

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035031**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.20

(21) Номер заявки
201401291

(22) Дата подачи заявки
2014.12.19

(51) Int. Cl. **C07K 7/08** (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЕ ПРОИЗВОДНОЕ АЛЛОФЕРОНА-1

(31) 2013141484

(32) 2013.09.10

(33) RU

(43) 2016.01.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ
ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬ БЕККЕР
ГЕРМАН ПЕТРОВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:

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

(56) KUCZER Mariola et al. New Alloferon Analogues: Synthesis and Antiviral Properties, Chem Biol Drug Des, 2013, 81 (2): p. 302-309. doi: 10.1111/cbdd.12020. Epub 2012, Nov 19
RU-C2-2267496
RU-C2-2470031

(57) 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 аминокгруппу в пара-положении ароматического звена, получено производное Аллоферона-1: Phe(p-NH₂)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly. Полученный пептид стимулирует индукцию интерлейкина-18, интерферон-гамма, подавляет вирусы гриппа А и В и, следовательно, обладает иммуномодулирующей, противораковой и противовирусной активностью. Указанное производное Аллоферона-1 может быть использовано для создания лекарственных средств.

B1

035031

035031

B1

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

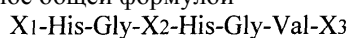
Известна группа противовирусных пептидов, выделенных из насекомых с общей формулой X_1 -His-Gly- X_2 -His-Gly-Val- X_3 , или их фармацевтически приемлемые соли, или эфиры, или амиды, где X_1 отсутствует либо содержит не менее 1 аминокислоты; X_2 содержит не менее 1 аминокислоты либо представляет собой 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 С07К 7/06, С07К 7/08, А61К 38/08, А61К 38/10, А61Р 37/02, 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 пептидов, описываемое общей формулой

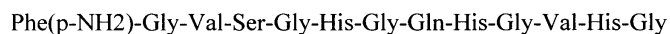


включает большое число молекул, построенных на основе природных аминокислот, обладающих широким спектром биологических свойств.

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 в пара-положении нуклеофильный заместитель, получен пептид



Phe(p-NH₂)-Аллоферон

Технический результат состоит в том, что полученный пептид обладает высокой иммуномодулирующей, противораковой и противовирусной активностью, что будет подтверждено примерами.

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

Сырой пептид промывали холодным диэтиловым эфиром, растворяли в воде и лиофилизовали. Очистка пептида производилась методом HPLC с использованием колонок TOSOH Bioscience C18 (21,5×300 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. Очищенный лиофилизованный пептид имел чистоту более 95%.

Финишная стадия получения пептида - лиофилизация из раствора в 50% уксусной кислоте.

Химическая идентификация пептида 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 Phe(p-NH₂)-Аллоферона на индукцию IL-18.

Индукция осуществлялась путем введения подкожно Phe(p-NH₂)-Аллоферона и для сравнения Аллоферона-1 однократно в дозе 2 мг на 1 кг веса лабораторных животных. Для эксперимента использовались мыши линии BALB/C, самки, массой 16-22 г, возраста 14 недель, полученные из питомника лабораторных животных и прошедшие необходимый карантин. Температура окружающей среды была 22±2°C, относительная влажность 60±5%, содержание аммиака составляло 10 ppm, углекислого газа - не превышало 0,15% к объему воздуха, кратность воздухообмена составляла 10-15 крат/ч при скорости движения воздуха - 0,3 м/с. Фильтрация воздуха обеспечивалась 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°C 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 ч 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 84 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 ч после введения у пептидов наблюдается небольшой достоверный пик увеличения концентрации IL-18. Через 24 ч наблюдается второй пик значительного увеличения содержания IL-18 в сыворотке крови опытной группы животных, который длится около 20 ч. Наличие первого пика на 3-4 ч 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 табл. 1.

Таблица 1

Динамика концентрации ИЛ-18 (пг/мл) в крови мышей после введения Phe(p-NH₂)-Аллоферона

| Интервал между наблюдениями -ми, часы | Контроль | Аллоферон-1 | Phe(p-NH ₂)-Аллоферон |
|---------------------------------------|----------|-------------|-----------------------------------|
| 1 | 216±15 | 218±12 | 230±17 |
| 2 | 210±18 | 216±18 | 236±12 |
| 3 | 208±20 | 245±15 | 255±13 |
| 4 | 213±17 | 250±16 | 257±14 |
| 5 | 223±12 | 220±25 | 244±16 |
| 6 | 203±29 | 212±30 | 227±13 |
| 8 | 211±21 | 213±17 | 229±11 |
| 12 | 213±17 | 224±12 | 244±15 |
| 16 | 218±12 | 229±11 | 252±19 |
| 24 | 212±22 | 240±15 | 305±25 |
| 32 | 220±15 | 362±22 | 395±18 |
| 40 | 200±30 | 354±14 | 373±19 |
| 48 | 204±28 | 242±18 | 231±28 |
| 56 | 213±17 | 291±19 | 475±25 |

Введение как Phe(p-NH₂)-Аллоферона, так и Аллоферона-1 вызвало индукцию ИЛ-18, которая длилась до 3 суток. Максимальная концентрация ИЛ-18 достигается спустя 32 ч после однократного введения пептида. Характер индукции - интенсивность и временной диапазон - для пептидов одинакова. При этом Phe(p-NH₂)-Аллоферон показывают более высокий уровень индукции интерлейкина-18, чем Аллоферон-1.

Максимальный уровень интерлейкина-18 был зафиксирован для Phe(p-NH₂)-Аллоферона через 32 ч (395 пг/мл). Фоновый уровень в среднем в группе контрольных животных составил 200 пг/мл.

Пример 2. Изучение интерферогенности Phe(p-NH₂)-Аллоферона.

Активность определялась путем введения Phe(p-NH₂)-Аллоферона и Аллоферона-1 подкожно однократно в дозе 1 мг на 1 кг веса лабораторных животных. Для эксперимента использовались мыши линии BALB/C, самки, массой 16-22 г, возраста 18 недель, содержащиеся в соответствии с протоколом, изложенным выше в примере 1. Определялся уровень интерферон-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 ч после введения препарата.

Параллельно изучалось "фоновое" количество интерферон-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 в дозе 25 мкг с изучаемым Phe(p-NH₂)-Аллофероном, а также Аллофероном-1. Результаты испытания препаратов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Изучение динамики индукции интерферон-гамма

| Интервал между наблюдениями, часы | Контроль | Аллоферон-1 | Phe(p-NH ₂)-Аллоферон |
|-----------------------------------|----------|-------------|-----------------------------------|
| 3 | 30±7 | 91±16 | 101±17 |
| 6 | 28±5 | 88±12 | 99±13 |
| 12 | 29±8 | 62±5 | 63±6 |
| 16 | 31±6 | 46±7 | 40±12 |
| 24 | 28±9 | 38±6 | 36±9 |
| 32 | 28±12 | 28±7 | 34±14 |
| 40 | 30±6 | 22±7 | 22±10 |
| 48 | 29±13 | 29±12 | 25±8 |

Полученные данные свидетельствуют о том, что Phe(p-NH₂)-Аллоферон вызывает индукцию интерферон-гамма, превышающую уровень индукции Аллоферона-1.

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

Пример 3. Изучение влияния Phe(p-NH₂)-Аллоферона на резистентность мышей к вирусу гриппа А.

Антивирусное действие пептида изучали на модели летальной вирусной инфекции мышей вирусом гриппа А. Суспензию вируса вводили интраназально в дозе, соответствующей 10 LD₅₀. Аллоферон-1 и Phe(p-NH₂)-Аллоферон в 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида вводили внутривентриально 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 60 мышей.

Введение Phe(p-NH₂)-Аллоферона и Аллоферона-1 инфицированным животным вызывало дозозависимый протекторный эффект (табл. 3). Препараты в дозе 25 мкг вызвали значительное увеличение числа выживших в течение срока наблюдения животных. Эффект данной дозы высокодостоверен.

Таблица 3

Изучение влияния Phe(p-NH₂)-Аллоферона 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** |
| Phe(p-NH ₂)-Аллоферон | 25 | 20 | 1 | 5*** |

**P<0,01.

***P<0,001.

Таким образом, результаты примера 3 свидетельствуют о том, что Phe(p-NH₂)-Аллоферон в дозе 25 мкг оказывает выраженное антивирусное действие на мышей, инфицированных вирусом гриппа А, превышающее антивирусное действие Аллоферона-1.

Пример 4. Изучение влияния Phe(p-NH₂)-Аллоферона на резистентность мышей к вирусу гриппа В.

Исследование влияния Phe(p-NH₂)-Аллоферона 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 LD₅₀. В качестве позитивного контроля использовали специфический антивирусный препарат Рибавирин.

Аллоферон-1 и Phe(p-NH₂)-Аллоферон вводили внутривентриально в дозе 25 мкг за 1 сутки до инфицирования вирусом, затем через 1, 2, 4, 6 и 8 суток.

Результаты изложены в табл. 4.

Таблица 4

Изучение влияния пептидов на резистентность мышей к вирусу гриппа В

| Препарат | Доза вируса (LD 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** |
| Phe(p-NH ₂)- Аллоферон | 30 | 20 | 1 | 5*** |

**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 LD₅₀) в условиях данного эксперимента оказался малоэффективным. В то же время Phe(p-NH₂)-Аллоферон оказал выраженное протекторное действие, превышающее антивирусное действие Аллоферон-1.

Таким образом, результаты примера 4 свидетельствуют о том, что Phe(p-NH₂)-Аллоферон в дозе 25 мкг оказывает выраженное антивирусное действие на мышей, инфицированных вирусом гриппа В, существенно превышающее защитный эффект Рибавирина, хорошо зарекомендовавшего себя антивирусного средства, а также Аллоферона-1 и может служить основой для создания новых антивирусных препаратов.

Перечень последовательностей

```

<110> Общество с ограниченной ответственностью «ЮНИТ МФ»
Obshchestvo S Ogranichennoy Otvetstvennostyu «UNIT MF»

<120> Биологически активное производное 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> белок
<213> artificial sequence
искусственная последовательность

<220>
<223> Peptide 1
Пептид 1

<220>
<221> misc_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. Производное Аллоферона-1 с аминокислотной последовательностью Phe(p-NH₂)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly, обладающее высокой иммуномодулирующей, противораковой и противовирусной активностью.

2. Иммуномодулирующая, противораковая и противовирусная фармацевтическая композиция, содержащая производное Аллоферона-1 по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль в сочетании со вспомогательными веществами.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2