



(19) **RU** (11) **2 203 902** (13) **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 7/64, 7/56, A 61 K 38/12, A 61 P 7/02**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2000103210/04 , 09.07.1998

(24) Дата начала действия патента: 09.07.1998

(30) Приоритет: 11.07.1997 US 08/893,526

(46) Дата публикации: 10.05.2003

(56) Ссылки: WO 96/00581 A1, 11.01.1996. RU 95106829 A1, 10.01.1997. WO 96/40781 A1, 19.12.1996. WO 94/14836 A1, 07.07.1994.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 11.02.2000

(86) Заявка РСТ:
FI 98/00579 (09.07.1998)

(87) Публикация РСТ:
WO 99/02551 (21.01.1999)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры",
Н.Г. Лебедевой, рег.№ 0112

(71) Заявитель:

БАЙОТАЙ ТЕРАПИС КОРП. (FI)

(72) Изобретатель: ХЕЙНО Юрки (FI),

ИВАСКА Йоханна (FI), КЯПЮЛЯ Ярмо (FI)

(73) Патентообладатель:

БАЙОТАЙ ТЕРАПИС КОРП. (FI)

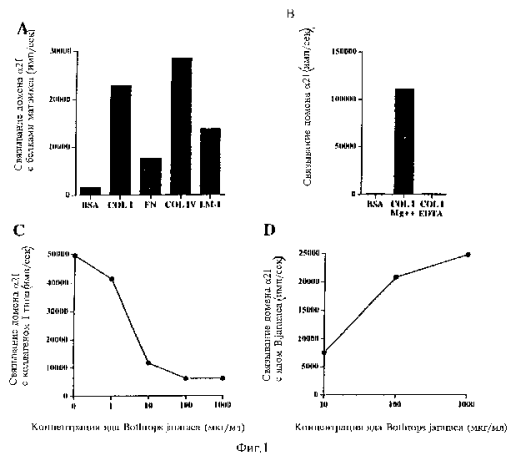
(74) Патентный поверенный:

Лебедева Наталья Георгиевна

(54) **СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С ИНТЕГРИНОМ ПЕПТИД И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(57)

Изобретение относится к циклическому связывающемуся с интегрином пептиду длиной 7-11 аминокислотных остатков, включающему в себя аминокислотную последовательность (RKK). Соединения по изобретению являются блокаторами домена $\alpha 2 I$ интегрин человека, а также потенциальными ингибиторами взаимодействия интегрин человека с коллагенами типов I и IV и с ламинином-1. Описана также фармацевтическая композиция, содержащая описанный пептид, способы ингибирования связывания интегринов, миграции клеток, адгезии тромбоцитов, а также способы анализа связывания агентов с интегрином. 11 с. и 4 з.п. ф-лы, 10 ил., 1 табл.





(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 203 902** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 7/64, 7/56, A 61 K 38/12, A 61 P 7/02**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

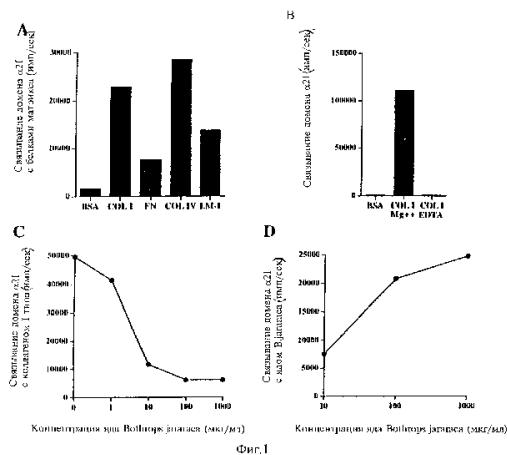
(21), (22) Application: 2000103210/04 , 09.07.1998
(24) Effective date for property rights: 09.07.1998
(30) Priority: 11.07.1997 US 08/893,526
(46) Date of publication: 10.05.2003
(85) Commencement of national phase: 11.02.2000
(86) PCT application:
FI 98/00579 (09.07.1998)
(87) PCT publication:
WO 99/02551 (21.01.1999)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", N.G. Lebedevoy, reg.№ 0112

(71) Applicant:
BAJOTAJ TERAPIS KORP. (FI)
(72) Inventor: KhEJNO Jurki (FI),
IVASKA Jokhanna (FI), KJaPJJuLJa Jarmo (FI)
(73) Proprietor:
BAJOTAJ TERAPIS KORP. (FI)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **INTEGRIN-BINDING PEPTIDE AND ITS USING**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, peptides.
SUBSTANCE: invention relates to cyclic peptide comprising 7-11 amino acid residues and involving amino acid sequence RKK that is able to bind integrin. Compounds are antagonists of human domain d21 of integrin and potential inhibitors of interaction of human integrin with collagens of types I and IV and with laminin-1. Invention describes also pharmaceutical composition comprising indicated peptide, methods of inhibition of integrins binding, cells migration, platelets adhesion and methods of analysis of binding agents with integrin. EFFECT: valuable medicinal properties of peptide. 15 cl, 1 tbl, 10 dwg, 9 ex



Фиг. 1

Текст описания в факсимильной виде(см. графическую часть). Т

Формула изобретения:

1. Циклический связывающийся с интегрином пептид длиной 7-11 аминокислотных остатков, включающий в себя аминокислотную последовательность RKK.

2. Пептид по п. 1, включающий в себя аминокислотную последовательность RKKH (SEQ ID NO 8).

3. Циклический пептид, включающий в себя аминокислотную последовательность $X_1RKKHX_2X_n$, при том, что X - любая аминокислота, и n= 1-4.

4. Циклический связывающийся с интегрином пептид, включающий в себя аминокислотную последовательность CTRKKHDNC (SEQ ID NO 4).

5. Циклический связывающийся с интегрином пептид, включающий в себя аминокислотную последовательность CTRKKHDNAQC (SEQ ID NO 5).

6. Фармацевтическая композиция, обладающая способностью связываться с доменом $\alpha 2I$ интегрин человека, содержащая связывающийся с интегрином пептид по любому из пп. 1-5.

7. Фармацевтическая композиция по п. 6, пригодная для локального применения.

8. Способ ингибирования связывания интегринов, содержащих домен $\alpha 2I$, с молекулами, распознающими указанный домен $\alpha 2I$, включающий в себя обеспечение взаимодействия указанного интегрин с указанным связывающимся с интегрином пептидом по любому из пп. 1-5.

9. Способ ингибирования зависимой от интегрин миграции клеток у пациента, включающий в себя обеспечение указанному пациенту эффективных количеств указанного связывающегося с интегрином пептида по любому из пп. 1-5.

10. Способ по п. 8, где указанная миграция клеток связана с раковым

заболеванием, сердечно-сосудистым заболеванием или периодонтитом у указанного пациента.

11. Способ ингибирования миграции клеток на коллагене у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий в себя введение указанному пациенту эффективных количеств указанного пептида по любому из пп. 1-5.

12. Способ ингибирования адгезии тромбоцитов на коллагене или индуцируемой коллагеном агрегации тромбоцитов у пациента, включающий в себя обеспечение указанному пациенту эффективных количеств указанного связывающегося с интегрином пептида по любому из пп. 1-5.

13. Способ по п. 13, где указанная адгезия или агрегация связаны с сердечно-сосудистым заболеванием у упомянутого пациента.

14. Способ анализа связывания, предназначенный для идентификации связывающихся с интегрином агентов, включающий в себя i) биотинилирование связывающегося с интегрином агента, тестирование которого осуществляется, ii) осуществление реакции указанного биотинилированного агента с иммобилизованным рекомбинантным доменом $\alpha 2I$ или производными от этого домена пептидами в подходящих для связывания условиях, iii) промывание твердой подложки, несущей связанный агент, iv) добавление меченного биотин-связывающего агента, и v) выявление любого связанного интегрин-связывающего агента.

15. Способ анализа связывания, предназначенный для идентификации связывающихся с интегрином агентов, включающий в себя i) мечение домена $\alpha 2I$ европием, ii) смешение связывающегося с интегрином агента, который должен быть протестирован, с меченным европием доменом $\alpha 2I$, в условиях, подходящих для связывания, и iii) выявление любого связанного интегрин-связывающего агента.

45

50

55

60

Изобретение относится к области терапевтического применения белков. Конкретно настоящее изобретение направлено на циклические пептиды и их применение, особенно на применение этих пептидов для блокирования или подавления биологической активности интегрина.

Интегрины являются гетеродимерными поверхностно-клеточными гликопротеинами клеточной поверхности, которые образованы нековалентносвязанными α - и β -субъединицами. Всего было идентифицировано шестнадцать α -субъединиц и восемь β -субъединиц. Было обнаружено свыше 20 различных комбинаций этих субъединиц.

Интегрины обеспечивают прикрепление клеток с их окружением, опосредуя взаимодействие между клеткой и матриксом и межклеточные взаимодействия (обзоры см. Hemler M.E., 1990, Annu. Rev. Immunol., 8, 365-400; и Hynes R.O., 1992, Cell, 69, 11-25, включая цитированные в них работы). Распознавание интегрином трипептидной последовательности RGD ("аргинин-глицин-аспарагиновая кислота") в составе белков внеклеточного матрикса является фундаментальным явлением в процессах взаимодействия между клеткой и матриксом. Фибронектин является прототипом RGD-содержащего белка. Кроме

того, большое количество других молекул матрикса у млекопитающих, птиц, лягушек или насекомых опосредует адгезию клеток с участием находящегося в их составе мотива RGD. Гетеродимеры интегрина, включающие в себя субъединицы $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ или $\beta 6$, могут образовывать RGD-зависимые рецепторы (Ruoslahti E., 1991, J. Clin. Invest., 87, 1-5; Busk M. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 7875-7881; и Elices M.J. et al., 1991, J. Cell Biol., 112, 169-181). В составе $\beta 1$ -субъединицы RGD-связывающийся мотив был картирован в N-концевой части молекулы; также имеется ряд доказательств того, что α -субъединица может влиять на это взаимодействие (Shih D.T. et al., 1993, J. Cell Biol., 122, 1361-1371). В целом десять гетеродимеров интегрина характеризуются общей $\beta 1$ -субъединицей и, соответственно, также имеют потенциальный RGD-связывающий участок. Большинство $\beta 1$ -содержащих интегринов характеризуется, однако, наличием и других механизмов связывания лиганда. Денатурированные фибриллярные коллагены распознаются RGD-зависимыми интегринами, такими как $\alpha 5 \beta 1$, в то время как нативные коллагены взаимодействуют с интегринами по RGD-независимому механизму (Gullberg D. et al., 1992, EMBO J., 11, 3865-3873).

Два интегрина, гетеродимеры $\alpha 1 \beta 1$ и $\alpha 2 \beta 1$, являются основными клеточными рецепторами для нативных коллагенов и, как и все интегрины, их взаимодействие с лигандами является зависимым от двухвалентных катионов (Staatz W.D. et al.,

1991, J. Biol. Chem., 266, 7363-7387). Интегрин $\alpha 2\beta 1$, например, экспрессирован в эпителиальных клетках, тромбоцитах, клетках грануляционной ткани и в различных опухолевых клетках. Биологические явления, в которых активность (функция) интегрин $\alpha 2\beta 1$ является ключевой, включают в себя индуцируемую коллагеном агрегацию тромбоцитов, клеточную миграцию на коллагене и зависимую от клеток реорганизацию коллагеновых нитей. В биологии рака интегрин $\alpha 2\beta 1$ ассоциировался с инвазивным фенотипом клеток, а также он может являться маркером агрессивной меланомы. С другой стороны, повышенная экспрессия интегрин $\alpha 2\beta 1$ в клетках опухоли молочной железы восстанавливает нормальный фенотип. Как и другие интегрины, интегрин $\alpha 2\beta 1$ формирует сигналы, которые участвуют в регуляции клеточных функций и экспрессии генов. В частности, предполагается, что уровень мРНК, кодирующий коллагеназу-1, контролируется интегрином $\alpha 2\beta 1$.

Субъединицы $\alpha 1$ и $\alpha 2$ отличаются по своей структуре от всех других ассоциирующихся с $\beta 1$ -субъединицей α -субъединиц в том, что они содержат своеобразный "вставленный" домен - домен I, - который сходен с доменом A, обнаруживаемым, например, в составе фактора фон Виллебранда (Michishita M. et al., 1993, Cell, 72, 857-867). Подтверждено, что домены $\alpha 1I$ и $\alpha 2I$ ответственны за первичное распознавание коллагена соответствующими интегринными (Kamata T. et al., 1994, J. Biol. Chem., 269, 9659-9663; Kamata T. et al., 1994, J. Biol.

Chem., 269, 26006-26101: Kern A. et al., 1994, J. Biol. Chem., 269, 22811-22816). Два других лиганда интегрин $\alpha 2\beta 1$ -а именно ламинин-1 и ЕСНО-вирус-1, - также связываются с доменом $\alpha 2I$. Однако ЕСНО-вирус-1, по-видимому, распознаёт отличающийся сайт в составе $\alpha 2I$ -домена по отношению к другим белкам матрикса (Bergelson J.M. et al., 1993, J. Clin. Invest., 92, 232-239).

Связывающие сайты интегринов $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 1$ в составе коллагенов были картированы на трехспиральных участках молекул (Eble J.A. et al., 1993, EMBO J., 12, 4795-4802; Gulberg D. et al., 1992, EMBO J., 11, 3865-3873). Для одной из аминокислотных последовательностей, производных от α -субъединицы коллагена, сообщалось о блокировании взаимодействия "интегрин-коллаген", однако во многих проведённых исследованиях оно оказывалось неэффективным и, по-видимому, не представляет истинный сайт связывания коллагена (Cardarelli P.M. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 23159-23164; Pfaff M. et al., 1993, Exp. Cell Res., 206, 167-176; и Tuckwell D. et al., 1995, J. Cell Sci, 108, 1629-1637). Более вероятным представляется то, что коллагено-рецепторные интегрины распознают аминокислотные остатки из состава более чем одной α -цепи коллагена. При анализе взаимодействия коллагена IV типа и интегрин $\alpha 1\beta 1$ было установлено важное значение одного остатка аргинина и двух остатков аспарагиновой кислоты, причём все они происходят из разных

коллагеновых α -субъединиц (Eble J.A. et al., 1993, EMBO J., 12, 4795-4802).

Известные молекулы-лиганды матрикса, взаимодействующие с интегрином $\alpha 2\beta 1$, не содержат последовательности RKK(H). Для богатого аргинином линейного пептида, включающего в себя последовательность RKK, производную от белка Tat вируса иммунодефицита человека, было показано взаимодействие с интегрином $\alpha V\beta 5$ (Vogel B.E. et al., 1993, J. Cell Biol., 121, 461-468). Однако было показано, что интегрин-белковое взаимодействие стабильно в присутствии EDTA, что указывает на наличие отличающегося механизма соединения. Также известна ранее описанная последовательность в составе фибронектина, связывающаяся с гепаринсульфатом, содержащая трипептидный мотив RKK, который, в свою очередь, очевидно не является функциональным с точки зрения связывания с доменом $\alpha 2 I$ интегрин (Drake et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 15859-15867).

Яд некоторых видов змей содержит дезинтегриноподобные белки, которые блокируют функции интегринов тромбоцитов и которые связаны с противосвёртывающим эффектом действия ядов. Эти белки помогают понять молекулярные механизмы функции интегрин, и они могут иметь потенциальное значение также при разработке новых лекарственных препаратов. Многие из дезинтегринов содержат RGD-последовательность: они подавляют функционирование интегринов $\alpha I I \beta 3$ и $\alpha V \beta 3$ тромбоцитов. В составе жарарагина - дезинтегриновой металлопро-

теиназы, содержащейся в яде копьеголовой змеи-жарараки *Bothrops jararaca*, - последовательность ECD замещает мотив RGD (Paine M.J.I. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 22869-22876). Жарарагин является потенциальным ингибитором индуцируемой коллагенами агрегации тромбоцитов, и его действие основано на подавлении функционирования интегрина $\alpha 2\beta 1$ (De Luca M. et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun., 206, 570-576). Точный механизм его действия пока не определен. Интегрин $\alpha 2\beta 1$ также может взаимодействовать с жарацином - белком змеиного яда, включающим в себя дезинтегриновый домен жарарагина, однако взаимодействие оказывается более слабым, чем в случае с самим жарарагином (De Luca M. et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun., 206, 570-576).

В настоящем изобретении представлены циклические пептиды, которые связываются с доменом $\alpha 2 I$ интегрина человека (нативным или рекомбинантным). Кроме того, они являются потенциальными ингибиторами взаимодействия интегрина человека с коллагенами типов I и IV и с ламинином-1.

Циклические пептиды согласно изобретению исходно являются производными от металлопротеиназного домена жараракина. Каждый из новых связывающихся с интегрином белков согласно изобретению включает в себя коллинеарную последовательность из трёх аминокислот - аргинин-лизин-лизин (RKK). Присутствие мотива RKK в кольцевой форме обеспечивает активность по связыванию с интегрином.

Далее, в настоящем изобретении представлены циклические

пептиды, которые содержат одну или большее число копий последовательности RKK в пределах аминокислотной последовательности данного пептида: такие копии являются существенными в обеспечении данным пептидом способности уменьшать взаимодействие интегрина с коллагеном.

Также в настоящем изобретении представлены циклические пептиды, которые включают в себя аминокислотную последовательность $X_1RKKX_2X_3X_4X_5X_6$ (SEQ ID NO 1), при том, что X_1-X_6 - любые аминокислоты, но предпочтительно X_2 - гистидин (H).

Также в настоящем изобретении представлены циклические пептиды, которые включают в себя аминокислотную последовательность $X_1RKKX_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID NO 2), при том, что X_1-X_5 - любые аминокислоты, но предпочтительно X_2 - гистидин (H).

Также в настоящем изобретении представлены циклические пептиды, которые включают в себя аминокислотную последовательность $X_1RKKX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO 3), при том, что X_1-X_4 - любые аминокислоты, но предпочтительно X_2 - гистидин (H).

Далее, в настоящем изобретении представлены два циклических пептида - CTRKKHDNC (SEQ ID NO 4) и CTRKKHDNAQC (SEQ ID NO 5), - включающих аминокислоты 241-247 (CTRKKHD: SEQ ID NO 6) и 241-249 (CTRKKHDNA: SEQ ID NO 7), соответственно, из состава металлопротеиназного домена жарарафина, а также циклические фрагменты этих белков, которые лишены одной или большего числа аминокислот, в частности, одной или нескольких аминокислот, выбираемых из группы, включающей в себя C, T, H, D, N, A и (или) Q.

Далее, в настоящем изобретении представлены способы применения этих белков с целью блокирования функций интегрина и с целью лечения пациентов, у которых отмечены физиологическое состояние или заболевание, которые нуждаются в блокировании такой активности.

Циклические связывающиеся с интегрином белки, в соответствии с настоящим изобретением, также применимы для выделения содержащих $\alpha 2$ -субъединицу интегринов из смешанного образца.

Краткое описание рисунков

Фигура 1 (A-D). Связывание меченного европием домена $\alpha 2 I$ с различными субстратами в твёрдофазном тесте. Лунки микротитровального планшета предварительно покрывали коллагеном I типа (COL I), коллагеном IV типа (COL IV), ламинином-1 (LM-1) и фибронектином (FN). Мотив $\alpha 2 I$ оставляли реагировать в течение 3 часов (A). Мотив $\alpha 2 I$ оставляли реагировать с коллагеном I типа в присутствии EDTA (B) или $MgCl_2$ и различными концентрациями яда жарараки Bothrops jararaca (C). В другом варианте лунки планшета предварительно покрывали ядом жарараки Bothrops jararaca, а $\alpha 2 I$ оставляли реагировать в течение 3 часов в присутствии хлорида магния (D).

Фигура 2 (A-B). Связывание меченного европием домена $\alpha 2 I$ с адгезивными белками и производными от жарарагина белками в твёрдофазном тесте. Лунки микротитровального планшета предварительно покрывали различными белками - кол-

лагеном I типа, коллагеном IV типа и фибронектином. Данные представляют собой средние величины, полученные по трем параллельно проводимым экспериментам, показывающим связывание $\alpha 2 I$ с различными субстратами (A). Лунки микротитровального планшета предварительно покрывали бычьим сывороточным альбумином (BSA) и коллагеном I типа, а $\alpha 2 I$ оставляли реагировать в течение 3 часов в присутствии пептида (B).

Фигура 3. Присоединение $\alpha 2 I$ к пептидам и яду жарараки *Bothrops jararaca* в присутствии пептида 229ox. Лунки микротитровального планшета предварительно покрывали пептидом или ядом жарараки *Bothrops jararaca*. Домен $\alpha 2 I$ оставляли связываться в присутствии или отсутствии пептида 229ox. Данные представлены в виде средних величин по трем параллельно проводившимся экспериментам.

Фигура 4 (A-C). Свойства пептида 229ox. Кривые дозовой зависимости ингибирования связывания $\alpha 2 I$ с коллагеном I типа в присутствии циклического или линейного пептида 229ox (A). В другом варианте лунки микротитровального планшета предварительно покрывали пептидом 229ox (B). Пептид 229ox добавляли в $\alpha 2 I$ -связывающий тест на различные предварительно наносимые субстраты (C).

Фигура 5. Влияние белка 229ox на связывание $\alpha 2 I$ с коллагеном I типа и ЕСНО-вирусом-1. Лунки микротитровального планшета предварительно покрывали коллагеном I типа и ЕСНО-

вирусом-1, а $\alpha 2I$ оставляли реагировать в присутствии или отсутствие пептида. Данные представлены в виде средних величин по трём параллельно проводившимся экспериментам.

Фигура 6 (А-В). Ингибирование связывания $\alpha 2I$ с коллагеном I типа пептидами 229ох с замещённым аланином. Лунки микротитровального планшета были предварительно покрыты пептидами, а $\alpha 2I$ оставляли реагировать (А). В другом варианте лунки микротитровального планшета предварительно покрывали коллагеном I типа, а $\alpha 2I$ оставляли реагировать в присутствии пептида (В).

Фигура 7 (А-С). Пептиды с доменом $\alpha 2I$ (А) и $\alpha 2I$ (А, В) связывали с твёрдой фазой и добавляли биотинилированный 229ох. Показано связывание белка 229ох с белками, производными от домена $\alpha 2I$ (А). Важность присутствия ионов магния для связывания белка 229ох с твёрдой фазой, связанной

с $\alpha 2I$, показана на (В). Важность ионов магния для связывания $\alpha 2I$ с твердой фазой, связанной с коллагеном I типа и с пептидом 229ох, показана на (С).

Фигура 8. Подавление связывания рекомбинантного $\alpha 2I$ с коллагеном. Закрашенные кружки показывают влияние указанных концентраций белка 229ох (STRKKHDNAQC: SEQ ID NO 5). Незакрашенные кружки показывают влияние белка 248ох (STRKKHDNC: SEQ ID NO 4).

Фигура 9 (А-В). Миграция клеток HOS-MNNG на коллагене I типа. Клетки оставляли для прикрепления к субстратам. После

4 дней клетки окрашивали, а площадь покрытых клетками поверхностных областей определяли с помощью анализатора образов (А), а лунки фотографировали (В).

Фигура 10. Адгезия клеток HaCat и UT-SCC-2 в присутствии белка 229ox и антитела Gi9, специфичного в отношении субъединицы $\alpha 2$ интегрина.

В нижеследующем описании использован ряд терминов, широко применяемых в медицинской науке и при изучении белков. С целью обеспечения точности и ясности понимания описания и формулы изобретения, включая охватываемые данными терминами значения, приведены следующие определения.

Термином "пациент" обозначается животное или человек, в отношении которого требуется медицинское или ветеринарное вмешательство, в частности, необходимо лечение с использованием композиций согласно изобретению.

Термин "лечение" или "осуществление лечения" означает введение эффективного количества композиции, содержащей один или большее число пептидов, описываемых в данном тексте, пациенту, нуждающемуся в них, с такими целями, которые могут включать в себя профилактику, улучшение состояния, предотвращение или вылечивание заболевания или возможного состояния, восприимчивого к таким лекарственным средствам.

Термин "введение" означает доставку желательного вещества в организм пациента любым подходящим путём. Применимые способы введения включают в себя, не ограничиваясь ими, парентеральное (например, внутривенное),

внутримышечное, подкожное, ионтофоретическое, пероральное, ректальное и энтеральное введения.

Под "эффективным количеством" понимается количество вещества, эффективное с точки зрения достижения желаемого результата. Эффективное количество согласно изобретению - это количество, которое достаточно для уменьшения уровня, подавления или предотвращения функционального взаимодействия между содержащим домен $\alpha 2 I$ интегрином и одним или большим числом мишеней, которые бы взаимодействовали с этим интегрином в отсутствие данного пептида согласно изобретению.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соли, образуемые фармацевтически приемлемыми кислотами или основаниями, например, такими кислотами как (что не является ограничением) серная кислота, соляная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.д., или такими основаниями как щёлочи щелочных металлов, гидроксид аммония, алкиламмонийные гидроокиси и т.п.

Термин "фармацевтически приемлемый наполнитель" означает растворители, носители, разбавители и подобное, которые применяются в качестве добавок к лекарственным препаратам согласно изобретению с целью обеспечения наличия носителя или адъюванта, необходимого для введения такого соединения.

Хотя обсуждение и описание примеров, приведённых ниже, как правило, приведены в связи с интегринами человека,

пептиды и способы согласно изобретению применимы в отношении любых видов организмов, подверженных укусам змей, при которых активным компонентом яда является жараракин, поскольку такая активность подтверждает способность пептидов согласно изобретению связываться с интегрином-мишенью у таких видов организмов. Таким образом, обсуждение и описание примеров, основанные на варианте с белками человека, не призваны ограничить объем настоящего изобретения в данном отношении.

Распознавание коллагенов интегринами напоминает связывание "интегрин-фибронектин". Это связано не только с наличием структурного сходства у коллаген-связывающих доменов $\alpha 1$ и RDG-связывающих потенциальных доменов $\beta 1$, но и с тем, что циклические RGD-содержащие пептиды могут связываться с интегрином $\alpha 2 \beta 1$. Считается, что три аминокислотных остатка в составе коллагена, являющиеся ключевыми с точки зрения связывания интегрин с коллагеном, - это два остатка аспарагиновой кислоты и один остаток аргинина.

Заявители предположили, что мотив жарарагина, который блокирует связывание домена $\alpha 2 \beta 1$ с коллагеном, должен содержать либо остатки аспарагиновой кислоты, либо остатки аргинина, и что ключевой для такой активности мотив должен находиться в составе гидрофильной петли, поскольку известные сайты интегринов, распознающие молекулы межклеточного матрикса, или дезинтегрины змеиного яда находятся именно в

гидрофильных петлях. Заявители подвергли скринингу известные неидентифицированные последовательности в структуре жарарагина, которые удовлетворяют этим критериям, и сформировали синтетические пептиды, предназначенные для тестирования в твёрдофазных тестах с использованием интегринового домена $\alpha 2 I$.

Для одного из пептидов, производных от металлопротеиназного домена STRKKHDNAQC (SEQ ID NO 5), - включающего в себя аминокислоты 241-249 (остатки цистеина по обоим концам были добавлены к нативной последовательности) из состава металлопротеиназного домена жарарагина, было показано жёсткое связывание с доменом $\alpha 2 I$. Высокий уровень аффинности такого связывания подтверждался тем фактом, что, когда меченный европием мотив $\alpha 2 I$ (т.е. рекомбинантный домен $\alpha 2 I$) присоединялся к данному пептиду, не было отмечено сколько-нибудь значимого отсоединения в течение последующих двух часов, причём даже тогда, когда к пробе добавляли 10-кратный избыток немеченного домена $\alpha 2 I$.

Среди тестированных пептидов один и тот же пептид оказался единственным, который ингибировал адгезию домена $\alpha 2 I$ к коллагенам типов I и IV и к ламинину-1. Более того, этот пептид конкурировал с ядом жарараки B.ja-garaca по связыванию с доменом $\alpha 2 I$. Таким образом, заявители заключили, что присутствие аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 241-249, определяет

взаимодействие жараргина с интегрином $\alpha 2 \beta 1$.

Мутационный анализ аминокислотной последовательности пептида указал на существование нового интегрин-связывающего мотива - RKK или RKKH (SEQ ID NO 8). Гистидин, являющийся четвёртым остатком в мотиве RKKH, также может быть важным компонентом, обеспечивающим полноту проявления функций. Неожиданно мутирование аспарагиновой кислоты в данной аминокислотной последовательности не имело эффекта. Известные молекулы межклеточного матрикса, являющиеся лигандами для интегрин $\alpha 2 \beta 1$, не содержат последовательности RKK(H).

Обнаруженный выше новый связывающий мотив домена $\alpha 2 I$ или пептиды, его содержащие, могут предотвращать распознавание белков матрикса. Не претендуя на доказательство, объяснением может служить то, что данный эффект предположительно обусловлен прямым взаимодействием с доменом-I сайта связывания лиганда или происходит в результате изменения конформации домена-I, что тем самым обуславливает "маскировку" сайта узнавания. Пептид-зависимое изменение конформации домена $\alpha 2 I$ было подтверждено в экспериментах, показавших, что, одновременно с предотвращением связывания коллагена, данный пептид индуцирует присоединение домена $\alpha 2 I$ к ЕСНО-вирусу-1. Это также указывает на то, что блокирование одного сайта узнавания лиганда может регулировать аффинность в отношении другого сайта.

Следовательно, каждый из новых интегрин-связывающихся

белков согласно изобретению включает в себя коллинеарную последовательность из трёх аминокислот - аргинин-лизин-лизин (RKK), - которая, когда пептид имеет кольцевую форму, обеспечивает активность по связыванию интегрина с данным пептидом. Одна, две, три или большее число копий мотива RKK могут присутствовать в составе аминокислотной последовательности пептида, при том, что такие копии достаточны для придания пептиду способности уменьшать взаимодействие интегрина с коллагеном.

В первом варианте пептиды согласно изобретению - это циклические пептиды, которые включают в себя аминокислотную последовательность $X_1\text{RKKX}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{X}_6$ (SEQ ID NO 1), при том, что X - это аминокислота, а $X_1\text{-X}_6$ - любые аминокислоты (в частности. A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V), но предпочтительно X_2 - гистидин.

В другом варианте пептиды согласно изобретению - это циклические пептиды, которые включают в себя аминокислотную последовательность $X_1\text{RKKX}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5$ (SEQ ID NO 2), при том, что $X_1\text{-X}_5$ - любые аминокислоты, как это было обозначено выше, но предпочтительно X_2 - гистидин (H).

В другом варианте пептиды изобретению - это циклические пептиды, которые включают в себя аминокислотную последовательность $X_1\text{RKKX}_2\text{X}_3\text{X}_4$ (SEQ ID NO 3), при том, что $X_1\text{-X}_4$ - любые аминокислоты, как это было обозначено выше, но предпочтительно X_2 - гистидин (H), и при том, что пептид имеет циклическую структуру в соответствии с отмеченным выше.

В наиболее предпочтительном варианте пептид согласно изобретению - это циклический пептид, который имеет аминокислотную последовательность STRKKHDNC (SEQ ID NO 4) или циклический пептид, имеющий аминокислотную последовательность STRKKHDNAQC (SEQ ID NO 5), и предпочтительно два концевых остатка цистеина вовлечены в образование дисульфидной связи, которая обеспечивает кольцевую структуру данному пептиду.

Циклические пептиды согласно изобретению могут утрачивать одну или большее число аминокислот, которые обозначены выше как X, в частности, одну или большее число аминокислот C, T, H, D, N, A и (или) Q. Далее, циклические пептиды согласно изобретению могут включать в себя дополнительные аминокислоты, которые встроены в пределах обозначенной выше последовательности и (или) фланкируют обозначенные выше последовательности, длина которых такова, чтобы не нарушалась коллинеарность мотива RKK и чтобы обеспечивалась способность связывания с интегрином $\alpha 2$.

Для концевых остатков цистеина необходимо только одно-такое расположение, которое обеспечивает циклизацию данного полипептида. Предпочтительно остатки цистеина расположены в концевых сайтах данного пептида, в результате чего образование дисульфидной связи между ними приводит к образованию петли надлежащего размера, необходимого для обеспечения биологической активности кольцевой формы данного пептида. Однако один или оба остатка цистеина могут иметь внутреннее положение в последовательности пептида: при

этом любой "хвост", выступающий за остаток цистеина, по-видимому, не составит какой-либо проблемы, поскольку это не приводит к нарушению кольцевой структуры остальной части пептида. В этом отношении в случае, если циклическая форма данного пептида не нарушается, в результате образуется такая конформация, которая позволяет сохранить биологическую активность, и при этом другая составляющая, например, такой белок как альбумин, может быть использована в качестве линкера, спейсера или может быть присоединена к концу циклического пептида, например, для присоединения циклического пептида согласно изобретению к твёрдой подложке, или же иная составляющая, например, пригодная для выявления метка.

Когда остатки цистеина находятся на концах данного пептида, этот пептид предпочтительно включает в себя девять аминокислот между этими остатками цистеина. Восемь аминокислот не усиливают активность и поэтому также применимы в этом отношении. Циклический пептид с семью аминокислотами, находящимися между концевыми остатками цистеина, был примерно в 20 раз более эффективным по сравнению с вариантами, состоящими всего из 7 или 8 аминокислот, поэтому он наиболее предпочтителен. В целом, если пептиды, состоят из 10 или большего числа аминокислот, расположенных между концевыми остатками цистеина, возникает риск их поведения как линейной (нефункциональной), а не кольцевой молекулы. Циклические пептиды, которые включают в себя пять или меньше аминокислот

между концевыми остатками цистеина, очень трудно получить, если вообще возможно. Следовательно, циклический пептид, который содержит семь аминокислот между концевыми остатками цистеина, является наиболее предпочтительным вариантом.

Аминокислотная последовательность пептида согласно изобретению определяет варианты описанных выше пептидов, при том, что такие варианты характеризуются аминокислотными заменами, не приводящими к каким-либо изменениям: например, замена одной основной аминокислоты на другую (за исключением самого мотива RKK), замена одного гидрофобного остатка на другой, замена одного нейтрального остатка на другой, замена одного кислого остатка на другой или замена одной ароматической аминокислоты на другую.

В предпочтительном варианте кольцевая форма пептида образуется с участием дисульфидной связи. Однако любая ковалентная связь, в результате которой образуется кольцевая форма пептида, применима, при том, что функцией "мостика" является лишь поддержание структуры пептида в необходимой конформации.

Как известно в данной области техники, аминокислотные остатки могут находиться в защищённой или незащищённой формах; при этом используются подходящие N- или C-концевые защитные группы. Применимыми фармацевтически приемлемыми катионами являются катионы щелочных металлов (например, Na, K, Li, $\frac{1}{2}$ Ca, $\frac{1}{2}$ Ba и т.д.) или аминокатионы (например, тетраалкиламмонийный, триалкиламмонийный, где каждая алкильная

группа может быть группой C1-C12, но предпочтительно разветвлённой или неразветвлённой алкильной группой C1-C6). Также могут быть, приготовлены фармацевтически приемлемые эфиры низших алкилов, фармацевтически приемлемые амиды и фармацевтически приемлемые соли вносимых кислот.

Пептиды согласно изобретению могут быть синтезированы и циклизованы с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, например, в соответствии с описанным в патенте США № 5627263, включённом в данный текст в виде библиографической ссылки.

Циклические связывающиеся с интегрином пептиды согласно изобретению применимы в качестве блокаторов (ингибиторов) функций интегрина, в частности, функций интегрина человека. Связывание интегрина с его нативными лигандами подавляется или предотвращается в присутствии пептидов согласно изобретению. В частности, циклические связывающиеся с интегрином пептиды применимы для блокировки взаимодействия домена $\alpha 2 I$ интегрина с макромолекулами, которые взаимодействуют с этим доменом, например, с коллагенами, такими как коллагены I и IV типов, и, например, с ламинином-1.

Последовательность рекомбинантного домена $\alpha 2 I$ интегрина человека опубликована Такадой и Хемлером (Takada Y. & Hemler M.E., 1989, J. Cell Biol., 109, 397-407) (включено в данный текст в виде ссылки). Домен $\alpha 2 I$ может быть получен с применением обычного рекомбинантного организма-хозяина,

например, E.coli. Его свойства могут быть охарактеризованы с использованием чувствительного твёрдофазного анализа на основе мечення домена $\alpha 2 I$ европием и измерения флуоресценции во времени. Этот тест позволяет напрямую измерять связывание домена $\alpha 2 I$ в отсутствие ферментов или других связывающихся с ним крупных молекул.

Способность пептида согласно изобретению связываться с интегрином $\alpha 2$ может быть определена любым способом, который бы выявлял такое связывание и который, в частности, выявлял бы способность такого связывания блокировать взаимодействие интегрина с коллагеном I типа, коллагеном IV типа или с ламинином-1. Как будет ниже показано в примерах, для этих целей применимы тест на связывание с меченым европием рекомбинантным доменом $\alpha 2 I$ (пример 2) и тест на выявление активации сайта распознавания ЕСНО-вируса-1 в составе домена $\alpha 2 I$.

Пептиды согласно изобретению в конкретном случае применимы для подавления или предотвращения миграции клеток на коллагене *in vivo* или *in vitro*. Способность пептида согласно изобретению блокировать клеточную миграцию может быть определена с использованием теста на миграцию клеток, приведённого в примере 7. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способы подавления миграции клеток на коллагене *in vitro*, а также *in vivo* у пациента, в лечении которого такое подавление необходимо, если такая миграция опосредована зависимым от интегрина механизмом. Таким

образом, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболеваний, включая периодонтит, при которых миграция клеток является частью патогенетического процесса.

Далее, настоящим изобретением предлагается способ подавления миграции клеток злокачественных опухолей, тем самым пригодный для лечения заболеваний, характеризующихся такой миграцией, например, раковых заболеваний, включая остеосаркому и меланому, особенно в случаях, когда зависимость от $\alpha 2 I$ интегрина миграция клеток может участвовать в механизмах развития опухоли.

В настоящем изобретении предлагается также способ подавления адгезии тромбоцитов на коллагене и индуцируемой коллагеном агрегации тромбоцитов. Способность пептида согласно изобретению подавлять клеточную адгезию может быть определена, как описано в примере 8. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения пациентов, нуждающихся в профилактическом или терапевтическом лечении состояний или таких заболеваний как сердечно-сосудистые, при которых необходимо предотвращение адгезии тромбоцитов на коллагене или индуцируемой коллагеном агрегации тромбоцитов, например, у жертв сердечного удара или у пациентов, характеризующихся риском такого сердечного приступа.

Фармацевтические препараты, содержащие пептиды согласно изобретению, могут включать в себя, помимо прочего, фармацевтически приемлемые носители, необходимые для стабилизации и эффективного приготовления пептидов,

подходящие наполнители; такие препараты, включающие в себя другие человеческие белки, например, сывороточный альбумин человека, описаны, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences" (18th ed., ed. by A.R.Gennaro, Mack Publ., Easton, PA; 1990). С целью получения фармацевтически приемлемой композиции, которая была бы пригодна для введения эффективного количества пептидов согласно изобретению пациенту, нуждающемуся в получении такой композиции, данная композиция должна содержать эффективное количество одного или большего числа пептидов согласно изобретению наряду с подходящим количеством носителя-наполнителя, если их присутствие является желательным.

Пептиды согласно изобретению могут быть предпочтительно очищены в такой степени, чтобы быть в существенной степени свободными от загрязняющих компонентов. Материал обозначается как "в существенной степени свободный от загрязняющих компонентов" тогда, когда он в существенной степени очищен от нежелательного материала, с которым он мог бы быть связан в процессе синтеза, осуществлявшегося или в клетке, или в системе *in vitro*, до степени, достаточной для использования очищаемого материала для желаемой цели.

Композиции, применимые в способах согласно изобретению, могут содержать один или большее число пептидов настоящего изобретения. Когда в композиции содержится более одного пептида, он может быть частью той же аминокислотной цепочки, что и другой пептид, или же может присутствовать в данной

композиции в виде отдельного пептида. Композиции для внутривенного, внутримышечного или подкожного введения предпочтительно содержат дозы примерно от 1 мкг до 1 мг на 1 кг веса тела, хотя для введения могут быть использованы и более низкие или более высокие дозы. Необходимая доза будет зависеть, например, от тяжести состояния пациента и от таких факторов как вес тела, пол, возраст и анамнез пациента. Доза также может варьироваться в зависимости от того, будет ли она вводиться ветеринаром животному или лечащим врачом пациенту.

Для парентерального введения композиции, содержащие пептиды согласно изобретению, предпочтительно растворяют в дистиллированной воде и предпочтительно доводят pH примерно до 6-8. Если пептид предназначен для представления в лиофилизованной форме, то к раствору может быть добавлена лактоза, что облегчит процесс лиофилизации. В такой форме раствор затем стерилизуют, вносят в ампулы и подвергают лиофилизации.

Используемые препараты композиций согласно изобретению, предназначенные для парентерального введения, также включают в себя стерильные водные и неводные растворители, суспензии и эмульсии. Примерами применяемых неводных растворителей являются полиэтиленгликоль, пропилентгликоль, растительное масло, рыбий жир и органические эфиры. Примерами водных растворителей являются вода, водно-спиртовые растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и забуференные медицинские парентеральные наполнители, такие как раствор хлорида натрия,

раствор Рингера с декстрозой, раствор хлорида натрия и декстрозы, содержащий лактозу раствор Рингера или фиксированные масла. Примерами наполнителей для внутривенного введения являются жидкие и съедобные наполнители, электролитные наполнители, подобные основанным на растворе Рингера с декстрозой, и им подобное.

Препараты для инъекций, такие как масляные растворы, суспензии или эмульсии, могут быть приготовлены в соответствии со способами, известными в данной области техники, с использованием диспергирующих, увлажняющих или суспендирующих агентов, если это необходимо. Когда активный компонент находится в водорастворимой форме, например, в виде растворимой в воде соли, в стерильном инъекционном препарате может быть использован нетоксичный приемлемый для парентерального введения растворитель, например, непирогенная вода или 1,3-бутандиол. Среди других приемлемых наполнителей и растворителей, которые могут быть использованы, - 5%-ный инъекционный раствор декстрозы, инъекционный раствор Рингера и изотонический инъекционный раствор хлорида натрия (в соответствии с описанным в Национальной Фармакопее США). Когда активные компоненты находятся в водонерастворимой форме, используются подходящие стерильные масляные суспензии, содержащие подходящие липофильные растворители или наполнители, такие как жирное масло, например, кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, например, этилолеат или триглицериды. С другой стороны, могут быть

использованы водные инъекционные суспензии, которые содержат вещества, повышающие вязкость, например, натриевую карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и (или) декстран, а также произвольно содержащие стабилизирующие компоненты.

Для ионтофоретического введения пептида согласно изобретению предпочтительно, чтобы раствор этого пептида имел pH примерно 4,0 или ниже или pH примерно 7,0 или выше. Способы ионтофореза известны: например, они описаны в патентах США № 5637084 и 495U229 (включены в данный текст в виде ссылок).

Фармацевтические препараты для перорального (но системного) введения могут быть получены путём комбинирования активных компонентов с твёрдыми наполнителями с возможным гранулированием полученной смеси и формированием микстуры или гранул после добавления подходящих вспомогательных компонентов, если это желательно или необходимо, с получением таблеток и драже. Фармацевтические препараты для лечения периодонтита могут вводиться в виде композиции, которая сохраняется в ротовой полости, предпочтительно нанесение препарата прямо в периодонтальный карман, и наиболее предпочтительно в медленно высвобождаемой форме. С другой стороны, препарат может быть нанесён на зубы и (или) дёсны, что обеспечивает локальный выход пептида в желательном месте. Такие методы представлены в патентах США № 5002769, 5023082, 5160737, 5330746, 5425953, 5438076 и 5639795 (все они включены в данный текст в виде ссылок). Препарат также может

быть представлен на мембране.

Подходящими наполнителями, в частности, являются такие филлеры как углеводы, например, лактоза или сахароза, маннит или сорбит, препараты целлюлозы и/или фосфаты кальция, например, трифосфат кальция или однозамещённый фосфат кальция, равно как и такие связывающие компоненты как крахмал, пасты, в которых использованы, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал или картофельный крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натриевая карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон, и/или, если это желательно, дезинтегрирующие компоненты, такие как названные выше крахмалы, а также карбоксиметил-крахмал, поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или её соль, такая как альгинат натрия. Вспомогательными компонентами главным образом являются вещества, регулирующие текучесть, и смазывающие вещества, например, кремнезём, тальк, стеариновая кислота или её соли, такие как стеарат магния или стеарат кальция, с соответствующим покрытием, если это желательно, обеспечивающим устойчивость к действию желудочного сока, которое обеспечивается, помимо прочего, концентрированными растворами углеводов, которые, возможно, содержат гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль и /или диоксид титана, растворы лаков и подходящие органические растворители или смеси растворителей. С целью получения покрытия, обеспечивающего устойчивость к действию

желудочного сока, используются растворы подходящих препаратов целлюлозы, такие как фталат ацетилцеллюлозы или фталат гидроксипропилметилцеллюлозы. Пищевые красители или пигменты могут быть добавлены в покрытия таблеток или драже, например, для идентификации или для обозначения различных сочетаний доз активных компонентов.

Твёрдые лекарственные формы для перорального введения включают в себя капсулы, таблетки, пилюли, пастилки, лепёшки, порошки и гранулы. В таких твёрдых лекарственных формах активный компонент может быть смешан, по меньшей мере, с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы также могут включать в себя, исходя из нормальной практики применения, фармацевтические адъюванты, например, смазывающие стеараты. Твёрдые препараты для перорального введения также могут быть приготовлены с использованием пищевых или других форм покрытий, которые бы модулировали выделение активных компонентов.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают в себя фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные нетоксичные разбавители, используемые в фармацевтике, такие как вода и спирт. Такие композиции могут также содержать адъюванты, такие как увлажняющие вещества, эмульгаторы, суспендирующие компоненты, подсластители и ароматизаторы.

Композиции согласно изобретению также могут быть введены с помощью насоса или в форме, обеспечивающей постепенное

выделение. Соединения согласно изобретению также могут быть доведены до конкретного органа в высокой концентрации с помощью подходящих катетеров или путём представления этих молекул в составе химерных молекул (или комплексов), которые доставляются в конкретные органы-мишени. В этом случае обозначенные выше пептиды могут образовывать циклическую "петлю" на конце более длинного пептида, включающего в себя другой домен, который способствует гибели клеток, содержащих интегрин, ассоциированный с мембранами, который связывает циклический пептид согласно изобретению.

Введение формы, обеспечивающей постепенное выделение, является наиболее оправданным тогда, когда больному предстоит длительный курс инъекций, поскольку такая форма препарата может обеспечить этому пациенту больший комфорт. Препараты с контролируемым выделением могут быть получены путем использования полимеров, образующих комплекс или адсорбирующих пептиды согласно изобретению. Контролируемое высвобождение препарата может быть достигнуто путем отбора подходящих макромолекул (например, полиэфиров, полиаминокислот, поливинилпирролидона, этиленвинилацетата, метилцеллюлозы, цинк-протамин-карбоксиметилцеллюлозы и протаминсульфата), равно как и способом включения, обеспечивающего контролируемое выделение. Другим возможным способом контроля продолжительности действия препаратов с регулируемым выделением является внесение желаемого пептида в частицы полимерного материала, такого как полиэфиры,

полиаминокислоты, гидрогели, поли (молочная кислота) или сополимеры этиленвинилацетата. Альтернативно, вместо включения данного пептида в такие полимерные частицы, пептиды могут быть введены в состав микрочастиц, приготовленных, например, с помощью метода коацервации или путём пограничной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозы или желатиновых микрокапсул и полиметилметакрилатных капсул, соответственно, или в состав коллоидных систем высвобождения лекарств, например, липосом, альбуминовых микросфер, микроэмульсий, наночастиц и нанокапсул или макроэмульсий.

Биологическое время полужизни пептида согласно изобретению может быть увеличено путём увеличения времени удержания или повышения стабильности циклической формы в желательной среде. В частности, от агентов, которые повышают стабильность циклической формы, можно ожидать и увеличения биологического времени полужизни данного пептида. В этом отношении одна или большее число D-аминокислот (особенно в случае замещения такой же L-аминокислоты в том же положении полипептида) или один или большее число аналогов аминокислот, таких как пеницилламин (3-меркаптовалин), в структуре данного пептида могут быть размещены таким образом, чтобы D-аминокислота или аминокислотный аналог нарушали метаболическое разрушение данной циклической структуры в организме животного или человека-пациента, которому данная композиция вводится, равно как и в составе желаемой

композиции *in vitro*.

Также здесь предлагается использование D-аминокислот или аминокислотных аналогов для увеличения связывания пептида согласно изобретению с конкретной мишенью, в частности, с интегринами, содержащими домен $\alpha 2 I$.

Пептиды, которые используются в композициях и способах согласно изобретению, могут быть использованы в таких лекарственных формах как таблетки, капсулы, порошки или жидкие растворы для перорального введения, если биологическая активность материала не нарушается в процессе пищеварения и если характеристики соединения позволяют ему адсорбироваться в ткани кишечника.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть получены известными способами, например, путем обычного смешивания, гранулирования, изготовления драже, растворения, лиофилизации или сходных процессов.

Пептид согласно изобретению также может быть использован в качестве аффинного реагента для экстрагирования лигандов, которые связываются с ним, в частности, для экстрагирования из смеси интегринов, имеющих в своей структуре домен $\alpha 2 I$.

Всё сказанное выше в полном описании изобретения, может быть проще понято при ознакомлении с конкретными примерами, которые представлены с целью иллюстрации и конкретизации некоторых аспектов настоящего изобретения и которые не являются ограничительными.

Примеры

Пример 1

Получение рекомбинантного интегринового домена $\alpha 2I$ человека

ДНК, кодирующая домен $\alpha 2I$, была получена с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы кДНК $\alpha 2$ -субъединицы интегрин человека (кДНК $\alpha 2$ -интегрин человека - дар Д-ра М.Хемлера из компании Dana-Farber, Boston). Прямая затравка была следующей - 5'-CACAGGGATCCCCTGAT TTTCAGCTC-3' (SEQ ID NO 9); обратная затравка - 5'-GTGGCTGAATTCAA CAGTACCTTCAATG-3' (SEQ ID NO 10). Затравки были сформированы так, чтобы вносить два рестрикционных сайта в амплифицируемый продукт: BamHI-сайт в 5'-концевой области и EcoRI-сайт в 3'-концевой области. ПЦР-продукт и плазмида pGEX2T (Pharmacia) подвергали расщеплению рестриктазами BamHI и EcoRI, лигировали и трансформировали ими клетки E.coli штамма DH $\alpha 5F'$. Плазмиду (pJK $\alpha 2I$), включающую вставку, кодирующую домен $\alpha 2I$, затем секвенировали и трансформировали ею клетки E.coli штамма BL21 с целью получения рекомбинантного белка $\alpha 2I$. Получение и очистка слитого белка, включающего в себя глутатион-S-трансферазу и $\alpha 2I$, проводили следующим образом: обычно 400 мл среды LB (с 50 мкг/мл карбенициллина) инокулировали 40 мл выращиваемой в течение ночи культуры BL21/pJK $\alpha 2I$, затем полученную культуру выращивали в течение 1 часа при 37°C. Затем на 4 часа добавляли индуктор - IPTG (в конечной

концентрации 0,1 мМ).

Рекомбинантный $\alpha 2\text{I}$ -интегрин человека очищали из клеток кишечной палочки следующим образом. Клетки отбирали центрифугированием, и полученные гранулы ресуспендировали в фосфатном буфере (PBS - pH=7,4). Полученные суспензии подвергали воздействию ультразвука, центрифугировали, и надосадочную фракцию сохраняли. Гранулы ресуспендировали в фосфатном буфере, обрабатывали ультразвуком, центрифугировали ещё дважды и отбирали надосадочные фракции. Добавляли содержащую глутатион сефарозу (Pharmacia), и полученный лизат инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут при тщательном перемешивании. Лизат центрифугировали, надосадочную фракцию удаляли, а сефарозу с глутатионом со связанным на ней слитым белком переносили на подходящую колонку. Затем колонку промывали 10 объемами фосфатного буфера (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4 - pH=7,3) и слитый белок элюировали с использованием глутатион-элюирующего буфера (Pharmacia: 10 мМ восстановленного глутатиона в 50 мМ Трис-HCl - pH=8,0). Слитый белок расщепляли тромбином (Pharmacia: 10 ед.), по меньшей мере, в течение двух часов при комнатной температуре и подвергали диализу против фосфатного буфера с целью удаления глутатиона. Расщепляемую смесь во второй раз пропускали через глутатион-сефарозную колонку с целью удаления глутатион-S-трансферазы.

Рекомбинантный $\alpha 2\text{I}$ собирали из потока. Необходимым

было обработать рекомбинантный белок 5 мМ дитиотрептолом (DTT) для обеспечения нормальной пространственной укладки (5 мМ DTT в фосфатном буфере), поскольку при анализе в нативном электрофореze в ПААГ в отсутствие обработки дитиотрептолом проявляются избыточные бэнды. Рекомбинантный белок был, по меньшей мере, на 90% очищен с помощью электрофореza в SDS-ПААГ (электрофореz в полиакриламидном геле), а при нативном электрофореze в ПААГ обнаруживался единственный бэнд.

Полученный рекомбинантный домен $\alpha 2I$ состоял из 223 аминокислот, в N-концевой области включал в себя две неинтегриновые аминокислоты - GS (глицин-серин), соответствовал аминокислотной последовательности интегринa на участке 124-339 (PDFQ....IEGTV) (SEQ ID NO 11 и SEQ ID NO 12), а также с C-конца включал в себя шесть "неинтегриновых" аминокислот - EFIVTD - SEQ ID NO 13).

Пример 2

Тест на связывание $\alpha 2I$, меченного европием

Предотвращение ядом жарараки Bothrops jararaca связывания рекомбинантного интегринового домена $\alpha 2I$ с коллагеном I типа

Был разработан чувствительный твёрдофазный тест на связывание $\alpha 2I$, основанный на использовании меченного европием $\alpha 2I$. Мечение $\alpha 2I$ европием осуществляли следующим образом: 1/20 объёма 1М NaHCO₃ (pH=8,5) добавляли к очищенному $\alpha 2I$ для повышения pH, чтобы обеспечить изотиоцианатное мечение. Реагент для мечения европием (Wallac) добавляли в

100-молярном избытке и инкубировали в течение ночи при 4°C. Избыточную метку удаляли с помощью гель-фильтрации на колонке Сефадекс-G50/сефароза-6В (Pharmacia) с отбором фракций, содержащих помеченный белок.

Поверхность лунок иммунологического 96-луночного планшета (Maxisorp, Nunc) была покрыта 0,1 мл фосфатного буфера, содержащего 5 мкг в расчёте на 1 см² планшета коллаген I типа (кожный бычий коллаген: Cellon), коллаген IV типа (Sigma), ламинин-1 (очищенный из базальных мембран клеток мышинной опухоли Engclbreth-Holn-Swarm: Collaborative Research), фибронектин (плазматический фибронектин человека: Boehringer Mannheim) или 3,3 мкг/мл ЕСНО-вируса-1 или ЕСНО-вируса-7 в течение 12 часов при 4°C. С другой стороны, пептидами и ядом B.jararaca (Sigma) покрывали в различных концентрациях 96-луночные аминокислотные планшеты (Costar), в соответствии с инструкциями производителя.

Остаточные сайты адсорбции на всех лунках блокировали добавлением 0,1%-ого инактивированного нагреванием бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере в течение 1 часа при 37°C. Вирусы ЕСНО-1 (штамм Farouk) и ЕСНО-7 (штамм Wallace) были получены в коллекции ATCC. Очищенные вирусы разводили в фосфатном буфере, содержащем 0,5 мМ MgCl₂, и до использования хранили при -70°C. Меченный европием га²¹ добавляли в концентрации 500 нг/мл в фосфатном буфере, 2 мМ MgCl₂, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина к покрытым лункам и инкубировали в течение 3 часов при 37°C. Затем лунки

промывали трижды фосфатным буфером + 2 мМ хлорида магния. Затем добавляли 0,1 мл усиливающего раствора Delfia (Wallac) на каждую лунку, а сигнал меченя европием определяли флуорометрически (модель 1232- Delfia: Wallac).

В случае эндогенного добавления пептидов лиофилизированные пептиды солюбилизировали напрямую с меченным европием $\alpha 2 I$ из расчёта 500 нг/мл в фосфатном буфере, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и затем добавляли к лункам. В вариантах, в которых вместо $MgCl_2$ использовали EDTA, меченный европием $\alpha 2 I$ разводили в фосфатном буфере, 2 мМ EDTA, и последующие промывки проводили в этом буфере. Был отмечен высокий уровень чувствительности разработанного теста на связывание, что делает возможным минимизацию количества $\alpha 2 I$, используемого в экспериментах. Далее, небольшое количество европия подтверждает, что проводимые измерения более просты по сравнению с таковыми для более крупных маркерных молекул. В-третьих, описанный здесь тест с микротитровальными лунками, как было показано, применим для скрининга большого числа молекул, предположительно блокирующих интегриновый домен $\alpha 2 I$.

Домен $\alpha 2 I$ связывал коллаген I типа, коллаген IV типа и ламинин-1. Однако он в сколько-нибудь существенной степени не связывал фибронектин или альбумин (фиг. 1A). Связывание домена $\alpha 2 I$ с коллагеном I типа зависело от ионов двухвалентного магния, а добавление 2 мМ EDTA полностью предотвращало это связывание (фиг. 1B). Это соответствует

тому факту, что интегрин $\alpha 2\beta 1$ взаимодействует с коллагенами только в присутствии двухвалентных катионов. Связывание домена $\alpha 2I$ с вирусом ECHO-1 было намного более слабым по сравнению со связыванием с молекулами матрикса.

Проводившимися ранее исследованиями было показано, что яд жарараки B.jararaca подавляет взаимодействие тромбоцитарного интегрин $\alpha 2\beta 1$ с коллагеном (De Luca M. et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun., 206, 570-576). Однако пока неясно, обусловливается ли это подавление нарушением функций домена $\alpha 2I$. Также пока неизвестны эпитопы, вовлечённые в это взаимодействие.

Влияние яда жарараки B.jararaca на связывание домена $\alpha 2I$ с коллагеном I типа было исследовано с использованием твёрдофазного теста на связывание лигандов, описаного выше. Меченный европием $\alpha 2I$ оставляли для связывания с коллагеном I типа в присутствии 2 мМ Mg^{++} , а затем определяли количество $\alpha 2I$. Влияние яда тестировали в диапазоне его концентраций от 1 мкг/мл до 1000 мкг/мл. Яд эффективно подавлял взаимодействие между доменом $\alpha 2I$ и коллагеном при наличии отчётливой зависимости от концентрации (фиг. 1С). Для определения того, обусловлено ли выявленное ингибирование прямым взаимодействием $\alpha 2I$ со змеиным ядом, лунки микротитровального планшета покрывали белками яда и тестировали на связывание $\alpha 2I$ с этим субстратом. Было показано, что связывание $\alpha 2I$ с ядом имеет прямую

зависимость от концентрации (фиг. ID). В соответствии с опубликованным в литературе, ясно, что жарарагин является белком яда жарараки *B.jararaca*, подавляющим связывание интегрин $\alpha 2\beta 1$ с коллагеном (De Luca M. et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun., 206, 570-576) и, соответственно, являющимся наиболее вероятным компонентом яда, связывающимся с доменом $\alpha 2I$.

Пример 3

Пептиды и тест на связывание с использованием биотинилированного 229ox

Короткий циклический полученный из жарарагина пептид имитирует влияние яда *B.jararaca* на взаимодействие домена интегрин $\alpha 2I$ и коллагена.

Дальнейшая характеристика сайта связывания домена $\alpha 2I$ в составе жарарагина была получена с использованием серии коротких циклических пептидов, соответствующих участкам вдоль длины этого полипептида. Участки для тестирования выбирали, основываясь на следующем: 1) мотивы связывания в составе белков матрикса и дезинтегринов змеиного яда обнаруживаются в составе выпетленных структур; 2) известные интегрин-связывающие мотивы включают в себя остатки аспарагиновой кислоты; 3) опубликованная модель взаимодействия "интегрин-коллаген" подчёркивает роль остатка аргинина в дополнение к остатку аспарагиновой кислоты.

Производные от жарарагина пептиды были сформированы на основе предсказания вторичной структуры аминокислотной

последовательности жарарагина. Предсказание вторичной структуры было осуществлено с использованием программы PeptideStructure, разработанной группой Genetics Computer Group (GCG: Madison, WI). В расчет были приняты оценки вероятной поверхностной структуры по методу Эмини (Emini E.A. et al., 1985, J. ViroL, 55, 836-839) и вероятной гидрофильности по методу Кайта-Дулиттла (Kyte J. et al., 1982, J. Mol. BioL, 157, 105-132).

Пептиды были синтезированы с применением автоматического пептидного синтезатора (Applied Biosystems: модель 431A) с использованием 9-фторонилметоксикарбонильного (Фмос) химического метода. Пептилы для получения серии замещений остатка аланина были приобретены в Research Genetics (Huntsville, AL). По окончании синтеза пептиды были окислены до образования дисульфидных связей. Пептиды солюбилизировали в концентрации 1 мг/мл в буфере с 0,1 М карбоната аммония и инкубировали в течение 16-24 часов при 4°C. Прошедшее окисление проверяли с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой, а окисленные пептиды лиофилизировали.

Все пептиды полностью растворялись при концентрации 10 мг/мл в фосфатном буфере. Поскольку максимальной использованной была концентрация 1 мг/мл, были исключены какие-либо неспецифические эффекты, обусловленные нерастворимостью пептидов. Изоэлектрические точки (pI) различных белков были также определены на основе первичной последовательности с применением программы Isoelectric из

пакета программ, разработанных Genetics Computer Group (GCG: Madison, WI). Было установлено, что пептид 225ох (табл. 1) характеризуется сходной изоэлектрической точкой по сравнению с пептидом 229ох (табл. 1), поэтому и был выбран в качестве контрольного пептида в некоторых экспериментах.

Биотинилирование 229ох было осуществлено следующим образом: лиофилизированный пептид 229ох солюбилизировали в фосфатном буфере и 1/5 объема 0,1 М NaHCO_3 , 0,5 М NaCl ($\text{pH}=8,0$) добавляли для повышения pH до уровня, необходимого для биотинилирования. Сульфо-NHS-биотин (Calbiochem) добавляли, исходя из весового соотношения 229ох:биотин=1:2 и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Для окончания реакции биотинилирования добавляли 1/10 объема 0,5 М Трис- HCl ($\text{pH}=8,0$).

Для проведения тестов на связывание с использованием меченного биотином пептида 229ох 96-луночные аминокислотные планшеты (Costar) были покрыты доменом $\alpha 2\text{I}$ в различных концентрациях или производными от домена $\alpha 2\text{I}$ пептидами, в соответствии с инструкциями производителя. Остаточные сайты адсорбции на всех лунках блокировали добавлением 0,1%-ного инактивированного нагреванием бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере в течение 1 часа при 37°C . 100 мкМ биотинилированного 229ох в фосфатном буфере, 2 мМ MgCl_2 , 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина добавляли на покрытые лунки и инкубировали в течение 3 часов при 37°C . Затем лунки трижды промывали фосфатным буфером, 2

мМ $MgCl_2$, и добавляли меченный европием стрептавидин (Wallac) в концентрации 500 нг/мл в фосфатном буфере, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина на 30 минут при комнатной температуре. Лунки вновь промывали трижды. Затем добавляли 0,1 мл усиливающего раствора Delfia (Wallac) на каждую лунку, и сигнал европия измеряли флуориметрически (модель 1232-Delfia, Wallac). В вариантах, в которых вместо $MgCl_2$ использовали EDTA, меченный европием $\alpha 2I$ разводили в фосфатном буфере, 2 мМ EDTA, и последующие промывки проводили в этом буфере.

Были синтезированы пептиды, соответствующие выбранным последовательностям, а данные по полученным в результате пептидам суммированы в таблице 1.

Для анализа того, могут ли какие-либо из этих пептидов напрямую взаимодействовать с доменом $\alpha 2I$, производные от жарарагина пептиды, наряду с циклическим пептидом RGD, коллагеном 1 типа, коллагеном IV типа и фибронектином, использовали для покрытия микротитровальных лунок с последующим добавлением в них меченного европием домена $\alpha 2I$. Полученные результаты показывают, что один из "жарарагиновых пептидов", обозначенный 229ох, связывался эффективно с доменом $\alpha 2I$, в то время как другие тестируемые белки такого эффекта не проявили (фиг. 2А).

Пептиды затем были протестированы на их способность влиять на связывание $\alpha 2I$ с коллагеном I типа в концентрации 500 мкМ. Опять-таки только один пептид - 229ох - вызывал

существенный эффект: он почти полностью подавлял взаимодействие между доменом $\alpha 2 I$ и коллагеном (фиг. 2B).

Таблица 1

Последовательности синтетических пептидов, использовавшихся в настоящем исследовании. Показаны наименования и положения пептидов, синтезированных на основе первичной структуры жарарагина (Paine M.J. et al., 1992. J. Biol. Chem., 267, 22869-22876) и домена $\alpha 2 I$ (Takada Y. & Hemler M.E., 1989, J. Cell Biol., 109, 397-407).

Жарарагиновый Пептид	Аминокислотная последовательность	№№ Аминокислот
192ox; SEQ ID NO 14	CWSNGDKITC*	212-219
195ox; SEQ ID NO 15	CEQQRYDPYKC*	151-159
197ox; SEQ ID NO 16	CKLPDSEAHAC*	103-111
223ox; SEQ ID NO 17	CHYSPDGREIC*	46-54
225ox; SEQ ID NO 18	CPADV FHKNC*	441-449
229ox; SEQ ID NO 5	CTRKKHDNAQC*	241-249
231ox; SEQ ID NO 19	CYSNDDEHKGC*	537-545
I-пептидный Пептид	Аминокислотная последовательность	№№ Аминокислот
P1; SEQ ID NO 20	VCDESNSIYC*	149-157
P2; SEQ ID NO 21	VCDESNSNSIYPWDAVKNC*	149-164
P3; SEQ ID NO 22	IYPWDAVKNFLEK FVQG	155-172
P4; SEQ ID NO 23	AVKNFLEK FVQGLDIG	160-176
P5; SEQ ID NO 24	LDIGPTQVGLIQYA	173-188

P6; SEQ ID NO 25	QYANNPRVVFNLTNYKTKEE	186-205
P7; SEQ ID NO 26	LNTYKTKEEMIVAT	197-210
P8; SEQ ID NO 27	ATSQTSQYGGDLTNT	209-223
P9; SEQ ID NO 28	RKYAYSAASGGRRSAT	231-246
P10; SEQ ID NO 29	TDGESHDGSMLKAVIDQ	253-269
P11; SEQ ID NO 30	LDTKNLIKEIKAIASIPTR	291-310
P12; SEQ ID NO 31	SDEAALLEKAGTLGEQ	316-331

Другие Пептиды	Аминокислотная последовательность	Ссылка
RGD	GACRGDCLGA*; SEQ ID NO 32	Koivunen E. et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 0205-20210
RGE	GACRGECLGA*; SEQ ID NO 33	Koivunen E. et al., 1993, J. Biol. Chem., 268 2025-20210

*- циклические пептиды

Для демонстрации корреляции между связывающими свойствами пептида 229ох и ядом жарараки B.jararaca была протестирована способность пептида 229ох конкурировать с $\alpha 2 I$ -связывающим сайтом в составе белков змеин/ого яда. Полученные результаты показывают, что и 229ох, и яд

В. jararaca связывают $\alpha 2 I$ и что связь 229-ох/ $\alpha 2 I$ указывает на то, что 229ох является реальным сайтом связывания интегрина в составе жарарагина. Поскольку подавление не было полным (примерно 50%-ным), то существует вероятность того, что яд жарараки В. jararaca также включает в себя иной сайт связывания домена $\alpha 2 I$.

В ряде публикаций было показано, что циклическая структура лиганда интегрина, мимикрирующая синтетический пептид, обычно является существенной для высокоаффинного связывания. Для проверки этого и окисленная (т.е. циклизированная), и линейная формы пептида p229 были использованы в твёрдофазном тесте на связывание, который был описан выше. Циклический пептид 229ох, как было показано, обладал способностью подавлять адгезию $\alpha 2 I$ с коллагеном I типа, в то время как линейная форма этого же пептида проявляла лишь слабое действие (фиг. 4А). Связывание $\alpha 2 I$ с твердой фазой, с которой связан 229ох, зависело от концентрации, и значительное связывание было выявлено при концентрации покрытия 75 мкг/мл (фиг. 4В). Вдобавок к коллагену I типа, домен $\alpha 2 I$ также связывает коллаген IV типа и ламинин-1. Пептид 229ох подавлял связывание $\alpha 2 I$ с этими лигандами, в то время как контрольный пептид 225ох, характеризующийся таким же размером и конформацией, а также изoelektrической точкой pI, такого влияния не проявлял (фиг. 4С). Это подтверждает, что домен $\alpha 2 I$ связывает все эти

лиганды с участием одного и того же механизма, а также то, что пептид 229ох подавляет связывание либо за счёт прямого взаимодействия с сайтом распознавания лиганда, либо путём изменения пространственной структуры домена I с превращением её в неактивную.

Пример 4

Активация производным от жарарагина пептидом сайта распознавания ЕСНО-вируса-1 в составе домена $\alpha 2 I$ интегрина

Вдобавок к тому, что интегрин $\alpha 2 \beta 1$ опосредует адгезию клеток на коллагене и ламинине-1, так он же функционирует как рецептор вирусов, опосредуя прикрепление к поверхности клеток и инфицирование патогенным для человека вирусом ЕСНО-1. Было установлено, что белки матрикса и ЕСНО-вирус-1 взаимодействуют с интегрином по разным механизмам, однако сайты связывания ЕСНО-вируса-1 также находятся в пределах I-домена $\alpha 2$ -субъединицы интегрин. Как было описано выше, домен $\alpha 2 I$ продемонстрировал слабое связывание с покрытием ЕСНО-вирусом-1, однако, к удивлению, добавление пептида 229ох увеличивало это связывание примерно на порядок, в то время как контрольный пептид 225ох таким действием не обладал (фиг. 5). Этот результат указывает на то, что связывание пептида 229ох с доменом $\alpha 2 I$ индуцирует структурное изменение в данном белке, что и увеличивает аффинность связывания $\alpha 2 I$ с ЕСНО-вирусом-1.

Всё это подтверждает вероятное присутствие сайта

модуляции активности в составе I-домена, в котором связывание RKK могло бы за счёт аллостерического эффекта подавлять связывание с коллагеном. RKK-индуцируемое изменение конформации домена $\alpha 2 I$ было подтверждено в проведённых заявителями экспериментах, в которых пептид RKK не только блокирует адгезию домена $\alpha 2 I$ с коллагеном, но также и существенно увеличивает прикрепляемость домена $\alpha 2 I$ к ЕСНО-вирусу-1. В дополнение к подтверждению ранее обозначенных предположений о том, что ЕСНО-вирус-1 и коллаген распознают разные сайты в составе домена $\alpha 2 I$, полученные данные указывают на существование важного регуляторного механизма в одном из сайтов распознавания лиганда (сайт связывания с ЕСНО-вирусом-1), связанный с оккупацией другого сайта связывания (RKK-связывающий сайт). Однако имеющаяся информация о структурно-функциональных параметрах домена $\alpha 2 I$, недостаточна для того, чтобы сделать заключение о том, связывается ли RKK напрямую с сайтом распознавания коллагена или имеется аллостерический ингибитор взаимодействия домена $\alpha 2 I$ и коллагена. В обоих случаях RKK-включающие пептиды являются высокоэффективными тестерами для исследований, нацеленных на установление функций I-доменов интегрина по распознаванию лигандов.

Пример 5

Существенность последовательности из трёх аминокислот (RKK) для связывания с доменом $\alpha 2 I$ интегрина

Ранее опубликованная информация о распознающих сайтах интегрина в составе различных белков подтверждает важность двух аминокислотных остатков, а именно остатков аспарагиновой кислоты и аргинина. Для установления ключевых аминокислотных остатков в пределах полипептида 229ох была протестирована серия новых пептидов, в которых аминокислоты p229 были замещены одна за другой остатками аланина. Пептиды связывались с твёрдой подложкой, и их тестировали по способности связываться с $\alpha 2 I$. Интересным оказалось обнаружение того, что три аминокислоты - "аргинин-лизин-лизин" (RKK) - являются ключевыми, а также некоторый эффект проявлялся с участием соседнего гистидина. Замещение остатков аспарагиновой кислоты или аспарагина не имело эффекта (фиг. 6A). Согласно с этим, связывание $\alpha 2 I$ с коллагеном 1 типа в незначительной степени подавляется пептидами, включающими в себя замены на аланин в составе последовательности RKK, в то время как замещение остатков аспарагиновой кислоты или аспарагина не нарушает этой функции (фиг. 6B).

Для идентификации вероятных сайтов связывания в составе $\alpha 2 I$ по отношению к пептиду 229ох серия пептидов, соответствующих гидрофильным участкам домена $\alpha 2 I$, были синтезированы и протестированы на их способность связываться с биотинилированным 229ох. Пептиды с доменом $\alpha 2 I$ и домен $\alpha 2 I$ связывались с твёрдой фазой с последующим добавлением биотинилированного 229ох. Для пептида 229ох было показано

существенное связывание $\alpha 2 I$ и пептида P9, в то время как в серии повторных экспериментов не было выявлено связывания с другими пептидами (фиг. 7A). Взаимодействие между биотинилированным пептидом 229ох и твёрдой фазой, на которой связан домен $\alpha 2 I$, зависело от присутствия двухвалентных катионов (фиг. 7B), равно как и связывание меченного европием $\alpha 2 I$ с твёрдой фазой, на которой были связаны коллаген I типа и пептид 229ох (фиг. 7C).

Пример 6

Критическая длина RKK- включающего пептида

С целью определения критической длины RKK-пептида была сформирована серия пептидов, включающая в себя последовательность RKK и дополнительные аминокислоты в соответствии со следующим. Были протестированы STRKKHDNAQC (229ох; SEQ ID NO 5), STRKKHDNAC (SEQ ID NO 34) и STRKKHDNC (248ох; SEQ ID NO 4). Самый короткий из этих пептидов проявлял максимальный уровень подавления связывания домена $\alpha 2 I$ с коллагеном при концентрации 10 мкМ. Этот уровень оказался более чем на порядок более эффективным по сравнению с более длинным пептидом 229ох (фиг. 8).

Пример 7

Тесты на миграцию клеток

Миграционный тест изображает движение клеток на коллагеновом матриксе. Этот пример показывает, что представленные пептиды блокируют движение таких клеток и, следовательно, применимы в способах лечения заболеваний, в

патогенезе которых участвует такое движение.

Для того, чтобы показать влияние пептида 229ox/RKK и пептида 225ox на взаимодействие "коллаген-клетки", химически трансформированные клетки линии HOS-MNNG оставляли для прикрепления к коллагену I типа и затем для миграции на нём. Важность участия интегрина $\alpha 2 \beta 1$ в этом процессе была подтверждена ранее (Vihinen P. et al., 1996, Cell Growth & Differ., 7, 439-447).

Тесты на миграцию клеток были проведены в соответствии с ранее описанным (Vihinen P. et al., 1996, Cell Growth & Differ., 7, 439-447). Существенным является то, что клетки остеосаркомы HOS-MNNG (взятые из коллекции ATCC) были суспендированы в бесывороточной среде Optimem-1 (Life Technologies Inc.), а 20-30 тысяч клеток на лунку были перенесены на 24-луночный планшет для клеточного культивирования (Costar) внутри металлического цилиндра диаметром 2,8 мм. Лунки для культивирования клеток были покрыты коллагеном I типа из расчёта 5 мкг/см². Клетки оставляли прикрепляться к коллагену I типа на 16 часов при 37°C. Цилиндры удаляли, неприкрепившиеся клетки смывали средой Optimem (Life Technologies Inc.), а прикрепившиеся клетки оставляли мигрировать в среде Optimem в присутствии тестируемых пептидов в течение 4 дней. Замены на свежую среду Optimem, содержащую пептиды, проводили на лунках ежедневно. Спустя 4 дня покрытую клетками поверхность измеряли с помощью микрокомпьютерного устройства, версия M4 (Imaging Research

Inc.) .

Результаты этого эксперимента показаны на фиг. 9. Либо пептид 229ох, либо пептид 225ох добавляли к клеткам в концентрации 500 мкМ, а свежие порции пептида добавляли ежедневно. Способность клеток HOS-MNNG мигрировать на коллагене I типа не нарушалась контрольным пептидом 225ох, однако пептид 229ох в существенной степени подавлял эту миграцию - $P < 0,001$ по критерию Стьюдента (фиг. 9) .

Такое подавление миграции клеток остеосаркомы на коллагене подтверждает, что 1) движение клеток злокачественных опухолей и, соответственно, метастазирование рака может быть блокировано пептидом 229ох, и 2) миграция клеток любого типа также может быть подавлена тогда, когда такая миграция является следствием, по меньшей мере, отчасти, взаимодействия интегрина $\alpha 2 \beta 1$ и коллагена.

Пример 8

Подавление адгезии клеток пептидом RKK

Исследована адгезия кератиноцитов человека линии HaCaT и клеточной линии UT-SCC-2, сформированной на основе клеток плоскоклеточной карциномы рта, на коллаген I типа в присутствии пептида 220ох или активного антитела Gi9 против $\alpha 2$ -субъединицы интегрина (антитело против $\alpha 2$ -субъединицы интегрина доступно на коммерческой основе от Immunotech/Coulter, Westbrook, ME, США). Клетки обрабатывали циклогексимидом (10 мкг/мл) в бессывороточной среде в течение 1 часа. Клетки открепляли и оставляли для адгезии на

микротитровальных планшетах с коллагеном I типа в течение 1 часа в среде DMEM с 1% глицина. Неприкрепившиеся клетки смывали, а прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым, и число прикрепившихся клеток определяли по величине оптического поглощения.

Полученные результаты суммированы на фиг. 10: они показывают, что пептиды согласно изобретению, например, пептид 229ox (p229ox), должны подавлять миграцию клеток и, следовательно, они могут быть применены для лечения или предотвращения заболеваний и состояний, в которые вовлечена миграция эпителиальных клеток, таких, например, как периодонтит, при котором эпителиальные клетки связывают интегрин $\alpha 2\beta 1$ и используют это связывание для миграции вдоль коллагена.

Пример 9

Применение RKK-пептида для лечения периодонтита и гингивита

Периодонтит - заболевание, характеризующееся воспалением и разрушением поддерживающей зубы соединительной ткани. Заболевание инициируется патогенной ротовой бактерией, которая активирует тканевые клетки по выработке и секреции гидролитических ферментов, которые разрушают тканевые компоненты. Существенным свойством этого заболевания является увеличение пролиферации и миграции эпителиальных клеток, которые прикрепляют десну к поверхности зуба (соединительный эпителий/эпителий зубо-десневого кармана).

Традиционное лечение периодонтита и гингивита сосредоточено на удалении патогенных бактерий из ротовой полости либо на механической чистке (зубных камней), либо на применении антибиотиков. Кроме того, часто применяется хирургическая коррекция структуры тканей ротовой полости.

Подавление миграции клеток, обеспечиваемое пептидами согласно изобретению, например, пептидом 229ох, может быть использовано само по себе или в сочетании с другими способами с целью предотвращения или лечения заболеваний ротовой полости, включая периодонтит и гингивит. Конкретно композиции, содержащие эффективные количества одного или большего числа циклических пептидов согласно изобретению, которые включают последовательность RKK, могут быть введены топически пациенту, нуждающемуся в лечении заболевания ротовой полости, включая периодонтит и гингивит. Композиция для применения в этом случае может быть составлена для топического применения с использованием любого стандартного способа. Пептиды согласно изобретению могут быть приготовлены с включением носителей, включая полимерные носители, такие, например как, те, которые основаны на этилцеллюлозе, силиконовых резинах и особенно разрушаемых полимерах и сополимерах, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, поли-молочная/полигликолевая кислота, полиамиды и полиэфиры, желатин, коллаген, альбумин и фибриноген; при этом желательным является перекрёстное сшивание, которое обеспечило бы желательную активность RKK или параметры

выделения. Такие доставочные системы для ротовой полости описаны, например, в патентах США № 5002769, 5023082, 5160737, 5330746, 5425953, 5438076 и 5639795 (включены в данный текст в виде библиографических ссылок). Пептид доставляется в желательный сайт ротовой полости в форме имплантата или в виде части жидкой композиции, которая затвердевает в ротовой полости, или в форме зубной пасты или геля, который обеспечивает достижение эффективных уровней RKK-включающего пептида до желаемого сайта. Количество данного пептида согласно изобретению варьируется таким образом, чтобы обеспечить адекватные уровни в желаемых участках ротовой полости желаемого эффекта подавления, но в целом находится в пределах 0,001-95% от состава жидкой композиции до её затвердевания или состава твёрдой композиции, в зависимости от тяжести состояния, лечение которого проводится.

Также может быть использована мембрана, используемая в качестве подложки, обеспечивающей доставку пептида согласно изобретению до желаемого сайта.

RKK-включающие пептиды согласно изобретению также применимы для лечения и (или) профилактики заболеваний, характеризующихся миграцией эпителиальных клеток, особенно для лечения состояний, при которых предпочтительным является топическое применение.

По завершении полного описания изобретения должно, однако, остаться очевидным специалисту в данной области техники, что то же самое может быть достигнуто путём внесения

небольших модификаций, которые не нарушают содержание или дух настоящего изобретения.

RU 2203902 C2

RU 2203902 C2

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) БАЗОВАЯ ИНФОРМАЦИЯ

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ: Heino Jyrki

Ivaska Johanna

Kapyla Jarmo

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Связывающийся с интегрином
белок и его применение

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ:

(iv) АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

(A) АДРЕСАТ: Sterne, Kessler, Goldstein & Fox
P.L.L.C.

(B) УЛИЦА: 1100 New York av. NW

(C) ГОРОД: Washington

(D) ШТАТ: DC

(E) СТРАНА: Соединенные Штаты Америки

(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС: 20005-3934

(V) ФОРМА, ПРИГОДНАЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРА

(A) ТИП СВЯЗИ: дискета

(B) КОМПЬЮТЕР: IBM-совместимый

(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS

(D) ПРОГРАММА:

(vi) ДАННЫЕ ПРИОРИТЕТА ЗАЯВКИ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ: US 08/893526

(B) ДАТА ПОДАЧИ: 11 июля 1997 г.

(C) КЛАССИФИКАЦИЯ:

(viii) ИНФОРМАЦИЯ О ПАТЕНТНОМ ПОВЕРЕННОМ:

(A) ИМЯ: SIMBALA MICHELE a.

(B) НОМЕР РЕГИСТРАЦИИ: 33851

(C) РЕЕСТРОВЫЙ НОМЕР: 1102.0240000

(ix) ТЕЛЕКОММУНИКАЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(A) ТЕЛЕФОН: (1-202) 371-2600

(B) ФАКС: (1-202) 371-2540

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 1

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 9 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 1

Xaa Arg Lys Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 2

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 8 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 2

Xaa Arg Lys Lys Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 3

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 7 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 3

Xaa Arg Lys Lys Xaa Xaa Xaa

1 5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 4

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 9 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 4

Cys Thr Arg Lys His Asp Asn Cys

1 5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 5

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 11 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 5

Cys Thr Arg Lys Lys His Asp Asn Ala Gln Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 6

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 7 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 6

Cys Thr Arg Lys Lys His Asp

1 5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 7

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 9 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 7

Cys Thr Arg Lys Lys His Asp Asn Ala

1 5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 8

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 4 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 8

Arg Lys Lys His

1

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 9

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 26 нуклеотидов

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЧИСЛО ЦЕПЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 9

SACAGGGGATC CCCTGATTTT CAGCTC

26

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 10

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 28 нуклеотидов

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЧИСЛО ЦЕПЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 10

GTGGCTGAAT TCAACAGTAC CTTCAATG

28

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 11

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 4 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 11

Pro Asp Phe Gln

1

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 12

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 5 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 12

Ile Glu Gly Thr Val

1

5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 13

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 6 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 13

Glu Phe Ile Val Thr Asp

1

5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 14

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 10 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 14

Cys Trp Ser Asn Gly Asp Lys Ile Thr Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 15

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 11 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 15

Cys Glu Gln Gln Arg Tyr Asp Pro Tyr Lys Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 16

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 11 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 16

Cys Lys Leu Pro Asp Ser Glu Ala His Ala Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 17

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 11 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 17

Cys His Tyr Ser Pro Asp Gly Arg Glu Ile Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 18

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 10 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 18

Cys Pro Ala Asp Val Phe His Lys Asn Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 19

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 11 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 19

Cys Tyr Ser Asn Asp Asp Glu His Lys Gly Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 20

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 10 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 20

Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Cys

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 21

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 17 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 21

Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro

1 5 10

Trp Asp Ala Val Lys Asn Cys

15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 22

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 17 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 22

Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys Asn Phe

1 5 10

Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly

15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 23

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 16 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 23

Ala Val Lys Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val

1 5 10

Gln Gly Leu Asp Ile Gly

15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 24

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 16 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 24

Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys Thr Gln Val

1 5 10

Gly Lys Ile Gln Tyr Ala

15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 25

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

RU 2203902 C2

RU 2203902 C2

(A) ДЛИНА: 20 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 25

Gln Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe

1 5 10

Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys Glu Glu

15 20

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 26

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 14 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 26

Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys Glu Glu Met Ile Val Ala Thr

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 27

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 15 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 27

Ala	Thr	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Tyr	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	Asn	Thr
1				5					10					15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 28

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 16 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 28

Arg Lys Tyr Ala Tyr Ser Ala Ala Ser Gly

1		5		10
---	--	---	--	----

Gly Arg Arg Ser Ala Thr

15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 29

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 17 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 29

Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met

1		5		10
---	--	---	--	----

Leu Lys Ala Val Ile Asp Gln

15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 30

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 20 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 30

Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu lle

1 5 10

Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg

15 20

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 31

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 16 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 31

Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala

1 5 10

Gly Thr Leu Gly Glu Gln

15

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 32

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 10 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 32

Gly Ala Cys Arg Gly Asp Cys Leu Gly Ala

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 33

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 10 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 33

Gly Ala Cys Arg Gly Glu Cys Leu Gly Ala

1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 34

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 10 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

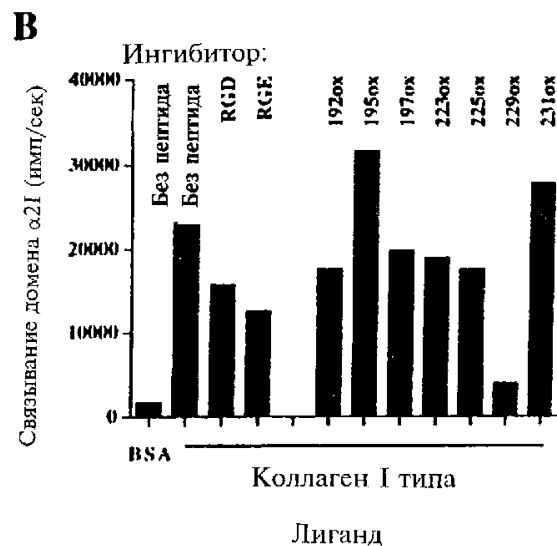
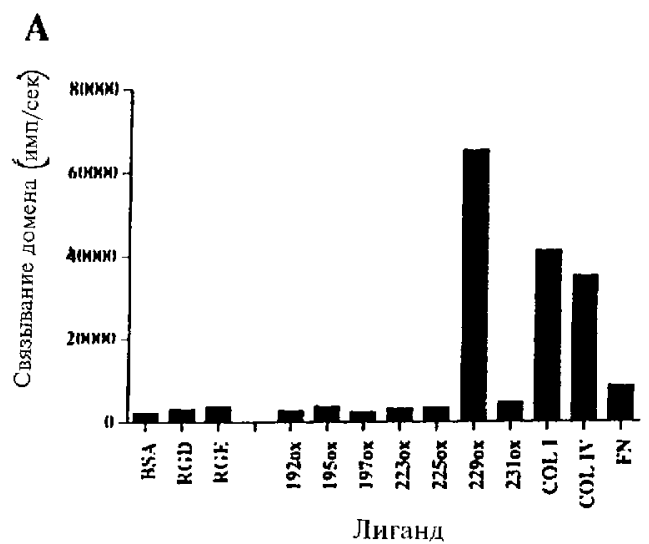
(D) ТОПОЛОГИЯ: кольцевая

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

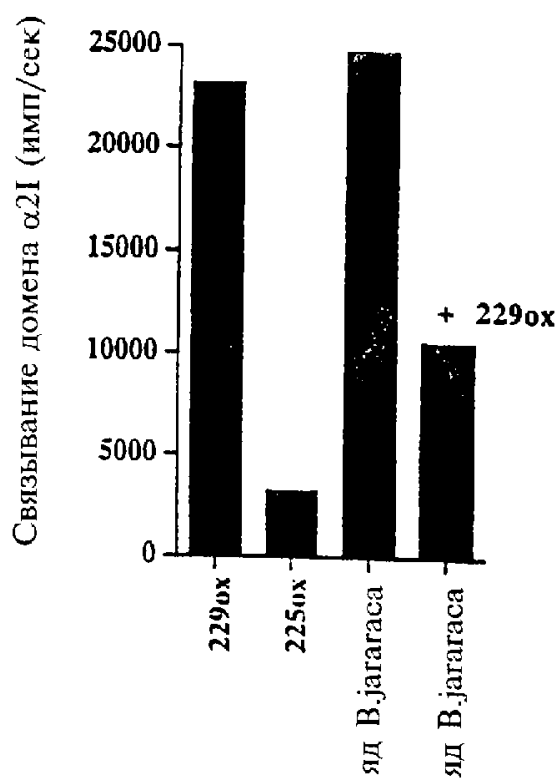
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 34

Cys Thr Arg Lys Lys His Asp Gln Ala Cys

1 5 10

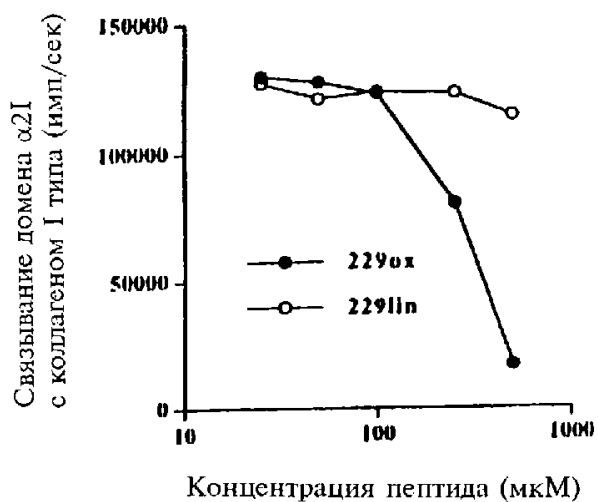


Фиг.2

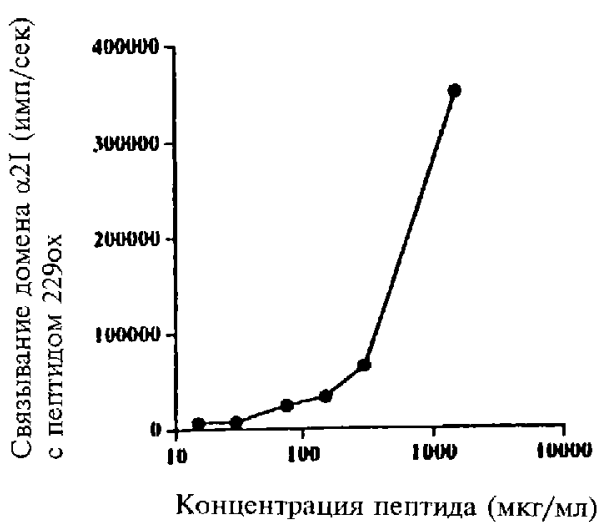


Фиг.3

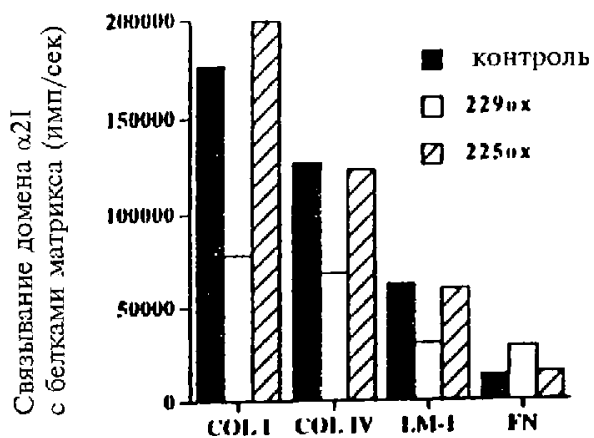
А



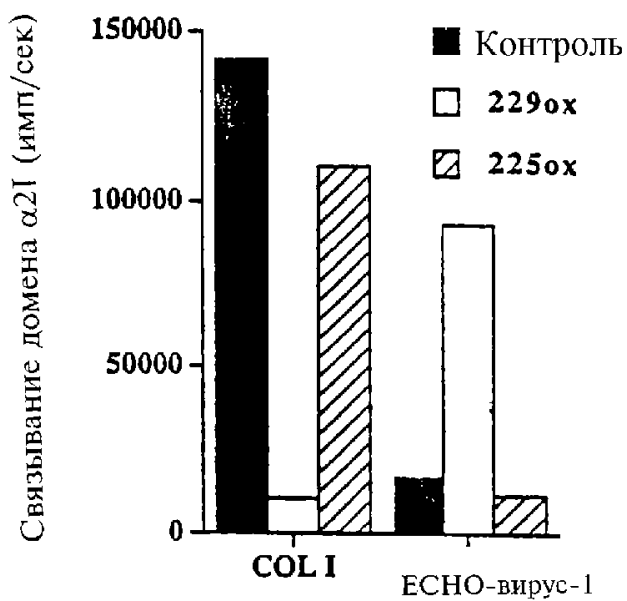
В



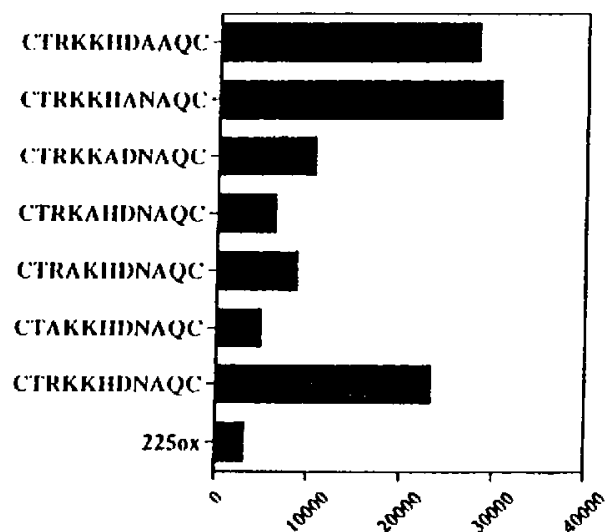
С



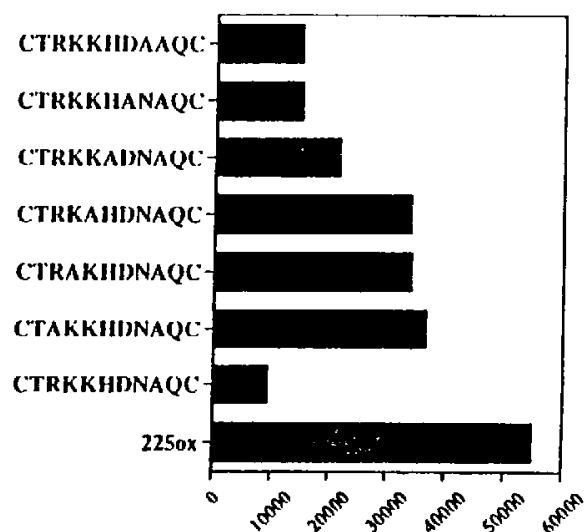
Фиг.4



Фиг.5

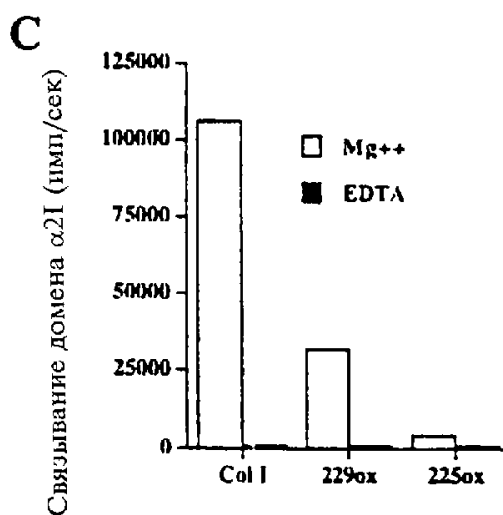
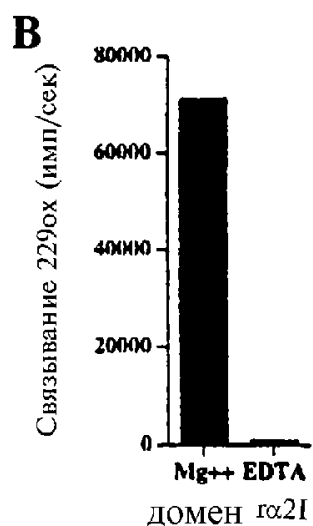
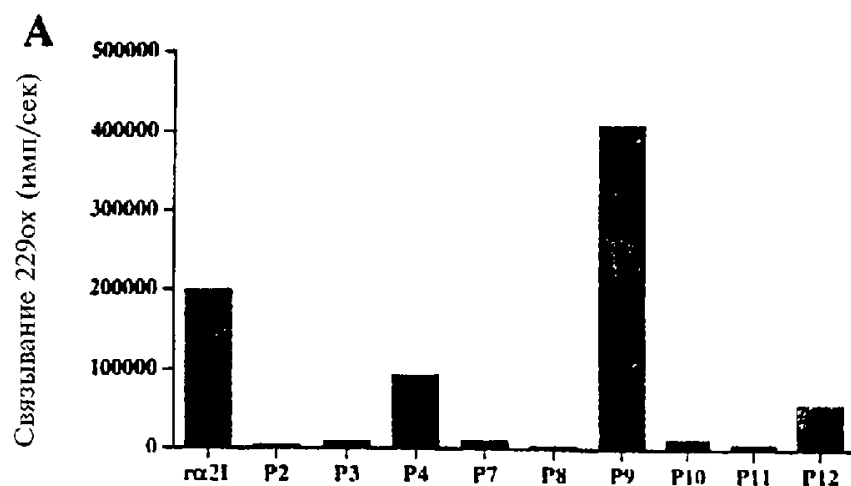


Связывание домена $\alpha 2I$
с мутантными пептидами (имп/сек)

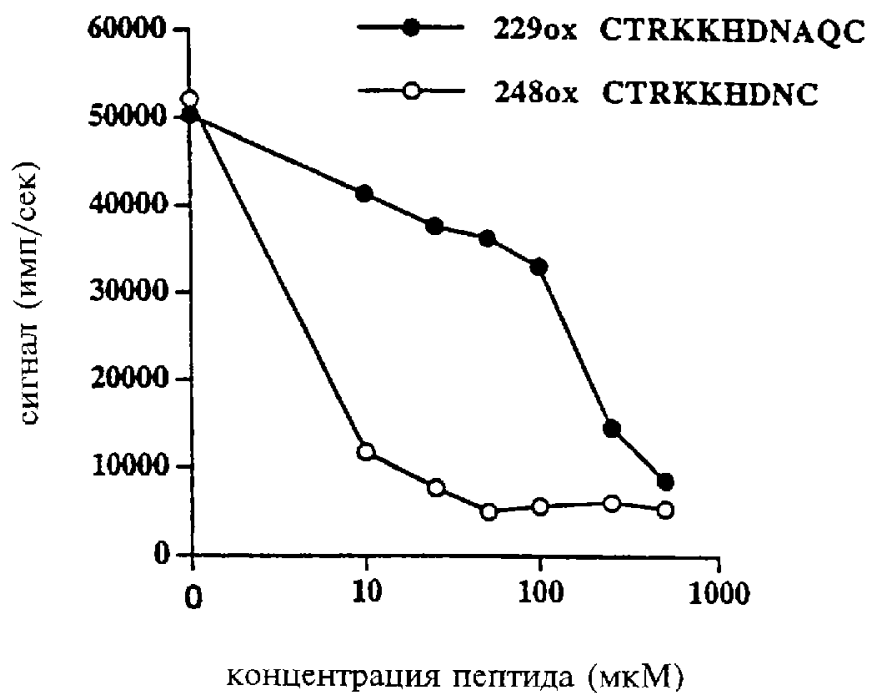


Связывание домена $\alpha 2I$
с коллагеном I типа (имп/сек)

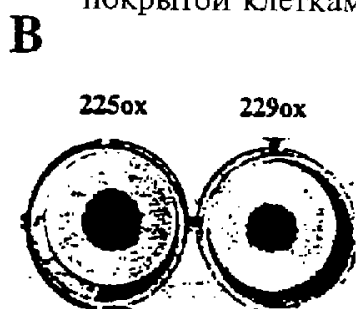
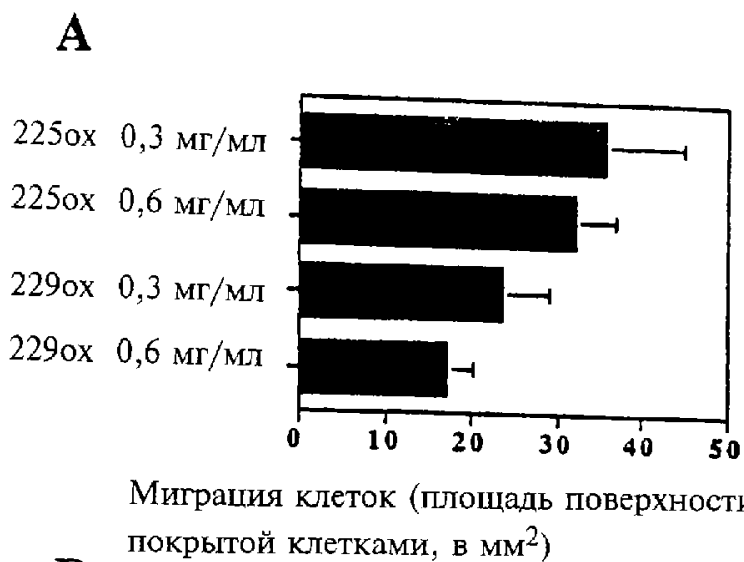
Фиг.6



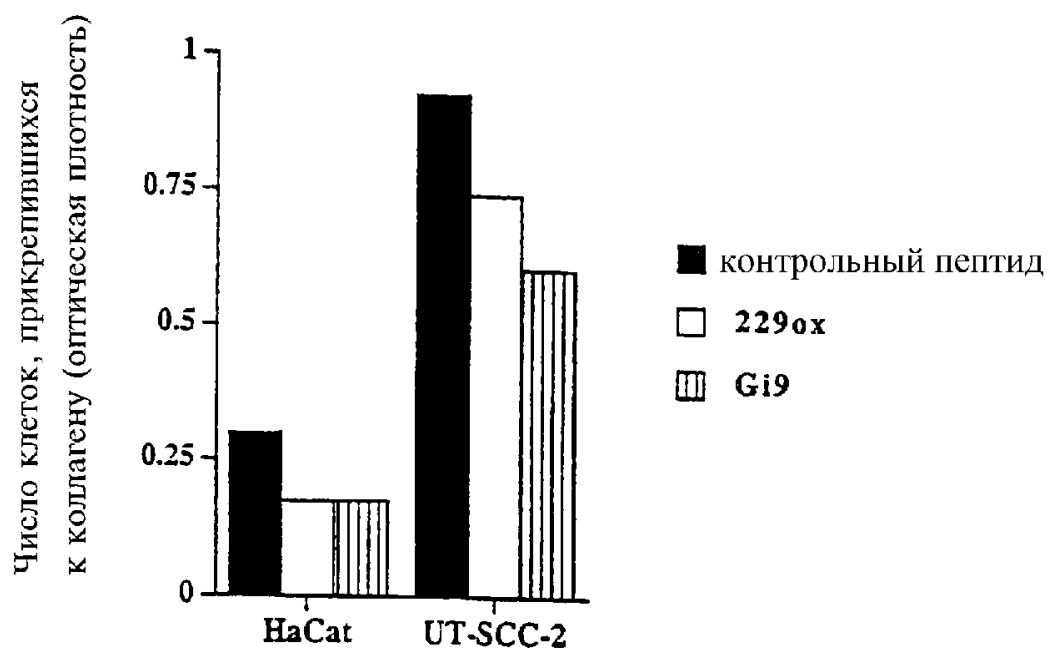
Фиг.7



Фиг.8



Фиг.9



Фиг.10