

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201401291** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.01.29

(22) Дата подачи заявки
2014.12.19

(51) Int. Cl. **A61K 38/10** (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(54) БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АЛЛОФЕРОНА-1

(31) 2013141484

(32) 2013.09.10

(33) RU

(71) Заявитель:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"АЛЛОФЕРОН" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Беккер Игорь (DE), Кучер Мариола,
Чарниевска Элизабет (PL), Никонов
Борис Алексеевич (RU), Ким Су Ин
(KR)**

(57) Заявляемое изобретение относится к белкам и биологически активным пептидам с иммуномодулирующей, противораковой и противовирусной активностью, а также лекарственным средствам на их основе. Замена в молекуле Аллоферона-1 гистидина на фенилаланин позволяет получить производные, содержащие заместители в ароматическом кольце. Заменой гистидина в положении 1 на фенилаланин, содержащий амино-, хлор- и метоксигруппы в пара-положение ароматического звена, получены производные Аллоферона-1: Phe(p-R)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly где R - NH₂, Cl, OMe. Полученные производные стимулируют индукцию интерлейкина-18, интерферона гамма и подавляют вирусы гриппа А и В, таким образом, обладают иммуномодулирующей, противораковой и противовирусной активностью. Указанные производные Аллоферона-1 могут быть использованы для создания лекарственных средств.

A2

201401291

201401291

A2

Биологически активные производные Аллоферона-1

Изобретение относится к белкам и биологически активным пептидам с иммуномодулирующей, противораковой и противовирусной активностью.

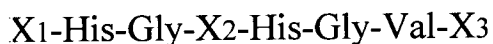
Известна группа противовирусных пептидов выделенных из насекомых с общим названием Аллофероны и общей формулой: X_1 -His-Gly- X_2 -His-Gly-Val- X_3 или их фармацевтически приемлемые соли, или эфиры, или амиды, где X_1 отсутствует либо содержит не менее 1 аминокислоты, X_2 содержит не менее 1 аминокислоты либо представляет собой пептидную связь; X_3 отсутствует либо содержит не менее 1 аминокислоты, причем указанные аминокислоты выбраны из групп: алифатической, ароматической или гетероциклической (Патент РФ № 2172322, МПК C07K7/06, C07K7/08, A61K38/08, A61K38/10, A61P37/02, опубл. 20.08.2001 г.).

На основе одного из пептидов этой группы Аллоферона-1, имеющего структуру His-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly, был разработан лекарственный препарат «Аллокин-альфа лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения», который выпускается с 2003 г. в качестве лекарственного средства для лечения хронического рецидивирующего герпеса 1 и 2 типа, острого гепатита В и папилломовирусных инфекций.

Противовирусная активность Аллоферона-1 обусловлена многими факторами.

Так установлено, что он обладает прямым противовирусным действием (1). Однако основным механизмом биологической активности Аллоферона-1 можно считать индукцию цитокинов, в том числе интерферона-альфа (2) и интерлейкина-18 (3).

Семейство Аллоферонов описываемое общей формулой:



включает большое число молекул построенных на основе природных аминокислот, обладающих широким спектром биологических свойств.

Одной из возможностей изменения молекул и, соответственно, их биологической активности является введение в состав пептида химически модифицированных аминокислот. Наиболее простым объектом для модификации является введение в молекулу Аллоферона-1 фенилаланина, содержащего заместители в ароматическом ядре.

Технической задачей, на решение которой направлено заявляемое изобретение, является создание новых производных пептида Аллоферона-1, обладающих повышенной биологической активностью, которые могут быть использованы для создания лекарственных препаратов для лечения и профилактики вирусных и микробных инфекций, а также опухолей.

Для решения поставленной технической задачи путем замены в молекуле Аллоферона-1 гистидина в положении 1 на фенилаланин, имеющий нуклеофильный заместитель в пара-положении, получено несколько новых пептидов:

Phe(p-NH₂)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly (Пептид I)

Phe(p-Cl)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly (Пептид II)

Phe(p-OMet)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly (Пептид III)

Технический результат состоит в том, что полученные пептиды обладают высокой иммуномодулирующей, противовирусной и противораковой активностью, что будет подтверждено примерами.

Синтез пептидов произведен по стандартной Fmoc-процедуре твердофазным способом. Удаление защиты производилось 20%-м раствором пиперидина в диметилформамиде. Реакцию сочетания проводили с помощью HBTU в присутствии HOBt и NMM в течение 2 часов при комнатной температуре. Финишное отделение пептидов проводили с помощью TFA, EDT и воды (95:2,5:2,5) в течение 2 часов при комнатной температуре.

Сырые пептиды промывались холодным диэтиловым эфиром, растворялись в воде и лиофилизировались. Очистка пептидов производилась методом HPLC с использованием колонок TOSOH Bioscience C18 (21,5 мм x300 мм) (Tosoh, Japan) с UV-детектором 210/240 нм. Процесс проводили в градиенте вода -ацетонитрил содержащий 0,1% TFA при скорости потока 7 мл/мин. Очищенные лиофилизированные пептиды имели чистоту более 95%.

Финишная стадия получения пептидов – лиофилизация из раствора в 50% уксусной кислоте.

Химическая идентификация пептидов была подтверждена методом масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра типа Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH).

Возможность достижения цели изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Изучение влияния биологически активных производных Аллоферона-1 (пептидов I, II, III) на индукцию IL-18

Индукция осуществлялась путем введения подкожно Аллоферона-1 и его биологически активных производных (пептидов I, II, III) однократно в дозе 2 мг на кг веса лабораторных животных. Для эксперимента использовались мыши линии BALB/C, самки, массой 16-22 грамма, возраста 14 недель, полученные из питомника лабораторных животных и прошедшие необходимый карантин. Температура окружающей среды была $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, относительная влажность $60 \pm 5\%$, содержание аммиака составляло 10 ppm, углекислого газа - не превышало 0,15% к объему воздуха, кратность воздухообмена составляла 10-15 крат/час при скорости движения воздуха - 0,3 м/с. Фильтрация воздуха обеспечивали с помощью фильтров грубой фильтрации. Кормили мышей гранулированным комбикормом, изготовленным в соответствии со стандартами приготовления кормов для лабораторных животных. Корм предварительно стерилизовали в автоклаве с

использованием вакуума при 121°C и 1,2 атм. в течение 20 мин. Кормление проводили 1 раз в сутки из расчета 8,0 г. на одну мышь, после чистки клеток. Питьевую воду заливали в бутылки-поилки вместимостью 200 мл и стерилизовали при 121 С и 1,2 атм. в течение 45 мин., пробки автоклавировали отдельно. Поилки ежедневно заменяли на новые. Определялся уровень интерлейкина-18 (IL-18) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, с использованием специфических антител. Количество IL-18 в сыворотке определяли на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48, 56 час после введения препаратов.

Параллельно изучалось «фоновое» количество IL-18, присутствующее в сыворотке крови исследуемых животных. Для этой цели использовалось 14 мышей в качестве контрольной группы, которые получали подкожную инъекцию физиологического раствора. В опытной группе использовалось 168 животных. В случае контрольной группы доверительный интервал рассчитывался по измерениям разведения одного и того же образца. В опытной группе доверительный интервал вычислялся относительно трех образцов от трех животных на каждую измеряемую точку.

Через 3-4 часа после введения у всех пептидов наблюдается небольшой достоверный пик увеличения концентрации IL-18. Через 24 часа наблюдается второй пик значительного увеличения содержания IL-18 в сыворотке крови опытной группы животных, который длится около 20 часов. Наличие первого пика на 3-4 часу возможно обусловлено не специфической индукцией. Значительное повышение IL-18 на 2-3-й день эксперимента свидетельствует о специфической способности препаратов индуцировать изучаемый цитокин. Результаты испытания препарата приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Динамика концентрации ИЛ-18 (пг/мл) в крови мышей после введения физ. раствора, Аллоферона-1 и пептидов I, II, III

Интервал между наблюдениями, часы	Контроль	Аллоферон-1	Пептид I	Пептид II	Пептид III
1	216±15	218±12	230±17	225±15	215±24
2	210±18	216±18	236±12	227±23	223±26
3	208±20	245±15	255±13	232±27	227±13
4	213±17	250±16	257±14	241±13	225±19
5	223±12	220±25	244±16	252±18	220±18
6	203±29	212±30	227±13	226±14	218±14
8	211±21	213±17	229±11	222±29	213±28
12	213±17	224±12	244±15	235±25	215±25
16	218±12	229±11	252±19	235±19	220±15
24	212±22	240±15	305±25	252±22	226±17
32	220±15	362±22	395±18	324±14	325±12
40	200±30	354±14	373±19	374±21	430±21
48	204±28	242±18	231±28	263±17	255±22
56	213±17	291±19	475±25	292±18	308±23

Введение как Аллоферона-1, так и пептидов I, II, III вызвало индукцию ИЛ-18, которая длилась до 3 суток. Максимальная концентрация ИЛ-18 достигается спустя 35 часов после однократного введения пептидов. Характер индукции – интенсивность и временной диапазон – для пептидов одинаков. При этом пептиды I, II, III показывают более высокий уровень индукции интерлейкина-18 чем Аллоферон-1.

Максимальный уровень интерлейкина-18 через 40 часа (430 пг/мл) был зафиксирован для пептида III. Фоновый уровень в среднем в группе контрольных животных составил 200 пг/мл.

Пример 2. Изучение интерферогенности биологически активных производных Аллоферона-1 (пептидов I, II, III)

Активность определялась путем введения подкожно изучаемых пептидов однократно в дозе 1 мг на кг веса лабораторных животных. Для эксперимента использовались мыши линии BALB/C, самки, массой 16-22

грамма, возраста 18 недель, содержащиеся в соответствии с протоколом, изложенным выше в примере 1. Определялся уровень интерферона гамма в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, с использованием специфических антител. Количество интерферона в сыворотке определяли на 3, 6, 12, 16, 24, 32, 40 и 48 час после введения препарата.

Параллельно изучалось «фоновое» количество интерферона гамма, присутствующее в сыворотке исследуемых животных. Для этой цели использовалось 8 мышей в качестве контрольной группы, которые получали подкожную инъекцию физиологического раствора. Среднее значение по контрольной группе на 5% уровне значимости составило 29 ± 8 пг/мл исследуемой сыворотки. В каждой опытной группе также использовались по 8 мышей, которые получали подкожную инъекцию препаратов в дозе 25 мкг с изучаемыми пептидами I, II, III, а также Аллофероном-1. Результаты испытания препаратов представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Изучение динамики индукции интерферона гамма биологически активными производными Аллоферона-1 (пептидами I, II, III)

Интервал между наблюдениями, часы	Контроль	Аллоферон-1	Пептид I	Пептид II	Пептид III
3	30 ± 7	91 ± 16	101 ± 17	89 ± 15	95 ± 14
6	28 ± 5	88 ± 12	99 ± 13	90 ± 12	87 ± 14
12	29 ± 8	62 ± 5	63 ± 6	71 ± 7	64 ± 12
16	31 ± 6	46 ± 7	40 ± 12	42 ± 7	42 ± 14
24	28 ± 9	38 ± 6	36 ± 9	29 ± 9	21 ± 6
32	28 ± 12	28 ± 7	34 ± 14	23 ± 8	22 ± 8
40	30 ± 6	22 ± 7	22 ± 10	21 ± 7	26 ± 5
48	29 ± 13	29 ± 12	25 ± 8	29 ± 9	29 ± 8

Полученные данные свидетельствуют о том, что изучаемые пептиды I, II, III вызывают индукцию интерферона гамма превышающую уровень индукции Аллоферона-1.

На основании вышеизложенного можно утверждать, что разработанный пептид обладает всеми заявленными свойствами.

Пример 3. Изучение влияния биологически активных производных Аллоферона-1 (пептидов I, II, III) на резистентность мышей к вирусу гриппа А

Антивирусное действие биологически активных производных Аллоферона-1 (пептидов I, II, III) изучали на модели летальной вирусной инфекции мышей вирусом гриппа А. Суспензию вируса вводили интраназально в дозе, соответствующей 10 LD₅₀. Аллоферон-1 и его производные (пептиды I, II, III) в 0,5 мл 0.9% раствора натрия хлорида вводили внутривбрюшинно за одни сутки до инокуляции вируса, затем через 1,2,4,6 и 8 дней после инокуляции. Препараты испытывали в дозе 25 мкг. В контроле мышам вводили равный объем растворителя. Критерием эффективности служила выживаемость животных через 10 суток после инфицирования вирусом. Для проведения эксперимента были отобраны половозрелые белые мыши, самцы, весом 20,0-22,0 г, полученные из питомника лабораторных животных и прошедшие необходимый карантин. Содержание мышей осуществлялось по протоколу, изложенному выше в примере 1. В эксперименте были использованы 100 мышей.

Введение Аллоферона-1 и его производных инфицированным животным вызвало дозозависимый протекторный эффект (Таблица 3). Препараты в дозе 25 мкг вызвали значительное увеличение числа выживших в течение срока наблюдения животных. Эффект данной дозы высокодостоверен.

Таблица 3

**Изучение влияния биологически активных производных Аллоферона-1
(пептидов I, II, III) на резистентность мышей к вирусу гриппа А.**

Препарат	Доза, мкг	К-во животных	Смертность через 10 суток после введения вируса	
			N	%
Контроль	-	20	14	70
Аллоферон-1	25	20	5	25**
Пептид I	25	20	1	5***
Пептид II	25	20	3	15**
Пептид III	25	20	2	10**

**P<0,01

***P<0,001

Таким образом, результаты примера 3 свидетельствуют о том, что биологически активные производные Аллоферона-1 (пептиды I, II, III) в дозе 25 мкг оказывают выраженное антивирусное действие на мышей, инфицированных вирусом гриппа А, превышающее антивирусное действие Аллоферона-1.

Пример 4. Изучение влияния биологически активных производных Аллоферона-1 (пептидов I, II, III) на резистентность мышей к вирусу гриппа В

Исследование влияния биологически активных производных Аллоферона-1 (пептидов I, II, III) на устойчивость мышей к вирусу гриппа В проводилось на 120 мышах. Для проведения эксперимента были отобраны половозрелые белые мыши, самцы, весом 20,0-22,0 г, полученные из питомника лабораторных животных и прошедшие необходимый карантин.

Содержание мышей осуществлялось по протоколу, изложенному выше в примере 1. Мышей инфицировали штаммом LEE 1/40 вируса гриппа В, взятым в инфекционной дозе, соответствующих 30 ЛД₅₀. В качестве позитивного контроля использовали специфический противовирусный препарат Рибавирин.

Аллоферон-1 и его производные вводили внутривентриально в дозе 25 мкг за 1 сутки до инфицирования вирусом, затем через 1,2,4,6 и 8 суток.

Результаты изложены в Таблице 4.

Таблице 4.

Изучение влияния биологически активных производных Аллоферона-1 (пептидов I, II, III) на резистентность мышей к вирусу гриппа В

Препарат	Доза вируса (ЛД ₅₀)	К-во животных	Смертность через 10 суток после введения вируса	
			N	%
Контроль	30	20	16	80
Рибавирин	30	20	12	60
Аллоферон-1	30	20	6	30**
Пептид I	30	20	1	5***
Пептид II	30	20	3	15**
Пептид III	30	20	2	10**

**P<0,01

***P<0,001

В контроле интраназальное введение вируса вызвало тяжелую пневмонию с высокой летальностью (80%). На этом фоне Рибавирин при высокой инфекционной нагрузке (30 ЛД₅₀) в условиях данного эксперимента оказался малоэффективным. В то же время биологически активные

производные Аллоферона-1 (пептиды I, II, III) оказали выраженное протекторное действие, превышающее антивирусное действие Аллоферон-1.

Таким образом, результаты примера 4 свидетельствуют о том, что биологически активные производные Аллоферона-1 (пептиды I, II, III) в дозе 25 мкг оказывают выраженное антивирусное действие на мышей, инфицированных вирусом гриппа В, существенно превышающее защитный эффект Рибавирина, хорошо зарекомендовавшего себя антивирусного средства, а также Аллоферона-1 и могут служить основой для создания новых антивирусных препаратов.

SEQUENCE LISTING

<110> Общество с ограниченной ответственностью «Аллоферон»
 Obshchestvo S Ogranichennoy Otvetstvennostyu
 <120> Биологически активные производные Аллоферона-1
 Biologically active derivates of alloferon-1
 <130> RU2013141484
 <140> RU 2013141484
 <141> 2013-09-10
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 искусственная последовательность
 <220>
 <223> Peptide 1
 Пептид 1
 <220>
 <221> misk_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be phenylalanine having a amino group in para-position
 Xaa может быть фенилаланином, имеющим амино-группу в пара-положении
 <400> 1
 Xaa Gly Val Ser Gly His Gly Gln His Gly Val His Gly
 1 5
 10

Формула изобретения

1. Производные Аллоферона-1

Phe(p-R)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly,

где R: NH₂, Cl, OMe

обладающие высокой иммуномодулирующей, противораковой и противовирусной активностью;

2. Фармацевтические композиции, содержащие пептиды по п.1 или их фармацевтически приемлемые соли в сочетании со стандартными вспомогательными веществами.