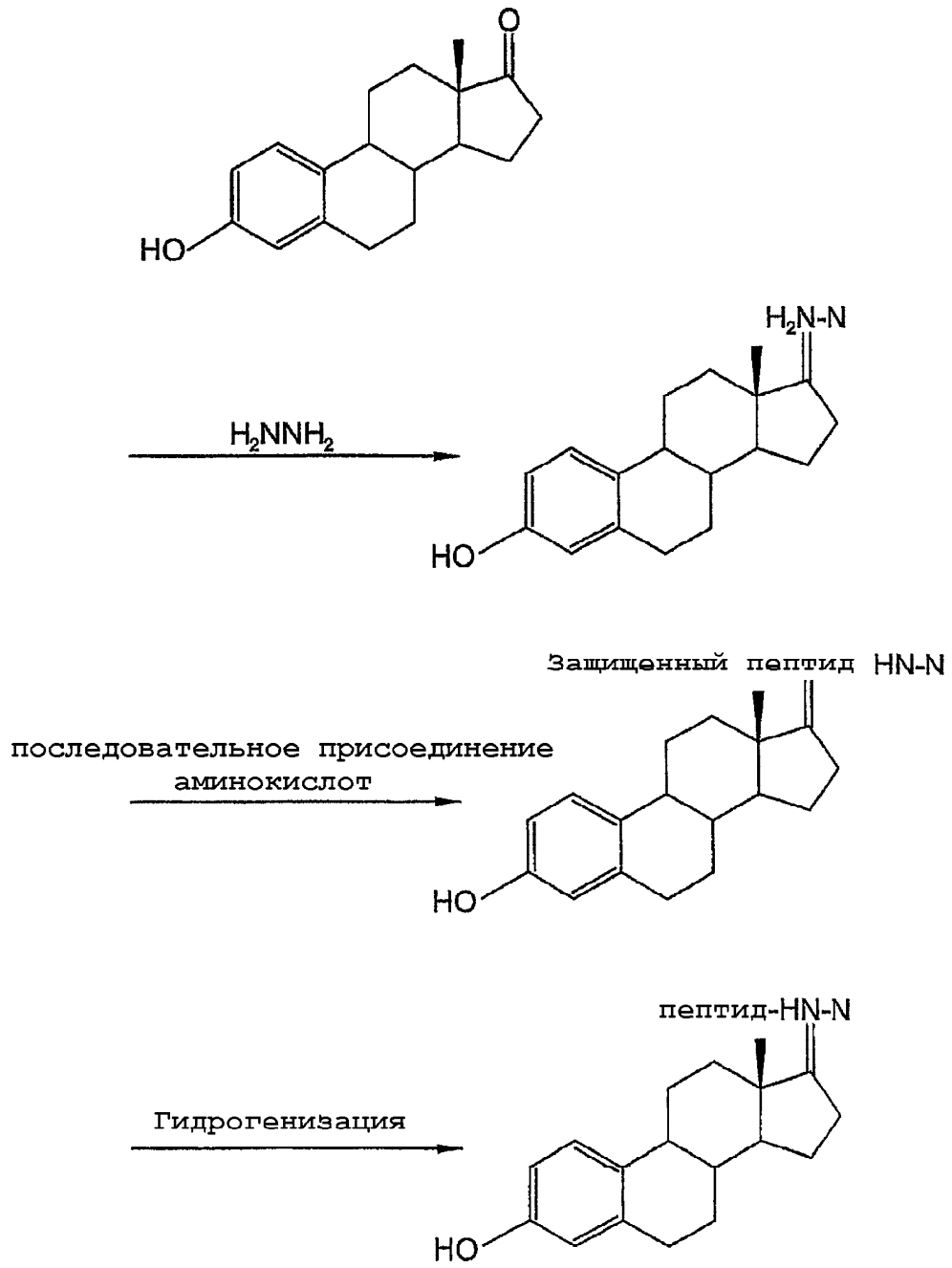
<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

<400> 30
Val Ala Leu Leu Thr
1 5

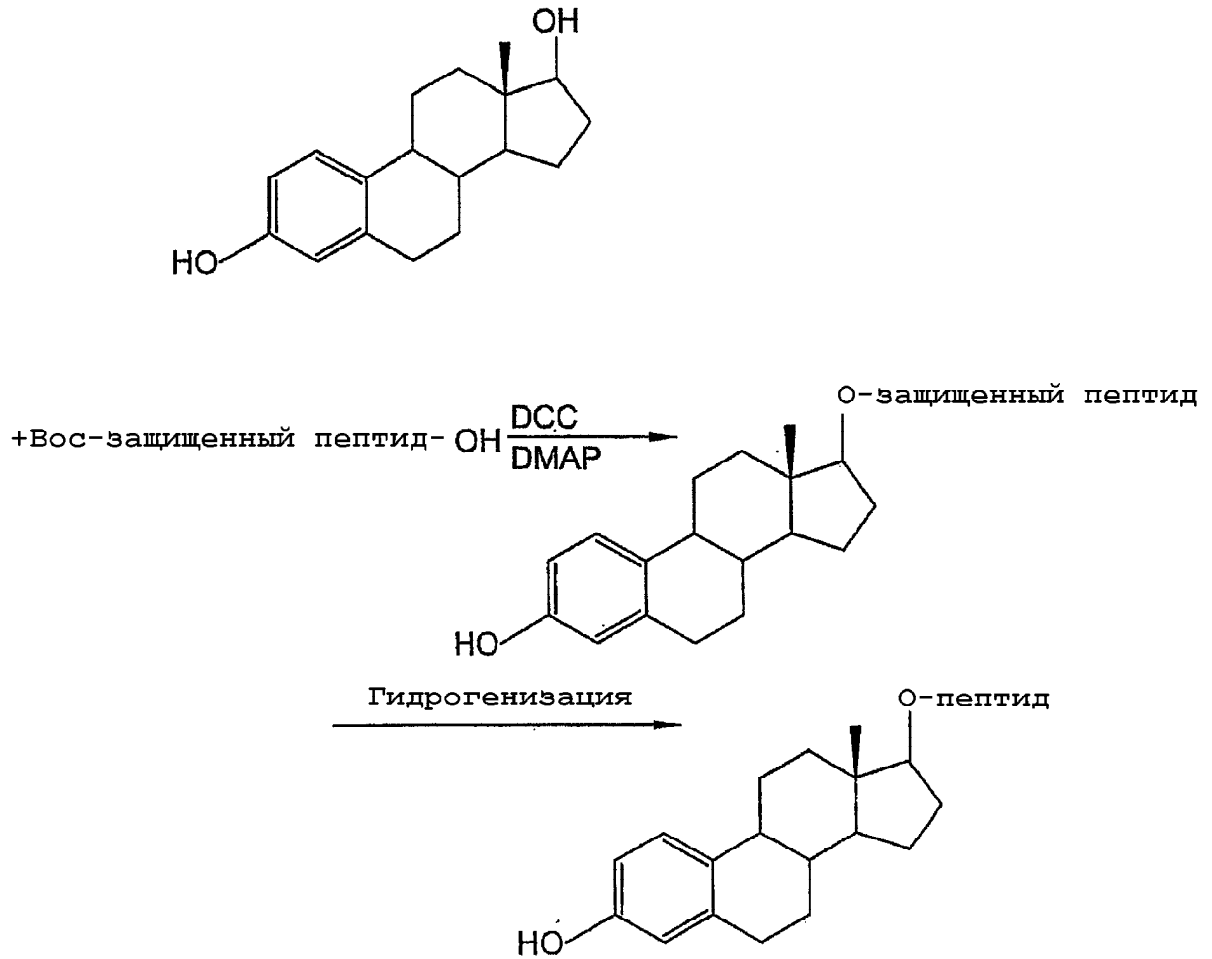
<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая пептидная последовательность

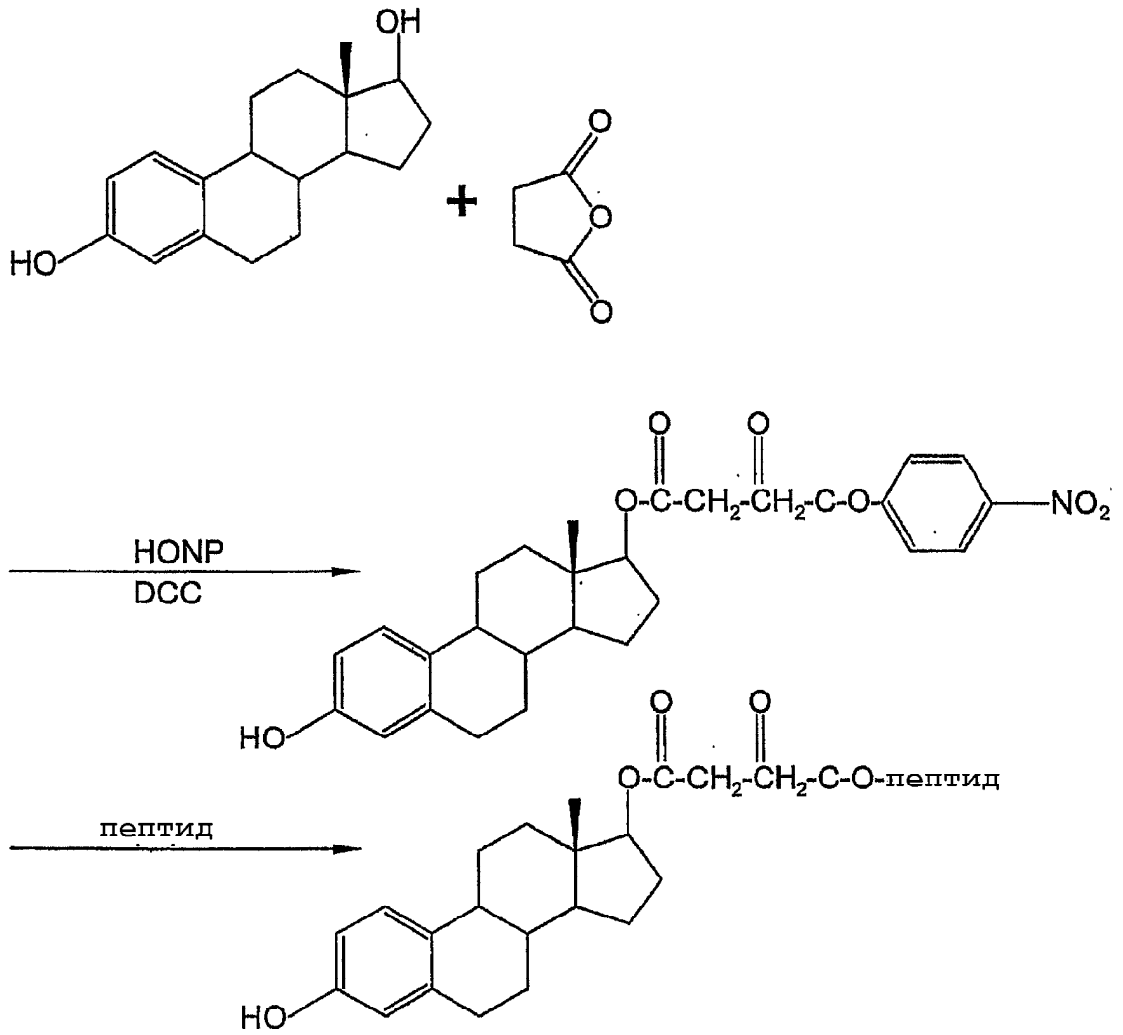
<400> 31
Val Ala Asn Pro Lys
1 5



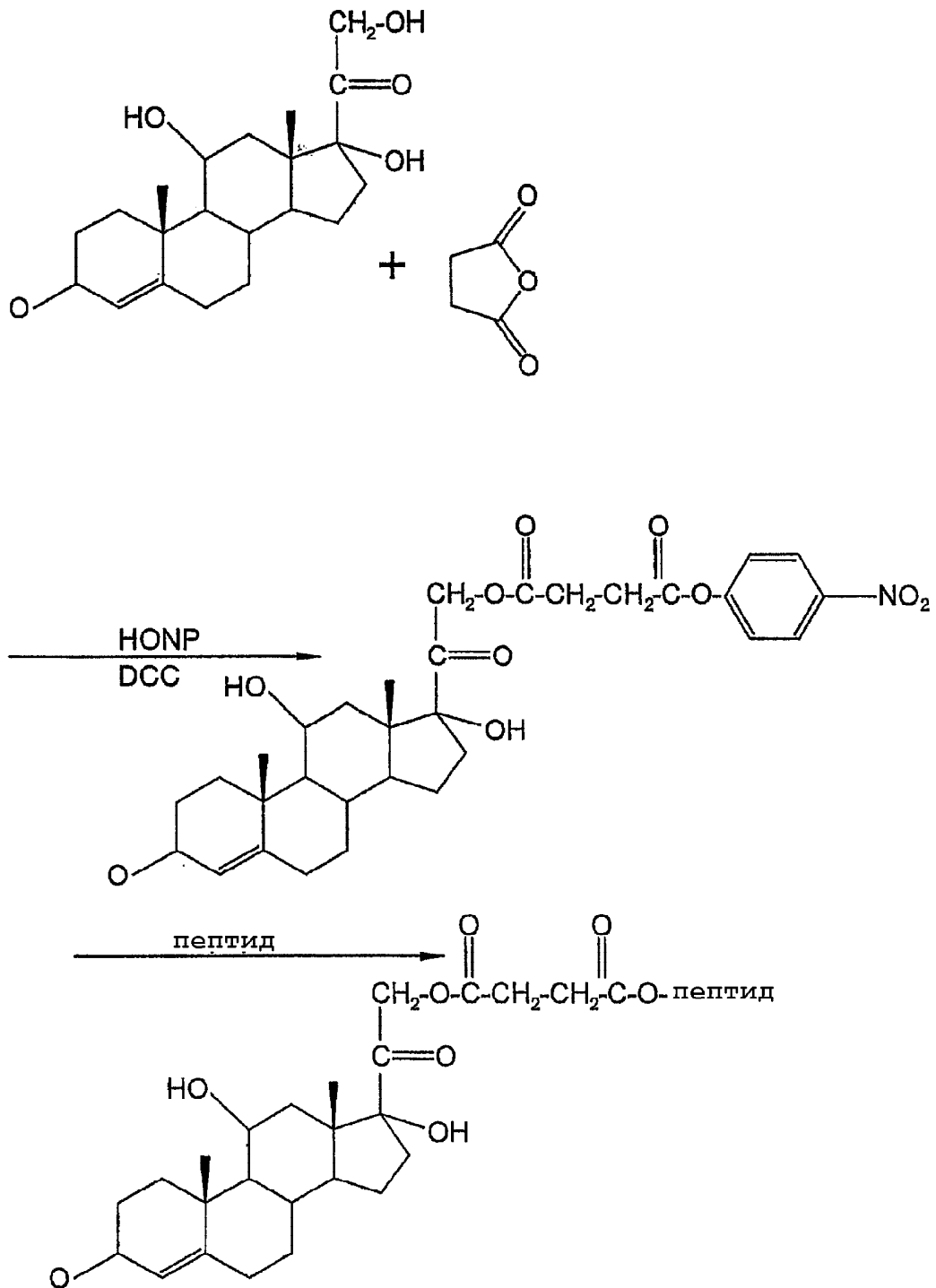
ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4



Фиг. 5