



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **130911** (13) **C2**
(51) МПК
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
A61P 37/06 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2021 00550 (22) Дата подання заявки: 10.07.2019 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 18.06.2026 (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 260555 (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 11.07.2018 (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: IL (41) Публікація відомостей про заявку: 26.05.2021, Бюл.№ 21 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 17.06.2026, Бюл.№ 24 (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/IL2019/050774, 10.07.2019	(72) Винахідник(и): Овадіа Еран (IL), Бен-Шимон Аві (IL) (73) Володілець (володільці): ІММЮНІТІ ФАРМА ЛТД., 28 Meron Street, 9076424 Mevasseret Zion, Israel (IL) (74) Представник: Свентозельська Тетяна Русланівна, реєстр. №414 (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2006/021954 A2, 02.03.2006 Specific Inhibition of Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis by Substance P / R. DIMRI et al. // The Journal of Immunology. 2000. Vol. 164. No. 5. P. 2479–2486 US 2016/038571 A1, 11.02.2016 US 2007/197444 A1, 23.08.2007 US 2004/204340 A1, 14.10.2004 Convulsant peptides related to corticotropin-releasing factor (CRF) / M. NOMIZU et al. // Brain Research. 1989. Vol. 505. No. 2. P. 326–328 Bradykinin degradation pathways in human blood plasma / O.A. MIRGORODSKAYA et al. // FEBS Letters. 1992. Vol. 307. No. 3. P. 263–266 Electronic interactions of i, i + 1 dithioamides: increased fluorescence quenching and evidence for n-to-[π]* interactions / Y. HUANG et al. // Chemical Communications. 2016. Vol. 52. No. 50. P. 7798–7801 US 10011829 B2, 03.07.2018 Bax-inhibiting peptide derived from mouse and rat Ku70 / T. YOSHIDA et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004. Vol. 321. No. 4. P. 961–966
--	--

(54) ВИДІЛЕНИЙ ПЕПТИД ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ ЛІКУВАННІ БІЧНОГО АМІОТРОФІЧНОГО СКЛЕРОЗУ

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного пептиду для застосування при лікуванні бічного аміотрофічного склерозу.

UA 130911 C2

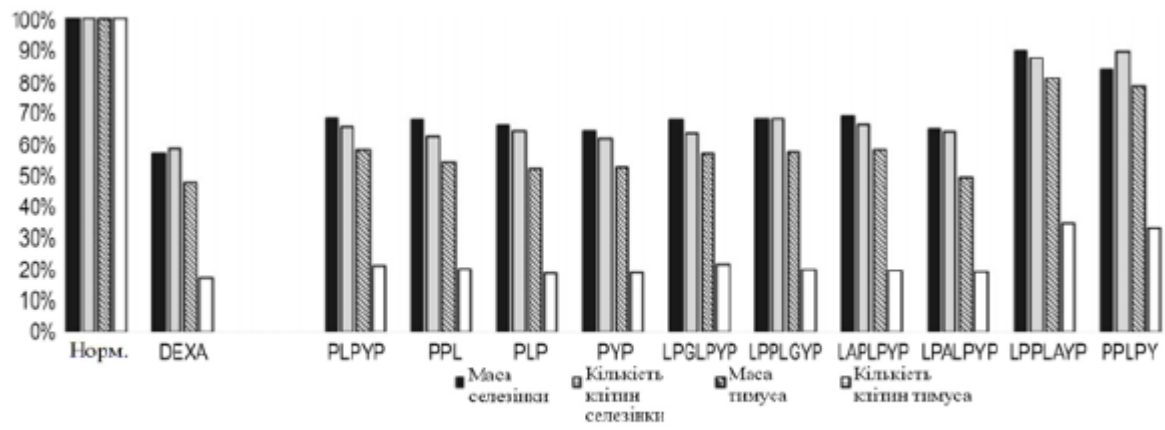


Fig. 1

Споріднені заявки

За цією заявкою заявляється пріоритет відповідно до заявки на патент Ізраїлю № 260555, поданої 11 липня 2018 р., зміст якої повністю включено в цей документ за допомогою посилання.

5 Викладення переліку послідовностей

Файл ASCII під назвою 77809 Sequence Listing.txt, що створений 7 липня 2019 р. і містить 8069120 байт, представлений одночасно з поданням цієї заявки, включений в цей документ за допомогою посилання.

10 Область техніки, до якої відноситься даний винахід, і попередній рівень техніки даного винаходу

Даний винахід, згідно з деякими його варіантами здійснення, відноситься до композицій і способів їх застосування для лікування запальних і аутоімунних захворювань.

15 Існує незадоволена потреба в нових композиціях, які можуть служити для ослаблення клітинної та імунної відповіді на стрес в нормальній тканині специфічним, безпечним і ефективним чином, тим самим знижуючи важкість пов'язаних зі стресом дегенеративних захворювань і викликаного стресом запалення.

20 Пептид LPPLPYP (SEQ ID NO: 2, також відомий як Stressin-1 та IPL344) являє собою короткий пептид з 7 амінокислот, який захищає клітини різних типів від проапоптичного тиску і активує систему передачі сигналів Akt. Структура IPL344 нагадує сайти зв'язування адаптерних білків. Був запропонований механізм дії, який включає в себе імітацію таких білків і активацію клітинних захисних процесів за допомогою Akt і, можливо, інших шляхів.

У публікаціях міжнародних патентних заявок: WO 2006/021954 і WO2012/160563 розкривається застосування пептиду LPPLPYP (SEQ ID NO: 2) для лікування таких захворювань, як ALS.

25 Коротке розкриття даного винаходу

Згідно з аспектом даного винаходу передбачений виділений пептид, що складається не більше ніж з десяти амінокислот, який містить амінокислотну послідовність, представлену формулою $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$ (SEQ ID NO: 17),

30 (i) де X_1 являє собою пролін або його аналог або похідне;
(ii) де X_2 являє собою пролін або його аналог;
(iii) де X_3 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, лейцину, цистеїну, ізолейцину, метіоніну та їх похідного або аналога;
(iv) де X_4 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, серину та їх похідного або аналога;

35 (v) де X_5 являє собою будь-яку амінокислоту;
(vi) де X_6 являє собою пролін або його аналог або похідне і
(vii) де пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

40 Згідно з аспектом даного винаходу передбачений виділений пептид, довжина якого не перевищує шести амінокислот, який містить амінокислотну послідовність, представлену формулою $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO: 1),

(i) де X_1 являє собою пролін або його аналог або похідне;
(ii) де X_2 являє собою пролін або його аналог або похідне;
(iii) де X_3 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, лейцину, цистеїну, ізолейцину,
45 метіоніну та їх похідного або аналога;
(iv) де X_4 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, серину та їх похідного або аналога;

(v) де X_5 являє собою будь-яку амінокислоту і
(vi) де пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси
50 селезінки та/або тимуса у мишей.

Згідно з аспектом даного винаходу передбачений виділений пептид, що складається з п'яти амінокислот, який складається з амінокислотної послідовності, представлені формулою $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO: 5), де

55 (i) X_1 і X_3 являють собою будь-які амінокислоти;
(ii) X_2 являє собою пролін або його аналог або похідне;
(iii) X_4 не являє собою пролін;
(iv) пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

60 Згідно з аспектом даного винаходу передбачений виділений пептид, що складається з семи амінокислот, який складається з амінокислотної послідовності, представлені формулою X_1-X_2-

X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 6), де

- (i) X₁, X₅ і X₆ являють собою будь-які амінокислоти;
- (ii) X₂, X₃ і X₇ являють собою пролін або його аналог або похідне;
- (iii) X₄ не являє собою пролін і

5 (iv) пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

Згідно з аспектом даного винаходу передбачена фармацевтична композиція, що містить пептид за будь-яким з пп. 1-27 в якості активного засобу і фізіологічно прийнятний носій.

10 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу похідне проліну вибрано з групи, що складається з N-метилпроліну, альфа-метилпроліну і α-аміномасляної кислоти.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу довжина пептиду складає 6 амінокислот.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу пептид містить амінокислоту, яка приєднана до N-кінця X₁, причому амінокислота вибрана з групи, що складається з аланіну, валіну, лейцину, цистеїну, ізолейцину, метіоніну та їх похідного або аналога.

15 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу амінокислота, яка приєднана до N-кінця X₁, являє собою лейцин або його похідне або аналог.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу амінокислота, яка приєднана до N-кінця X₁, являє собою D-амінокислоту.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу довжина пептиду складає 7 амінокислот.

20 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу X₄ являє собою аланін або його аналог або похідне.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу X₅ вибраний з групи, що складається з тирозину, фенілаланіну, триптофану та їх похідного або аналога.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу X₅ являє собою тирозин.

25 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу виділений пептид містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 4.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу виділений пептид складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 4.

30 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу пептид містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 18.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу пептид складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 18.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу виділений пептид складається з 5 амінокислот.

35 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу X₄ вибраний з групи, що складається з аланіну, проліну, похідного або аналога аланіну та похідного або аналога проліну.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу похідне або аналог проліну вибирають з групи, що складається з N-метилпроліну, альфа-метилпроліну і α-аміномасляної кислоти.

40 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу амінокислотна послідовність включає в себе послідовність, наведену в SEQ ID NO: 3.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу виділений пептид складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 18.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу X₃ являє собою лейцин.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу X₁ і/або X₃ є D-амінокислоти.

45 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу пептид являє собою штапельний пептид.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу пептид являє собою циклічний пептид.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу порядок послідовності зворотний, і всі амінокислоти відносяться до D-типу.

50 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу пептид приєднаний до фрагмента, що проникає в клітину.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу частина, що проникає в клітину, приєднана до N-кінця пептиду.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу пептид призначений для лікування запального або дегенеративного захворювання.

55 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу захворювання, пов'язане з апоптозом, являє собою запальне або дегенеративне захворювання.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу запальне захворювання являє собою аутоімунне захворювання.

60 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу дегенеративне захворювання являє собою нейродегенеративне захворювання.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу захворювання, пов'язане з апоптозом, вибрано з групи, що складається з вікової макулярної дегенерації (AMD), пігментного ретиніту, інсульту та інфаркту міокарда.

Якщо не вказано інше, всі технічні та/або наукові терміни, які використовуються в цьому документі, характеризуються тим самим значенням, яке зазвичай розуміється фахівцем у цій галузі техніки, до якої відноситься даний винахід. Хоча способи і матеріали, подібні або еквівалентні описаним в цьому документі, можна застосовувати на практиці або при тестуванні варіантів здійснення даного винаходу, нижче описані ілюстративні способи та/або матеріали. У разі конфлікту опис патенту, включаючи в себе визначення, буде мати переважну силу. Крім того, матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження.

Короткий опис графічних матеріалів

Деякі варіанти здійснення даного винаходу описані в цьому документі тільки в якості прикладу з посиланням на супроводжуючі графічні матеріали. Звертаючись тепер до конкретних докладних графічних матеріалів, слід підкреслити, що подробиці представлені як приклад і з метою ілюстративного обговорення варіантів здійснення даного винаходу. В цьому відношенні опис графічних матеріалів робить очевидним для фахівців у цій галузі техніки, як варіанти здійснення даного винаходу можуть бути реалізовані на практиці.

На графічних матеріалах:

Фіг. 1 являє собою графік, який ілюструє вплив ілюстративних пептидів на масу селезінки, кількість клітин селезінки, масу тимуса і кількість клітин тимуса.

Пептиди, використані при скринінгу, були наступними:

PPLPY-SEQ ID NO: 3

LPPLAYP-SEQ ID NO: 4

PLPYP-SEQ ID NO: 9

PPL-SEQ ID NO: 10

PLP-SEQ ID NO: 11

PYP-SEQ ID NO: 12

LPGLPYP-SEQ ID NO: 13

LPPLGYP-SEQ ID NO: 14

LALPYP-SEQ ID NO: 15

LPALPYP-SEQ ID NO: 16

Фіг. 2 являє собою графік, який ілюструє вплив ілюстративних пептидів на масу селезінки, кількість клітин селезінки, масу тимуса і кількість клітин тимуса.

Пептиди, використані при скринінгу, були наступними:

LPPLPYP-SEQ ID NO: 2 (контроль)

PPLAYP-SEQ ID NO: 18

LPPLPY-SEQ ID NO: 7

LPPLAYP-SEQ ID NO: 4

PPLPY-NH2-SEQ ID NO: 19

PPLPY-SEQ ID NO: 3

Опис конкретних варіантів здійснення даного винаходу

Даний винахід, згідно з деякими його варіантами здійснення, відноситься до композицій і способів їх застосування для лікування запальних і аутоімунних захворювань.

Перш ніж докладно пояснювати щонайменше один варіант здійснення даного винаходу, слід розуміти, що даний винахід не обов'язково обмежується в своєму застосуванні деталями, викладеними в нижченаведеному описі або проілюстрованими прикладами. Цей винахід може бути реалізований в інших варіантах здійснення або реалізовано на практиці різними способами.

Пептидні зв'язки майже завжди зустрічаються в транс-конформації з омега-кутом кручення, близьким до 180° , тоді як в цис-конформації спостерігається лише дуже обмежена частина з омега-кутом приблизно 0° . Енергетичний бар'єр між транс/цис-конфігураціями становить приблизно 20 [ккал/моль], а енергетичний бар'єр для транс-ізомеру становить $\sim 2,5$ [ккал/моль]. Серед 20 канонічних амінокислот пролін відіграє особливу роль. Пептидний зв'язок проліну з попереднім амінокислотним залишком (Хаа-Pro, Хаа позначає будь-яку амінокислоту) позбавлений амідного водню, так що цей пептидний зв'язок не може діяти як донор водневого зв'язку, і енергетичний бар'єр, а також енергетичний пропуск значно зменшуються до ~ 13 і $\sim 0,5$ [ккал/моль], відповідно [2], зміщуючи транс/цис-рівновагу в бік цис-конфігурації. Сильні зміни омега-кута, пов'язані з процесом транс/цис-ізомеризації проліну (від 0 до 180°), модулюються як внутрішньо-, так і міжмолекулярними взаємодіями і здійснюють колосальний вплив на співвідношення структурної активності поліпептидного ланцюга. Таким чином, ізомеризація

проліну стає важливим компонентом в управлінні активністю багатьох біологічних процесів. Це особливо актуально для коротких пептидів, в яких цис-конфігурація може займати більше 30 % конформаційної популяції, в залежності від попереднього залишку.

Крім того, відомо, що мультikonформаційний ефект проліну проявляється в залишках проліну, розташованих в якості другого залишку від N-кінця пептиду (передостанній пролін). Усічення першого N-кінцевого залишку в пептиді, що містить передостанній пролін, як правило, призводить до конформаційних змін пептиду. У наборі даних з 58 пептидів було виявлено, що майже 80 % пептидів проявляли цей ефект [Glover, M.S., et al., 2014 J Am Soc Mass Spectrom. 26 (3): с. 444-5].

Мультипроліновий пептид LPPLPYP (SEQ ID NO: 2), також відомий як IPL344 і Stressin-1) являє собою короткий пептид з 7 амінокислот, який захищає клітини різних типів від проапоптичного тиску і активує систему передачі сигналів Akt. Підходить для лікування запальних і аутоімунних захворювань.

З урахуванням тонкої конформаційної природи пролінів, автори винаходу поставили завдання визначити, чи домінує конфігурація транс-проліну над функціональністю всіх чотирьох залишків проліну в пептиді LPPLPYP (SEQ ID NO: 2). Автори даного винаходу несподівано виявили, що заміна передостаннього проліну на аланін призводить до пептиду (SEQ ID NO: 4), який значно знижує кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей (фіг. 1). На відміну від цього, заміна передостаннього проліну на гліцин приводила до отримання пептиду, позбавленого цієї активності.

При подальшому застосуванні цього винаходу на практиці автори винаходу виявили, що видалення першої та останньої амінокислоти з SEQ ID NO: 2 також призводить до пептиду (що має послідовність, наведену в SEQ ID NO: 3), який значно знижує кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

Автори цього винаходу прийшли до висновку, що короткі пептиди на основі SEQ ID NO: 3 і 4 перспективні для лікування запальних і аутоімунних захворювань.

При подальшому застосуванні цього винаходу на практиці автори винаходу виявили, що додатковий пептид (SEQ ID NO: 18), який відповідав формулі, наведеній в SEQ ID NO: 17, показав значне поліпшення зниження кількості індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей (дивіться фіг. 2).

Автори даного винаходу також показали, що ілюстративні пептиди, які підпадають під будь-яку з розкритих загальних формул, демонструють значне поліпшення в порівнянні з основним пептидом (SEQ ID NO: 2) щодо зниження кількості індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

Використовуваний в цьому документі термін "пептид" відноситься до полімеру з природних або синтетичних амінокислот, включаючи в себе нативні пептиди (продукти деградації, синтетично синтезовані поліпептиди або рекомбінантні поліпептиди) і пептидоміметики (як правило, синтетично синтезовані пептиди), а також пептоїди і полупептоїди, які є аналогами поліпептидів, які можуть мати, наприклад, модифікації, що роблять пептиди навіть більш стабільними в організмі або більш здатними проникати в клітини.

Цей винахід також охоплює похідні (з модифікацією і/або додаванням хімічної функції до бічного ланцюга амінокислоти, без хімічної зміни пептидного скелета) і аналоги (з модифікацією і/або додаванням хімічної функції в пептидному скелеті, наприклад, модифікація N-кінця або C-кінця, модифікація пептидного зв'язку, модифікація амінокислоти, яка не визначена як "похідне"), комплекси з іншими частинками, такими як іон металу (наприклад, мідь, цинк, марганець, магній та інші).

Такі модифікації включають в себе, без обмеження, модифікацію N-кінця, модифікацію C-кінця, модифікацію поліпептидного зв'язку, включаючи в себе, без обмеження, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH або CF=CH, модифікації основного ланцюга та модифікації залишків. Способи отримання пептидоміметичних сполук добре відомі в цій області техніки і описані, наприклад, в публікації Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Глава 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), яка включена за допомогою посилання, як якщо б вона була повністю викладена в цьому документі. Більш детальна інформація з цього приводу наводиться нижче.

Поліпептидні зв'язки (-CO-NH-) всередині поліпептиду можуть бути заміщені, наприклад, N-метилованими зв'язками (-N(CH₃)-CO-), складноефірними зв'язками (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), кетометиленовими зв'язками (-CO-CH₂-), α-аза-зв'язками (-NH-N(R)-CO-), де R являє собою будь-який алкіл, наприклад, метил, карба-зв'язками (-CH₂-NH-), гідроксиметиленовими зв'язками (-CH(OH)-CH₂-), тіоамідними зв'язками (-CS-NH-), олефіновими подвійними зв'язками (-CH=CH-), ретроамідними зв'язками (-NH-CO-), похідними поліпептиду (-N(R)-CH₂-CO-), де R

являє собою "нормальний" бічний ланцюг, природно присутній на атомі вуглецю.

Ці модифікації можуть відбуватися в будь-якій зі зв'язків уздовж поліпептидного ланцюга і навіть в декількох (2-3) одночасно.

Природні ароматичні амінокислоти, Trp, Tyr і Phe, можуть бути замінені синтетичними неприродними кислотами, такими як аналог фенілгліцину, TIC, нафтиламін (Nol), метиловані по кільцю похідні Phe, галогеновані похідні Phe або о-метил-Trp.

Пролін може бути заміщений синтетичними, неприродними кислотами, такими як похідні N-метилпроліну, альфа-метилпроліну і аналога α -аміномасляної кислоти.

Інші неприродні амінокислоти наведені в таблиці 2 нижче.

У додаток до вищесказаного, поліпептиди даного винаходу можуть також включати в себе одну або кілька модифікованих амінокислот або один або кілька мономерів, які не являють собою амінокислоти (наприклад, жирні кислоти, складні вуглеводи тощо).

Термін "амінокислота" або "амінокислоти", який використовується в цьому документі в описі і в розділі формули винаходу, включає в себе 20, що зустрічаються у природі, амінокислот; ті амінокислоти, які часто посттрансляційно модифікуються *in vivo*, включаючи в себе, наприклад, гідроксипролін, фосфосерин і фосфотреонін; та інші незвичайні амінокислоти, включаючи в себе, без обмеження, 2-аміноадипінову кислоту, гідроксилізин, ізодезмосін, норвалін, норлейцин і орнітин. Крім того, термін "амінокислота" включає в себе як D-, так і L-амінокислоти (стереоізомери).

У таблицях 1 і 2 нижче перераховані ті, що зустрічаються в природі, амінокислоти (таблиця 1) і нетрадиційні або модифіковані амінокислоти (таблиця 2), які можна використовувати до даного винаходу.

Таблиця 1

Амінокислота	Трилітерне скорочення	Однолітерний символ
Аланін	Ala	A
Аргінін	Arg	R
Аспарагін	Asn	N
Аспарагінова кислота	Asp	D
Цистеїн	Cys	C
Глутамін	Gln	Q
Глутамінова кислота	Glu	E
Гліцин	Gly	G
Гістидин	His	H
Ізолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лізин	Lys	K
Метіонін	Met	M
Фенілаланін	Phe	F
Пролін	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонін	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валін	Val	V
Будь-яка амінокислота, як вказано вище	Xaa	X

Таблиця 2

Нетрадиційна амінокислота	Код	Нетрадиційна амінокислота	Код
орнітин	Orn	гідроксипролін	Hyp
α -аміномасляна кислота	Abu	амінонорборнілкарбоксилат	Norb
D-аланін	Dala	аміноциклопропанкарбоксилат	Cpro
D-аргінін	Darg	N-(3-гуанідинопропіл)гліцин	Narg
D-аспарагін	Dasn	N-(карбамілметил)гліцин	Nasn
D-аспарагінова кислота	Dasp	N-(карбоксиметил)гліцин	Nasp
D-цистеїн	Dcys	N-(тіометил)гліцин	Ncys

D-глутамін	Dgln	N-(2-карбамілетил)гліцин	Ngln
D-глутамінова кислота	Dglu	N-(2-карбоксиетил)гліцин	Nglu
D-гістидин	Dhis	N-(імідазоліетил)гліцин	Nhis
D-ізолейцин	Dile	N-(1-метилпропіл)гліцин	Nile
D-лейцин	Dleu	N-(2-метилпропіл)гліцин	Nleu
D-лізин	Dlys	N-(4-амінобутил)гліцин	Nlys
D-метіонін	Dmet	N-(2-метилтіоетил)гліцин	Nmet
D-орнітин	Dorn	N-(3-амінопропіл)гліцин	Norn
D-фенілаланін	Dphe	N-бензилгліцин	Nphe
D-пролін	Dpro	N-(гідроксиметил)гліцин	Nser
D-серин	Dser	N-(1-гідроксиетил)гліцин	Nthr
D-треонін	Dthr	N-(3-індолілетил)гліцин	Nhtrp
D-триптофан	Dtrp	N-(п-гідроксифеніл)гліцин	Ntyr
D-тирозин	Dtyr	N-(1-метилетил)гліцин	Nval
D-валін	Dval	N-метилгліцин	Nmgly
D-N-метилаланін	Dnmala	L-N-метилаланін	Nmala
D-N-метиларгінін	Dnmarg	L-N-метиларгінін	Nmarg
D-N-метиласпарагін	Dnmasn	L-N-метиласпарагін	Nmasn
D-N-метиласпаратат	Dnmasp	L-N-метиласпарагінова кислота	Nmasp
D-N-метилцистеїн	Dnmcys	L-N-метилцистеїн	Nmcys
D-N-метилглутамін	Dnmgln	L-N-метилглутамін	Nmgln
D-N-метилглутамат	Dnmglu	L-N-метилглутамінова кислота	Nmglu
D-N-метилгістидин	Dnmhis	L-N-метилгістидин	Nmhis
D-N-метилізолейцин	Dnmile	L-N-метилізолейцин	Nmile
D-N-метиллейцин	Dnmleu	L-N-метиллейцин	Nmleu
D-N-метиллізин	Dnmlys	L-N-метиллізин	Nmlys
D-N-метилметіонін	Dnmmet	L-N-метилметіонін	Nmmet
D-N-метилорнітин	Dnmorn	L-N-метилорнітин	Nmorn
D-N-метилфенілаланін	Dnmphe	L-N-метилфенілаланін	Nmphe
D-N-метилпролін	Dnmpro	L-N-метилпролін	Nmpro
D-N-метилсерин	Dnmser	L-N-метилсерин	Nmser
D-N-метилтреонін	Dnmthr	L-N-метилтреонін	Nmthr
D-N-метилтриптофан	Dnmtrp	L-N-метилтриптофан	Nmtrp
D-N-метилтирозин	Dnmtyr	L-N-метилтирозин	Nmtyr
D-N-метилвалін	Dnmval	L-N-метилвалін	Nmval
L-норлейцин	Nle	L-N-метилнорлейцин	Nmnle
L-норвалін	Nva	L-N-метилнорвалін	Nmnva
L-етилгліцин	Etg	L-N-метил-етилгліцин	Nmetg
L-трет-бутилгліцин	Tbug	L-N-метил-трет-бутилгліцин	Nmtbug
L-гомофенілаланін	Hphe	L-N-метил-гомофенілаланін	Nmhphe
α -нафтилаланін	Anap	N-метил- α - нафтилаланін	Nmanap
пеніциламін	Pen	N-метилпеніциламін	Nmpen
γ -аміномасляна кислота	Gabu	N-метил- γ - амінобутират	Nmgabu
циклогексилаланін	Chexa	N-метил-циклогексилаланін	Nmchexa
циклопентилаланін	Cpen	N-метил-циклопентилаланін	Nmcpen
α -аміно- α - метилбутират	Aabu	N-метил- α -аміно- α -метилбутират	Nmaabu
α -аміноізомасляна кислота	Aib	N-метил- α -аміноізобутират	Nmaib
D- α -метиларгінін	Dmarg	L- α -метиларгінін	Marg
D- α -метиласпарагін	Dmasn	L- α -метиласпарагін	Masn
D- α -метиласпартат	Dmasp	L- α -метиласпартат	Masp
D- α -метилцистеїн	Dmcys	L- α -метилцистеїн	Mcys
D- α -метилглутамін	Dmgln	L- α -метилглутамін	Mgln
D- α -метилглутамінова кислота	Dmglu	L- α -метилглутамат	Mglu
D- α -метилгістидин	Dmhis	L- α -метилгістидин	Mhis
D- α -метилізолейцин	Dmile	L- α -метилізолейцин	Mile
D- α -метиллейцин	Dmleu	L- α -метиллейцин	Mleu
D- α -метиллізин	Dmlys	L- α -метиллізин	Mlys
D- α -метилметіонін	Dmmet	L- α -метилметіонін	Mmet

D-α-метилорнітин	Dmorn	L-α-метилорнітин	Morn
D-α-метилфенілаланін	Dmphe	L-α-метилфенілаланін	Mphe
D-α-метилпролін	Dmpro	L-α-метилпролін	Mpro
D-α-метилсерин	Dmser	L-α-метилсерин	Mser
D-α-метилтреонін	Dmthr	L-α-метилтреонін	Mthr
D-α-метилтриптофан	Dmtrp	L-α-метилтриптофан	Mtrp
D-α-метилтирозин	Dmtyr	L-α-метилтирозин	Mtyr
D-α-метилвалін	Dmval	L-α-метилвалін	Mval
N-циклобутилгліцин	Ncbut	L-α-метилнорвалін	Mnva
N-циклогептилгліцин	Nchep	L-α-метилетилгліцин	Metg
N-циклогексилгліцин	Nchex	L-α-метил-трет-бутилгліцин	Mtbug
N-циклодецилгліцин	Ncdec	L-α-метил-гомофенілаланін	Mhphe
N-циклододецилгліцин	Ncdod	α-метил-α-нафтилаланін	Manap
N-циклооктилгліцин	Ncoct	α-метилпеніциламін	Mpen
N-циклопропілгліцин	Ncpro	α-метил-α-амінобутират	Mgab
N-циклоундецилгліцин	Ncund	α-метил-циклогексилаланін	Mchexa
N-(2-аміноетил)гліцин	Naeg	α-метил-циклопентилаланін	Mcpen
N-(2,2-дифенілетил)гліцин	Nbhm	N-(N-(2,2-дифенілетил)карбамілметил-гліцин	Nnbhm
N-(3,3-дифенілпропіл)гліцин	Nbhe	N-(N-(3,3-дифенілпропіл)карбамілметил-гліцин	Nnbhe
1-карбокси-1-(2,2-дифенілетиламіно)циклопропан	Nmbc	1,2,3,4-тетрагідроізохінолін-3-карбонова кислота	Tic
фосфосерин	pSer	фосфотреонін	pThr
фосфотирозин	pTyr	О-метил-тирозин	
2-аміноадипінова кислота		гідроксилізін	

Таблиця 2. Продовження

Амінокислоти пептидів винаходу можуть бути замінені консервативно або неконсервативно.

- Використовуваний в цьому документі термін "консервативна заміна" відноситься до заміни амінокислоти, присутньої в нативній послідовності в пептиді, на ті, що зустрічаються в природі або не зустрічаються в природі, аміно- або пептидоміметики, що характеризуються аналогічними стеричними властивостями. Якщо бічний ланцюг нативної амінокислоти, яку необхідно замінити, є полярним або гідрофобним, консервативна заміна повинна відбуватися на природну амінокислоту, неприродну амінокислоту або пептидоміметичний фрагмент, який також є полярним або гідрофобним (у додаток до тих самих стеричних властивостей, що і бічний ланцюг заміненої амінокислоти).

- Оскільки амінокислоти, що зустрічаються в природі, як правило, групуються відповідно до їх властивостей, консервативні заміни амінокислотами, що зустрічаються в природі, можуть бути легко визначені з урахуванням того факту, що відповідно до даного винаходу розглядається заміна заряджених амінокислот на стеричні схожі незаряджені амінокислоти в якості консервативних замін.

- Для отримання консервативних замін амінокислотами, що не зустрічаються в природі, також можна використовувати аналоги амінокислот (синтетичні амінокислоти), добре відомі в цій галузі техніки. Пептидоміметик амінокислоти, що зустрічається в природі, добре описаний в літературі, відомій кваліфікованому практикуючому фахівцеві.

При використанні консервативних замін амінокислота, що замінює, повинна містити таку ж або аналогічну функціональну групу в бічному ланцюзі, що і вихідна амінокислота.

- Використовувана в цьому документі фраза "неконсервативні заміни" відноситься до заміни амінокислоти, присутньої у вихідній послідовності, іншою природною або неприродною амінокислотою, яка характеризується іншими електрохімічними та/або стеричними властивостями. Таким чином, бічний ланцюг амінокислоти, що замінює, може бути значно більшим (або меншим), ніж бічний ланцюг замінювальної нативної амінокислоти, і/або може містити функціональні групи із тими, що значно відрізняються, електронними властивостями, ніж заміщувальна амінокислота. Приклади неконсервативних замін цього типу включають в себе заміну фенілаланіну або циклогексилметилгліцину на аланін, ізолейцин на гліцин або -NH-CH[(-CH₂)₅-COOH]-CO- на аспарагінову кислоту. Ті неконсервативні заміни, які підпадають

під обсяг даного винаходу, являють собою заміни, які все ще складають пептид, що має антибактеріальні властивості.

Як згадувалося, N- і C-кінці пептидів винаходу можуть бути захищені функціональними групами. Відповідні функціональні групи описані в Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991, ідеї яких включені в цей документ за допомогою посилання. Кращими захисними групами є ті, які полегшують транспорт приєднаної до них сполуки в клітину, наприклад, за рахунок зниження гідрофільності і збільшення ліпофільності сполук.

Ці фрагменти можна розщеплювати *in vivo* або шляхом гідролізу, або ферментативно всередині клітини. Гідроксильні захисні групи включають в себе складні ефіри, карбонати і карбаматні захисні групи. Захисні групи аміну включають в себе алкокси- і арилоксикарбонильні групи, як описано вище для N-кінцевих захисних груп. Захисні групи карбонових кислот включають в себе аліфатичні, бензилові й арилові ефіри, як описано вище для C-кінцевих захисних груп. Згідно з одним варіантом здійснення група карбонової кислоти в бічному ланцюзі одного або декількох залишків глутамінової кислоти або аспарагінової кислоти в пептиді даного винаходу захищена, переважно, метиловим, етиловим, бензиловим або заміщеним бензиловим складним ефіром.

Приклади N-кінцевих захисних груп включають в себе ацильні групи (-CO-R1) і алкоксикарбонильні або арилоксикарбонильні групи (-CO-O-R1), де R1 являє собою аліфатичну, заміщену аліфатичну, бензильну, заміщену бензильну, ароматичну або заміщену ароматичну групу. Конкретні приклади ацильних груп включають в себе ацетил, (етил-CO-, н-пропіл-CO-, ізопропіл-CO-, н-бутил-CO-, втор-бутил-CO-, трет-бутил-CO-, гексил, лауроїл, пальмітоїл, миристоїл, стеарил, олеоїлфеніл-CO-, заміщений феніл-CO-, бензил-CO- і (заміщений бензил)-CO-. Приклади алкоксикарбонильних і арилоксикарбонильних груп включають в себе CH₃-O-CO-, (етил)-O-CO-, н-пропіл-O-CO-, ізопропіл-O-CO-, н-бутил-O-CO-, втор-бутил-O-CO-, трет-бутил-O-CO-, феніл-O-CO-, заміщений феніл-O-CO- и бензил-O-CO-, (заміщений бензил)-O-CO-. Адамantan, нафтаден, миристолеїл, толуол, бифеніл, циннамоїл, нітробензол, толуоїл, фуроїл, бензоїл, циклогексан, норборнан, Z-капронова кислота. Щоб полегшити N-ацилювання, на N-кінці молекули можуть бути присутні від одного до чотирьох залишків гліцину.

Карбоксильна група на C-кінці сполуки може бути захищена, наприклад, амідом (тобто гідроксильна група на C-кінці заміщена на -NH₂, -NHR₂ і -NR₂R₃) або складним ефіром (тобто гідроксильна група на C-кінці заміщена на -OR₂). R₂ і R₃ незалежно являють собою аліфатичну, заміщену аліфатичну, бензильну, заміщену бензильну, арильну або заміщену арильну групу. Крім того, взяті разом з атомом азоту, R₂ і R₃ можуть утворювати гетероциклічне кільце від C4 до C8 з приблизно 0-2 додатковими гетероатомами, такими як азот, кисень або сірка. Приклади відповідних гетероциклічних кілець включають в себе піперидиніл, піролідиніл, морфоліно, тіоморфоліно або піперазиніл. Приклади C-кінцевих захисних груп включають в себе -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -NH(етил), -N(етил)₂, -N(метил)(етил), -NH(бензил), -N(C1-C4 алкіл)(бензил), -NH(феніл), -N(C1-C4 алкіл) (феніл), -OCH₃, -O-(етил), -O-(н-пропіл), -O-(н-бутил), -O-(ізопропіл), -O-(втор-бутил), -O-(трет-бутил), -O-бензил і -O-феніл.

Пептиди за цим винаходом можуть також містити неамінокислотні фрагменти, такі як, наприклад, гідрофобні фрагменти (різні лінійні, розгалужені, циклічні, поліциклічні чи гетероциклічні вуглеводні і вуглеводневі похідні), приєднані до пептидів; засоби, що не проникають в пептиди; різні захисні групи, особливо якщо сполука є лінійною, які приєднані до кінців сполуки для зменшення деградації. Хімічні (не амінокислотні) групи, присутні в сполуки, можуть бути включені для поліпшення різних фізіологічних властивостей, таких як: зменшена деградація або кліренс; зниження відштовхування різними клітинними насосами, поліпшення імунотенної активності, поліпшення різних способів введення (таких як приєднання різних послідовностей, які дозволяють проникати через різні бар'єри, через кишечник тощо); підвищена специфічність, підвищена афінність, знижена токсичність і т.п.

Приєднання компонента амінокислотної послідовності пептидів за цим винаходом до інших не амінокислотних засобів може відбуватися шляхом ковалентного зв'язування, утворенням нековалентного комплексу, наприклад, утворенням комплексу з гідрофобним полімером, який може руйнуватися або розщеплюватися з утворенням сполуки, здатної до пролонгованого вивільнення; шляхом захоплення амінокислотної частини пептиду ліпосомами або міцелами з отриманням кінцевого даного винаходу. Зв'язок може відбуватися шляхом захоплення амінокислотної послідовності іншим компонентом (ліпосоми, міцели) або імпрегнування амінокислотної послідовності в полімер з отриманням кінцевого пептиду за цим винаходом.

Згідно з конкретним варіантом здійснення пептид приєднаний до фрагменту, що проникає в клітину.

Використовуваний в цьому документі термін "здатний проникати в клітину фрагмент" відноситься до фрагмента (наприклад, ліпіди, наприклад, пальмітинової кислоти), який посилює транслокацію приєднаного пептиду через клітинну мембрану. Згідно з конкретним варіантом здійснення фрагмент, здатний проникати в клітину, не є пептидним фрагментом. Фрагмент

може бути приєднаний до N- або C-кінця. Пептиди за цим винаходом можуть бути лінійними або циклічними (циклізація може поліпшити стабільність). Циклізація може відбуватися будь-якими способами, відомими у цій галузі техніки. Якщо сполука складається переважно з амінокислот, циклізація може відбуватися через N- до C-кінця, N-кінець до бічного ланцюга і N-кінець до основного ланцюга, C-кінець до бічного ланцюга, C-кінець до основного ланцюга, бічний ланцюг до основного ланцюга і бічний ланцюг до бічного ланцюга, а також циклізація від основного ланцюга до основного ланцюга. Циклізація пептиду може також відбуватися через неамінокислотні органічні фрагменти, що містяться в пептиді.

Автори винаходу також розглядають штапельні пептиди.

Термін "штапельний пептид" в контексті даного опису відноситься до пептиду, що має обрану кількість стандартних або нестандартних амінокислот і, крім того, має щонайменше дві частини, здатні вступати в реакцію, що сприяє утворенню вуглець-вуглецевого зв'язку, який контактував з реагентом для створення щонайменше одного засобу, що зшиває, між щонайменше двома фрагментами, який модулює, наприклад, стабільність пептиду.

Використовуваний в цьому документі термін "штапельювання" вводить в пептид щонайменше два фрагмента, здатні вступати в реакцію, що сприяє утворенню вуглець-вуглецевого зв'язку, які можуть контактувати з реагентом для утворення щонайменше одного засобу, що зшиває, між щонайменше двома фрагментами. Штапельювання накладає обмеження на вторинну структуру, таку як структура α -спіралі. Довжину і геометрію засобу, що зшиває, можна оптимізувати, щоб поліпшити вихід бажаного змісту вторинної структури. Забезпечуване обмеження може, наприклад, запобігти розгортанню вторинної структури і/або може посилити форму вторинної структури. Наприклад, вторинна структура, яка не може розгортатися, більш стійка.

Пептиди за даним винаходом можна синтезувати біохімічно, наприклад, з використанням стандартних твердофазних технологій. Ці способи передбачають виключно твердофазний синтез, способи часткового твердофазного синтезу, конденсацію фрагментів, класичний синтез з розчинів. Процедури твердофазного поліпептидного синтезу добре відомі в цій області техніки і додатково описані John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

Великомасштабний синтез пептидів описаний в Andersson *Biopolymers* 2000; 55 (3): 227-50.

Синтетичні пептиди можна очищати за допомогою препаративної високоефективної рідинної хроматографії [Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y.], склад яких можна підтвердити за допомогою амінокислотного секвенування.

Рекомбінантні технології також можуть використовуватися для отримання пептидів за цим винаходом. Для отримання пептиду за даним винаходом з використанням рекомбінантної технології полінуклеотид, що кодує пептид винаходу, легують у вектор експресії нуклеїнової кислоти, який містить полінуклеотидну послідовність під контролем транскрипції цис-регуляторної послідовності (наприклад, промоторної послідовності), підходящої для управління конститутивною, тканеспецифічною або індукційною транскрипцією поліпептидів даного винаходу в клітинах-господарях.

Крім того, що пептиди винаходу можуть бути синтезовані в клітинах-господарях, вони також можуть бути синтезовані з використанням систем експресії *in vitro*. Ці способи добре відомі в цій області техніки, і компоненти системи комерційно доступні.

Описані в цьому документі пептиди здатні знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей, наприклад, після ін'єкції (IP) 100 мкг дексаметазону.

Згідно з іншим варіантом здійснення описані в цьому документі пептиди здатні втручатися і блокувати секрецію як TNF- α , так і IL-6 клітинами макрофагів у відповідь на вроджені активатори, такі як ліпополісахарид (LPS) і олігонуклеотиди CpG.

Додатково або альтернативно, описані в цьому документі пептиди здатні знижувати, запобігати або пригнічувати апоптоз в клітині. Незалежно від механізму, за допомогою якого пептиди за даним винаходом опосередковують стресові реакції, і не бажаючи зв'язуватися будь-якої теорією або механізмом дії, постулюється, що пептиди можуть бути здатні зв'язувати р53, таким чином запобігаючи зв'язуванню р53 з пошкодженими ДНК. Пептид може бути протестований шляхом аналізу його здатності пригнічувати відповідь на гіпертермію клітинної

лінії L12 (яка позбавлена ендогенної активності p53 і була стабільно трансфікована геном p53 або контрольним вектором). У цих клітинах активність p53 викликає зупинку росту і виживання клітин, а не апоптоз у відповідь на гіпертермію (як описано в публікації міжнародної заявки WO2012/160563, зміст якої включено в цьому документі за допомогою посилання).

Способи вимірювання апоптозу. Апоптоз являє собою активний генно-спрямований процес самознищення клітини, пов'язаний з характерними морфологічними і біохімічними змінами. Ядерна та цитоплазматична конденсація і фрагментація вмираючої клітини на мембранно-зв'язані апоптичні тільця є типовими характеристиками апоптозу. Іншою особливістю апоптичної загибелі клітин є деградація хромосомної ДНК на олігонуклеосомні фрагменти після активації специфічними нуклеазами.

Під "інгібуванням апоптозу" або "пригніченням апоптичної активності" мається на увазі будь-яке зменшення кількості клітин, які зазнають апоптоз, в порівнянні з необробленим контролем (тобто клітини, які не піддалися впливу пептидів за цим винаходом). Переважно зменшення становить щонайменше 25 %, більш переважно зменшення становить щонайменше 50 % і найбільш переважно зменшення становить щонайменше однократно.

Проточна цитометрія пропонує широкий спектр можливостей для вимірювання апоптозу. Були розроблені і впроваджені різні способи, деякі з яких забарвлюють поверхню клітин, а деякі - внутрішньоклітинно.

Одним з перших підходів було, крім спостереження, що апоптичні клітини стискаються і мають більш високу внутрішньоклітинну гранулярність, фарбувати ДНК-специфічними флуорохромами (наприклад, йодидом пропідію [PI], бромидом етидію [EtBr]). Як тільки наноситься смертельний удар, ДНК починає змінювати свій профіль. Апоптична ДНК не тільки складається з фрагментованої ДНК (візуалізованої у вигляді більш коротких смуг, так званої сходинок ДНК, в агарозному гелі), але також частково розщеплюється на окремі нуклеотиди, так що флуорохром, такі як PI або EtBr, мають менше ДНК для фарбування (Nicoletti et al., 1991). Як правило, це спостерігається по зрушенню ліворуч, званому піком суб-G1, на конкретному каналі виявлення флуорохрома в FACScan™ (від Becton Dickinson, США).

Інший спосіб полягає в опосередкованому термінальною дезоксирибонуклеотидилтрансферазою (TdT) мічення кінців розривів ланцюга ДНК (TUNEL). Спосіб TUNEL виявляє розриви ланцюга ДНК в клітинах, які піддаються апоптозу. TdT являє собою фермент, який каталізує приєднання дезоксирибонуклеотидтрифосфату до 3'-ОН кінців двох-або одноланцюгової ДНК. На відміну від нормальних клітин, ядра апоптичних клітин містять екзогенні нуклеотиди (dUTP)-DIG в присутності TdT. Фрагмент антитіла до DIG з кон'югованим флуорохромом дозволяє візуалізувати апоптичні клітини. Збільшення кількості апоптичних клітин викликає більшу кількість фрагментів ДНК і, отже, більш яскраву флуоресценцію. Перевагою цього способу є дуже висока специфічність (Gavrieli et al., 1992). Недоліком цього способу є те, що він дорогий і може використовуватися тільки для невеликого набору зразків, так як це вимагає багато часу. Отже, це не застосовується для великих програм скринінгу.

Втрата полярності клітинної мембрани і представлення підвищених кількостей фосфатидилсерина (PS) на зовнішній стороні клітинної мембрани під час ранньої фази апоптозу привели до ще одного нового підходу. Аннексин V являє собою кальцій-залежний зв'язуючий фосфоліпід білок з високою спорідненістю до PS. Цілісність клітинної мембрани зберігається на ранній і проміжній фазах апоптозу. Клітини раннього і проміжного апоптозу демонструють підвищене зв'язування аннексина-FITC і в основному негативні для фарбування PI. Пізні стадії апоптозу і некротичні клітини стають двічі позитивними через презентацію PS на поверхні і фарбування внутрішньоклітинних нуклеїнових кислот PI через розпад мембрани. Цей спосіб також дорогий і трудомісткий.

Інші способи вимірювання апоптозу in vivo та in vitro розкриті в патентах США № 6726895 та 6723567.

Таким чином, згідно з першим аспектом даного винаходу передбачений виділений пептид, довжина якого не перевищує шести амінокислот, який містить амінокислотну послідовність, представлену формулою $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO: 1),

(i) де X_1 являє собою пролін або його аналог або похідне;

(ii) де X_2 являє собою пролін або його аналог або похідне;

(iii) де X_3 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, лейцину, цистеїну, ізолейцину, метіоніну та їх похідного або аналога;

(iv) де X_4 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, серину, проліну та їх похідного або аналога;

(v) де X_5 являє собою будь-яку амінокислоту і

(vi) де пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси

селезінки та/або тимуса у мишей.

Пептид згідно з цим аспектом даного винаходу може становити в довжину п'ять або шість амінокислот.

5 Переважно амінокислоти обрані таким чином, щоб пептидний зв'язок між X_1 і X_2 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації, тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації; і пептидний зв'язок між X_3 і X_4 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у транс-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік транс-конфігурації.

10 Способи тестування цис/транс-конфігурації пептидного зв'язку відомі в цій області техніки і передбачають, наприклад, ЯМР.

Згідно з одним варіантом здійснення X_4 вибраний з групи, що складається з аланіну, проліну, похідного або аналога аланіну і похідного або аналога проліну.

15 Згідно з конкретним варіантом здійснення похідне або аналог проліну являє собою N-метилпролін, альфа-метилпролін або α -аміномасляну кислоту.

Згідно з одним варіантом здійснення пептид містить послідовність, наведену в SEQ ID NO: 3 (PPLPY).

Згідно з іншим варіантом здійснення пептид складається з послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 3 (PPLPY).

20 Згідно з іншим варіантом здійснення пептид складається з послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 7 (LPPLPY).

Згідно з конкретним варіантом здійснення X_1 і/або X_3 можуть являти собою D-амінокислоти, такі як пептид, наведений в SEQ ID NO: 20 (d-LPPLPY).

25 Згідно з іншим аспектом даного винаходу передбачений виділений пептид, що складається не більше ніж з десяти амінокислот, який містить амінокислотну послідовність, представлену формулою X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 (SEQ ID NO: 17),

(i) де X_1 являє собою пролін або його аналог або похідне;

(ii) де X_2 являє собою пролін або його аналог;

30 (iii) де X_3 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, лейцину, цистеїну, ізолейцину, метіоніну та їх похідного або аналога;

(iv) де X_4 вибраний з групи, що складається з аланіну, валіну, серину та їх похідного або аналога;

(v) де X_5 являє собою будь-яку амінокислоту;

(vi) де X_6 являє собою пролін або його аналог або похідне і

35 (vii) де пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

40 Переважно амінокислоти обрані таким чином, щоб пептидний зв'язок між X_1 і X_2 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації, тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації; і пептидний зв'язок між X_3 і X_4 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у транс-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік транс-конфігурації; і пептидний зв'язок між X_5 і X_6 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації.

45 Згідно з одним варіантом здійснення пептид цього аспекту даного винаходу становить в довжину 6 амінокислот.

Прикладом такого пептиду є пептид, наведений в SEQ ID NO: 18 (PPLAYP).

50 Переважні неприродні амінокислоти, які можна використовувати для заміни проліну, включають в себе, без обмеження, N-метилпролін, альфа-метилпролін і α -аміномасляну кислоту.

Автори цього винаходу розглядають додаткову амінокислоту, приєднану до N-кінця X_1 SEQ ID NO: 17.

55 Додаткова амінокислота переважно вибирається так, щоб пептидний зв'язок між нею і X_1 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації.

Кандидати в амінокислоти включають в себе, без обмеження, аланін, валін, лейцин, цистеїн, ізолейцин, метіонін та їх похідне або аналог.

60 Згідно з конкретним варіантом здійснення додаткова амінокислота, приєднана до N-кінця X_1 ,

являє собою лейцин або його похідне або аналог.

Згідно з додатковим варіантом здійснення додаткова амінокислота, приєднана до N-кінця X_1 , являє собою D-амінокислоту.

Таким чином, автори винаходу представляють пептиди, що містять 7 амінокислот і мають формулу, наведену в SEQ ID NO: 17.

Згідно з конкретним варіантом здійснення X_4 являє собою аланін або його аналог або похідне.

Згідно з ще одним варіантом здійснення X_5 вибраний з групи, що складається з тирозину, фенілаланіну, триптофану та їх похідного або аналога.

Прикладом амінокислоти, яка розглядається в якості X_5 , є тирозин.

Прикладом амінокислоти, яка розглядається в якості X_3 , є лейцин.

Пептид цього аспекту винаходу може містити амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 4 (LPPLAYP). Такий пептид може складатися з 7, 8, 9 або 10 амінокислот.

Пептид цього аспекту даного винаходу може складатися з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 4.

Для пептидів цього аспекту даного винаходу X_1 і/або X_3 і/або X_5 можуть являти собою D-амінокислоти, такі як, наприклад, d-LPPLAYP (SEQ ID NO: 21).

Для будь-якого з пептидів, описаних в цьому документі, даний винахід також розглядає ретро-інверсні пептиди. Такі пептиди стійкі до протеаз і складаються з D-амінокислот у зворотному порядку, що призводить до зміни основного ланцюга пептиду, але незмінної орієнтації бічних ланцюгів.

Згідно ще одному аспекту даного винаходу передбачений інший виділений пептид, що складається з п'яти амінокислот, який складається з амінокислотної послідовності, представленої формулою X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 (SEQ ID NO: 5), де

(i) X_1 і X_3 являють собою будь-які амінокислоти;

(ii) X_2 являє собою пролін або його аналог або похідне;

(iii) X_4 не являє собою пролін;

(iv) пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

Переважаю амінокислоти обрані так, щоб пептидний зв'язок між X_1 - X_2 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації; і пептидний зв'язок між X_3 - X_4 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у транс-конфігурації, тобто рівновагу було зміщено в бік транс-конфігурації.

Згідно з ще одним аспектом даного винаходу передбачений виділений пептид, що складається з семи амінокислот, який складається з амінокислотної послідовності, представленої формулою X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 6), де

(i) X_1 , X_5 і X_6 являють собою будь-які амінокислоти;

(ii) X_2 , X_3 і X_7 являють собою пролін або його аналог або похідне;

(iii) X_4 не являє собою пролін і

(iv) пептид здатний знижувати кількість індукованої дексаметазоном втрати маси селезінки та/або тимуса у мишей.

Переважаю амінокислоти обрані так, щоб пептидний зв'язок між X_1 - X_2 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації; пептидний зв'язок між X_2 - X_3 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації; пептидний зв'язок між X_6 - X_7 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у цис-конфігурації - тобто рівновагу було зміщено в бік цис-конфігурації; і пептидний зв'язок між X_4 - X_5 (щонайменше 50 % часу, щонайменше 60 % часу, щонайменше 70 % часу, щонайменше 80 % часу або навіть 90 % часу) перебував у транс-конфігурації, тобто рівновага була зміщена в бік транс-конфігурації.

Описані в цьому документі пептиди можна використовувати для лікування багатьох захворювань, включаючи в себе ті, які пов'язані зі стрес-асоційованими відповідями. До них відносяться патологічні стани, такі як нейродегенеративні захворювання (наприклад, інсульт, хвороба Паркінсона і хвороба Альцгеймера), інфаркт міокарда, вплив радіації або хіміотерапевтичних засобів, запалення, травми (наприклад, опіки і пошкодження центральної нервової системи), клітинне старіння, гіпертермія, судоми, гіпоксії (наприклад, ішемія і інсульт),

а також в тканинах і органах трансплантата до трансплантації.

Ці стани також включають в себе аутоімунні захворювання, що характеризуються станом імунізації людини щонайменше проти одного з нормальних компонентів організму. Ці явища спостерігаються, зокрема, при патологіях, що включають в себе, без обмеження, інфекції, пов'язані з SLE (системний червоний вовчак), синдромом Гугеро-Шегрена (або хворобою Шегрена) і ревматоїдний поліартрит, а також при таких патологіях, як саркоїдоз і остеопенія, спондилоартрит, склеродермія, розсіяний склероз, бічний аміотрофічний склероз (ALS), гіпертиреоз, хвороба Аддісона, аутоімунна гемолітична анемія, хвороба Крона, синдром Гудпасчера, хвороба Грейвса, тиреоїдит Хашимото, ідіопатична пурпура, геморагія, інсулінозалежний цукровий діабет, міастенія, вульгарна пухирчатка, перніціозна анемія, постстрептококовий гломерулонефрит, псоріаз і спонтанне безпліддя, а також негайні або відстрочені явища, які спостерігаються під час відторгнення трансплантата і реакції "трансплантат проти господаря". Відповідно до одного конкретного варіанту здійснення пептиди даного винаходу застосовні для лікування розсіяного склерозу. Згідно з іншим варіантом здійснення пептиди даного винаходу застосовні для лікування ішемії або інфаркту міокарда.

Інші захворювання, що розглядаються в даному винаході, включають в себе, без обмеження, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, вторинну дегенерацію після травми, інсульт, інтоксикацію ЦНС, глаукому, макулярну дегенерацію, цукровий діабет 1 типу, розсіяний склероз, системний червоний вовчак, аутоімунний увеїт, хворобу трансплантат проти господаря, відторгнення трансплантата, артрит, синдром системної запальної реакції (SIRS), запальне захворювання кишечника (IBD), респіраторний дистрес-синдром (ARDS) у дорослих, псоріаз, атеросклероз, інфаркт міокарда, променева хвороба, гіпертермія, гіпоксія, миттєва токсична печінка, ниркова недостатність, безпліддя і багато інших.

Феномен відторгнення трансплантата являє собою стан імунізації людини проти сторонніх компонентів (біологічних рідин, таких як кров, спинномозкова рідина тощо, клітин, тканин, органів, антитіл тощо), навмисно імплантованих пацієнтові.

Використовувані в цьому документі терміни "дегенеративний розлад", "дегенеративне захворювання" і "дегенеративний стан" відносяться до будь-якого порушення, захворювання або стану, що характеризується невідповідною проліферацією клітин або невідповідною загибеллю клітин, або, в деяких випадках, і тим, і іншим, або аберрантним або нерегульованим апоптозом. Ці стани також включають в себе стани, при яких надмірний апоптоз, хоча і доречний і регулюється на рівні окремої клітини, пов'язаний з дисфункцією або відмовою органу.

Згідно з одним варіантом здійснення пептиди застосовні для запобігання загибелі клітин в незлоякісній тканині або клітинах у суб'єкта, що страждає неопластичним захворюванням і проходить хіміотерапію і/або променеву терапію для лікування раку.

Використовувані в цьому документі терміни "запальне захворювання" і "запальний стан" означає будь-яке захворювання або стан, при якому надмірна або нерегульована запальна реакція призводить до надмірних запальних симптомів, пошкодження тканини господаря або втрати функції тканини.

Згідно з одним варіантом здійснення запальне захворювання або стан являє собою аутоімунне захворювання.

Згідно з іншим варіантом здійснення запальне захворювання або стан характеризується етіологією, пов'язаною з виробництвом щонайменше одного прозапального цитокіна, обраного з IL-6 і TNF- α .

Згідно з іншим варіантом здійснення захворювання або стан вибрано з групи, що складається з: хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, вторинної дегенерації після травми, інсульту, інтоксикації ЦНС, глаукоми, макулярної дегенерації, інфаркту міокарда, променевої хвороби, гіпертермії, гіпоксії, фульмінантно-токсичної печінки, ниркової недостатності і безпліддя.

Згідно з ще одним варіантом здійснення захворювання включає в себе пігментний ретиніт і макулярну дегенерацію.

Згідно з іншим варіантом здійснення захворювання включає в себе інсульт або інфаркт міокарда.

Пептиди можуть бути передбачені самі по собі або як частина фармацевтичної композиції, де вони змішані з відповідними носіями або допоміжними речовинами.

Використовуваний в цьому документі термін "фармацевтична композиція" відноситься до препарату одного або декількох активних інгредієнтів, описаних в цьому документі, з іншими хімічними компонентами, такими як фізіологічно відповідні носії і допоміжні речовини. Призначення фармацевтичної композиції полягає в тому, щоб полегшити введення сполуки в

організм.

У цьому документі термін "активний інгредієнт" відноситься до пептидів, відповідальних за біологічний ефект.

У цьому документі і далі фрази "фізіологічно прийнятний носій" і "фармацевтично прийнятний носій", які можуть використовуватися як взаємозамінні, відносяться до носія або розріджувача, який не викликає значного подразнення організму і не скасовує біологічну активність і властивості сполуки, що вводиться. Під цими фразами включено допоміжний засіб.

Приготування фармацевтичних композицій, що містять пептиди або поліпептиди в якості активних інгредієнтів, добре відомо у цій галузі техніки. Як правило, такі композиції готують за призначенням або у вигляді рідких розчинів, або у вигляді суспензій, однак також можуть бути приготовлені тверді форми, які можуть бути суспендовані або солюбілізовані перед ін'єкцією. Також препарат можна емульгувати. Активний терапевтичний інгредієнт змішують з неорганічними і/або органічними носіями, які є фармацевтично прийнятними і сумісними з активним інгредієнтом. Носії являють собою фармацевтично прийнятні допоміжні речовини (наповнювачі), що містять більш-менш інертні речовини, при додаванні до фармацевтичної композиції для додавання композиції підходящої консистенції або форми. Відповідними носіями є, наприклад, вода, фізіологічний розчин, глюкоза, гліцерин, етанол і т.п. та їх комбінації. Крім того, при бажанні композиція може містити незначну кількість допоміжних речовин, таких як змочуючі або емульгуючі засоби і буферні засоби рН, які підвищують ефективність активного інгредієнта.

Токсичність і терапевтична ефективність описаних в цьому документі пептидів можна визначити стандартними фармацевтичними процедурами на культурах клітин або експериментальних тваринах, наприклад, шляхом визначення IC50 (концентрація, що забезпечує 50 % інгібування) і LD50 (летальна доза, що викликає смерть 50 % тестованих тварин) для досліджуваної сполуки. Дані, отримані в результаті цих аналізів клітинних культур і досліджень на тваринах, можна використовувати для визначення діапазону доз для застосування у людини. Дозування може варіюватися в залежності від застосовуваної лікарської форми і використововуваного шляху введення. Точний склад, спосіб введення та дозування можуть бути обрані індивідуальним лікарем з урахуванням стану пацієнта. (Дивіться, наприклад, Fingl et al., 1975).

Кількість активного засобу, який використовується в композиції для введення за даним винаходом, являє собою кількість, ефективну для досягнення мети конкретного активного засобу для цільового показання. Кількість активного засобу в композиціях, як правило, являє собою фармакологічно, біологічно, терапевтично або хімічно ефективну кількість. Однак ця кількість може бути меншою, ніж кількість, коли композиція застосовується в одиничній дозованій формі, оскільки одинична дозована форма може містити багато сполук або активних засобів в одній композиції або може містити розділені фармакологічно, біологічно, терапевтично або хімічно ефективні кількості. Загальну ефективну кількість потім можна вводити в кумулятивних одиницях, що містять в цілому ефективну кількість активного засобу.

Терапевтично ефективна кількість пептиду за даним винаходом є кількість, яка при введенні пацієнту здатна виявляти антиапоптичну активність і/або протизапальну активність. Аналізи для виявлення антиапоптичної активності пептиду за даним винаходом включають в себе, без обмеження, фарбування ДНК специфічними флуорохромами, такими як йодид пропідію і бромід етидію, аналізи аннексину V, аналізи TUNEL і т.п., деякі необмежувані приклади таких аналізів представлені в прикладах нижче. Аналізи для визначення протизапальної активності пептидів також добре відомі в цій галузі техніки.

Хоча оптимальне дозування пептиду за даним винаходом варіюється в залежності від шляху введення, віку, маси тіла, статі або стану пацієнта і повинно визначатися лікарем в кінці, доза, відповідна для дорослих людей, як правило, може складати приблизно 0,2-2000 мг/кг маси тіла, переважно приблизно 2-200 мг/кг.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом містять одну або декілька сполук за цим винаходом і одну або кілька допоміжних речовин або розріджувачів. Згідно з одним варіантом здійснення одна або кілька сполук, або сольватів, або солей цих сполук.

Використовуваний в цьому документі термін "фармацевтично прийнятна сіль" відноситься до солей, які по суті нетоксичні для живих організмів. Ілюстративні фармацевтично прийнятні солі включають в себе ті солі, які одержують реакцією сполук за даним винаходом з фармацевтично прийнятною мінеральною або органічною кислотою. Такі солі також відомі як кислотно-адитивні солі.

Композиції, що містять сполуки і активні засоби, придатні для доставки активних засобів у вибрані біологічні системи і для збільшення або поліпшення біодоступності активного засобу в

порівнянні з введенням активного засобу без засобу доставки. Доставка може бути поліпшена шляхом доставки більшої кількості активного засобу протягом певного періоду часу або шляхом доставки активного засобу в конкретний період часу (наприклад, для забезпечення більш швидкої або відстроченої доставки) або протягом періоду часу (наприклад, тривала доставка).

5 Таким чином, фармацевтичні композиції для застосування відповідно до даного винаходу можуть бути складені звичайним способом з використанням одного або декількох фізіологічно прийнятних носіїв, які містять допоміжні речовини і допоміжні засоби, які полегшують переробку активних сполук в препарати, які можна використовувати в фармацевтиці. Правильний склад залежить від обраного шляху введення.

10 Фармацевтичні композиції можна вводити місцево або системно будь-яким загальноприйнятним і відповідним шляхом, включаючи в себе, крім іншого, пероральний, внутрішньочеревний, парентеральний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, підшкірний, трансдермальний, інтратекальний, місцевий, ректальний, букальний, інгаляційний або інтраназальний.

15 Для ін'єкції сполуки за даним винаходом можуть бути складені у водних розчинах, переважно у фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний сольовий буфер. Для введення через слизові оболонки в складі використовуються забезпечувальні проникнення речовини, які підходять для проникного бар'єру. Такі забезпечувальні проникнення речовини, наприклад, ДМСО або поліетиленгліколь, як правило, відомі в цій галузі техніки.

20 Фармацевтичні композиції, які можна застосовувати перорально, включають в себе тверді капсули, виготовлені з желатину, а також м'які герметичні капсули з желатину і пластифікатора, такого як гліцерин або сорбіт. Тверді капсули можуть містити активні інгредієнти в суміші з таким наповнювачем, як лактоза, такими сполучними речовинами, як крохмалі, такими змащувальними речовинами, як тальк або стеарат магнію, і, необов'язково, стабілізаторами.

25 У м'яких капсулах активні сполуки можуть бути розчинені або суспендовані у відповідних рідинах, таких як жирні олії, рідкий парафін або рідкі поліетиленгліколи. Крім того, можуть бути додані стабілізатори. Всі склади для перорального введення повинні бути в дозуваннях, які підходять для обраного шляху введення.

30 Альтернативно, сполуки за даним винаходом можуть бути включені в рідкі препарати для перорального застосування, такі як водні або масляні суспензії, розчини, емульсії, сиропи або еліксири, наприклад. Більш того, склади, що містять ці сполуки, можуть бути представлені у вигляді сухого продукту для змішування з водою або іншим відповідним носієм перед застосуванням. Такі рідкі препарати можуть містити звичайні добавки, такі як суспендуючі засоби, такі як сироп сорбіту, метилцелюлоза, сироп глюкози/цукру, желатин, гідроксиетилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, гель стеарату алюмінію і гідрогенізовані харчові жири; емульгуючі засоби, такі як лецитин, моноолеат сорбітану або гуміарабік; неводні наповнювачі (які можуть включати в себе харчові олії), такі як мигдальна олія, фракціонована кокосова олія, масляні складні ефіри, пропіленгліколь і етиловий спирт; і консерванти, такі як метил або пропіл-пара-гідроксibenзоат і сорбінова кислота.

35 Для введення шляхом інгаляції пептиди для застосування відповідно до даного винаходу зручно доставляти в формі аерозольного спрею з упаковки під тиском або розпилювача з використанням відповідного пропелента, наприклад, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану або діоксиду вуглецю. У разі аерозолу під тиском дозована одиниця може бути визначена шляхом забезпечення клапана для доставки відміреної кількості. Капсули і картриджі, наприклад, з желатину для застосування в інгаляторі або інсуфляторі, можуть бути складені з вмістом порошкової суміші пептиду і підходящої порошкової основи, такої як лактоза або крохмаль.

40 Фармацевтичні композиції даного винаходу також застосовні для місцевого застосування і всередині осередку ураження. Використовуваний в цьому документі термін "місцевий" означає "що відноситься до конкретної області поверхні", наприклад, шкірі і слизових оболонках, а місцевий засіб, нанесений на певну область поверхні, вплине тільки на область, на яку він нанесений. Склади пептидів/аналогів пептидів можна вводити місцево у вигляді гелю, мазі, крему, емульсії, складу з уповільненим вивільненням, включаючи в себе трансдермальний пластр, і вони можуть містити ліпосоми і будь-який інший фармацевтично прийнятний носій, що підходить для місцевого введення лікарського засобу. Описані в цьому документі фармацевтичні композиції можуть також включати в себе відповідні тверді носії або допоміжні речовини гелевої фази. Приклади таких носіїв або допоміжних речовин включають в себе, без обмеження, карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні цукри, крохмалі, похідні целюлози, желатин і полімери, такі як поліетиленгліколи.

Композиції за даним винаходом можуть, якщо бажано, бути представлені в упаковці або дозуючому пристрої, такому як схвалений FDA набір, який може містити одну або кілька одиничних дозованих форм, що містять активний інгредієнт. Упаковка може, наприклад, містити металеву або пластикову фольгу, таку як блістерна упаковка. До упаковки або дозатора можуть додаватися інструкції із застосування. На упаковці або дозаторі також може бути розміщено повідомлення, пов'язане з контейнером, в формі, визначеній урядовим агентством, регулюючим виробництво, застосування або продаж фармацевтичних препаратів, причому це повідомлення відображає схвалення агентством форми композицій або введення людині або тварині. Таке повідомлення, наприклад, може відноситися до маркування, схваленого Управлінням з контролю за продуктами і лікарськими засобами США для рецептурних ліків, або до затвердженого вкладиша продукту. Композиції, що містять препарат за даним винаходом, складений в сумісному фармацевтичному носії, також можуть бути приготовлені, поміщені у відповідний контейнер і помічені для лікування вказаного стану, як додатково детально описано вище.

Використовуваний в цьому документі термін "приблизно" відноситься до $\pm 10\%$. Терміни "містить", "що містить", "включає в себе", "включаючи в себе", "має" і споріднені з ними слова за коренем і значенням означають "включаючи в себе, без обмеження".

Термін "що складається з" означає "що включає в себе і обмежений".

Термін "що складається по суті з" означає, що композиція, спосіб або структура можуть включати в себе додаткові інгредієнти, стадії і/або частини, але тільки в тому випадку, якщо додаткові інгредієнти, стадії і/або частини не змінюють суттєво основні і нові характеристики заявленого складу, способу або структури.

Використовувані в цьому документі форми однини включають в себе множинні посилання, якщо контекст явно не диктує інше. Наприклад, термін "сполука" або "щонайменше одна сполука" може включати в себе безліч сполук, включаючи в себе їх суміші.

У цій заявці різні варіанти здійснення даного винаходу можуть бути представлені в форматі діапазону. Слід розуміти, що опис в форматі діапазону даний просто для зручності і стислості і не повинний розглядатися як жорстке обмеження обсягу винаходу. Відповідно, слід вважати, що опис діапазону конкретно розкриває всі можливі піддіапазони, а також окремі числові значення в цьому діапазоні. Наприклад, опис діапазону, такого як від 1 до 6, повинно розглядатися як конкретно розкриті піддіапазони, такі як від 1 до 3, від 1 до 4, від 1 до 5, від 2 до 4, від 2 до 6, від 3 до 6 і т.д., а також окремі числа в цьому діапазоні, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 і 6. Це застосовано незалежно від ширини діапазону.

Кожного разу, коли в цьому документі вказується числовий діапазон, мається на увазі, що він включає в себе будь-яке процитоване число (дробове або ціле) в межах зазначеного діапазону. Фрази "діапазон/діапазони між" першим зазначеним числом і другим зазначеним числом і "діапазон/діапазони від" першого зазначеного числа "до" другого зазначеного числа використовуються в цьому документі як взаємозамінні і призначені для включення першого і другого зазначених чисел і всіх дрібних і цілих чисел між ними.

Використовуваний в цьому документі термін "спосіб" відноситься до методів, засобів, технологій і процедур для виконання даної задачі, включаючи в себе, без обмеження, ті методи, засоби, технології і процедури, які або відомі, або легко розроблені з відомих методів, засобів, технологій і процедур практикуючими фахівцями в хімії, фармакології, біології, біохімії та медицині.

Використовуваний в цьому документі термін "лікування" включає в себе припинення, істотне пригнічення, уповільнення або повернення назад прогресування стану, істотне полегшення клінічних або естетичних симптомів стану або істотне запобігання появі клінічних або естетичних симптомів стану.

Зрозуміло, що певні особливості цього винаходу, які для ясності описані в контексті окремих варіантів здійснення, також можуть бути передбачені в комбінації згідно з одним варіантом здійснення. І навпаки, різні особливості цього винаходу, які для стислості описані в контексті одного варіанта здійснення, також можуть бути передбачені окремо або в будь-якій зручній підкомбінації або як підходящі в будь-якому іншому описаному варіанті здійснення даного винаходу. Певні особливості, описані в контексті різних варіантів здійснення, не слід розглядати як суттєві особливості цих варіантів здійснення, якщо тільки варіант здійснення не працює без цих елементів.

Різні варіанти здійснення і аспекти цього винаходу, як описано вище і заявлено в розділі формули винаходу, знаходять експериментальну підтримку в наступних прикладах.

ПРИКЛАДИ

Здійснене посилання на наступні приклади, які разом з вищенаведеними описами

ілюструють деякі варіанти здійснення даного винаходу без обмеження.

Як правило, використовувана в цьому документі номенклатура і лабораторні процедури, які використовуються в даному винаході, включають в себе молекулярні, біохімічні, мікробіологічні та рекомбінантні способи ДНК. Такі способи докладно описані в літературі. Дивіться, наприклад, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методології, викладені в патентах США № 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); доступні імуноаналізу докладно описані в патентній і науковій літературі, дивіться, наприклад, патенти США № 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); всі вони включені в посилання, як якщо б вони були повністю викладені в цьому документі. В цьому документі наводяться інші загальні посилання. Передбачається, що наведені в ньому процедури добре відомі в цій області техніки та надані для зручності читача. Вся інформація, що міститься в ньому, включена в цей документ за допомогою посилання.

ПРИКЛАД 1

Дексаметазон являє собою кортикостероїдний лікарський засіб, який викликає апоптоз імунних клітин і лімфомієлоїдних тканин. Мишей BALB/c використовували для дослідження здатності пептидів-кандидатів рятувати лімфоцитарні клітини від апоптозу. Мишам внутрішньоочеревинно вводили 100 мкг дексаметазону. Миші, що отримували дексаметазон, отримували внутрішньовенну ін'єкцію пептидів-кандидатів (250 або 400 мкг пептиду/миша) одразу після лікування дексаметазоном і через 24 години після цього. Мишей умертвляли через 48 годин після першого впливу. Селезінку і тимус зважували і виконували повний підрахунок клітин обох органів.

Пептиди, використані при скринінгу, представляли собою наступні:

- RPLPY-SEQ ID NO: 3
- LPPLAYP-SEQ ID NO: 4
- PLPYP-SEQ ID NO: 9
- PPL-SEQ ID NO: 10
- PLP-SEQ ID NO: 11
- PYP-SEQ ID NO: 12
- LPGLPYP-SEQ ID NO: 13
- LPPLGY-SEQ ID NO: 14
- LAPLPYP-SEQ ID NO: 15
- LPALPYP-SEQ ID NO: 16

Результати:

Дексаметазон викликав втрату маси селезінки і тимусу і зниження кількості клітин селезінки приблизно на 50 %. Кількість клітин тимуса зменшувалася майже на 80 % в порівнянні з нормальними мишами. Два пептиди надавали значний ефект на зменшення втрати маси селезінки і тимусу, а також зменшення кількості клітин - SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4 (дивіться фіг. 1). Не було різниці між двома дозами впливу (250 або 400 мкг/миша).

ПРИКЛАД 2

Мишей BALB/c використовували для дослідження здатності пептидів-кандидатів рятувати лімфоцитарні клітини від апоптозу. Мишам внутрішньоочеревинно вводили 100 мкг дексаметазону. Миші, що отримували дексаметазон, отримували внутрішньовенну ін'єкцію пептидів-кандидатів (200 мкг пептиду/миша) одразу після лікування дексаметазоном і через 24

години після нього. Мишей умертвляли через 48 годин після першого впливу. Селезінку і тимус зважували і виконували повний підрахунок клітин обох органів.

Пептиди, використані при скринінгу, представляли собою наступні:

LPPLPYP-SEQ ID NO: 2 (контроль)

5 PPLAYP-SEQ ID NO: 18

LPPLPY-SEQ ID NO: 7

LPPLAYP-SEQ ID NO: 4

PPLPY-SEQ ID NO: 3

PPLPY-NH₂-SEQ ID NO: 19

10 РЕЗУЛЬТАТИ

Результати представлені на фіг. 2. Кожен з досліджених пептидів показав поліпшення в порівнянні з контрольним пептидом (SEQ ID NO: 2).

Хоча даний винахід був описаний в зв'язку з його конкретними варіантами здійснення, очевидно, що багато з альтернатив, модифікацій і варіацій будуть очевидні для фахівців у цій галузі техніки. Відповідно, передбачається, що він охоплює всі такі альтернативи, модифікації і варіації, які знаходяться в межах суті і широкого обсягу прикладеної формули винаходу.

Всі публікації, патенти і заявки на патенти, згадані в цій заявці, повністю включені в даний опис за допомогою посилання в тій мірі, як якщо б кожна окрема публікація, патент або заявка на патент були спеціально та індивідуально вказані для включення в даний опис за допомогою посилання. Крім того, цитування або ідентифікація будь-якого посилання в цій заявці не повинно тлумачитися як визнання того, що таке посилання доступне в якості відомого рівня техніки для цього винаходу. Тією ж мірою, в якій використовуються заголовки розділів, їх не слід розглядати як обов'язкові обмеження.

Крім того, пріоритетний документ цієї заявки повністю включений в цей документ за допомогою посилання.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

30 1. Виділений пептид, що складається з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 21, для застосування при лікуванні бічного аміотрофічного склерозу.

2. Виділений пептид за п. 1, включений до фармацевтичної композиції.

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність Stressin-1

<400> 2

Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Pro
 1 5

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<400> 3

Pro Pro Leu Pro Tyr
 1 5

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<400> 4

Leu Pro Pro Leu Ala Tyr Pro
 1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Х2 являє собою пролін або його аналог або похідне

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Х являє собою пролін

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 5

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> Х являє собою пролін або його аналог або похідне

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Х являє собою пролін

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X являє собою пролін або його аналог або похідне

<400> 6

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 1 5

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<400> 7

Leu Pro Pro Leu Pro Tyr
 1 5

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<400> 8

Pro Pro Leu Pro Tyr Pro
 1 5

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<400> 9

Pro Leu Pro Tyr Pro
1 5

<210> 10
<211> 3
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид

<400> 10

Pro Pro Leu
1

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид

<400> 11

Pro Leu Pro
1

<210> 12
<211> 3
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид

<400> 12

Pro Tyr Pro
1

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 13

Leu Pro Gly Leu Pro Tyr Pro
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 14

Leu Pro Pro Leu Gly Tyr Pro
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 15

Leu Ala Pro Leu Pro Tyr Pro
1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 16

Leu Pro Ala Leu Pro Tyr Pro
1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X являє собою пролін або його аналог або похідне

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X являє собою пролін або його аналог

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X являє собою аланін, валін, лейцин, цистеїн, ізолейцин, метіонін або його похідне або аналог

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X являє собою аланін, валін, серин або їх похідне або аналог

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X являє собою пролін або його аналог або похідне

<400> 17

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 18

Pro Pro Leu Ala Tyr Pro

1 5

<210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Утворення амідного зв'язку

<400> 19

Pro Pro Leu Pro Tyr
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> може являти собою D-амінокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> може являти собою D-амінокислоту

<400> 20

Leu Pro Pro Leu Pro Tyr
 1 5

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> може являти собою D-амінокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> може являти собою D-амінокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

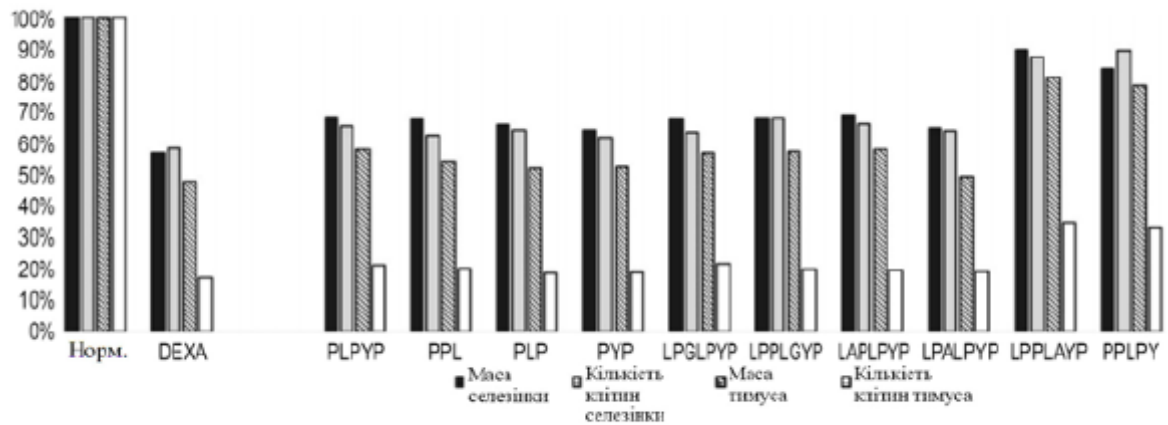
<222> (5)..(5)

<223> може являти собою D-амінокислоту

<400> 21

Leu Pro Pro Leu Ala Tyr Pro

1 5



Фиг. 1

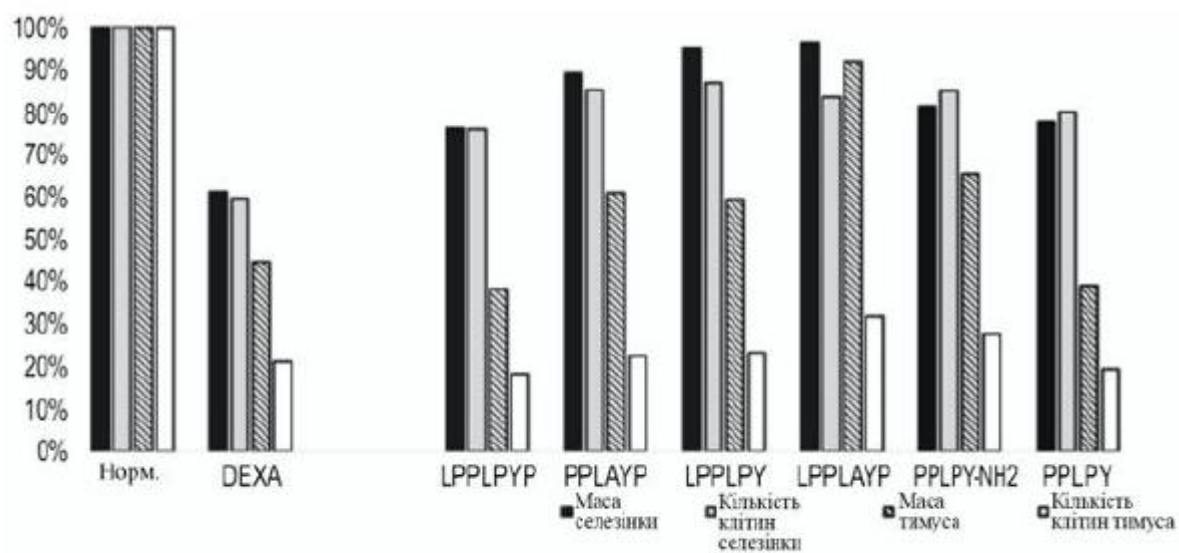


Fig. 2