



(51) МПК  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 9/00* (2006.01)  
*C07K 7/06* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: **2008152813/10**, **11.06.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**11.06.2007**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
**12.06.2006 FR 0605193**

(43) Дата публикации заявки: **20.07.2010** Бюл. № 20

(45) Опубликовано: **27.03.2012** Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: **WO 9823741 A1, 04.06.1998. WO 2005103079**  
**A1, 03.11.2005. RU 2267496 C2, 10.01.2006.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
 национальной фазе: **12.01.2009**

(86) Заявка РСТ:  
**FR 2007/000955 (11.06.2007)**

(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2007/144492 (21.12.2007)**

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
 ООО "Юридическая фирма Городисский и  
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной**

(72) Автор(ы):

**ФЕРРАНДИ Эрик (FR),  
 КАМАРА И ФЕРРЕР Хосе-Антонио (FR),  
 МАРЭН Жан-Грегуар (FR)**

(73) Патентообладатель(и):

**ИПСЕН ФАРМА С.А.С. (FR)**

**(54) ПЕПТИД С АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ  
 КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к получению противоопухолевых средств, и может быть использовано в медицине. Путем химического

синтеза были получены пептиды с антипролиферативной активностью.

Изобретение позволяет эффективно лечить пролиферативные заболевания. 2 н. и 4 з.п. ф-лы, 3 ил., 4 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 9/00* (2006.01)  
*C07K 7/06* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008152813/10, 11.06.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**11.06.2007**

Priority:

(30) Priority:  
**12.06.2006 FR 0605193**

(43) Application published: **20.07.2010 Bull. 20**

(45) Date of publication: **27.03.2012 Bull. 9**

(85) Commencement of national phase: **12.01.2009**

(86) PCT application:  
**FR 2007/000955 (11.06.2007)**

(87) PCT publication:  
**WO 2007/144492 (21.12.2007)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**FERRANDI Ehrik (FR),  
KAMARA I FERRER Khose-Antonio (FR),  
MAREhN Zhan-Gregar (FR)**

(73) Proprietor(s):

**IPSEN FARMA S.A.S. (FR)**

(54) **PEPTIDE WITH ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PROLIFERATIVE DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.  
SUBSTANCE: invention refers to biotechnology, namely to preparing anticancer agents, and can be used in medicine. Peptides with antiproliferative

activity are produced by chemical synthesis.

EFFECT: invention provides effective treatment of proliferative diseases.

6 cl, 3 dwg, 4 ex

RU 2 446 174 C2

RU 2 446 174 C2

Объектом настоящего изобретения являются полипептиды и пептиды с антипролиферативной активностью или одна из их фармацевтически приемлемых солей, а также их применение для профилактики или лечения злокачественной опухоли.

5 Существуют множество типов злокачественной опухоли. В частности, среди них можно отметить нейробластому.

Нейробластома представляет собой довольно редкий тип злокачественной опухоли симпатической нервной системы, который, как правило, поражает детей.

Нейробластома представляет собой злокачественную опухоль, которая наиболее

10 распространена у детей, развивающаяся из клеток предшественников нервного гребня, которые должны колонизировать мозговое вещество надпочечника и симпатические ганглии. Нейробластому обычно выявляют у младенцев и детей раннего возраста. Приблизительно 96% случаев нейробластом проявляются до

15 возраста 10 лет. Как правило, заболевание возникает в мозговом веществе надпочечников или в других местах расположения симпатической нервной ткани, с наиболее частым участком расположения в брюшной полости рядом с надпочечниками. Нейробластомы также можно выявить в грудной клетке, шее или тазовой области. Вероятность выявления пациентов, страдающих злокачественной

20 опухолью типа нейробластомы, является высокой. Частыми симптомами нейробластом являются давление, вызванное опухолью, или боль в костях. Нейробластомы также могут сдавливать спинной мозг, обуславливая паралич. Также

были отмечены случаи лихорадки, анемии или высокого кровяного давления. Лечение нейробластомы основано на мультидисциплинарном подходе, фактически

25 объединяющем хирургию, лучевую терапию и химиотерапию. Среди способов лечения, известных в настоящее время, можно отметить лечение с применением циклофосфида, доксорубина, этопозида, солей платины или винкристина.

Среди злокачественных опухолей также можно отметить лейкозы.

30 Термин лейкоз относится к совокупности злокачественных опухолей, поражающих кровь. В среднем у взрослого человека содержится приблизительно пять литров крови, ролью которой является доставка питательных веществ, оксигенация и удаление отходов. Кровь состоит из эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и плазмы.

35 Лейкоциты помогают в борьбе с инфекцией. Тромбоциты крови формируют сгустки, предотвращающие потерю крови во время повреждений и кровотечений.

Приблизительно 55% крови составляет плазма, жидкость соломенно-желтого цвета, которая содержит клетки крови и тромбоциты и доставляет в организм питательные

40 вещества, образующиеся в результате переваривания, и гормоны, вырабатываемые железами. Как указано, лейкоциты ответственны за механизм защиты. Существует два основных типа лейкоцитов - лимфоциты и моноциты. Существует два типа

45 лимфоцитов - В-лимфоциты, вовлеченные в продукцию антител, и Т-лимфоциты. Т-лимфоциты также делят на 3 группы: воспалительные Т-клетки, которые рекрутируют макрофаги и нейтрофилы в участке инфекции или какой-либо поврежденной

ткани; цитотоксические Т-лимфоциты, уничтожающие вирусы, которые инфицируют клетки; и Т-хелперные клетки, которые увеличивают продукцию антител В-клетками.

50 Наиболее распространенным лейкозом у детей является острый лимфобластный лейкоз. Это лейкоцитарная злокачественная опухоль, а конкретно лимфоцитарная. Злокачественные лейкозные клетки представляют собой клетки крови, которые больше не функционируют нормально. Как результат, лейкоциты не могут помочь организму бороться с инфекцией. Вследствие этого у детей с острым лимфобластным лейкозом часты инфекции и лихорадка. В зависимости от числа аномальных клеток и

их расположения у пациентов с лейкозом наблюдают определенный ряд симптомов. У детей с острым лимфобластным лейкозом часто содержится малое количество эритроцитов и здоровых тромбоцитов. Как следствие, содержится недостаточно эритроцитов для того, чтобы переносить кислород к органам, что приводит к анемии, с возможной внешней бледностью пациентов с ощущением слабости и утомления. При недостатке тромбоцитов у пациентов происходят кровотечения и легко образуются повреждения. Некоторые общие симптомы острого лимфобластного лейкоза включают: лихорадку, слабость, частые инфекции, бледность, легко возникающие кровотечения или гематомы, маленькие красные пятна (называемые петехиями) под кожей и/или боль в костях или суставах.

Известные в настоящее время способы лечения лейкоза, в частности, представляют собой способы лечения с использованием Ara-C, идарубицина, даунорубицина, мелфалана или бусульфана.

Среди злокачественных опухолей, можно также отметить злокачественные опухоли предстательной железы.

Злокачественная опухоль предстательной железы представляет собой распространенную злокачественную опухоль, поражающую исключительно мужчин. Предстательная железа составляет часть мужской репродуктивной системы. Здоровая предстательная железа размером с каштан. Предстательная железа представляет собой орган, расположенный непосредственно под мочевым пузырем, позади лобкового симфиза и перед прямой кишкой. Она окружает мочеточник, проток, выводящий мочу, в пределах от 3 до 4 см. Предстательная железа представляет собой железу, которая продуцирует часть семенной жидкости. Увеличенная предстательная железа сдавливает мочеточник, вызывая проблемы с мочеиспусканием, замедляя или останавливая поток мочи из мочевого пузыря к половому члену. Как правило, более чем 70% всех злокачественных опухолей предстательной железы у мужчин диагностируют в возрасте более 65 лет. Хотя этиология рака предстательной железы неизвестна, факторы риска включают окружающую среду, генетический фактор и семейный анамнез. Уровень смертности от рака предстательной железы, по меньшей мере, вдвое выше у афроамериканских мужчин, чем у мужчин европеоидной расы. Из-за дополнительного риска афроамериканским мужчинам рекомендован более ранний скрининг рака предстательной железы. По рекомендациям американского общества по борьбе с раковыми заболеваниями, мужчинам в возрасте 50 лет и более, и тем, кто находится в группе повышенного риска в возрасте более 45 лет, как например, афроамериканским мужчинам и мужчинам с семейным анамнезом рака предстательной железы, следует сдавать анализ крови с целью выявления специфического антигена простаты (PSA) и проводить ректальное исследование каждый год. Как правило, симптомы рака предстательной железы включают: проблемы мочеиспускания, невозможность мочиться или трудности с началом или окончанием мочеиспускания, необходимость часто мочиться, в частности ночью, слабый или прерывистый поток мочи, боль или жжение во время мочеиспускания, проблемы с достижением эрекции, присутствие крови в моче или сперме и частые боли в нижнем отделе спины, тазовой области или бедрах.

Известные в настоящее время способы лечения рака предстательной железы, в частности, представляют собой использование являющегося аналогом LHRH (рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона) пептида трипторелина, используемого до тех пор, пока рост опухолевых клеток находится под контролем андрогенных гормонов. Очень часто после длительного периода лечения аналогами LHRH

опухолевые клетки теряют чувствительность к гормональному контролю и затем становятся гормон-резистентными.

Химиотерапию предпочтительно применяют при раке предстательной железы, когда последний разовьется до степени, выходящей за пределы предстательной железы, и более не отвечает на гормональное лечение. Химиотерапия включает использование таких средств или смесей средств, как доцетаксел, паклитаксел, эстрамустин/доцетаксел, эстрамустин/этопозид, эстрамустин/винбластин и эстрамустин/паклитаксел.

Лечение злокачественных опухолей, таких как, например, нейробластома, лейкоз, рак предстательной железы, рак молочной железы, меланома или рак ободочной и прямой кишки, может быть локальным или системным. Локальные способы лечения, например, хирургическое вмешательство и облучение, затрагивают злокачественные клетки опухоли и область, близкую к последним. Системные способы лечения, например, химиотерапия, гормональная терапия и биологическая терапия, опосредованы циркуляцией крови, достигая злокачественных клеток во всем организме, но многим нежелательным эффектам также подвержены здоровые клетки.

Для соответствия промышленным требованиям необходимо найти новые способы лечения злокачественной опухоли и, в частности, другие соединения, обладающие противоопухолевой активностью.

Проблемой, которую также предложено решить посредством изобретения, является предоставление новых соединений, обладающих противоопухолевой активностью.

Неожиданно авторы изобретения показали, что пептиды с последовательностями SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3 обладают антипролиферативной активностью.

С этой целью в настоящем изобретении предоставлен полипептид не более чем со 150 аминокислотами, содержащий, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

Изобретение также предоставлено в виде лекарственного средства, пептида с последовательностью SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3, а также полипептида, описанного выше.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей полипептид или пептид, по изобретению.

Наконец, объектом изобретения также является использование полипептидов, пептидов и соединений по изобретению для лечения или предотвращения злокачественных опухолей толстого кишечника, прямой кишки, молочной железы, легких, поджелудочной железы, яичек, почек, матки, яичников, предстательной железы, кожи, костей и спинного мозга, а также сарком, карцином, фиброаденом, нейробластом, лейкозов, лимфом и меланом.

Изобретение также относится к антителам, направленным против полипептидов, пептидов или соединений по изобретению.

В изобретении предоставлены определенные преимущества, в частности полипептиды, пептиды или соединения, по изобретению, являющиеся высокоспецифичными к клеткам-мишеням, которые снижают побочные эффекты.

Преимущественно полипептиды, пептиды или соединения по изобретению или их соли обладают повышенной растворимостью в биологических средах, в частности в водных условиях.

Преимуществом изобретения является то, что его можно осуществлять во всех

областях промышленности, в частности фармацевтической, ветеринарной или косметической промышленности.

Другие преимущества и характеристики изобретения станут очевидными при чтении последующего описания и примеров, которые приводятся исключительно с целью иллюстрирования и не являются ограничивающими.

В понятиях изобретения под выражением злокачественная опухоль подразумевают любой тип злокачественной опухоли, т.е. инвазивный, неинвазивный, инфильтрирующий, гормональный, негормональный, локализованный или метастатический.

В понятиях изобретения под выражением полипептид подразумевают макромолекулу, содержащую, по меньшей мере, 31 аминокислотный остаток. Эти аминокислоты образуют или не образуют непрерывную, линейную или нелинейную, разветвленную или неразветвленную последовательность. Полипептид по изобретению также может включать различные полипептиды, как определено далее в настоящем документе.

В понятиях изобретения под выражением пептид подразумевают аминокислотную последовательность, содержащую не более 30 аминокислотных остатков. Эти аминокислоты образуют или не образуют непрерывную, линейную или нелинейную, разветвленную или неразветвленную последовательность. Пептид по изобретению также может включать различные полипептиды, как определено в настоящем документе.

Изобретение относится к полипептиду, содержащему не более 150 аминокислотных остатков, содержащему, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

В частности изобретение относится к полипептиду, содержащему не более 100 аминокислотных остатков, включающему, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

В частности изобретение относится к полипептиду, содержащему не более 75 аминокислотных остатков, включающему, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

Более конкретно полипептид по изобретению представляет собой полипептид, содержащий не более 50 аминокислотных остатков, включающий, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

Еще более конкретно полипептид по изобретению представляет собой полипептид, содержащий не более 35 аминокислотных остатков, включающий, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

Объект настоящего изобретения также представляет собой пептид, содержащий не более 30 аминокислотных остатков, включающий, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

Объект настоящего изобретения также представляет собой пептид, содержащий не более 25 аминокислотных остатков, включающий, по меньшей мере, одну пептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

Более конкретно пептид по изобретению представляет собой пептид, содержащий не более 18 аминокислотных остатков, включающий, по меньшей мере, пептидную последовательность SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

Еще более конкретно пептид по изобретению представляет собой пептид, содержащий не более 10 аминокислотных остатков, включающий, по меньшей мере, пептидную последовательность SEQ ID No. 3.

Объект по изобретению также представляет собой пептидную последовательность SEQ ID No. 1, приведенную ниже:

Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg.

Объект по изобретению также представляет собой пептидную последовательность SEQ ID No. 2, приведенную ниже:

Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg.

Объект по изобретению также представляет собой пептидную последовательность SEQ ID No. 3, приведенную ниже:

Val Gln Leu Asp Glu Arg.

По варианту изобретения полипептид, пептид или соединение по изобретению могут содержать модификации.

По варианту изобретения полипептид или пептид по изобретению может представлять собой вариант полипептида или пептида, который означает полипептид или пептид, который отличается от природного полипептида или пептида заменами, инсерциями, делециями и/или модификациями аминокислот. Некоторые варианты содержат консервативные замены. Консервативная замена представляет собой замену, где одну аминокислоту заменяют другой аминокислотой, обладающей теми же свойствами, как те, которые определены специалистом в данной области, который не ожидает изменений во вторичной структуре, а также в гидрофильных свойствах полипептида или пептида. Замены аминокислот, как правило, осуществляют на основании сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы остатков. Например, отрицательно заряженные аминокислоты, включающие аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; положительно заряженные аминокислоты, включающие лизин и аргинин; и незаряженные полярные аминокислоты, обладающие сходными величинами гидрофобности, включающие лейцин, изолейцин и валин; глицин и аланин; аспарагин и глутамин; серин, треонин, фенилаланин и тирозин. Остальными группами аминокислот, которые представляют консервативные замены, являются, в частности, следующие: группа (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr;

группа (2) Cys, Ser, Tyr, Thr;

группа (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;

группа (4) Lys, Arg, His;

и (5) Phe, Tyr, Trp, His.

Вариант также или альтернативно может содержать неконсервативные замены.

Варианты, образующие фрагмент по изобретению, также включают полипептиды или пептиды, в которых первичная структура природного полипептида или пептида модифицирована посредством инсерции химических спейсеров между 2 аминокислотами.

Варианты, образующие фрагмент по изобретению, также включают полипептиды или пептиды, в которых первичная структура природного полипептида или пептида модифицирована посредством образования ковалентных или нековалентных

конъюгатов с другими полипептидами или химическими структурами, такими как липидные группы или гликозилирующие или ацетилфосфатные группы.

Варианты, образующие фрагмент по изобретению, также включают полипептиды или пептиды, в которых первичная структура природного полипептида или пептида модифицирована посредством делеции одного или более аминокислотных остатков, где делетированные аминокислоты могут являться последовательными или непоследовательными.

Настоящее изобретение также включает полипептиды или пептиды с гликозилирующими молекулами или без них. Например, полипептид или пептид по изобретению может быть гликозилирован или может содержать гликозилирующие остатки, такие как ацетилы. В этом случае ацетильные группы включаются в пептидную цепь.

Настоящее изобретение также включает полипептиды или пептиды, несущие одну или более мутаций участков расщепления протеазами, обеспечивая устойчивость к протеазам и, таким образом, увеличенную стабильность в кровотоке.

По конкретному варианту осуществления изобретения полипептид или пептид по изобретению имеет остатки аргинина последовательностей SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3, которые полностью или частично делетированы, модифицированы или замещены другими аминокислотами.

Полипептид или пептид по изобретению на одном из своих концов или на обоих своих концах также может содержать амидную функциональную группу.

Предпочтительно объект по изобретению представляет собой соединение формулы или амид пептида с последовательностью SEQ ID No. 1, приведенной ниже:

$\text{NH}_2$  -Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg- CO - $\text{NH}_2$

Предпочтительно объект по изобретению также представляет собой соединение формулы или амид пептида с последовательностью SEQ ID No. 2, приведенной ниже:

$\text{NH}_2$  -Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg - CO -  $\text{NH}_2$

Предпочтительно объект по изобретению также представляет собой соединение формулы или амид пептида с последовательностью SEQ ID No. 3, приведенной ниже:

$\text{NH}_2$  -Val Gln Leu Asp Glu Arg- CO - $\text{NH}_2$ .

Модификации и варианты, описанные выше для полипептида или пептида по изобретению, также действительны и для соединения по изобретению.

Предпочтительно полипептид, пептид или соединение по изобретению линейны, но их можно представить в виде кольцевой или спиральной формы.

Полипептид, пептид или соединение по изобретению могут содержать левовращающие (L) или правовращающие (D) аминокислоты или оба варианта.

Предпочтительно полипептид, пептид или соединение по изобретению содержат левовращающие аминокислоты.

Объект настоящего изобретения также представляет собой пептид последовательностей SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3 для применения в качестве лекарственного средства.

Объект по изобретению также представляет собой описанный выше полипептид по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Объект настоящего изобретения также представляет собой описанное выше соединение по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

По некоторым аспектам изобретения полипептиды, пептиды, соединения, антитела по изобретению можно включить в фармацевтическую композицию.



Фармацевтические композиции содержат один или более из этих продуктов и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов (носителей).

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим, по меньшей мере, один полипептид, пептид или соединение по изобретению.

5 Изобретение также относится к антителам, направленным против полипептидов, пептидов или соединений по изобретению. Антитела могут содержаться в сыворотках, где эти сыворотки могут являться поликлональными или моноклональными. По варианту изобретения они могут представлять собой какой-либо фрагмент антитела, 10 где этот фрагмент содержит антигенсвязывающий участок, который специфически связывает полипептид, пептид или соединение, как описано ранее, и, в частности, моноклональное антитело или фрагмент последнего, который специфически связывает пептид с последовательностью SEQ. ID. No. 1, No. 2 или No. 3.

15 Антитела получают любым способом, доступным специалисту в данной области (для сравнения Harlow и Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Как правило, антитела можно получать способами культуры клеток, включающих образование моноклональных антител, или посредством трансфекции генов антител в клетки-хозяева бактерий или млекопитающих для выработки 20 рекомбинантных антител.

Среди других способов предпочтительным является использование способов, описанных далее в настоящем документе. Иммуноген, содержащий полипептид, пептид или соединение по изобретению, инъецируют группе млекопитающих (например, мышам, крысам, кроликам, овцам или козам). На этом этапе полипептиды, 25 пептиды или соединения по настоящему изобретению могут служить в качестве иммуногенов без модификаций.

Альтернативно можно индуцировать повышенный иммунный ответ, если полипептид, пептид или соединение связаны с транспортным белком, таким как бычий 30 сывороточный альбумин или гемоцианин лимфы улитки.

Иммуноген инъецируют животному-хозяину, предпочтительно по предварительно установленной схеме, и периодически у животных забирают кровь. Таким образом, поликлональные антитела, специфичные к полипептиду, пептиду или соединению по изобретению, можно очистить от таких антисывороток, например с помощью 35 аффинной хроматографии с использованием полипептида или пептида, связанного с подходящим твердым носителем.

По другому аспекту настоящего изобретения полипептиды, пептиды или соединения, а также их варианты по изобретению можно использовать при лечении 40 пролиферативных заболеваний.

Таким образом, полипептиды, пептиды или соединения, а также их варианты по изобретению можно использовать для лечения злокачественных и предзлокачественных клеток, а также злокачественных опухолей. Конкретно, полипептиды, пептиды или соединения можно использовать для ингибирования роста 45 и стимуляции модуляции клеточной пролиферации при противоопухолевой терапии, например, такой как при конкретных опухолях молочной железы или предстательной железы.

Такие полипептиды, пептиды или соединения также можно использовать для 50 лечения ряда карцином, включающих меланомы, многочисленные формы глиобластом, карциномы легких, а также злокачественные опухоли ободочной и прямой кишки. Вещества, активирующие экспрессию таких полипептидов, пептидов или соединений, также можно использовать в рамках этих способов лечения.

По этим аспектам изобретения полипептиды, пептиды или соединения, а также их варианты по изобретению предпочтительно включают в фармацевтическую композицию, как описано выше.

5 Все пациенты, подходящие для лечения, являются теплокровными животными, а предпочтительно - людьми. У пациента, подходящего для лечения по изобретению, может или может не быть диагностировано поражение злокачественной опухолью. Иными словами, описанные выше фармацевтические композиции, таким образом, можно использовать для ингибирования развития злокачественной опухоли на разных  
10 стадиях заболевания (для предотвращения появления злокачественной опухоли или для лечения пациентов, пораженных злокачественной опухолью).

В конкретном способе целью изобретения является применение полипептида, пептида или соединения, описанных выше, а также их вариантов для лечения или  
15 предупреждения злокачественных опухолей толстого кишечника, прямой кишки, молочной железы, легких, поджелудочной железы, яичек, почек, матки, яичников, предстательной железы, кожи, костей и спинного мозга, а также сарком, карцином, фиброаденом, нейробластом, лейкозов, лимфом и меланом.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят способом,  
20 соответствующим каждой конкретной подлежащей лечению злокачественной опухоли.

Полипептид, пептид или соединение по изобретению или его соль могут находиться в твердой форме, например в порошках, гранулах, таблетках, желатиновых капсулах, липосомах или суппозиториях. Подходящими твердыми носителями могут быть,  
25 например, фосфат кальция, стеарат магния, сахара, лактоза, декстрин, крахмал, желатин, целлюлоза, метил целлюлоза, натрий карбоксиметил целлюлоза и поливинилпирролидин.

Полипептид, пептид или соединение по изобретению или его соль, используемые по изобретению, также могут быть предоставлены в жидкой форме, например, в  
30 растворах, эмульсиях, суспензиях или сиропах. Подходящими жидкими носителями могут являться, например, вода, органические растворители, такие как глицерин или гликоли, а также их водные смеси в различных пропорциях.

Полипептид, пептид или соединение по изобретению или его соль, применяемые по изобретению, можно также предоставить в полужидкой форме, например в гелях.

35 Введение полипептида, пептида или соединения по изобретению или его соли, применяемых по изобретению, можно проводить местно, системно, пероральным или парентеральным путем, внутримышечно, внутривенно, подкожно, введением внутрибрюшинно и т.д. Также можно рассматривать местное введение в  
40 злокачественную или предположительно злокачественную опухоль.

Доза продукта по настоящему изобретению для лечения указанных выше заболеваний или нарушений варьирует в зависимости от способа введения, возраста и массы тела подлежащего лечению субъекта, а также состояния последнего и фармакологических и фармакодинамических свойств полипептидов, пептидов или  
45 соединений по изобретению.

В качестве указания вводимая доза, предусматриваемая для лекарственного средства по изобретению, содержит от 0,1 мкг до 1 г/кг, в зависимости от типа используемого активного соединения.

50 На фигуре 1 показано влияние соединений 1, 2 и 3 на пролиферацию опухолевых клеток нейробластомы человека SHSY-5Y.

На фигуре 2 показано влияние соединения 1 на пролиферацию опухолевых клеток нейробластомы человека SHSY-5Y, ксенотрансплантированных бестимусной мышши.

На фигуре 3 показано отсутствие токсичности соединения 1 у бестимусной мыши с ксенотрансплантатом.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение без ограничения его возможностей.

**Фармакологическое исследование продуктов по изобретению**

В примерах, приведенных далее в настоящем документе:

- "Соединение 1" обозначает соединение формулы или амидированный пептид с последовательностью SEQ ID No. 1, приведенной ниже:

NH<sub>2</sub> -Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg-CO-NH<sub>2</sub>;

- "Соединение 2" обозначает соединение формулы или амидированный пептид с последовательностью SEQ ID No. 2, приведенной ниже:

NH<sub>2</sub> -Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg -CO- NH<sub>2</sub>;

- "Соединение 3" обозначает соединение формулы или амидированный пептид с последовательностью SEQ ID No. 3, приведенной ниже:

NH<sub>2</sub> -Val Gln Leu Asp Glu Arg-CO-NH<sub>2</sub>.

**1/ Синтез соединений 1, 2 и 3:**

Синтез соединений 1, 2 и 3 выполняли с использованием известного способа синтеза пептидов.

Синтез соединений 1, 2 и 3 выполняли с использованием так называемой химии F-мос. Используемая смола представляет собой rink-amide смолу, поставляемую Applied Biosystems. Аминокислоты также получены у того же поставщика. Используемый способ активации представляет собой так называемый способ HAUT/DIPEA.

Расщепление смолы и защиту боковых групп осуществляли следующим способом: 92% TFA, 4% H<sub>2</sub>O, 2,5% EDT и 1,5% TIS. Очистку выполняют высокоэффективной жидкостной хроматографией высокого давления (или ВЭЖХ), с использованием колонок aquapore C8 250×10 мкм, 20 мкм.

**2/ Тест на клеточную пролиферацию *in vitro* на клетках типа SHSY-5Y с соединениями 1, 2 и 3:**

Злокачественные клетки нейробластомы человека SHSY-5Y (код ATCC: CRL-2266) культивируют в среде DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла), содержащей 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицин сульфата, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой. Клетки пересевают в течение 24 часов перед добавлением возрастающих концентраций соединений 1, 2 и 3 (0,001/0,01/0,1/1/10/100/1000 нМ).

Результаты представлены на фигуре 1, описывая действие соединений 1, 2 и 3 на процент количества клеток SHSY-5Y.

Значительную антипролиферативную активность на клетках SHSY-5Y в дозе 1000 нМ демонстрируют 3 соединения.

**3/ Тест на клеточную пролиферацию *in vivo* на клетках SHSY-5Y типа с соединением 1:**

Злокачественные клетки нейробластомы человека SHSY-5Y (код ATCC: CRL-2266) культивируют в среде DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла), содержащей 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицин сульфата, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой. Затем клетки, культивируемые таким образом, подвергают подкожной ксенотрансплантации в бока бестимусных мышей balb-c NCr-nu/nu в возрасте от 4 до 6 недель.

После латентного периода, в течение нескольких дней после трансплантации,

клетки SHSY-5Y пролиферируют и образуют небольшую опухоль (приблизительно 70 мм<sup>3</sup>), которая видна на боку животного.

Соединение 1, на стадии роста опухоли, вводят внутривентриально в дозах 5 и 10 мг/кг.

Результаты представлены на фигуре 2, характеризующей влияние соединения 1 на скорость роста и объем опухоли.

Соединение 1 проявляет дозозависимую противоопухолевую активность, связанную с его антипролиферативной активностью. Фактически, снижение скорости роста опухоли наблюдают при дозе 5 мг/кг, приблизительно с 20% сокращением размера опухоли через 21 сутки.

Этот эффект еще более выражен, когда соединение 1 вводят в дозе 10 мг/кг, при которой наблюдают очень отчетливое снижение скорости роста опухоли, вместе приблизительно с 50% сокращением размера опухоли через 21 сутки.

#### 4/ Определение токсичности соединения 1:

Злокачественные клетки из нейробластомы человека SHSY-5Y (код ATCC: CRL-2266) культивируют в среде DMEM (Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла), содержащей 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицин сульфата, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой. Затем клетки, культивируемые таким образом, подвергают подкожной ксенотрансплантации в бока бестимусных мышей.

После латентного периода в течение нескольких дней клетки SHSY-5Y пролиферируют и образуют небольшую видимую опухоль (приблизительно 70 мм<sup>3</sup>).

Соединение 1 на этой стадии опухолевого роста вводят внутривентриально в дозах 5 и 10 мг/кг.

Результаты представлены на фигуре 3, описывающей изменение веса животных, как функцию от времени, что является индикатором возможной токсичности продуктов, тестируемых на этой модели бестимусных мышей.

При любой из тестируемых доз соединения 1 (5 и 10 мг/кг) соединение 1 не влияет на вес животных. Этот результат указывает на очевидное отсутствие токсичности этого продукта.

#### Формула изобретения

1. Пептид, обладающий антипролиферативной активностью, с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 или SEQ ID No. 3.

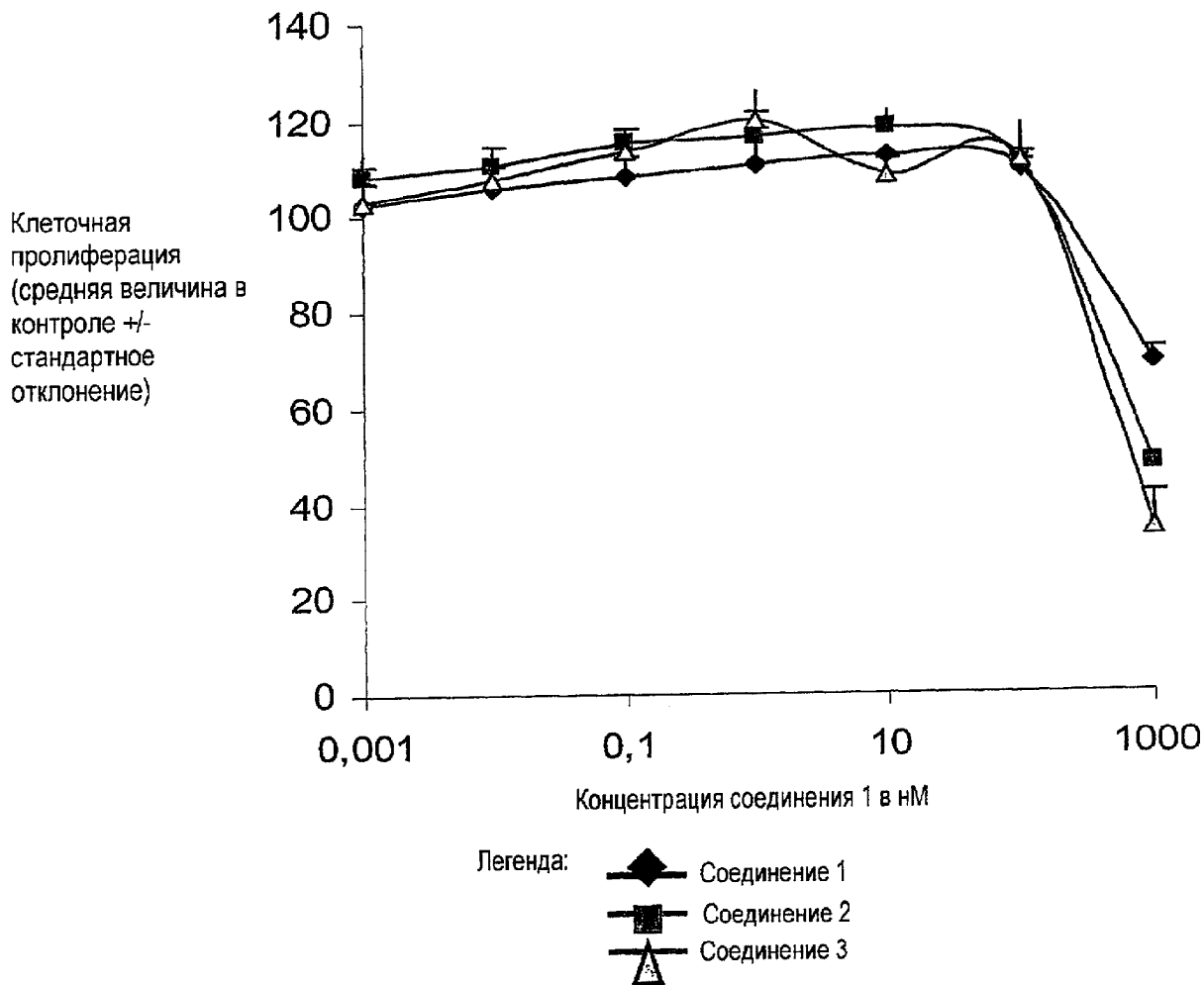
2. Пептид по п.1, ингибирующий пролиферацию раковых клеток.

3. Пептид по п.1 для применения в качестве лекарственного средства при лечении пролиферативных заболеваний.

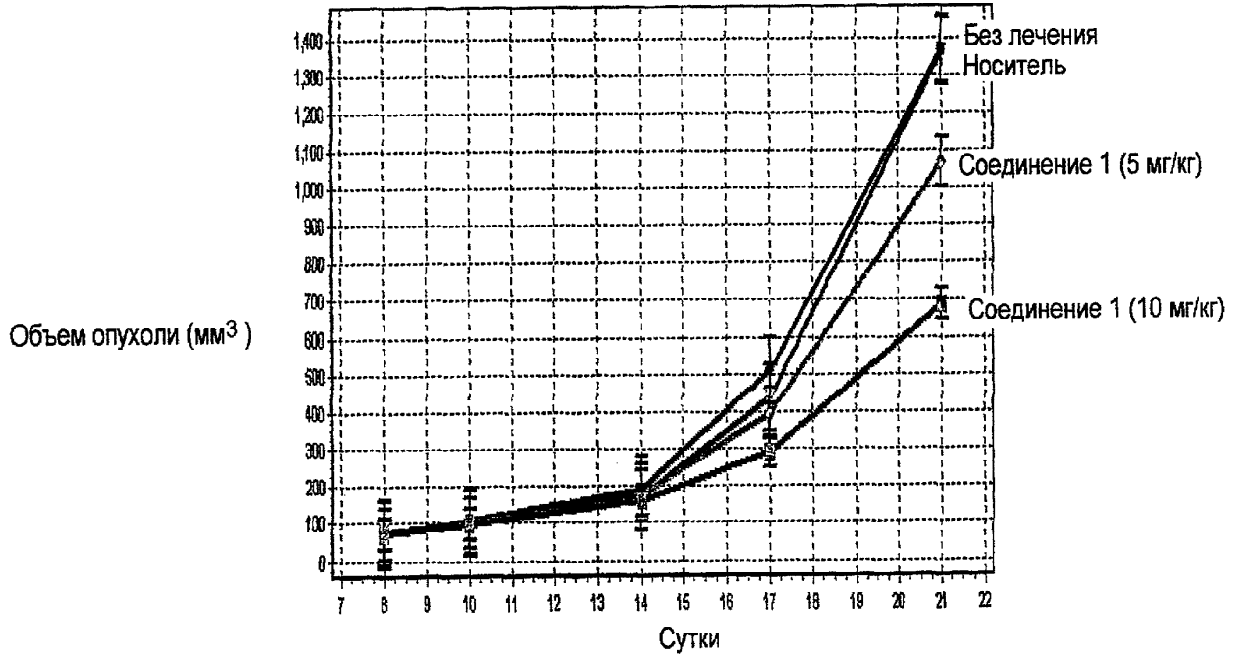
4. Фармацевтическая композиция для лечения пролиферативных заболеваний, содержащая эффективное количество, по меньшей мере, одного пептида по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, ингибирующая пролиферацию раковых клеток.

6. Фармацевтическая композиция по п.4 для применения в качестве лекарственного средства при лечении пролиферативных заболеваний.



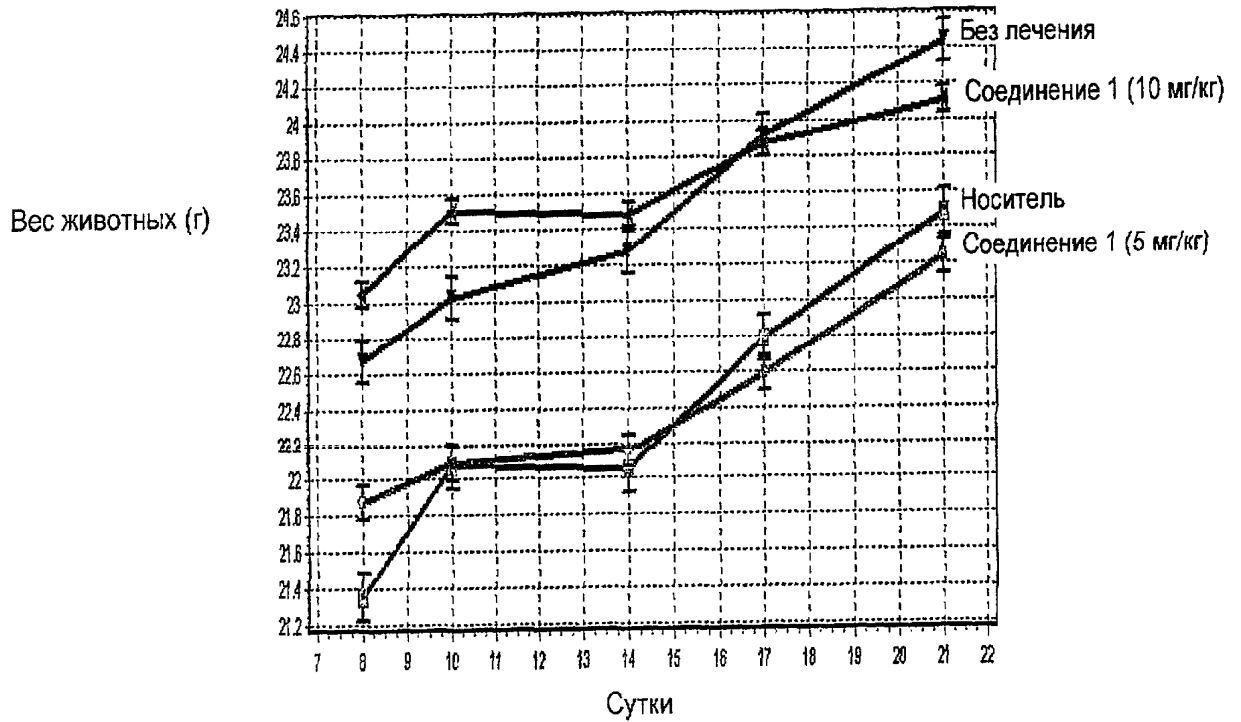
Фиг. 1



Легенда:

- ▽ Носитель
- Без лечения
- Соединение 1 (5 мг/кг)
- ◇ Соединение 1 (10 мг/кг)

ФИГ. 2



ФИГ. 3