



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 215 005<sup>(13)</sup> C2  
(51) МПК<sup>7</sup> C 07 K 14/47, A 61 K 38/17, A  
61 P 35/00, 31/18

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001113277/04, 15.09.2000  
(24) Дата начала действия патента: 15.09.2000  
(30) Приоритет: 17.09.1999 GB 9921881.0  
(43) Дата публикации заявки: 10.07.2003  
(46) Дата публикации: 27.10.2003  
(56) Ссылки: WO 95/33768 A1, 14.12.1995. RU  
2127599 C1, 20.03.1999. WO 97/12975 A,  
10.04.1997.  
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную  
фазу: 16.05.2001  
(86) Заявка РСТ:  
GB 00/03566 (15.09.2000)  
(87) Публикация РСТ:  
WO 01/25275 (12.04.2001)  
(98) Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой

(71) Заявитель:  
ХОЛМС Руперт Дональд (GB)  
(72) Изобретатель: ХОЛМС Руперт Дональд (GB)  
(73) Патентообладатель:  
ХОЛМС Руперт Дональд (GB)  
(74) Патентный поверенный:  
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) РЕГУЛЯТОРНЫЕ/РАЗВЕРНУТЫЕ ПЕПТИДЫ ЭЗРИНА

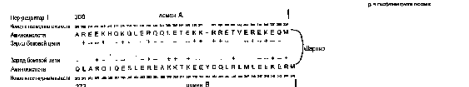
(57)

Изобретение относится к пептидам, имеющим аминокислотную последовательность, по меньшей мере по 5 аминокислотам идентичную части Нер-рецептора, соответствующей аминокислотам 308-373 этого рецептора, исключая пептид ТЕККРРЕТВЕРЕКЕ. Соединение по изобретению способно индуцировать полезные иммунные ответы в организме и может использоваться для лечения рака. 30 з.п. ф-лы, 2 ил., 1 табл.

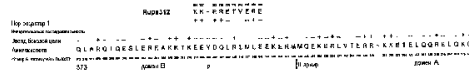
Первичная/вторичная структура Нер-рецептора

Обратите внимание, как в выше изложенном разделе используются и ограничительные закрывающие скобки, чтобы охватить, с соответствующими патентами, такие как Репер17, либо транскрипты с другим Нер-рецептором.

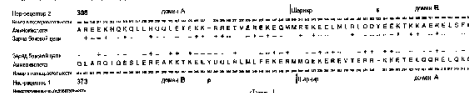
Секция 16. Пептиды, регулирующие активность Нер-рецептора



Вставка 16. Пептиды, регулирующие активность Нер-рецептора, соответствующие Репер17



Секция 16. Пептиды, регулирующие активность Нер-рецептора, соответствующие Репер17





Текст описания в факсимильном виде (см. графическую часть).

### Формула изобретения:

1. Молекула, которая является пептидом, имеющим аминокислотную последовательность, идентичную части Нер-рецептора, соответствующей аминокислотам 308-373, исключая пептид TEKKRRETVEREKE.

2. Пептид по п. 1, по меньшей мере по 5 аминокислотам идентичную части Нер-рецептора, соответствующей аминокислотам 333-373 этого рецептора, исключая пептид TEKKRRETVEREKE.

3. Пептид по п. 2, где указанная часть Нер-рецептора соответствует аминокислотам 333-355 этого рецептора.

4. Пептид по п. 3 длиной от пяти до тринадцати аминокислот.

5. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность MREKEELMLRLQDY (p) EEKTKKAERELSEQIRALQ.

6. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность EREKE.

7. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность EREKEQMMREKEEL.

8. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность KEELM.

9. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность KEELMLRLQDYEE.

10. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность KEELMLRLQDYpEE.

11. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность EELMLRLQDYEE.

12. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность EELMLRLQDYpEE.

13. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность ELMRLRLQDYEE.

14. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность

ELMLRLQDYpEE.

15. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность MLRLQ.

16. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность QDYEE.

17. Пептид по п. 2, имеющий аминокислотную последовательность QDYpEE.

18. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность AREEKHQQLERQQLETEKKRRETVEREKEQ M.

19. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность TEKKR.

20. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность TEKKRRETV.

21. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность TEKKRRETVER.

22. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KKRRE.

23. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KKRRETVE.

24. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KKRRETVERE.

25. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KKRRETVEREK.

26. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KKRRETVEREKE.

27. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KRRETVER.

28. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KRRETVEREK.

29. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность KRRETVEREKE.

30. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность RRETV.

31. Пептид по п. 1, имеющий аминокислотную последовательность RETVEREKE.

45

50

55

60

#### ПРИОРИТЕТНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Заявка на патент Великобритании GB9921881.0, Holms R.,  
17 сентября 1999 г.

#### ПАТЕНТНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Патент США 5773573

Rupert Holms 30 июня 1998 г.

#### ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ

Ossi Turunen, Markku Sainio, Juha Jaaskelainen, Olli Carpen, Antti Vaheri (1998) "Structure - Function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein" Biochimica et Biophysica Acta 1387: 1-16.

Anthony Bretscher, David Reczek and Mark Berryman (1997) "Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures" Journal of Cell Science 110: 3011-3018.

Claudia Hecker, Christoph Weise, Jorgen Schneider-

Schaulies, Harvey Holmes, Volker ter Meulen (1997) "Specific binding of HIV-1 envelope protein gp120 to the structural membrane proteins ezrin and moesin." Virus Research 49: 215-223.

M. Levancher, F. Hulstaert, S. Tallet, S. Ullery, J. J. Pocidalo, B. A. Bach (1992) "The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value" Clinical Experimental Immunology 90 376-382.

Stephan Oehen and Karin Brduscha-Riem (1998) "Differentiation of Naive CTL to Effector and Memory CTL: Correlation of Effector Function with Phenotype and Cell Division" The Journal of Immunology 161 5338-5346.

Область данного изобретения относится к лечению инфекционных болезней и рака посредством индукции иммунных ответов, направленных на борьбу с болезнью. Проблема роста новых штаммов патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам, ограниченный ассортимент соединений, эффективных против хронических вирусных и грибковых инфекций, и недостаток эффективных противораковых способов лечения свидетельствует о потребности в соединениях, которые могут усиливать защиту хозяина от этих проблем. Данное изобретение относится к новым заряженным молекулам, которые стимулируют иммунные ответы посредством связывания с Her-рецептором, новым активным сайтом в эзрине человека, который был открыт автором

данного изобретения. Предпочтительными заряженными молекулами являются новые пептиды с последовательностями, идентичными Нер-рецептору в эзрине человека.

Эзрин является представителем семейства белков ERM (эзрин-радиксин-моэзин), которые играют структурную и регуляторную роли в широком ряду клеточных типов. Имеется важное доказательство, свидетельствующее о том, что эзрин регулирует структуру кортикального цитоскелета, контролируя топографию клеточной поверхности. Эзрин принимает две основные конформации: 1) растворимую упакованную форму, которая выявляется в цитоплазме; и 2) развернутую и удлиненную форму, которая обнаруживается прикрепленной к цитоплазматической поверхности клеточной мембраны, в частности, в конъюгации с микроворсинками и другими связанными с активацией структурами. N-концевой домен белка прикреплен к цитоплазматической поверхности мембраны, тогда как C-концевая часть связывается с актиновым цитоскелетом. Эзрин является субстратом тирозинкиназы в Т-клетках, а также фосфорилируется по тирозину в результате стимуляции эпидермальным фактором роста (EGF) рецептора EGF. N-концевой домен эзрина в его удлиненной конформации связывается с цитоплазматическим концом CD44 в присутствии  $PIP_2$ . Эзрин также может связываться с цитоплазматическим концом ICAM-2. Эзрин очень чувствителен к регуляторным протеазам, таким как калпаин, и быстро обменивается во время активации клеток.

Anthony Bretscher, David Reczek and Mark Berryman (1997)

"Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures" Journal of Cell Science 110: 3011-3018.

Детальный анализ вторичной структуры эзрина показывает, что имеется три основных структурных домена: N-концевой домен из аминокислот с 1 по 300, высоко заряженный альфа-домен из аминокислот с 300 по 470 и C-концевой домен из аминокислот с 470 по 585. Структурное моделирование говорит о том, что альфа-домен в растворимой глобулярной форме эзрина уложен в две антипараллельные спирали, хотя положение шарнира еще не идентифицировано. В модели удлиненной фосфорилированной формы эзрин прикреплен к внутренней поверхности клеточной мембраны N-концевым доменом, альфа-домены двух молекул эзрина спарены в антипараллельные димеры и расположены под поверхностной мембраной клетки. В этой удлиненной форме эзрин фосфорилирован по тирозину в положении тирозина 353 (Yp 353).

Ossi Turunen, Markku Sainio, Juha Jaaskelainen, Olli Carpen, Antti Vaheri (1998) "Structure - Function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein" Biochimica et Biophysica Acta 1387: 1-16.

В патенте США 5773573 автор данного изобретения показал, что пептид NEP1 из четырнадцати аминокислот (аминокислотная последовательность TEKKRRETEREKE, SEQ ID 28, иден-

тичная аминокислотам 324-337 эзрина человека), который обладает 70% идентичностью с С-концом gp120, может ингибировать репликацию ВИЧ in vivo у человека. В то время автор предполагал, что наблюдаемое анти-ВИЧ-действие пептида НЕР1 было следствием перорального введения НЕР1, индуцирующего иммунологическую толерантность к аутореактивному иммунному ответу, вызываемому комплементарной последовательностью ВИЧ на С-конце gp120.

В настоящее время автор изобретения обнаружил, что анти-ВИЧ-активность НЕР1 является результатом активации нового иммунологического пути, в котором НЕР1 связывается со своей комплементарной последовательностью в домене В Нер-рецептора (НЕР1 идентичен части домена А Нер-рецептора).

#### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении описан новый регуляторный сайт в эзрине человека (Нер-рецептор) и заряженные молекулы, которые соединяются с этим сайтом, индуцируя в результате иммунные ответы. Автор изобретения обнаружил, что Нер-рецептор (смежные (последовательные) аминокислоты 308-373 эзрина человека) в растворимой конформации эзрина содержит два смежных альфа-спиральных домена, которые упакованы вместе вблизи шарнирного района (М339-М340) в две антипараллельные спирали, стабилизируемые комплементарными зарядами боковых цепей первичной аминокислотной последовательности (см. таблицу 1 и фигуру 1). Автор изобретения обнаружил, что в неупакованной ассоциированной с мембраной

конформации эзрина Нер-рецептор проталкивается сквозь клеточную мембрану и экспонируется на наружной мембране клетки (см. фигуру 2). Это неожиданное открытие находится в противоречии с моделями мембранной организации, существующими в настоящее время в научных публикациях, в которых не показано наличие какой-либо части альфа-домена эзрина на наружной поверхности клетки. Изобретением автора настоящей заявки является то, что пептиды с аминокислотными последовательностями, идентичными частям Нер-рецептора, связываются с комплементарными частями Нер-рецептора, что вызывает полезные с медицинской точки зрения иммунные ответы. Автор изобретения также обнаружил, что любая заряженная молекула, связывающаяся с этим сайтом, будет индуцировать полезные с медицинской точки зрения иммунные ответы. Эти заряженные молекулы могут вводиться перорально или другими известными путями введения для лечения различных инфекционных заболеваний и рака.

ТАБЛИЦА 1

Аминокислоты, трехбуквенный код, однобуквенный код и заряды боковых цепей

| Заряды боковых цепей аминокислот при физиологическом значении pH |                   |                   |       |        |
|------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------|--------|
| Аминокислота                                                     | Трехбуквенный код | Однобуквенный код | Заряд | Символ |
| Глицин                                                           | Gly               | G                 | нет   |        |
| Аланин                                                           | Ala               | A                 | нет   |        |

|                       |         |    |                     |    |
|-----------------------|---------|----|---------------------|----|
| Валин                 | Val     | V  | нет                 |    |
| Изолейцин             | Ile     | I  | нет                 |    |
| Лейцин                | Leu     | L  | нет                 |    |
| Серин                 | Ser     | S  | нет                 |    |
| Треонин               | Thr     | T  | нет                 |    |
|                       |         |    |                     |    |
| Аспарагиновая кислота | Asp     | D  | отрицательный       | -- |
| Глутаминовая кислота  | Glu     | E  | отрицательный       | -- |
| Фосфотирозин          | Tyr (P) | Yp | отрицательный       | -- |
| Аспарагин             | Asn     | N  | слабо отрицательный | -  |
| Глутамин              | Gln     | Q  | слабо отрицательный | -  |
|                       |         |    |                     |    |
| Лизин                 | Lys     | K  | положительный       | +  |
| Аргинин               | Arg     | R  | положительный       | +  |
| Гистидин              | His     | H  | слабо положительный | +  |
|                       |         |    |                     |    |
| Пролин                | Pro     | P  | нет                 |    |
| Триптофан             | Trp     | W  | нет                 |    |
| Фенилаланин           | Phe     | F  | нет                 |    |
| Тирозин               | Tyr     | Y  | нет                 |    |
| Метионин              | Met     | M  | нет                 |    |
| Цистеин               | Cys     | C  | нет                 |    |

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фигура 1 представляет собой диаграмму выравнивания первичных аминокислотных последовательностей:

а) упакованных антипараллельных связанных спиралей Нер-рецептора в растворимом эзрине,

б) развернутой спирали Нер-рецептора в мембрано-связанном эзрине с примером пептидного лиганда,

с) двух развернутых Нер-рецепторов, образующих димер антипараллельно связанных спиралей во время взаимодействия между двумя клетками.

Фигура 2 представляет собой иллюстрацию взаимодействия между Нер-рецептором эзрина, его лигандами, мембранами клеток, рецепторами клеточной поверхности и компонентами цитоскелета.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID 1 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 2 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 3 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 4 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 5 представляет собой аминокислотную последова-

тельность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 6 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 7 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 8 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 9 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 10 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 11 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 12 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 13 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 14 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 15 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 16 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 17 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 18 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 19 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 20 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 21 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 22 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 23 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 24 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 25 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 26 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 27 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

SEQ ID 28 представляет собой аминокислотную последовательность пептида согласно данному изобретению.

Растворимая конформация эзрина, обнаруженная в цитоплазме, содержит два прилегающих альфа-спиральных домена, которые сложены вместе в шарнирном районе (M339-M340) в две

антипараллельные спирали, стабилизированные посредством комплементарных зарядов боковых цепей первичной аминокислотной последовательности. Предметом данного изобретения является тот факт, что положительно и отрицательно заряженные боковые цепи аминокислотной последовательности домена А Нер-рецептора комплементарны положительно и отрицательно заряженным боковым цепям аминокислотной последовательности домена В Нер-рецептора. В активированной открытой конформации ээрина взаимодействие домена А и домена В Нер-рецепторов двух различных молекул ээрина дает возможность для образования антипараллельных димеров. Кроме выявления самих антипараллельных димеров ээрина, которые образуются под клеточной поверхностью, автор установил, что эти димеры могут образовываться между Нер-рецептором, экспонированным на поверхности одной клетки, и Нер-рецептором, экспонированным на поверхности другой клетки. Когда два Нер-рецептора образуют контакт во время близкой ассоциации двух клеточных поверхностей, в обеих клетках инициируется сигнал активации (фигура 2). Любая заряженная молекула, которая частично имитирует взаимодействие между зарядами боковых цепей домена А и домена В Нер-рецепторов, будет вызывать полезный с медицинской точки зрения биологический ответ.

Домен А Нер-рецептора (положения аминокислот 308-339 в ээрине человека) содержит следующую последовательность из 32 аминокислот.

(Последовательности приведены в списке с использованием од-

нобуквенного кода каждой аминокислоты, записанных от N-конца к С-концу полипептида. Yp представляет собой форму фосфотирозина, обнаруженную in vivo).

SEQ ID 1

AREEKHQKQLERQQLETEKKRRRETVEREKEQM

В патенте США 5773573 автор заявил об анти-ВИЧ-активности пептида HER1 (SEQ ID 28), который, как он открыл в настоящее время, имеет последовательность, идентичную части домена А Нер-рецептора (охватывающую аминокислоты 342-337 последовательности ээрина человека). В указанном выше патенте автор сделал предположение о том, что анти-ВИЧ-активность является следствием индукции иммунологической толерантности к аутореактивным иммунным ответам, индуцированным С-концом gp120 ВИЧ. В настоящее время автор открыл, что анти-ВИЧ-активность HER1 является следствием его связывания с доменом В Нер-рецептора и индукции нового иммунного ответа. Предметом данного изобретения является тот факт, что имеются новые пептиды, полученные из Нер-рецептора ээрина со значительно более высокой активностью, чем HER1.

Домен В Нер-рецептора (положения аминокислот 340-373 в ээрине человека) содержит следующую последовательность из 34 аминокислот (тирозин 353 [Y] может быть фосфорилирован до фосфотирозина [Yp] в конформации ээрина, ассоциированной с мембраной):

SEQ ID 2

MREKEELMLRLQDY<sub>(p)</sub>EECTKKAEREELSEQIQRALQ

Автор установил, что домен В Нер-рецептора является сайтом эзрина, с которым связывается gp120 ВИЧ во время инфекции мозга. (gp120 ВИЧ связывается с доменом В Нер-рецептора, используя свои заряженные С-концевые аминокислоты, которые имеют 70% идентичность с частью домена А Нер-рецептора). Новые заряженные молекулы, которые связываются с Нер-рецептором, могут использоваться при лечении деменции, связанной с ВИЧ.

Claudia Hecker, Christoph Weise, Jurgen Schneider-Schaulies, Harvey Holmes, Volker ter Meulen (1997) "Specific binding of HIV-1 envelope protein gp120 to the structural membrane proteins ezrin and moesin." Virus Research 49, 215-223.

Автор показал (пример 1А), что пептиды Нер-рецептора обладают значительной адъювантной активностью, которая была показана на примере усиления у мышей гуморального ответа на овальбумин в виде продукции IgG с использованием НЕР1, Rupe312, Rupe1014, Rupe1024 и Rupe2032. Автор также продемонстрировал (пример 1В) активность пептидов Нер-рецептора в усилении зависимого от антител цитотоксического ответа в тимусе мышей на эритроциты барана (ЭВ), с использованием НЕР1, Rupe312, Rupe 15, Rupe1014, Rupe1024 и Rupe2032.

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE и Rupe15 SEQ ID 3: TEKRR, и Rupe1014 SEQ ID 16: EREKE, и Rupe1024 SEQ ID 17: EREKEQMMREKEEL, и Rupe2032 SEQ ID 19: KEELMLRLQDYEE, и НЕР1 SEQ ID 28: TEKRRRETVEREKE).

Автор показал (пример 2), что пептиды her-рецептора обладают значительной противоопухолевой активностью, и это продемонстрировано посредством снижения пептидами Her-рецептора скорости роста быстро растущих трансплантированных сарком и более медленно растущего трансплантированного рака шейки матки у мышей с использованием Rupe312 и Rupe414.

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE и Rupe414 SEQ ID 13: KRRETVEREKE).

Автор показал (пример 3), что терапия HER1 (10 мг в сутки перорально либо в течение тридцати дней, либо в течение девяноста дней) у 21 ВИЧ-инфицированного пациента индуцировала иммунные ответы, которые приводили к клиническому улучшению в течение последующих шести месяцев после терапии, как было измерено по увеличению популяции CD4 Т-лимфоцитов и ослаблению условно-патогенных инфекций, снижению инфективности ВИЧ и убыванию CD38,CD8-популяции Т-лимфоцитов (установленный прогностический маркер прогрессирования СПИДа).

M. Levancher, F. Hulstaert, S. Tallet, S. Ullery, J. J. Pocardalo, B. A. Bach (1992) "The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value" Clinical Experimental Immunology 90 376-382.

В течение шести месяцев наблюдалось среднее увеличение уровня экспрессии CD44 и МНС класса I на Т-лимфоцитах, ко-

торое, как оказалось, также коррелировало с клиническим улучшением. При введении НЕР1 токсичности не выявлено. Увеличение экспрессии МНС класса I и экспрессии CD44 ассоциированы с увеличением количества Т-клеток памяти и усилением иммунитета, опосредованного клетками, ограниченными классом I.

Stephan Oehen and Karin Brduscha-Riem (1998) "Differentiation of Naïve CTL to Effector and Memory CTL: Correlation of Effector Function with Phenotype and Cell Division" The Journal of Immunology 161, 5338-5346.

Результаты этого испытания показывают, что пептид или другая заряженная молекула, которая имитирует весь или часть Нер-рецептора, может повышать сигнал активации, который в конечном итоге приводит к изменению гомеостаза иммунной системы и долговременному усилению клеточного и гуморального иммунитета. Автор также показал, что можно лечить острую и хроническую кандидную инфекцию у женщин, и она может быть вылечена посредством иммунного ответа, возникающего при стимуляции Нер-рецептором (пример 4). Автор показал, что пептиды, полученные из Нер-рецептора могут активировать моноциты и макрофаги у мышей как *in vitro*, так и *in vivo*, что приводит к защитному иммунному ответу. (Пример 5). Пептиды данного изобретения обладают значительно более высокой активностью, чем НЕР1. Стимуляция Нер-рецептором также приводит к активации мононуклеарных клеток периферической крови человека, что было показано измерением включения радио-

активного меченного тритием тимидина в ДНК растущих клеток. Новые пептиды Rupe312 и Rupe414, полученные из домена А Her-рецептора, обладают в десять раз более высокой активностью, чем HER1. (Пример 6).

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE и Rupe414 SEQ ID 13: KRRETVEREKE).

Автор также обнаружил, что 24-часовая инкубация белых кровяных телец человека (WBC) с пептидами, полученными из Her-рецептора, в результате приводит к падению экспрессии МНС класса I на поверхности клеток, возможно вследствие активации клеток и интернализации рецепторов, и к увеличению общей популяции макрофагов, экспрессирующих МНС класса I. Данный факт согласуется с долговременным увеличением популяции клеток, экспрессирующих МНС класса I, наблюдаемым у ВИЧ-пациентов в течение шести месяцев после терапии HER1. В данной системе исследования Rupe312 и Rupe414 обладали значительно более высокой активностью, чем HER1 (пример 7).

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE и Rupe414 SEQ ID 13: KRRETVEREKE).

Автор показал (пример 8), что пептиды her-рецептора обладают значительным супрессирующим действием на экспрессию IL-8. Ингибирование IL-8 может играть роль в избирательной активности пептидов her-рецептора в активации моноцитов/макрофагов.

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE).

Автор показал (пример 9), что очень низкая доза пептидов Нер-рецептора (1-100 нанограмм/мышь) защищает мышь от острой инфекции *Salmonella typhimurium*.

(Rupel5 SEQ ID 3: TEKKR и Rupel024 SEQ ID 17: EREKEQMMREKEEL, и HEP1 SEQ ID 28: TEKKRRETVEREKE).

Автор показал (пример 10), что очень низкая доза пептидов Нер-рецептора (1-1000 нанограмм/мышь) увеличивает время жизни мышей в модели летальной инфекции вирусом герпеса. (HEP1 SEQ ID 28: TEKKRRETVEREKE).

Данное изобретение описывает заряженные молекулы, которые специфично связываются с Нер-рецептором. Автор разработал три группы новых заряженных пептидов, которые имеют последовательности, идентичные аминокислотным последовательностям комплементарных доменов Нер-рецептора, и которые либо связываются с доменом В Нер-рецептора (SEQ ID 3 - SEQ ID 16), либо с обоими доменами - доменом А и доменом В (SEQ ID 17), или которые связываются с доменом А (SEQ ID 18 - SEQ ID 27). Пептиды, которые являются предметом данного изобретения, вероятно, связываются с экспонированными на поверхности клеток Нер-рецепторами и стабилизируют развернутую конформацию эзрина, и индуцируют иммуномодулирующие эффекты. Предпочтительными являются пептиды длиной от пяти до тринадцати аминокислот, и предпочтительными являются следующие последовательности.

Пептиды, связывающие домен В Нер-рецептора:

SEQ ID 3

Rupe 15: TEKKR

SEQ ID 4

Rupe 19: TEKKRRETV

SEQ ID 5

Rupe 111: TEKKRRETVER

SEQ ID 6

Rupe 37: KKRRE

SEQ ID 7

Rupe 310: KKRRETVE

SEQ ID 8

Rupe 312: KKRRETVERE

SEQ ID 9

Rupe 313: KKRRETVEREK

SEQ ID 10

Rupe 314: KKRRETVEREKE

SEQ ID 11

Rupe 411: KRRETVER

SEQ ID 12

Rupe 413: KRRETVEREK

SEQ ID 13

Rupe 414: KRRETVEREKE

RU 2215005 C2

RU 2215005 C2

SEQ ID 14

Rupe 59: RRETV

SEQ ID 15

Rupe 614: RETVEREKE

SEQ ID 16

Rupe 1014: EREKE

Пептид, связывающий домен А и домен В Нер-рецептора

SEQ ID 17

Rupe 1024: EREKEQMMREKEEL

Пептиды, связывающие домен А Нер-рецептора:

SEQ ID 18

Rupe 2024: KEELM

SEQ ID 19

Rupe 2032: KEELMLRLQDYEE

SEQ ID 20

Rupe 2032p: KEELMLRLQDYpEE

SEQ ID 21

Rupe 2132: EELMLRLQDYEE

SEQ ID 22

Rupe 2132p: EELMLRLQDYpEE

SEQ ID 23

Rupe 2232: ELMLRLQDYEE

SEQ ID 24

RU 2215005 C2

RU 2215005 C2

Rupe 2232p: ELMLRLQDYpEE

SEQ ID 25

Rupe 2428: MLRLQ

SEQ ID 26

Rupe 2832: QDYEE

SEQ ID 27

Rupe 2832p: QDYpEE

Другие пептиды или другие заряженные молекулы, которые связываются с доменом А или доменом В или же соединяют мостиком домен А и домен В Нер-рецептора, вероятно, являются биологически активными. Данные пептиды или другие заряженные молекулы могут быть введены перорально или другими путями для лечения различных инфекционных болезней и рака.

#### СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ

Пептиды, используемые в данном изобретении, могут быть синтезированы, например, с использованием твердофазного способа с применением либо Вос-, либо Fmoc-химии, либо любым другим практическим способом синтеза пептидов, известным специалистам в области пептидного синтеза.

Ступенчатый твердофазный синтез с использованием Вос-аминокислот может быть выполнен на основе метода Меррифила; (Journal of American Chemical Society 85, 2149-2154). Можно использовать следующие соединения (смола Novabiochem: Вос-Glu(OBzl)-PAM, аминокислоты: Вос-Lys (2Cl-Z-)OH, Вос-

Glu(OBzl)OH, Boc-Arg(Tos)OH, Boc-Val-OH, Boc-Thr (Bzl)-OH, растворители: DMF (Rathburn), дихлорметан (BDH), этилацетат (BDH), реагенты: HBTU (Phase Separation Ltd.), пара-крезол (Lanchester), ТФУ (Halocarbon Products Corporation), HF (BOC) DIEA (Fluka). Рекомендуемыми защитными группами для химически активных боковых цепей Boc-аминокислот являются Arg (Tos), Asn (Xan), Asp (OCHx1), Glu (OCHx1) Gln (Xan) или Gln, His (DNP), Lys (CIZ), Serine (Bzl) Tyr (BrZ) Trp (CHO). Сокращения имеют следующие значения: DCC = дициклогексилкарбодиимид, DIC = диизопропилкарбодиимид, DCM = дихлорметан, DMF = диметилформамид, ТФУ (TFA) = трифторуксусная кислота, Boc = трет-бутилоксикарбонил, HOBT = гидроксibenзотриазол, DIEA = диизопропилэтиламин, DCU = дициклогексилмочевина.

Например, Boc-синтез пептида данного изобретения может быть выполнен следующим образом: на активацию HBTU/in situ нейтрализацию в масштабе 0,5 ммоль расходуется 0,5 ммоль смолы и трехкратный избыток активированной Boc-аминокислоты. Boc-аминокислота и активирующий реагент (HBTU) следует использовать в эквимолярных количествах, т.е. 2 ммоль каждого в данном случае соответствует 3-х кратному избытку. DIEA используется как для нейтрализации смолы для связывания, так и для активации Boc-аминокислоты. (Поэтому используется 2,5 ммоль, 1 эквивалент Boc-а/к и 1 эквивалент смолы). Реактивы: 0,5M HBTU в DMF (М.м. = 379, 0,5 M = 18,95 г в 100 мл, следует обратить внимание: реактив не стойкий на

свету) требуется 2 ммоль = 4 мл и 2,5 ммоль DIEA = 0,46 мл (М.м. = 129, d = 0,742). Активация аминокислот: Вос-аминокислоту следует активировать только непосредственно перед добавлением к смоле, особенно в случае Arg (Tos). Для всех Вос-аминокислот следует отвесить 2 ммоль Вос-аминокислоты в 20 мл стеклянную колбу для образцов. Добавить 4 мл 0,5 М раствора HBTU и взболтать, чтобы растворить твердое вещество. Добавить 0,46 мл DIEA и перемешать (может наблюдаться некоторое изменение цвета). Способ: промыть смолу DMF, удалить Вос-защитную группу 100% ТФУ - встряхивать дважды по 1 минуте, сливая между встряхиваниями, слить, промыть в потоке DMF в течение 1 минуты, слить, добавить раствор активированной аминокислоты, встряхивать в течение 10 минут, затем отобрать образец и провести тест с нингидрином, чтобы определить эффективность связывания. В завершение синтеза промыть в потоке DMF, затем DCM и высушить. Синтез первого и каждого последующего уровня пептидной конструкции достигается с использованием трехкратного избытка активированных HBTU Вос-аминокислот в DMF. При всех связываниях эффективность связывания должна быть более 99%, как показано при количественном тестировании с нингидрином. Удаление защитных групп на N-концах проводят в 100% ТФУ. Смолу с пептидом осторожно промывают в потоке перед и после удаления защитных групп. После последнего связывания и удаления Вос-защиты смолу с пептидом промывают дихлорметаном и сушат на воздухе. Пептид извлекают из смолы с помощью способа при

высоком содержании HF (2 г пептида, связанного со смолой, 2 г крезола, 20 мл HF, 1,5 час при  $-5^{\circ}\text{C}$ ), получая неочищенный пептид, который осаждают этилацетатом (100 мл) и повторно растворяют в растворе 6 М гуанидин-HCl - 0,1 М трис (20 мл).

Пептид можно очистить следующим образом, используя разделение аналитической ВЭЖХ на колонке Vydac  $\text{C}_{18}$  5 RAC. Ацетонитрил со степенью очистки для ВЭЖХ (Aldrich) и воду фильтруют через мембранный фильтр и дегазируют потоком гелия перед использованием. Аналитическое разделение достигается с помощью градиента растворителя, начиная с 0% ацетонитрила, постоянно увеличивая до 60% ацетонитрила к 20 минутам, оставляя данную концентрацию в течение двадцати минут и постоянно снижая до 0% ацетонитрила в течение 10 минут при постоянном потоке 1,2 мл в минуту. Препаративное отделение пептида достигается на препаративной колонке  $\text{C}_{18}$  TSK-GEL. Разделение достигается с использованием градиента растворителя, начиная с 0% ацетонитрила, постоянно увеличивая до 18% ацетонитрила к 60 минутам, затем до 60% ацетонитрила в течение 80 минут, оставляя данную концентрацию в течение 30 минут при постоянном потоке 8 мл в минуту. Градиент можно регулировать двумя однопоршневыми насосами Gilson 302, контролируемые микропроцессором. Соединения можно регистрировать с помощью настраиваемого абсорбционного детектора Waters 486 при 214 нм, и аналитические хроматограммы можно записывать с помощью HP laserjet 5L. Запись при

220 нм с Holochrome UV-VIS детектора для препаративных хроматограмм может производиться с помощью одноканального записывающего устройства LKB 2210. Контроль качества с помощью капиллярного электрофореза может быть выполнен на оборудовании Waters Quanta 4000 с использованием фосфатного буфера (75 микроМ) pH 2,5, разгоняемого при 15 кВ, время внесения образца 20 секунд, наносимого гидростатическим впрыскиванием на 60 см-колонку, время электрофореза 12 минут. Выход для синтеза на 1 г 0,46 ммоль смолы должен составлять около 250 мг чистого пептида.

Также могут применяться альтернативные способы синтеза в растворе, чтобы получить большие количества пептидов данного изобретения. Защищенные тримерные фрагменты могут быть получены с помощью поэтапного синтеза методом активированных сложных эфиров, известным специалистам в области пептидного синтеза. Затем производя сборку фрагментов, используя DCC/НОВТ после удаления соответствующих С- и N-концевых защитных групп. После удаления всех защитных групп неочищенный пептид частично очищают ионообменной хроматографией на SP-сефадексе-С25 с последующей препаративной ВЭЖХ, затем лиофильно сушат.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

От 0,01 до 1000 мг лиофилизированного пептида можно растворять в 1-10 мл дистиллированной воды и вводить перорально или вагинально. От 0,01 до 1000 мг может быть вклю-

чено в пилюлю или капсулу, или суппозиторий в композиции с носителями, традиционно используемыми специалистами в области производства пилюль или капсул, или суппозитория, и введено перорально или вагинально, или анально. Простерилизованный фильтрованием раствор от 0,001 до 100 миллиграмм пептида в дистиллированной воде может быть инъецирован подкожно или внутривенно, или внутримышечно.

Следующие примеры служат только для иллюстрации изобретения, и не должны быть истолкованы как ограничивающие изобретение каким-либо образом.

#### ПРИМЕР 1А

Адъювантная активность пептидов Нер-рецептора, усиливающая у мышей гуморальный ответ на овалбумин в виде продукции IgG сыворотки

Определяли ответ, выражающийся в продукции IgG, у мышей через две недели после инъекции 50 микрограмм овалбумина плюс различные концентрации разных пептидов нер-рецептора. Ответ с продукцией IgG измеряли по оптической плотности (OD) сыворотки мыши при разведении от 1 до 100 в присутствии овалбумина.

#### Результаты

Ответ в виде продукции IgG, регистрируемый по OD.

| Код пептида | Контроль | в/б инъекция в микрограммах на мышь |       |       |       |  | Последовательность пептида |
|-------------|----------|-------------------------------------|-------|-------|-------|--|----------------------------|
|             | 0        | 0,01                                | 0,1   | 1     | 10    |  |                            |
| HEP1        | 0,69     | 0,45                                | 0,44  | 0,56  | 0,57  |  | TEKKRRETVEREKE             |
| Rupe312     | 0,69     | 0,68                                | 0,88  | 0,55  | 0,44  |  | KKRRETVERE                 |
| Rupe1014    | 0,127    | 0,232                               | 0,231 | 0,477 | 0,508 |  | EREKE                      |
| Rupe1024    | 0,152    | 0,250                               | 0,262 | 0,489 | 0,445 |  | EREKEQMMREKEEL             |
| Rupe2032    | 0,127    | 0,509                               | 0,606 | 0,327 | 0,203 |  | KEELMLRLQDYEE              |

Ответ в виде продукции IgG регистрировали по OD, затем данные пересчитывали относительно 100 для каждого контроля.

| Код пептида | Контроль | в/б инъекция в микрограммах на мышь |     |     |     |  | Последовательность пептида |
|-------------|----------|-------------------------------------|-----|-----|-----|--|----------------------------|
|             | 0        | 0,01                                | 0,1 | 1   | 10  |  |                            |
| HEP1        | 100      | 65                                  | 64  | 81  | 83  |  | TEKKRRETVEREKE             |
| Rupe312     | 100      | 99                                  | 128 | 80  | 64  |  | KKRRETVERE                 |
| Rupe1014    | 100      | 183                                 | 182 | 376 | 400 |  | EREKE                      |
| Rupe1024    | 100      | 164                                 | 172 | 322 | 293 |  | EREKEQMMREKEEL             |
| Rupe2032    | 100      | 401                                 | 477 | 257 | 160 |  | KEELMLRLQDYEE              |

#### Заключение

Все пептиды Нер-рецептора, за исключением HEP1, проявляют адъювантную активность, но при различных оптимальных концентрациях.

#### ПРИМЕР 1В

Активность пептидов Нер-рецептора, усиливающая зависимый от антител цитотоксический ответ в тимусе мышей на эритроциты барана (ЭВ)

Определяли влияние пептидов Нер-рецептора на активацию клеток, образующих антитела против эритроцитов барана (ЭВ) у мышей (F1 гибриды CBA-C57B1, 2-месячного возраста, весом 18-22 грамма). Сначала мышам делали внутрибрюшинные инъек-

ции, используя либо 0,5 мл стерильного физиологического раствора в качестве контроля, либо пептиды Нер-рецептора в таком же объеме физиологического раствора. Через 30 минут после инъекции пептидов Нер-рецептора каждой мышце внутрибрюшинно вводили суспензию клеток, содержащую 5 миллионов ЭБ. Через четыре дня после иммунизации мышей забивали смещением шейных позвонков, и в стерильных условиях получали селезенки. Каждую селезенку гомогенизировали в 2 мл среды 199, затем 100 микролитров полученной суспензии помещали в 1 мл агарозы, приготовленной в среде 199 (хранится в водяной бане при 48°C), добавляли суспензию ЭБ, в результате получая конечную концентрацию агарозы 1%. 1 мл смеси агароза - клетки встряхивали, затем переносили в чашку Петри для затверждения. После того как агароза становилась твердой, чашку Петри инкубировали в течение 1 часа при 37°C, затем сверху на агарозный гель добавляли 0,5 мл сыворотки морской свинки, разведенной 1 к 20 средой 199, в качестве источника комплемента. Инкубацию продолжали еще в течение 1 часа. Затем чашки визуально исследовали, используя 8-кратный бинокулярный микроскоп, и подсчитывали число бляшек (каждая бляшка эквивалента одной клетке селезенки мыши, секретирующей антитела). Результаты выражали как в количестве клеток, секретирующих антитела на один миллион ядерных клеток селезенки, так и в количестве клеток, секретирующих антитела, на всю селезенку. Так как митогенного действия не наблюдалось (результатом введения пептида Нер-рецептора были селе-

зенки мышей нормального размера), приведенные два расчета давали сходные результаты.

Усредненные данные (от тридцати мышей на точку полученных данных) о количестве клеток, образующих антитела, на один миллион ядерных клеток селезенки. Данные пересчитаны относительно 100 для каждой контрольной группы.

| Код пептида | Контроль | В/б инъекция в микрограммах на мышь |     | Последовательность пептида |
|-------------|----------|-------------------------------------|-----|----------------------------|
|             |          | 0                                   | 10  |                            |
| HEP1        | 100      | 192                                 | 203 | TEKKRRETVEREKE             |
| Rupe312     | 100      | 317                                 | 267 | KKRRETVERE                 |
| Rupe15      | 100      | 255                                 | 134 | TEKKR                      |
| Rupe1014    | 100      | 202                                 | 325 | EREKE                      |
| Rupe1024    | 100      | 401                                 | 397 | EREKEQMMREKEEL             |
| Rupe2032    | 100      | 236                                 | 232 | KEELMLRLQDYEE              |

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE и Rupe15 SEQ ID 3: TEKKR, и Rupe1014 SEQ ID 16: EREKE, и Rupe1024 SEQ ID 17: EREKEQMMREKEEL, и Rupe2032 SEQ ID 19: KEELMLRLQDYEE, и HEP1 SEQ ID 28: TEKKRRETVEREKE).

#### Закключение

Все пептиды Нер-рецептора усиливают антитело-зависимый цитотоксический ответ в тимусе, но при различных оптимальных концентрациях.

#### ПРИМЕР 2

Противораковое действие пептидов Нер-рецептора на рост трансплантированной саркомы матки SM-322 и на рак шейки матки CUS-5, осуществляемое на мышах СВА с использованием Rupe312 и Rupe414 в качестве примеров

Материалы и способы

Модель трансплантированной саркомы SM-322 (эндотели-  
альная опухоль)

Первичные опухоли матки индуцировали у самок мышей, используя 1,2-диметилгидразин. Несколько первичных опухолей трансплантировали в сингенных мышей. Первые видимые узелки начинали появляться в месте трансплантации через 4 дня. Средняя продолжительность жизни мышей с трансплантированными опухолями составляла 22-24 дня.

Модель трансплантированного рака шейки матки мышей  
CUC-5 (эпителиальная опухоль)

Первичные опухоли индуцировали у самок мышей, используя метилхолантрен. Затем несколько первичных опухолей аутооттрансплантировали в шейку матки. Средняя продолжительность жизни мышей с трансплантированными опухолями составляла 43 дня.

Мыши СВА

Самки мышей СВА весили  $21,4 \pm 1,2$  г, и были 2-3 месячного возраста. Опухоли вводили в виде 0,5 мл суспензии опухоли (1 г опухоли на 10 мл среды Игла), и в каждой группе обработки использовали десять мышей.

Пептидный препарат и введение

Лиофилизированный пептид растворяли в стерильном физиологическом растворе непосредственно перед использованием в трех концентрациях. 0,5 мл раствора инъецировали дважды в

неделю в брюшину мышей в течение эксперимента. Использовали три различных концентрации пептида, что приводило к трем конечным дозам 10; 1,0 и 0,1 микрограмм на инъекцию на мышь.

#### Результаты

Среднее уменьшение объема опухоли в процентах относительно контрольной группы регистрировали в трех временных точках. Сравнивали продолжительность жизни мышей в группах обработки и контрольных группах, и проводили сравнение между контрольными группами и группами обработки по гистологии опухолей.

#### Модель трансплантированной саркомы мышей SM-322

| Пептид   | Концентрация<br>мкг/мышь | Снижение объема опухоли относительно контроля в процентах |                |                | Средняя продолжительность жизни |
|----------|--------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|
|          |                          | День 8                                                    | День 12        | День 15        |                                 |
| Rupe312  | 10                       | 63                                                        | 54             | 27             | 12-27                           |
|          | 1                        | 67                                                        | 32             | 38             | 12-19                           |
|          | 0,1                      | 61                                                        | 34             | 59             | 12-22                           |
| Rupe414  | 10                       | 65                                                        | 43             | 43             | 13-20                           |
|          | 1                        | 68                                                        | 28             | 43             | 12-20                           |
|          | 0,1                      | 68                                                        | 39             | 22             | 12-19                           |
|          |                          | Объем, день 8                                             | Объем, день 12 | Объем, день 15 |                                 |
| Контроль |                          | 1,49                                                      | 11,2           | 17,7           | 12-16                           |

#### Модель трансплантированного рака шейки матки мышей CUC-5

| Пептид   | Концентрация<br>мкг/мышь | Снижение объема опухоли относительно контроля в процентах |                |                | Средняя продолжительность жизни |
|----------|--------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|
|          |                          | День 5                                                    | День 12        | День 19        |                                 |
| Rupe312  | 10                       | 50                                                        | 25             | 49             | 48-76                           |
|          | 1                        | 50                                                        | 26             | 49             | 47-76                           |
|          | 0,1                      | 50                                                        | 18             | 45             | 42-76                           |
| Rupe414  | 10                       | 50                                                        | 16             | 48             | 36-76                           |
|          | 1                        | 50                                                        | 16             | 43             | 36-76                           |
|          | 0,1                      | 50                                                        | 18             | 57             | 47-76                           |
|          |                          | Объем, день 5                                             | Объем, день 12 | Объем, день 19 |                                 |
| Контроль |                          | 0,06                                                      | 0,68           | 1,56           | 47-76                           |

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE и Rupe414 SEQ ID 13: KKRRETVEREKE).

## Заключение

Пептиды Rupe312 и Rupe414 Нер-рецептора снижают скорость роста быстро растущих трансплантированных сарком, приводя к небольшому (3-18%) увеличению средней продолжительности жизни.

Пептиды Rupe312 и Rupe414 Нер-рецептора снижают скорость роста медленно растущего трансплантированного рака шейки матки, но существенного увеличения (или снижения) средней продолжительности жизни не было обнаружено.

Пептиды Rupe312 и Rupe414 Нер-рецептора вызывали некрогическое язвенное разрушение в центре опухолей в обеих моделях, что соответственно приводило к меньшим объемам опухолей.

### ПРИМЕР 3

NEP1, пептид Нер-рецептора, введенный перорально (10 мг в сутки либо в течение тридцати дней, либо в течение девяноста дней) 21 пациенту, инфицированному ВИЧ, приводил к клиническому улучшению. Успех данного исследования в целом служит доказательством полезности и возможности внедрения в практику пептидов, полученных из Нер-рецептора.

Данное исследование проводилось с фармацевтически чистым NEP1, пептидом, который имеет последовательность, идентичную части домена А Нер-рецептора. Инфицированные ВИЧ добровольцы были набраны для исследования в Институте иммунологии в Москве под руководством профессора Равшана Атаул-

лаханова. Фармацевтически чистый НЕР1 прошел широкий круг испытаний токсичности на животных (крысы и кролики) и пре-клиническое тестирование перед началом испытания, которые показали безопасность соединения. (Предварительная оценка токсичности - отрицательно, эффект 1000-кратной терапевтической дозы - отрицательно, местное раздражение - отрицательно, влияние на ЦНС и сердечно-сосудистую систему (HVS) - отрицательно, подострая токсичность - отрицательно, мутагенные действия - отрицательно, хроническая токсичность - отрицательно, эмбриотоксичность - отрицательно).

#### План исследования

Пациентам перорально вводили раствор 10 мг НЕР1 в 2 мл стерильной дистиллированной воды один раз в сутки утром перед завтраком (раствор готовили и хранили отдельно по 10 мг при -20°C). Всем пациентам вводили закодированный раствор плацебо, дистиллированную воду в течение тридцати дней перед лечением. Первой группе из 11 пациентов НЕР1 вводили в течение 90 дней, а второй группе из 10 пациентов НЕР1 вводили в течение тридцати дней спустя пятнадцать месяцев после того, как были проанализированы данные от первой группы пациентов. В течение периода лечения от пациентов требовалось посетить клинику один раз в неделю, пройти медицинское обследование и сдать образец крови на анализ. От пациентов также требовалось сотрудничество при наблюдении после лечения и посещение клиники один раз в месяц в течение шести месяцев для дальнейшего медицинского обследования и пожерт-

ования образцов крови. 21 из 21 пациента сотрудничали при наблюдении во время периода лечения и 14 из 21 пациента согласились на наблюдение после лечения. Пациенты не получали никакой другой антиретровирусной терапии в течение периода лечения НЕР1 или же начиная за один месяц до начала лечения НЕР1.

#### Пациенты

Пациенты были набраны из различных клиник Москвы и на основании полученной информации дали письменное согласие на участие в испытании. Они были идентифицированы как ВИЧ-инфицированные по положительному анализу ELISA, имели пониженное содержание Т-клеток и испытывали некоторые клинические проявления болезни, связанной с ВИЧ. Затем было показано, что пациенты имели количество CD4-клеток в микролитре в пределах между 17 и 801, и количество ВИЧ-РНК в сыворотке (количественный анализ ПЦР на Roche Labs Amplicor) от не обнаруживаемого до 230000 копий в мл.

# Характеристики пациентов в начале испытания

| Код идентификации | Пол     | Возраст | Установленный период инфекции | CD4-клеток/мкл | ВИЧ-РНК копий/мл | Условно-патогенные инфекции | Разное                          |
|-------------------|---------|---------|-------------------------------|----------------|------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| P1                | мужской | 45      | 8                             | 219            | 500              | тяжелая                     |                                 |
| P2                | мужской | 33      | 2                             | 192            | 10000            | тяжелая                     |                                 |
| P3                | женский | 45      | 6                             | 481            | 2000             | тяжелая                     |                                 |
| P4                | женский | 16      | 8                             | 237            | 43000            | тяжелая                     |                                 |
| P5                | мужской | 27      | 2                             | 123            | <400             | умеренная                   | сильная тошнота                 |
| P6                | женский | 23      | 1                             | 357            | 10000            | умеренная                   | герпес z                        |
| P7                | мужской | 23      | 8                             | 139            | 94000            | очень низкая                | герпес z                        |
| P8                | женский | 38      | 10                            | 320            | 22000            | очень низкая                | киста яичника                   |
| P9                | мужской | 43      | 3                             | 17             | 10000            | тяжелая                     |                                 |
| P10               | мужской | 19      | 2                             | 155            | 21000            | тяжелая                     | на наркотиках                   |
| P11               | мужской | 35      | 3                             | 188            | <400             | тяжелая                     | активная форма туберкулеза (TB) |
|                   |         |         |                               |                |                  |                             |                                 |
| P12               | мужской | 32      | 8                             | 175            | 13000            | тяжелая                     |                                 |
| P17               | мужской | 25      | 1                             | 478            | 11000            | тяжелая                     |                                 |
| P21               | женский | 37      | 10                            | 98             | 11000            | тяжелая                     |                                 |
| P63               | мужской | 35      | 1                             | 651            | 4000             | тяжелая                     |                                 |
| P67               | женский | 31      | 7                             | 124            | 230000           | тяжелая                     | сильная тошнота                 |
| P68               | женский | 51      | 2                             | 597            | <400             | тяжелая                     | сильная тошнота                 |
| P69               | мужской | 34      | 1                             | 192            | 8000             | тяжелая                     | активная форма туберкулеза (TB) |
| P72               | мужской | 33      | 1                             | 534            | 25000            | тяжелая                     | активная форма туберкулеза (TB) |
| P73               | мужской | 30      | 1                             | 801            | <400             | тяжелая                     | активная форма туберкулеза (TB) |
| P76               | женский | 38      | 7                             | 72             | 9000             | тяжелая                     |                                 |
|                   |         |         |                               |                |                  |                             |                                 |
|                   |         |         |                               |                |                  |                             |                                 |

## Общие результаты наблюдения

Пациенты не сообщали о побочных реакциях на НЕР1, и 17 пациентов сообщили, что они чувствовали себя в целом лучше и прибавили от 1,5 до 4,5 кг веса во время терапии НЕР1 (один пациент также чувствовал себя лучше во время периода приема плацебо).

## Побочные реакции

Побочных реакций не наблюдалось. Была проведена клиническая оценка, включающая ультразвуковое обследование и серии всесторонних биохимических, гематологических, иммунологических тестов крови и тестов мочи.

## Условно-патогенные инфекции

Условно-патогенные инфекции выявляли при микробиологическом анализе, и у пациентов, которых лечили НЕР1, либо не возникало изменений в виде новых инфекций, либо инфекции ослабевали. Например, перед лечением 38% пациентов имели тяжелую инфекцию глотки *Candida albicans*, после лечения только 9% были серьезно инфицированы. Перед лечением 52% пациентов имели тяжелую инфекцию глотки *S. viridans*, после лечения только 33% были тяжело инфицированы. Перед лечением 33% пациентов имели тяжелую инфекцию глотки *S. aureus*, после лечения только 19% были серьезно инфицированы.

## CD4-T-лимфоциты

Группа из одиннадцати пациентов, которых лечили НЕР1 в течение трех месяцев, к концу лечения испытывала средний прирост количества Т-клеток 9%, и 32% в среднем за последующие шесть месяцев после лечения. Группа из десяти пациентов, которых лечили НЕР1 в течение одного месяца, испытывала средний прирост количества Т-клеток 3% к концу лечения и 20% в среднем за последующие шесть месяцев после лечения. Продолжающееся улучшение свидетельствует о том, что у пациентов было индуцировано некоторое позитивное иммунологическое изменение.

## Анализ инфективности ВИЧ по TCID

Вирусную нагрузку измеряли смешиванием инфицированных моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) ВИЧ-

инфицированных пациентов с РВМС неинфицированных доноров в соотношении между клетками образца и клетками культуры 1/16, и культивированием при 37°C в течение четырнадцати дней. Вирусную нагрузку культуры измеряли с помощью набора для анализа р24 ВИЧ Innogenetics, и результаты регистрировали в пикограммах р24 антигена ВИЧ в мл.

#### Три месяца лечения

| Пациент                                              | P1   | P2  | P3 | P4  | P5  | P6  | P7   | P8  | P9   | P10 | P11 |
|------------------------------------------------------|------|-----|----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|
| Инфективность в пг/мл р24 максим. в начале испытания | 1039 | 315 | па | 386 | 515 | 203 | 1113 | 369 | 1074 | па  | 480 |
| пересчитано относительно 100 в начале                | 100  | 100 | 0  | 100 | 100 | 100 | 100  | 100 | 100  | 0   | 100 |
| Фаза 0, среднее значение                             |      |     |    |     |     | 130 |      |     |      |     |     |
| Фаза 1, среднее значение                             | 7    | 32  |    | 0   | 28  | 0   | 47   | 0   | 39   |     |     |
| Фаза 2, среднее значение                             | 21   | 218 |    | 198 | 129 | 251 | 70   | 217 | 40   |     | 835 |
| Фаза 3, среднее значение                             | 0    | 61  |    | 0   | 85  | 0   | 48   |     | 24   |     |     |

#### Один месяц лечения

| Пациент                                              | P12  | P17 | P21  | P63 | P67  | P68 | P69   | P72 | P73 | P76 |
|------------------------------------------------------|------|-----|------|-----|------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Инфективность в пг/мл р24 максим. в начале испытания | 465  | 0,3 | 3,1  | 2,9 | 6642 | 6,5 | 3,2   | 2   | 1   | 4,5 |
| пересчитано относительно 100 в начале                | 100  | 100 | 100  | 100 | 100  | 100 | 100   | 100 | 100 | 100 |
| Фаза 0, среднее значение                             | 288  |     |      |     |      |     |       | 251 |     |     |
| Фаза 1, среднее значение                             | 24   | 0   |      |     | 5    |     | 29    | 0   |     | 73  |
| Фаза 2, среднее значение                             | 1815 | 209 | 6924 | 659 | 334  | 993 | 28919 | 115 | 236 | 141 |
| Фаза 3, среднее значение                             | 5    | 39  | 54   | 51  | 51   |     | 15    | 57  |     | 102 |

В обеих группах пациентов (P1-P11 и P12-P76) наблюдали общую картину инфективности при анализе TCID для выявления инфекционных вирусных частиц. В начале терапии НЕР1 (фаза 0 - фаза 1) нагрузка инфекционным вирусом ВИЧ резко уменьшалась до низких уровней в первые три недели лечения, и у 9 из 21 пациента падала до нуля в течение по меньшей мере одной недели. Три пациента испытывали увеличение инфективности в течение первой недели лечения перед тем, как инфективность падала до нуля на второй неделе. В последующей второй фазе (фаза 2) у большинства пациентов инфективность

ВИЧ увеличивалась от 2× до 600× между четвертой и восьмой неделями после начала лечения. Пациенты не сообщали об ухудшении своего состояния во время этого периода. Затем следовала фаза 3, на которой инфективность снижалась ниже уровней до лечения.

В фазе 1 среднее максимальное снижение уровней вируса ниже базовой линии до лечения составляло минус 80%. В фазе 2 среднее максимальное увеличение уровня вируса в фазе два было 22 -кратным. В фазе 3 среднее максимальное снижение уровней вируса ниже базовой линии до лечения было минус 64%. Во время фазы 3 у трех пациентов вирусная инфективность снижалась до нуля. Через шесть месяцев после окончания лечения НЕР1 вирусная инфективность, как правило, возвращалась к уровню до лечения.

Автор интерпретирует полученные результаты как свидетельство того, что иммунная система была активирована НЕР1 для борьбы с ВИЧ в фазе один. Повышенный уровень активации иммунной системы стимулировал активацию резерва клеток, латентно инфицированных ВИЧ, приводя к увеличению инфекционных вирусов в фазе 2. Наконец в фазе 3 активированная иммунная система успешно разрушала новоактивированный вирусный резерв. Группа из десяти пациентов, которых лечили НЕР1 только один месяц, показала, что прохождение через фазу 2 и фазу 3 не зависело от присутствия НЕР1.

Вирусная нагрузка ВИЧ по количественной ПЦР ВИЧ-РНК в плазме

Анализ вирусной нагрузки проводили ПЦР-анализом Roche labs: тест-система Amplicor HIV-1 Monitor.

| Пациент                               | P1  | P2  | P3  | P4  | P5   | P6  | P7  | P8  | P9   | P10 | P11  |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|
| ВИЧ-РНК в плазме в 1000 копий/мл      | 0,5 | 10  | 2   | 43  | <0,4 | 10  | 94  | 22  | 10   | 21  | <0,4 |
| пересчитано относительно 100 в начале | 100 | 100 | 100 | 100 | 0    | 100 | 100 | 100 | 100  | 100 | 0    |
| Фаза 0, среднее значение              |     |     |     |     |      | 108 | 143 |     | 101  |     |      |
| Фаза 1, среднее значение              |     |     | 38  | 39  | 28   | 37  | 68  | 78  | 90   | 45  |      |
| Фаза 2, среднее значение              | 476 | 197 | 103 | 64  | 28   | 223 | 112 | 110 | 1535 | 92  |      |
| Фаза 3, среднее значение              |     | 85  | 66  | 77  | 0    | 64  | 92  | 52  |      | 39  |      |

| Пациент                               | P12 | P17 | P21 | P63 | P67 | P68  | P69 | P72 | P73  | P76 |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|
| ВИЧ-РНК в плазме в 1000 копий/мл      | 13  | 11  | 11  | 4   | 230 | <0,4 | 8   | 25  | <0,4 | 9   |
| пересчитано относительно 100 в начале | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0    | 100 | 100 | 100  | 100 |
| Фаза 0, среднее значение              |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |
| Фаза 1, среднее значение              |     | 0   |     |     | 78  |      |     |     |      | 55  |
| Фаза 2, среднее значение              | 219 | 177 | 273 | 206 | 91  |      | 142 | 191 |      | 139 |
| Фаза 3, среднее значение              | 135 | 86  |     | 98  | 63  |      | 138 | 72  |      | 72  |

У большинства пациентов как при лечении в течение одного месяца, так и при лечении в течение трех месяцев наблюдали сходные фазы подавления вирусов (фаза 1), с последующей временной активацией вирусов (фаза 2), после чего следовало подавление (фаза 3), что было сходно с данными TCID. Фаза 1 продолжалась от одной до четырех недель, и вирусная нагрузка снижалась в среднем на минус 47%. Фаза 2 продолжалась от восьми до сорока недель (более длительный период, чем видно при анализе TCID), и содержание вирусной РНК в плазме увеличивалось в среднем в 3X. После этого следовала фаза 3, в которой содержание вирусной РНК в плазме падало ниже уровней перед лечением при среднем снижении минус 19%.

Популяции клеток и экспрессия маркеров поверхности клеток по данным цитометрии

Маркеры клеточной поверхности мононуклеарных клеток периферической крови в группе из десяти пациентов (P12-

P76), которых лечили HER1 в течение одного месяца, анализировали детально, используя микроскопию, флуоресцентно меченные антитела, проточную цитометрию и сходные способы. Лечение HER1 оказывало следующие воздействия на каждую популяцию клеток, усредненные для группы из 10 пациентов:

а) Лимфоциты

среднее увеличение абсолютного количества лимфоцитов во время лечения на 7% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения на 25%.

б) Лейкоциты

среднее увеличение во время лечения на 10% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 20%.

г) Натуральные киллерные клетки

среднее увеличение во время лечения на 10% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 30%.

е) В-клетки

среднее увеличение во время лечения на 5% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 80%.

ф) Клетки, экспрессирующие CD3

среднее увеличение во время лечения на 15% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 30%.

г) Клетки, экспрессирующие CD8

среднее увеличение во время лечения на 15% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 20%.

h) Клетки, экспрессирующие CD44-CD4

RU 2215005 C2

RU 2215005 C2

среднее увеличение во время лечения на 25% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 60%.

h) Клетки, экспрессирующие CD44-CD8

среднее увеличение во время лечения на 12% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 30%.

i) Уровень экспрессии HLA класса I на CD4-клетках

среднее увеличение во время лечения на 10% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 70%.

j) Уровень экспрессии HLA класса I на CD8-клетках

среднее увеличение во время лечения на 10% и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 70%.

k) клетки, экспрессирующие CD25-CD8

среднее увеличение во время лечения на 5% от низких уровней и увеличение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 100%. CD25-CD4-клетки не проявляли существенного изменения.

l) Клетки, экспрессирующие CD38-CD4

среднее увеличение во время лечения на 2% от низких уровней и уменьшение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 15%.

m) Клетки, экспрессирующие CD38-CD8

среднее увеличение во время лечения на 2% от низких уровней и уменьшение в течение пяти месяцев после лечения примерно на 25%. (Существенное уменьшение CD38 обсуждается в следующем разделе).

Другие маркеры, такие как CD28, HLA-DR, CD45RO, CD45RA, CD57, CD62L, не проявляли существенных изменений, и сходной картины между пациентами не наблюдалось.

CD38-CD8-клетки: прогностический показатель прогрессирования СПИДа

Легко установить, что увеличенный размер популяции клеток, экспрессирующих CD38-CD8, коррелирует с развитием СПИДа у ВИЧ-инфицированных пациентов.

M Levancher, F Hulstaert, S Tallet, S Ullery, J J Pocidalo, B A Bach (1992) "The significance of activation markers on CDS lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value" Clinical Experimental Immunology 90, 376-382.

Коротко, количество CD38-CD8-клеток, выраженное в процентах от общей CD8-популяции, коррелирует с прогрессированием ВИЧ-болезни - наблюдение, которое было подтверждено рядом более поздних публикаций. У здоровых людей процент CD8-клеток, которые также экспрессируют CD38, составляет между 30-50%, у ВИЧ-инфицированных пациентов без симптома - между 50-65%, у ВИЧ-инфицированных пациентов с ARC между 65% и 80%, и у пациентов со СПИД - между 80% и 98%. В завершение исследования десяти пациентов, которые принимали 10 мг NEP1 перорально в течение одного месяца, 5 пациентов предоставили образцы крови для анализа. Было очевидно, что у всех этих пациентов популяция CD38-CD8-клеток, выраженная

в процентах от общей CD8-популяции, снижалась до значений, свидетельствующих о более низком риске ВИЧ-болезни и улучшении здоровья.

| Процент CD38-CD8 клеток от количества CD8-клеток | Базовая линия | Месяц 1 лечение | Месяц 2 | Месяц 3 | Месяц 4 | Месяц 5 | Месяц 6 |
|--------------------------------------------------|---------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Пациент 12                                       | 92            | 94              |         | 79      | 84      | 73      | 72      |
| Пациент 17                                       | 66            | 71              |         | 69      | 50      | 55      | 57      |
| Пациент 21                                       | 83            | 86              |         |         |         | 66      |         |
| Пациент 69                                       | 90            | 94              |         | 86      | 79      | 71      |         |
| Пациент 76                                       | 78            | 84              |         | 77      | 64      | 54      | 50      |

#### Анти-ВИЧ-антитела в плазме

К концу одного месяца лечения НЕР1 10 пациентов (P12-P76) у 5 пациентов показаны значительно более высокие титры антител против различных антигенов ВИЧ (титры пересчитаны относительно 100 перед лечением).

|            | Анти gp120 | Анти gp41 | Анти p31 | Анти p24 | Анти p17 |
|------------|------------|-----------|----------|----------|----------|
| Пациент 17 | 216        | 93        | 157      | 97       | 101      |
| Пациент 21 | 127        | 110       | 71       | 103      | 110      |
| Пациент 63 | 110        | 131       | 387      | 146      | 154      |
| Пациент 69 | 160        | 274       | 813      | 507      | 116      |
| Пациент 72 | 93         | 111       | 147      | 245      | 143      |

#### Гуморальные ответы на условно-патогенные инфекции

Лечение НЕР1 стимулировало гуморальные ответы на условно-патогенные инфекции (титр антител пересчитан относительно 100 перед лечением).

| Макс. титр во время лечения | P12 | P17 | P21 | P63 | P67 | P68 | P69 | P72 | P73 | P76 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Aspergillus IgG             | 122 | 97  | 132 | 116 | 89  | 114 | 119 | 190 | 142 | 111 |
| Candida IgG                 | 127 | 100 | 126 | 170 | 447 | 51  | 293 | 214 | 120 | 129 |
| CMV IgG                     | 290 | 81  | 227 | 186 | 118 | 91  | 105 | 112 | 152 | 88  |
| CMV IgM                     | 120 | 141 | 142 | 215 | 159 | 92  | 102 | 148 | 120 | 142 |
| HSV1 IgM                    | 113 | 129 | 158 | 134 | 99  | 89  | 116 | 101 | 107 | 106 |
| HSV2 IgM                    | 107 | 129 | 109 | 108 | 156 | 158 | 146 | 111 | 300 | 186 |
| IgG против токсоплазмы      | 105 | 107 | 98  | 108 | 125 | 101 | 104 | 95  | 105 | 98  |

Среднее увеличение титра антител составляло плюс 23% для IgG против Aspergillus, плюс 78% для IgG против Candida, плюс 50% для CMV IgG, плюс 38% для CMV IgM, плюс 15% для HSV1 IgM, плюс 51% для HSV2 IgM и плюс 5% для IgG против токсоплазмы.

#### Заключение

Приведенные выше данные соответствуют открытию, что пептид с последовательностью, идентичной части Нер-рецептора, приводит к иммунной активации и клинической пользе для ВИЧ-пациентов при клиническом испытании на человеке.

#### ПРИМЕР 4

Тяжелая острая и хроническая инфекция Candida у женщин может быть вылечена посредством иммунного ответа в результате стимуляции Нер-рецептором

Клиническое исследование: рецидивирующая умеренная кандидная инфекция

Женщина (возраст 27 лет) с нелеченной, только что вспыхнувшей кандидной инфекцией добровольно согласилась на исследование. Она сообщила о рецидивирующей умеренной ваги-

нальной кандидной инфекции (шесть эпизодов в предыдущие двенадцать месяцев), которую ранее лечили интравагинальной аппликацией 1% клотримазола. Она сама вводила 5 мл раствора НЕР1 в концентрации 1 мг/мл интравагинально 5 мл-шприцем два следующих друг за другом дня. После трех дней все клинические симптомы кандидной инфекции исчезли, и она не сообщала о дополнительных рецидивах кандидной инфекции в последующие 12 месяцев.

Клиническое исследование: тяжелая персистентная кандидная инфекция

На исследование добровольно согласились три пациентки, проходящие лечение в Nearmedic Plus STD клинике в Москве, страдающие от тяжелой кандидной инфекции влагалища, после того как они были пролечены антибиотиками от различных мочеполовых инфекций. Пациенток лечили 5 мл раствора НЕР1 при концентрации 2 мг/мл в течение трех следующих друг за другом дней (другой противогрибковый курс лечения не использовали). Сравнение микробиологического анализа (культивирование мазков уретры, канала шейки матки и вагины) и клинического анализа до лечения и через три недели после лечения показывало либо значительное улучшение, либо ликвидацию инфекции.

| Пациент | Возраст | Период | Клинический анализ | Мазок уретры     | Мазок шейки матки | Влагалищный мазок |
|---------|---------|--------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| LLA     | 34      | До     | Тяжелая инфекция   | Интенсивный рост | Слабый рост       | Слабый рост       |
| KEM     | 28      | До     | Тяжелая инфекция   | Интенсивный рост | Интенсивный рост  | Интенсивный рост  |
| ALN     | 35      | До     | Тяжелая инфекция   | Интенсивный рост | Интенсивный рост  | Интенсивный рост  |
|         |         |        |                    |                  |                   |                   |
| LLA     | 34      | После  | Без симптомов      | Отсутствует      | Отсутствует       | Отсутствует       |
| KEM     | 28      | После  | Слабые симптомы    | Слабый рост      | немного           | Отсутствует       |
| ALN     | 35      | После  | Без симптомов      | Отсутствует      | Отсутствует       | Отсутствует       |

#### ПРИМЕР 5

Rupe312, Rupe414, Rupel11 и Rupe411 индуцируют сильный ответ у мышей, выраженный в активации макрофагов

На мышцах исследован ряд пептидов, полученных из домена А Нер-рецептора, включая NER1.

#### Индукция активированных макрофагов

Группам, состоящим из трех мышей (CDA × C57B1)F1 весом 22-24 г, абдоминально инъецировали каждый из пептидных растворов из 1,0 микрограмма пептида, растворенного в 0,5 мл физиологического раствора. Через 24 часа животных забивали посредством смещение шейных позвонков, и в брюшину инъецировали 5 мл раствора Хенкса. Брюшину массировали 30 секунд и затем собирали перитонеальную жидкость. Собранную жидкость фильтровали, используя нейлоновый фильтр, в силиконизированные пробирки, содержащие 1,5 мг/мл ЭДТА.

Затем определяли количество клеток, содержащих ядро, в 1 микрограмме фильтрата при микроскопическом исследовании, используя гемоцитометр Nihon. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 800 g, осадок ресуспендировали

в околоплодной сыворотке теленка, суспензию клеток капали на предметное стекло для микроскопа и сушили, затем фиксировали в метаноле и красили красящим средством по Романовскому. Морфологический анализ клеток перитонеального экссудата проводили, используя оптический микроскоп Opton при увеличении 1600. Оценивали количество лимфоцитов, покоящихся макрофагов, активированных макрофагов, гранулоцитов и других типов клеток. Результатом явилось то, что все пептиды увеличивали количество активированных макрофагов, но Rupe111, Rupe312, Rupe411 и Rupe414 были значительно более активными, чем HEP1.

| 1,0 микрограмм пептида/мышь                                   | Физ. раствор | HEP1 | Rupe111 | Rupe312 | Rupe411 | Rupe414 |
|---------------------------------------------------------------|--------------|------|---------|---------|---------|---------|
| Процент активированных макрофагов от общего количества клеток | 1,9          | 2,2  | 4,3     | 13,9    | 5,5     | 8,5     |

|         |            |                |
|---------|------------|----------------|
| HEP1    | SEQ ID 28: | TEKKRRETVEREKE |
| Rupe111 | SEQ ID 5:  | TEKKRRETVER    |
| Rupe312 | SEQ ID 8:  | KKRRETVERE     |
| Rupe411 | SEQ ID 11: | KRRETVER       |
| Rupe414 | SEQ ID 13: | KRRETVEREKE    |

#### ПРИМЕР 6

Активация мононуклеарных клеток периферической крови человека *in vitro* пептидами Нер-рецептора показана посредством измерения включения радиоактивного меченного тритием тимидина в ДНК растущих клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из периферической крови здорового донора, используя

стандартный способ фракционирования в градиенте фикола. РВМС суспендировали в среде для культивирования, содержащей среду RPMI1640 плюс 10% околоплодной сыворотки теленка, 1мМ L-глутамин и антибиотики (ВМ). Суспензию клеток помещали в лунки 96-луночного микропланшета для культивирования клеток, (100 микролитров суспензии, содержащей 100000 клеток на лунку). Затем добавляли 100 микролитров ВМ, содержащей пептид (конечная концентрация 0,001-10 микрограмм/мл). Лунка негативного контроля содержала ВМ, но не содержала пептида. Планшет инкубировали при 37°C в течение трех дней, затем добавляли радиоактивный <sup>3</sup>H-тимидин до конечной концентрации 1 микрокюри на мл. Включение <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток измеряли, используя бета-счетчик стандартным способом. Эксперимент повторяли дважды, и результаты выражали в виде среднего из двух экспериментов в импульсах радиоактивности в минуту. Результат показал, что все пептиды активируют пролиферацию мононуклеарных клеток, но Rure312 и Rure414 были значительно более активными, чем HEP1, с пиком активности около 3 нанограмм/мл.

RU 2215005 C2

RU 2215005 C2

| Пептид<br>мкг/мл | Контроль | HEP1 | Rupe19 | Rupe312 | Rupe414 | Rupe411 | Rupe111 | Rupe614 |
|------------------|----------|------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0,0001           | 370      | 410  | 426    | 563     | 493     | 385     | 483     | 464     |
| 0,0003           | 370      | 500  | 602    | 742     | 580     | 510     | 483     | 503     |
| 0,001            | 370      | 989  | 718    | 976     | 684     | 702     | 710     | 550     |
| 0,003            | 370      | 700  | 756    | 3222    | 2087    | 598     | 665     | 752     |
| 0,01             | 370      | 628  | 545    | 656     | 650     | 532     | 537     | 607     |
| 0,03             | 370      | 517  | 586    | 539     | 596     | 500     | 642     | 538     |
| 0,1              | 370      | 456  | 537    | 533     | 485     | 499     | 633     | 596     |
| 0,3              | 370      | 399  | 563    | 611     | 492     | 486     | 668     | 635     |
| 1                | 370      | 400  | 509    | 472     | 449     | 468     | 529     | 600     |
| 3                | 370      | 412  | 502    | 455     | 437     | 420     | 486     | 499     |
| 10               | 370      | 501  | 517    | 405     | 394     | 390     | 470     | 412     |

HEP1                    SEQ ID 28:        TEKKRRETVEREKE

Rupe19                SEQ ID 4:         TEKKRRETV

Rupe312               SEQ ID 8:         KKRRETVERE

Rupe414               SEQ ID 13:        KRRETVEREKE

Rupe411               SEQ ID 11:        KRRETVER

Rupe111               SEQ ID 5:         TEKKRRETVER

Rupe614               SEQ ID 18:        RETVEREKE

#### ПРИМЕР 7

Влияние пептидов Нер-рецептора на экспрессию МНС класса I на различных иммунных клетках

Инкубация пептидов, полученных из Нер-рецептора (0,003 микрограмма в мл) с лейкоцитами (WBC) человека в течение 24 часов при 37°C в результате приводила к падению интенсивности экспрессии HLA на клеточной поверхности всех WBC (вследствие активации клеток и интернализации рецепторов). Rupe312 был более активным, чем Rupe414, который был более активным, чем HEP1.

Данные пересчитаны относительно 100 для контрольного значения в отсутствие пептидов.

| Плотность экспрессии HLA класса I на поверхности клеток |                        |                   |                   |               |             |
|---------------------------------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------|
|                                                         | Моноциты/<br>макрофаги | CD8-<br>лимфоциты | CD4-<br>лимфоциты | Клетки В и NK | Гранулоциты |
| Контроль                                                | 100                    | 100               | 100               | 100           | 100         |
| НЕР1                                                    | 83                     | 83                | 80                | 84            | 89          |
| Rupe414                                                 | 83                     | 76                | 77                | 77            | 85          |
| Rupe312                                                 | 71                     | 72                | 70                | 73            | 81          |
|                                                         |                        |                   |                   |               |             |

Специфичное для клеток действие данной активации представляло собой увеличение популяции моноцитов, экспрессирующих МНС класса I и уменьшение популяции CD8-лимфоцитов, экспрессирующих МНС класса I.

Данные пересчитаны относительно 100 для контрольного значения в отсутствие пептидов.

| Процент популяции клеток, экспрессирующих HLA класса I |                        |                   |                   |               |             |
|--------------------------------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------|
|                                                        | Моноциты/<br>макрофаги | CD8-<br>лимфоциты | CD4-<br>лимфоциты | Клетки В и NK | Гранулоциты |
| Контроль                                               | 100                    | 100               | 100               | 100           | 100         |
| НЕР1                                                   | 108                    | 91                | 105               | 102           | 100         |
| Rupe414                                                | 109                    | 89                | 105               | 101           | 98          |
| Rupe312                                                | 119                    | 85                | 104               | 105           | 98          |
|                                                        |                        |                   |                   |               |             |

(Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE и Rupe414 SEQ ID 13: KKRRETVEREKE)

#### ПРИМЕР 8

Пептиды Нер-рецептора подавляют продукцию IL-8 в WBC

Обнаружено супрессирующее действие возрастающих концентраций Rupe312, пептида Нер-рецептора, на экспрессию IL-8 WBC человека после 48-часовой инкубации при 37°C. IL-8

является фактором, вызывающим хемотаксис, который продуцируется в ответ на воспалительный стимул, который привлекает и активирует Т-клетки, нейтрофилы, базофилы, гранулоциты, но не моноциты/макрофаги. Ингибирование IL-8 может играть роль в избирательной активности Rupe312 в активировании моноцитов/макрофагов. Измерение IL-8 обеспечивает пробу для определения активности различных пептидов, полученных из Нер-рецептора.

| Концентрация Rupe312<br>в микрограммах/мл | Концентрация IL-8<br>культуре в<br>в пикограммах/мл |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 0                                         | 18900                                               |
| 0,001                                     | 13900                                               |
| 0,003                                     | 10700                                               |
| 0,01                                      | 8984                                                |
| 0,03                                      | 7869                                                |
| 0,1                                       | 6426                                                |

(система для ИФА-анализа IL-8, производимая Innogenetics, Belgium). (Rupe312 SEQ ID 8: KKRRETVERE)

#### ПРИМЕР 9

Очень низкие дозы пептидов Нер-рецептора (1-100 нанограмм/мышь) защищают мышь от острой инфекции *Salmonella typhimurium*

Лабораторных мышей (F1-гибриды CBA × C57B1) делили на группы по пять мышей, которые получали либо 0,5 мл физиологического раствора, либо 0,5 мл физиологического раствора плюс различные концентрации разных пептидов Нер-рецептора

(1,10 или 100 нанограмм). Спустя 24 часа мышей остро инфицировали *Salmonella typhimurium* (10000 или 100000 бактерий, инъецированных внутрибрюшинно на мышь). Регистрировали процент выживших мышей в каждой группе через 20 дней (летально инфицированные контрольные животные погибали в течение трех дней инфекции).

Процент выживших мышей в группах через 20 дней после инфекции

| Код пептида | 1000 Бактерий на мышь | Контроль | Пептиды Нер-рецептора в нанограммах на мышь |     |     |     | Последовательность пептида |
|-------------|-----------------------|----------|---------------------------------------------|-----|-----|-----|----------------------------|
|             |                       |          | 0                                           | 1   | 10  | 100 |                            |
|             |                       |          |                                             |     |     |     |                            |
| HEP1        | 10                    | 0%       | 20%                                         | 20% | 40% |     | TEKKRRETVEREKE             |
|             | 100                   | 0%       | 0%                                          | 0%  | 0%  |     |                            |
| Rupe15      | 10                    | 0%       | 20%                                         | 40% | 40% |     | TEKKR                      |
|             | 100                   | 0%       | 20%                                         | 20% | 0%  |     |                            |
| Rupe1024    | 10                    | 0%       | 40%                                         | 40% | 40% |     | EREKEQMMREKEEL             |
|             | 100                   | 0%       | 0%                                          | 20% | 40% |     |                            |

(Rupe15 SEQ ID 3: TEKKR и Rupe1024 SEQ ID 17: EREKEQMMREKEEL, и HEP1 SEQ ID 28: TEKKRRETVEREKE)

#### Заключение

Пептиды Нер-рецептора защищают животных от летальной бактериальной инфекции.

#### ПРИМЕР 10

Очень низкие дозы пептидов Нер-рецептора (1-1000 нанограмм/мышь) увеличивают продолжительность жизни мышей в модели летальной инфекции вирусом герпеса

Лабораторным белым мышам В/Р (пять на группу) внутрибрюшинно инъецировали пептид Нер-рецептора (1-1000 нано-

грамм на мышь) за 48 часов и 24 часа до летальной инъекции вируса герпеса (VPG-1 штамм L2) при титре 3,5 ЛД50 в 0,2 мл среды.

В группах мышей регистрировали среднюю продолжительность жизни в сутках.

| Код пептида | Контроль | Пептиды Нер-рецептора в нанограммах на мышь |    |    |     |      | Последовательность пептида |
|-------------|----------|---------------------------------------------|----|----|-----|------|----------------------------|
|             |          | 0                                           | 1  | 10 | 100 | 1000 |                            |
| HEP1        | 10       | 18                                          | 19 | 27 | 28  |      | TEKKRRETVEREKE             |

(HEP1 SEQ ID 28: TEKKRRETVEREKE)

#### Заключение

Пептиды Нер-рецептора значительно увеличивают продолжительность жизни при летальной вирусной инфекции.

#### ДОКУМЕНТЫ ПРИОРИТЕТА

Заявка на патент Великобритании GB9921881.0, Holms R., 17 сентября 1999 г.

#### ПАТЕНТНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Патент США 5773573

Rupert Holms, 30 июня 1998 г.

#### ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ

Ossi Turunen, Markku Sainio, Juha Jaaskelainen, Olli Carpen, Antti Vaheri (1998) "Structure - Function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-

associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein"  
Biochimica et Biophysica Acta 1387: 1-16.

Anthony Bretscher, David Reczek and Mark Berryman  
(1997) "Ezrin: a protein requiring conformational  
activation to link microfilaments to the plasma membrane in  
the assembly of cell surface structures" Journal of Cell  
Science 110: 3011-3018.

Claudia Hecker, Christoph Weise, Jurgen Schneider-  
Schaulies, Harvey Holmes, Volker ter Meulen (1997)"  
Specific binding of HIV-1 envelope protein gp120 to the  
structural membrane proteins ezrin and moesin." Virus  
Research 49: 215-223.

M. Levancher, F. Hulstaert, S. Tallet, S. Ullery, J.  
J. Pocidalo, B. A. Bach (1992) "The significance of activa-  
tion markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency  
syndrome: staging and prognostic value" Clinical Experimen-  
tal Immunology 90 376-382.

Stephan Oehen and Karin Brduscha-Riem (1998) "Differ-  
entiation of Naïve CTL to Effector and Memory CTL: Correla-  
tion of Effector Function with Phenotype and Cell Division"  
The Journal of Immunology 161 5338-5346.

# СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

## ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 28

### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 1

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 32 аминокислоты  
 ТИП: аминокислотная  
 КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
 ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 1

Домен А Нер-рецептора

A R E E K N Q K Q L E R Q Q L E T E K K R R E T V E R E K E Q M  
 1 5 10 15 20 25 30

### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 2

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 34 аминокислоты  
 ТИП: аминокислотная  
 КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
 ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 2

Домен В Нер-рецептора

M R E K E E L M L R L Q D Y<sub>(p)</sub> E E K T K K A E R E L S E Q I Q R A L Q  
 1 5 10 15 20 25 30

### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 3

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
 ТИП: аминокислотная  
 КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
 ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 3

Rupel5: T E K K R  
 1 5

### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 4

# ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 9 аминокислот  
 ТИП: аминокислотная  
 КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
 ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 4

Rupe19: T E K K R R E T V  
 1 5

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 5

### ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 11 аминокислот  
 ТИП: аминокислотная  
 КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
 ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 5

Rupe111: T E K K R R E T V E R  
 1 5 10

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 6

### ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
 ТИП: аминокислотная  
 КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
 ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 6

Rupe37: K K R R E  
 1 5

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 7

### ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 8 аминокислот  
 ТИП: аминокислотная  
 КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
 ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 7

Rupe310: K K R R E T V E  
1 5

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 8

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
ДЛИНА: 10 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 8

Rupe312: K K R R E T V E R E  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 9

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
ДЛИНА: 11 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 9

Rupe313: K K R R E T V E R E K  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 10

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
ДЛИНА: 12 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 10

Rupe314: K K R R E T V E R E K E  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 11

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
ДЛИНА: 8 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна

ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 11

Rupe411: K R R E T V E R  
1 5

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 12

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 10 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 12

Rupe413: K R R E T V E R E K  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 13

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 11 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 13

Rupe414: K R R E T V E R E K E  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 14

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 14

Rupe59: R R E T V  
1 5

RU 2215005 C2

RU 2215005 C2

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 15

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 9 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 15

Rupe614: R E T V E R E K E  
1 5

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 16

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 16

Rupe1014: E R E K E  
1 5

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 17

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 14 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 17

Rupe1024: E R E K E Q M M R E K E E L  
1 5 10

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 18

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 18

Rupe2024:

K E E L M

1 5

#### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 19

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 13 аминокислот

ТИП: аминокислотная

КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна

ТОПОЛОГИЯ: линейная

ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 19

Rupe2032: K E E L M L R L Q D Y E E

1 5 10

#### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 20

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 13 аминокислот

ТИП: аминокислотная

КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна

ТОПОЛОГИЯ: линейная

ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 19

Rupe2032p: K E E L M L R L Q D Yp E E

1 5 10

#### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 21

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 12 аминокислот

ТИП: аминокислотная

КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна

ТОПОЛОГИЯ: линейная

ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 21

Rupe2132: E E L M L R L Q D Y E E

1 5 10

#### ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 22

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 12 аминокислот

ТИП: аминокислотная

RU 2215005 C2

RU 2215005 C2

КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 22

Rupe2132p: E E L M L R L Q D Yp E E  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 23

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 11 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 23

Rupe2232: E L M L R L Q D Y E E  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 24

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 11 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 24

Rupe2232p: E L M L R L Q D Yp E E  
1 5 10

ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 25

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 25

Rupe2428: M L R L Q  
1 5

RU 2215005 C2

RU 2215005 C2

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 26

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 26

Rupe2832: Q D Y E E  
1 5

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 27

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

ДЛИНА: 5 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 27

Rupe2832p: Q D Yp E E  
1 5

## ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID 28

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

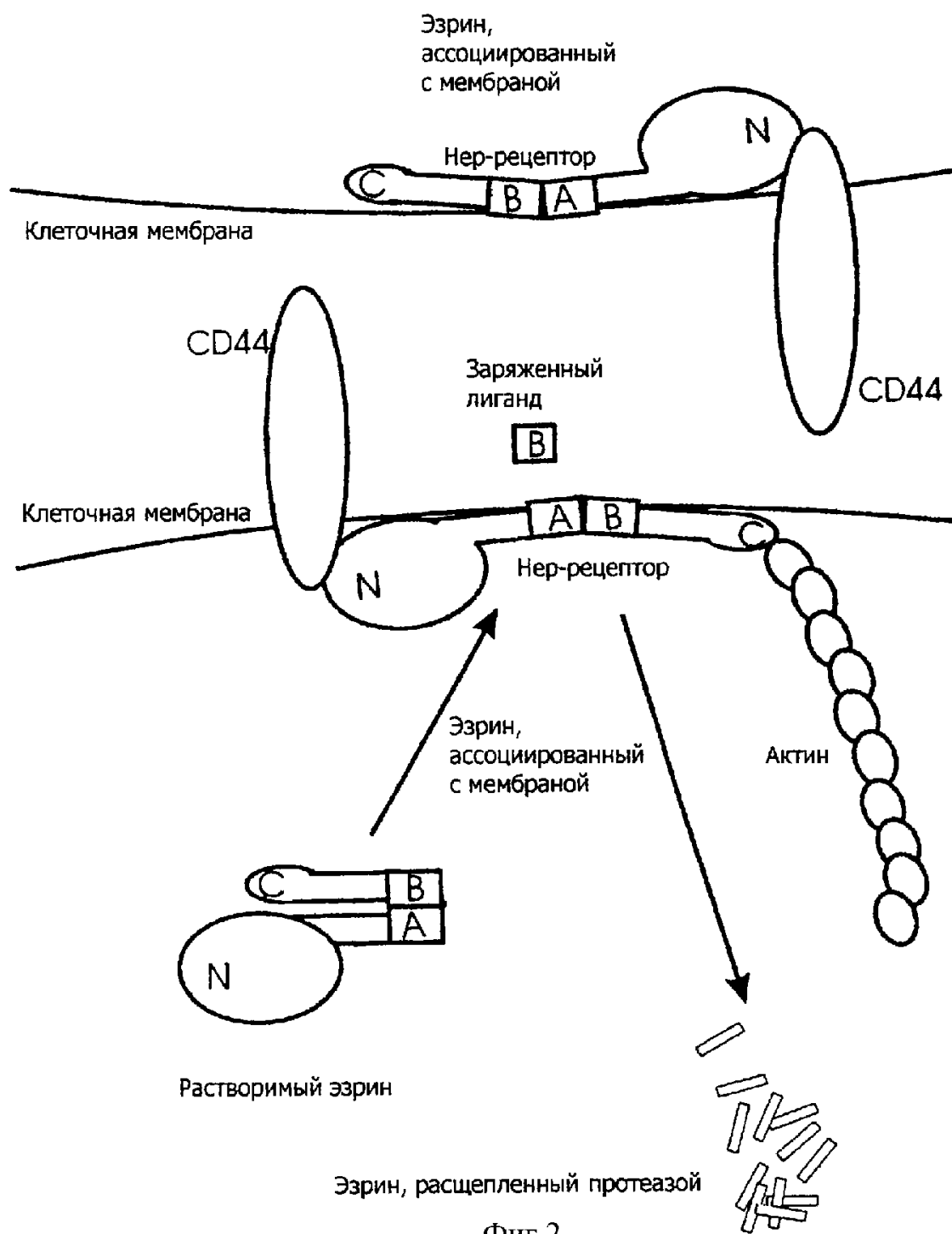
ДЛИНА: 14 аминокислот  
ТИП: аминокислотная  
КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна  
ТОПОЛОГИЯ: линейная  
ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

## ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID 28

HEP1: T E K K R R E T V E R E K E  
1 5 10

# Локализация в клетке и комплексы эзрина



Фиг.2