

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090811 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.19(51) Int. Cl. C07K 7/06 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.03.14

(54) ПЕПТИД ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АНГИОГЕНЕЗА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 10-2017-0122571

(72) Изобретатель:

(32) 2017.09.22

Чунг Йонг Жи, Ким Эюн Ми, Ли
Эюнг Жи (KR)

(33) KR

(86) PCT/KR2018/002978

(74) Представитель:

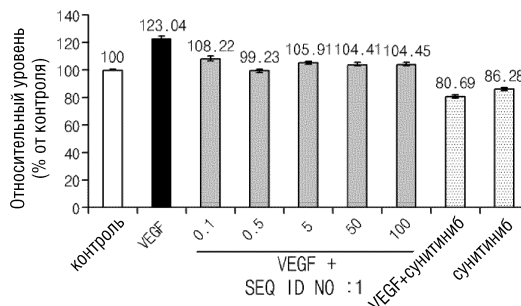
(87) WO 2019/059476 2019.03.28

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

КАРЕДЖЕН КО., ЛТД. (KR)

(57) Изобретение относится к новому пептиду с ангиогенез-ингибирующей активностью и к применению пептида, связанному с лечением или профилактикой заболеваний с избыточным ангиогенезом. В частности, новый пептид по настоящему изобретению связывается с рецепторами VEGF, конкурируя с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), и может значительно ингибировать пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток эндотелия сосудов, таким образом, его можно эффективно использовать в качестве активного ингредиента композиции или функционального диетического пищевого продукта для профилактики или лечения заболеваний, таких как дегенерация желтого пятна, опухоль, артрит или псориаз, вызванных избыточным ангиогенезом.



A1

202090811

202090811

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 561946EA/042

ПЕПТИД ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АНГИОГЕНЕЗА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому пептиду с ангиогенез-ингибирующей активностью и к применению пептида, связанному с лечением или профилактикой заболеваний, связанных с избыточным ангиогенезом.

Уровень техники

Ангиогенез представляет собой биологический процесс, который обеспечивает ткани или органы новыми кровеносными сосудами, и в частности, он относится к образованию новых капилляров из существующих микроваскулярных сосудов, и является фундаментальным процессом образования кровеносных сосудов в организме после роста. Физиологический ангиогенез, обычно наблюдаемый в организме человека, встречается только в очень ограниченном числе ситуаций, как, например, развитие эмбриона и плода, созревание матки, пролиферация плаценты, образование желтого тела и заживление ран, и даже в это время физиологический ангиогенез также очень жестко регулируется, так что, когда достигнуты необходимые функции, ангиогенез прекращается. Образование новых кровеносных сосудов жестко регулируется с помощью фактора, регулирующего ангиогенез, и было описано, что фенотипы ангиогенеза изменяются из-за общего баланса между положительной регуляцией факторов, стимулирующих ангиогенез, и негативной регуляцией факторов, ингибирующих ангиогенез (Folkman J., *Nat. Med.*, 1 (1): 27-31 (1995)).

Процесс образования новых кровеносных сосудов очень сложный и тонко организованный, но в общих чертах, процесс заключается в следующем. Во-первых, когда стимулы для ангиогенеза поступают к существующим кровеносным сосудам, кровеносные сосуды расширяются, и увеличивается проницаемость мембран. Во-вторых, фибрин высвобождается из кровеносного сосуда через расширенный кровеносный сосуд, а затем осаждается на цитоплазматическом матриксе вокруг кровеносного сосуда. В-третьих, активируются ферменты для разрушения базальных мембран существующих кровеносных сосудов, и разрушаются базальные мембраны, а эндотелиальные клетки высвобождаются из кровеносных сосудов между ними, а затем размножаются и мигрируют из матрикса окружающих клеток. Наконец, эндотелиальные клетки, расположенные в ряд, формируют трубку для образования новых кровеносных сосудов (Risau W., *Nature*, 386 (6626): 671-674 (1997)).

Заболевания, связанные с ангиогенезом, возникающим в патологическом состоянии, могут быть в значительной степени классифицированы как воспалительные заболевания, такие как артрит, офтальмологические заболевания, такие как диабетическая ретинопатия, дерматологические заболевания, такие как псориаз и злокачественная опухоль, как наиболее типичное заболевание (Folkman J., *Nat. Med.*, 1 (1): 27-31 (1995)). Офтальмологические заболевания, вызванные ангиогенезом, включают такие заболевания,

как дегенерация желтого пятна, диабетическая ретинопатия, при которых капилляры в сетчатке проникают в стекловидное тело, и в конечном итоге пациент становится слепым из-за осложнений сахарного диабета, ретинопатии у недоношенных детей, неоваскулярной глаукомы и т.п., и миллионы людей во всем мире ослепли из-за этих заболеваний. Кроме того, артрит возникает из-за аутоиммунной патологии, но известно, что хроническое воспаление, возникшее в синовиальной полости, индуцирует ангиогенез в ходе развития заболевания, и артрит представляет собой заболевание, которое вызвано тем, что новые капилляры проникают в суставы, разрушая хрящ. Кроме того, псориаз представляет собой хроническое пролиферативное заболевание, возникающее в коже, и поскольку для быстрой пролиферации необходимо много крови, активно происходящий ангиогенез не может помочь.

Между тем, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) среди факторов, стимулирующих ангиогенез, активирует различные цепи реакций по передаче сигнала и играет роль в индукции пролиферации, миграции и дифференцировки эндотелиальных клеток. Таким образом, биологическая активность и цепь реакций по передаче сигнала VEGF могут быть ингибированы с помощью нейтрализующих антител и ингибиторов передачи сигнала VEGF, которые могут стать терапевтической стратегией, способной лечить различные заболевания, связанные с ангиогенезом.

Однако, даже несмотря на то, что ингибирующие ангиогенез лекарственные средства, нацеленные на VEGF или рецепторы VEGF, могут лечить ряд заболеваний, связанных с аномальным ангиогенезом, до сих пор нет известных пептидов, которые связываются с рецепторами VEGF в конкуренции с VEGF и значительно ингибируют пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток эндотелия сосудов.

Техническая задача

Целью настоящего изобретения является создание нового пептида для ингибирования ангиогенеза.

Другой целью настоящего изобретения является разработка применения нового пептида для профилактики или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом.

Решение технической задачи

Для достижения поставленных целей в одном аспекте настоящее изобретение относится к пептиду для ингибирования ангиогенеза, включающему аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или 2.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, которая содержит пептид в качестве активного ингредиента.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к функциональному диетическому пищевому продукту для профилактики или улучшения заболеваний, связанных с ангиогенезом, которое содержит пептид в качестве активного ингредиента.

Полезные эффекты

Новый пептид по настоящему изобретению связывается с рецепторами фактора

роста эндотелия сосудов (VEGF), конкурируя с VEGF, и значительно ингибирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток эндотелия сосудов, благодаря чему может эффективно использоваться в качестве активного ингредиента в композиции для профилактики или лечения заболеваний, вызванных избыточным ангиогенезом.

Однако эффекты по настоящему изобретению не ограничиваются указанными выше эффектами, и другие неупомянутые эффекты будут понятны специалистам в данной области из следующего описания.

Описание чертежей

Фиг. 1 и 2 представляют собой графики с результатами, подтверждающими эффект ингибирования пролиферации клеток эндотелия сосудов пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, соответственно.

Фиг. 3 (a), 3 (b), 4 (a), и 4 (b) представляют собой диаграммы и графики с результатами, подтверждающими эффект ингибирования дифференцировки клеток эндотелия сосудов пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, соответственно.

Фиг. 5 и 6 представляют собой диаграммы с результатами, подтверждающими эффект ингибирования клеточного пути передачи сигнала, индуцированного VEGF, пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, соответственно.

Фиг. 7 и 8 представляют собой диаграммы с результатами, подтверждающими эффект изменения уровня экспрессии белка eNOS при помощи пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, соответственно.

Фиг. 9 и 10 представляют собой диаграммы с результатами, подтверждающими эффект изменения уровня экспрессии белка BAX при помощи пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, соответственно.

Фиг. 11 и 12 представляют собой графики с результатами, подтверждающими эффект того, что пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 и пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 связываются с рецепторами VEGF, соответственно.

Фиг. 13 и 14 представляют собой графики, показывающие результаты подтверждения того, что пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 и пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 связываются с рецепторами VEGF, конкурируя с VEGF, соответственно.

На фиг. с 1 до 14, «VEGF+SEQ ID NO: 1» представляет группу, обработанную как VEGF, так и пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, «VEGF+SEQ ID NO: 2» представляет группу, обработанную как VEGF, так и пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и «VEGF+Сунитиниб» или

«VEGF+Suni» представляет группу, получавшую как VEGF, так и сунитиниб.

Лучший вариант осуществления изобретения

Далее в настоящем документе настоящее изобретение будет описано подробно.

1. Пептиды для ингибирования ангиогенеза

В одном аспекте настоящее изобретение относится к новому пептиду с ангиогенез-ингибирующей активностью.

Пептид относится к полимеру, состоящему из двух или более аминокислот, связанных пептидными связями, и его недостаток в том, что пептид не эффективно вводится в целевую ткань или клетку из-за слишком большого размера самого пептида и быстро исчезает в организме из-за короткого времени полувыведения. Пептид по настоящему изобретению состоит из 20 или менее, предпочтительно 15 или менее, более предпочтительно 10 или менее аминокислот с ангиогенез-ингибирующей активностью.

Новый пептид по настоящему изобретению может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 и может быть вариантами или фрагментами аминокислот, имеющих разные последовательности за счет делеции, вставки, замены или комбинации аминокислотных остатков в пределах диапазона, который не влияет на ангиогенез-ингибирующую активность пептида. Замена аминокислот на уровне пептида, которая не изменяет ангиогенез-ингибирующую активность пептида в целом, известна в данной области. В некоторых случаях замена аминокислот может быть модифицирована путем фосфорилирования, сульфатирования, акрирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования и т.п. Таким образом, настоящее изобретение относится к пептиду с аминокислотной последовательностью, по существу идентичной пептиду с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и его вариантам или активным фрагментам. «По существу идентичный белок» относится к аминокислотной последовательности, имеющей гомологию последовательности 75% или более, предпочтительно 80% или более, более предпочтительно 90% или более, и наиболее предпочтительно 95% или более с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Кроме того, пептид может дополнительно включать аминокислотную последовательность, подготовленную с определенной целью, чтобы увеличить нацеливающую последовательность, метку, меченые остатки, время полувыведения или стабильность пептида.

Пептид по настоящему изобретению можно получать различными способами, хорошо известными в данной области. В качестве примера, пептид можно получать с использованием полинуклеотидной рекомбинации и белок-экспрессирующей системы или получать путем синтеза *in vitro* с помощью химического синтеза, такого как пептидный синтез, бесклеточный синтез белка и т.п.

Дополнительно, чтобы получить лучшую химическую стабильность, улучшенные фармакологические свойства (полувыведение, абсорбцию, титр, эффективность и т. д.), модифицированную специфичность (например, широкий спектр биологической

активности) и сниженную антигенность, можно связывать защитную группу с N- или C-концом пептида. Предпочтительно, защитная группа может быть ацетиловой группой, флуоренилметоксикарбонильной группой, формильной группой, пальмитоиловой группой, миристильной группой, стеарильной группой или полиэтиленгликолем (ПЭГ), но может включать без ограничений любые ингредиенты, которые могут усиливать модификацию пептида, в частности, стабильность пептида.

«Стабильность пептида» означает не только уровень стабильности *in vivo*, который защищает пептиды по настоящему изобретению от воздействия ферментов, расщепляющих белок *in vivo*, но также стабильность при хранении (например, стабильность при хранении при комнатной температуре).

Для подтверждения эффекта ингибирования пролиферации и дифференцировки клеток эндотелия сосудов пептидами по настоящему изобретению, в конкретном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения, клетки эндотелия сосудов обрабатывали пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, а затем подтверждали степень пролиферации и дифференцировки клеток эндотелия сосудов. В результате было подтверждено, что пролиферация и дифференцировка клеток эндотелия сосудов, индуцированная VEGF, была снижена в зависимости от того, обрабатывали ли их пептидом по настоящему изобретению (см. фиг. с 1 до 4).

Дополнительно, для подтверждения эффекта ингибирования клеточного пути передачи сигнала, индуцированного VEGF, пептидами по настоящему изобретению в конкретном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения, клетки эндотелия сосудов обрабатывали пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, а затем подтверждали изменения в фосфорилировании рецептора VEGF (VEGFR2), ERK, АКТ и p38, индуцированного VEGF. В результате было подтверждено, что пептиды по настоящему результату значительно ингибируют фосфорилирование VEGFR2, ERK, АКТ и p38, индуцированное VEGF (см. фиг. 5 и 6).

Дополнительно, для подтверждения эффекта ингибирования миграции клеток эндотелия сосудов пептидами по настоящему изобретению в конкретном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения подтверждали изменение уровня экспрессии клеточной миграции сосудистого эндотелия «eNOS» в зависимости от обработки клеток эндотелия сосудов пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В результате подтверждено, что пептиды по настоящему изобретению снижают экспрессию eNOS, повышенную при обработке VEGF, в зависимости от концентрации (см. фиг. 7 и 8).

Дополнительно, для подтверждения влияния пептидов по настоящему изобретению на проапоптотические белки, экспрессию которых снижает VEGF, в конкретном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве результата подтверждения изменения уровня экспрессии белка BAX в соответствии с обработкой сосудистых эндотелиальных клеток пептидом с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, подтвердили, что экспрессия белка BAX, который является белком, индуцирующим апоптоз, была снижена с помощью VEGF, в то время как экспрессия белка BAX была повышена в зависимости от концентрации в группе, обработанной пептидами по настоящему изобретению (см. фиг. 9 и 10).

Дополнительно, чтобы подтвердить конкурентное связывание с рецепторами VEGF в конкретном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения, в качестве результата подтверждения того, связывается ли пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 с рецептором VEGF, и связывается ли пептид с рецептором VEGF в конкуренции с VEGF, подтвердили, что пептиды по настоящему изобретению связываются с VEGFR2, конкурируя с VEGF (см. фиг. 13 и 14).

Таким образом, поскольку пептиды по настоящему изобретению связываются с рецепторами VEGF, конкурируя с VEGF, и значительно ингибируют пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток эндотелия сосудов, очевидно, что пептиды обладают активностью, которая эффективно ингибирует ангиогенез, и, таким образом, пептиды по настоящему изобретению можно эффективно использовать в качестве активного ингредиента в композиции для ингибирования избыточного ангиогенеза.

2. Фармацевтические композиции для лечения или профилактики заболеваний, связанных с ангиогенезом

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, включающей в качестве активного ингредиента пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, является таким же, как и пептид, описанный в разделе 1 «Пептид для ингибирования ангиогенеза», а подробное описание цитирует раздел 1 «Пептид для ингибирования ангиогенеза». Далее в настоящем изобретении будет описана только уникальная конфигурация фармацевтической композиции для лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом.

«Заболевание, связанное с ангиогенезом» относится к заболеванию, вызываемому аномально прогрессирующим ангиогенезом, и включает злокачественную опухоль, диабетическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных, неоваскулярную глаукому, меланому, пролиферативную ретинопатию, влажную макулодистрофию, псориаз, гемофильные суставы, гиперплазию капилляров в атеросклеротических бляшках, келоидные рубцы, грануляцию ран, сосудистую адгезию, ревматоидный артрит, остеоартрит, аутоиммунные заболевания, болезнь Крона, рестеноз, атеросклероз, болезнь кошачьей царапины, язвы, гломерулонефрит, диабетическую нефропатию, злокачественный невроз, тромботическую микроангиопатию или почечную гломерулопатию.

Таким образом, поскольку заболевания, вызванные ангиогенезом, можно предотвратить или лечить путем ингибирования ангиогенеза, для лечения заболеваний,

связанных с ангиогенезом, можно эффективно использовать композицию, содержащую в качестве активного ингредиента пептиды по настоящему изобретению, которые связываются с рецепторами VEGF в конкуренции с VEGF и значительно ингибируют пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток эндотелия сосудов.

С другой стороны, пептиды по настоящему изобретению могут находиться в фармацевтически приемлемых носителях, таких как коллоидные суспензии, порошки, физиологический раствор, липиды, липосомы, микросферы или наносферические частицы. Эти пептиды могут образовывать комплекс с носителем или могут быть связаны с комплексом с носителем и могут переноситься *in vivo* с использованием систем переноса, известных в данной области, таких как липиды, липосомы, микрочастицы, частицы золота, наночастицы, полимеры, конденсирующие реагенты, полисахариды, полиаминокислоты, дендримеры, сапонин, вещества, улучшающие адсорбцию или жирные кислоты.

Кроме того, фармацевтически приемлемый носитель может включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, смолу гуммиарабика, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло, которые, как правило, используют при получении, но не ограничиваются этими веществами. Кроме того, фармацевтическая композиция может дополнительно включать смазочное средство, увлажнитель, подсластитель, ароматизатор, эмульгатор, суспендирующее средство, консервант и т.п. в дополнение к вышеуказанным ингредиентам.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить перорально или парентерально (например, применять внутримышечно, внутривенно, интраперитонеально, подкожно, интрадермально или местно) в соответствии с желаемым способом, и дозировка варьируется в зависимости от состояния и массы пациента, степени заболевания, формы лекарственного средства и пути и времени введения, но может быть выбрана соответствующим образом специалистами в данной области.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в фармацевтически эффективной дозе. В настоящем изобретении «фармацевтически эффективная доза» относится к достаточному количеству для лечения заболеваний с разумным соотношением польза/риск, применимым к медицинскому лечению, и уровень эффективной дозы можно определять в соответствии с факторами, включающими тип и тяжесть заболевания пациента, активность лекарственного средства, чувствительность к лекарственному средству, время введения, способ введения, скорость выделения, продолжительность лечения и одновременно используемые лекарственные средства, а также другими факторами, хорошо известными в области медицины. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в виде отдельного терапевтического средства или в комбинации с другими ингибиторами ангиогенеза, и можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с общепринятыми

терапевтическими средствами, и можно вводить однократно или многократно. Важно вводить количество, способное достичь максимального эффекта с минимальным количеством без побочных эффектов, учитывая все факторы, и его могут легко определить специалисты в данной области.

В частности, эффективная доза фармацевтической композиции по настоящему изобретению может варьировать в зависимости от возраста, пола, состояния и массы пациента, поглощения активного ингредиента *in vivo*, скорости инактивации, уровня экскреции, типа заболевания и лекарственных средств, которые будут использоваться в комбинации, и может быть увеличена или уменьшена в зависимости от пути введения, тяжести ожирения, пола, массы, возраста и т. д. Например, пептид по настоящему изобретению можно вводить в количестве от 0,0001 мкг до 500 мг, предпочтительно от 0,01 мкг до 100 мг на кг массы тела пациента в сутки.

3. Функциональный диетический пищевой продукт для улучшения заболеваний, связанных с ангиогенезом

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к функциональному диетическому пищевому продукту для профилактики или облегчения заболеваний, связанных с ангиогенезом, включающему в качестве активного ингредиента пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, является таким же, как и пептид, описанный в разделе 1 «Пептид для ингибирования ангиогенеза», а подробно описывает раздел 1 «Пептид для ингибирования ангиогенеза». Далее в настоящем изобретении будет описана только уникальная конфигурация функционального диетического пищевого продукта.

Подобно фармацевтической композиции, поскольку заболевания, вызванные ангиогенезом, можно предотвращать или лечить путем ингибирования ангиогенеза, функциональный диетический пищевой продукт, включающий в качестве активного ингредиента пептиды по настоящему изобретению, которые связываются с рецепторами VEGF в конкуренции с VEGF и значительно ингибируют пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток эндотелия сосудов, может быть эффективно использовано для профилактики или улучшения заболеваний, связанных с ангиогенезом.

Функциональный диетический пищевой продукт можно использовать одновременно или отдельно с лекарственным средством для лечения до или после начала заболевания для профилактики или улучшения заболевания.

В функциональном диетическом пищевом продукте по настоящему изобретению активный ингредиент можно добавлять в пищу, как он есть, или использовать вместе с другими пищевыми продуктами или пищевыми ингредиентами, и можно соответствующим образом использовать в соответствии с общим способом. Количество смешиваемых активных ингредиентов может быть определено подходящим образом в соответствии с целью их использования (для профилактики или улучшения). В основном, для получения продуктов питания или напитков можно добавлять композицию по

настоящему изобретению в количестве предпочтительно 15% масс. или менее, более предпочтительно 10% масс. или меньше в отношении сырья. Однако в случае длительного приема пищи в целях здоровья и гигиены или по нормативному документу количество может быть равным или меньше, чем вышеупомянутый диапазон.

Функциональный диетический пищевой продукт по настоящему изобретению может содержать другие ингредиенты в качестве обязательных ингредиентов без конкретных ограничений, в дополнение к активным ингредиентам. Например, как в обычных напитках, в качестве дополнительного ингредиента могут содержаться различные ароматизаторы или природные углеводы. Примеры указанных выше природных углеводов могут включать общепринятые сахара, такие как моносахариды, такие как глюкоза, фруктоза и т.п.; дисахариды, такие как мальтоза, сахароза и т.п.; и полисахариды, такие как декстрин, циклодекстрин и т. д., и сахарные спирты, такие как ксилит, сорбит, эритритол и т. п. В качестве ароматизаторов, отличных от описанных выше, могут быть с успехом использованы натуральные ароматизаторы (тауматин, экстракт стевии (например, Ребаудиозид А, глициргинин и т.д.)) и синтетические ароматизаторы (сахарин, аспартам и т.д.). Соотношение природных углеводов может быть соответствующим образом определено выбором специалистов в данной области.

Кроме того, функциональный диетический пищевой продукт по настоящему изобретению может содержать различные питательные вещества, витамины, минералы (электролиты), ароматизаторы, такие как синтетические и натуральные ароматизаторы, красители и усилители вкуса (сыр, шоколад и т.д.), пектиновую кислоту и ее соли, альгиновую кислоту и ее соли, органическую кислоту, защитный коллоидный загуститель, средство регуляции pH, стабилизатор, консервант, глицерин, спирт, вещество угольной кислоты, используемое в газированном напитке, и т.п. Эти ингредиенты можно использовать независимо или в комбинации, и соотношение эти добавок также соответствующим образом может быть выбрано специалистами в данной области.

Далее в настоящем описании настоящее изобретение будет подробно описано в примерах и экспериментальных примерах.

Однако следующие примеры и экспериментальные примеры являются только иллюстративными для настоящего изобретения, и содержание настоящего изобретения не ограничивается следующими примерами и экспериментальными примерами.

Подготовительный Пример 1. Получение пептидов

Пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 и пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, показанные в таблице 1 ниже, синтезировали с использованием автоматизированного пептидного синтезатора (Milligen 9050, Millipore, США), соответственно, и эти синтезированные пептиды очищали с использованием C18 обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Waters Associates, США), соответственно. Использовали колонку ACQUITY UPLC VEN300 C18 (2,1 мм×100 мм, 1,7 мкм, Waters Co, США).

Таблица 1

SEQ ID NO.	Последовательность пептида
1	NKNFGYDLR
2	IHGTYKELL

Экспериментальный Пример 1. Подтверждения эффекта ингибирования пролиферации клеток эндотелия сосудов

Чтобы подтвердить эффект ингибирования пролиферации клеток эндотелия сосудов, обрабатывали клетки эндотелия сосудов пептидами, полученными в Примере 1, соответственно, а затем проводили анализ МТТ.

В частности, эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) высевали в 96-луночный планшет с плотностью 4×10^3 клеток/лунку, а затем инкубировали в течение ночи. После этого, после того как среда была заменена на среду с добавлением 1% сыворотки, их обрабатывали VEGF (20 нг/мл) и каждой концентрацией пептида по настоящему изобретению, соответственно, и инкубировали в течение 3 суток. Однако 2 мкМ сунитиниба применяли в качестве группы положительного контроля.

Дополнительно, для подтверждения эффекта ингибирования пролиферации, 4 мг/мл раствора тиозолилового синего тетразолия бромида (МТТ) добавляли в каждую лунку, формазан, образующийся после реакции в течение 4 часов, растворяли при обработке ДМСО, а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 560 нм с помощью микроспектрофотометра для чтения планшетов. Однако измеренные значения оптической величины были показаны путем расчета относительных уровней на основе необработанной контрольной группы.

Как показано на фиг. 1 и 2, пептиды по настоящему изобретению значительно ингибируют пролиферацию клеток эндотелия сосудов, повышенную за счет VEGF.

Что касается ангиогенеза, поскольку клетки эндотелия сосудов пролиферируют, а затем кровеносные сосуды образуются в результате инвазивного роста и дифференцировки, из приведенных выше результатов можно видеть, что пептиды по настоящему изобретению значительно ингибируют ангиогенез путем ингибирования пролиферации клеток эндотелия сосудов.

Экспериментальный Пример 2. Подтверждение эффекта ингибирования дифференцировки клеток эндотелия сосудов

Чтобы подтвердить эффект ингибирования дифференцировки клеток эндотелия сосудов, обрабатывали клетки эндотелия сосудов пептидами, полученными в Примере 1, соответственно, а затем проводили анализ образования трубок.

В частности, клетки HUVES высевали в 96-луночный планшет с плотностью $1,5 \times 10^5$ клеток/лунку и инкубировали в течение ночи, после чего среда была заменена средой без сыворотки, а затем обрабатывали VEGF (20 нг/мл) и пептидом по настоящему изобретению в разных концентрациях и инкубировали в течение 1 суток. Однако 2 мкМ сунитиниб применяли в качестве группы положительного контроля. После того, как инкубация была завершена, визуально наблюдали формирование трубок с использованием

оптического микроскопа, и измеряли количество узлов вместе.

Как показано на фиг. 3 и 4, было подтверждено, что VEGF значительно увеличивает образование трубок и количество узлов клеток эндотелия сосудов, но пептиды по настоящему изобретению ингибируют образование трубок из клеток эндотелия сосудов и значительно уменьшают количество узлов.

Промышленная применимость

Пептид для ингибирования ангиогенеза, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 или 2 по настоящему изобретению, и композиция, содержащая такой пептид в качестве активного ингредиента, могут проявлять превосходный эффект профилактики или лечения заболеваний, вызванных избыточным ангиогенезом, для очень эффективного использования в промышленности.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1: Asn Lys Asn Phe Gly Tyr Asp Leu Tyr Arg

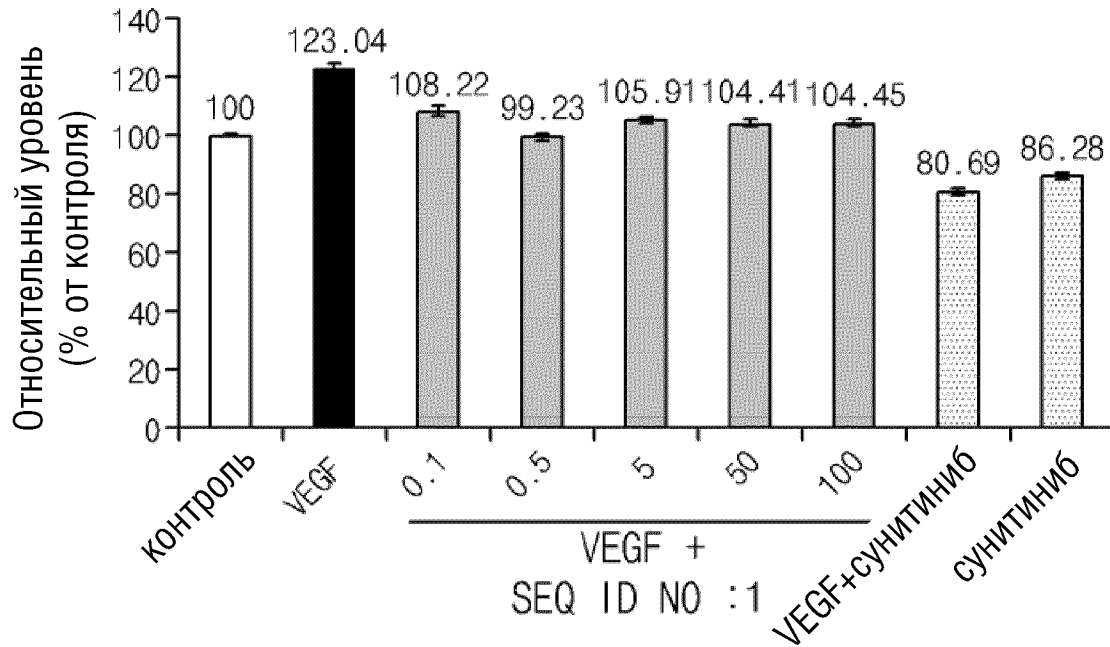
SEQ ID NO: 2: Ile His Gly Thr Tyr Lys Glu Leu Leu

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

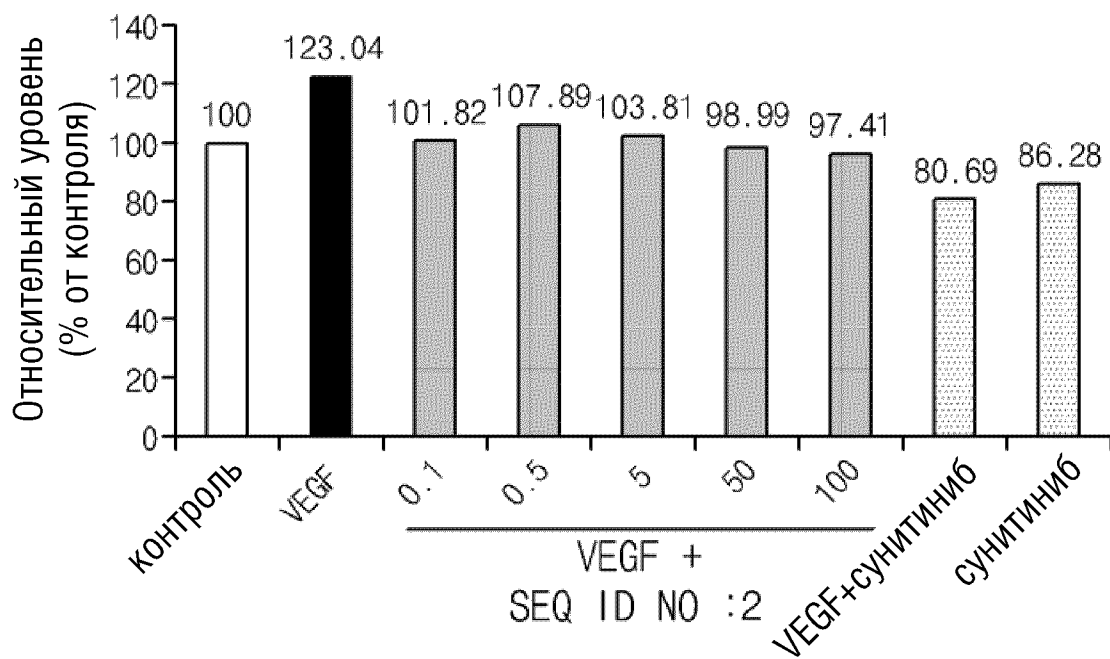
1. Пептид для ингибирования ангиогенеза, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.
2. Пептид для ингибирования ангиогенеза по п.1, где N- или C-конец пептида связывается с защитной группой, выбранной из группы, состоящей из ацетильной группы, флуоренилметоксикарбонильной группы, формильной группы, пальмитоильной группы, миристильной группы, стеарильной группы, и полиэтиленгликоля (ПЭГ).
3. Пептид для ингибирования ангиогенеза по п.1, где пептид ингибирует пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток эндотелия сосудов.
4. Пептид для ингибирования ангиогенеза по п.1, где пептид связывается с рецептором фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).
5. Пептид для ингибирования ангиогенеза по п.4, где рецептор VEGF представляет собой рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2).
6. Пептид для ингибирования ангиогенеза по п.1, где пептид связывается с рецептором VEGF, конкурируя с VEGF.
7. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, включающая в качестве активного ингредиента пептид по п.1.
8. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, по п.7, где композиция ингибирует пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток эндотелия сосудов.
9. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, по п.7, где заболевание, связанное с ангиогенезом, представляет собой по меньшей мере одно заболевание, выбранное из группы, состоящей из злокачественной опухоли, диабетической ретинопатии, ретинопатии недоношенных, неоваскулярной глаукомы, меланомы, пролиферативной ретинопатии, влажной макулодистрофии, псориаза, гемофильных суставов, гиперплазии капилляров в атеросклеротических бляшках, келоидных рубцов, грануляции ран, сосудистой адгезии, ревматоидного артрита, остеоартрита, аутоиммунных заболеваний, болезни Крона, рестеноза, атеросклероза, болезни кошачьей царапины, язв, гломерулонефрита, диабетической нефропатии, злокачественного невроза, тромботической микроангиопатии и почечной гломерулопатии.
10. Функциональный диетический пищевой продукт для профилактики или облегчения заболеваний, связанных с ангиогенезом, включающий в качестве активного ингредиента пептид по п.1.

По доверенности

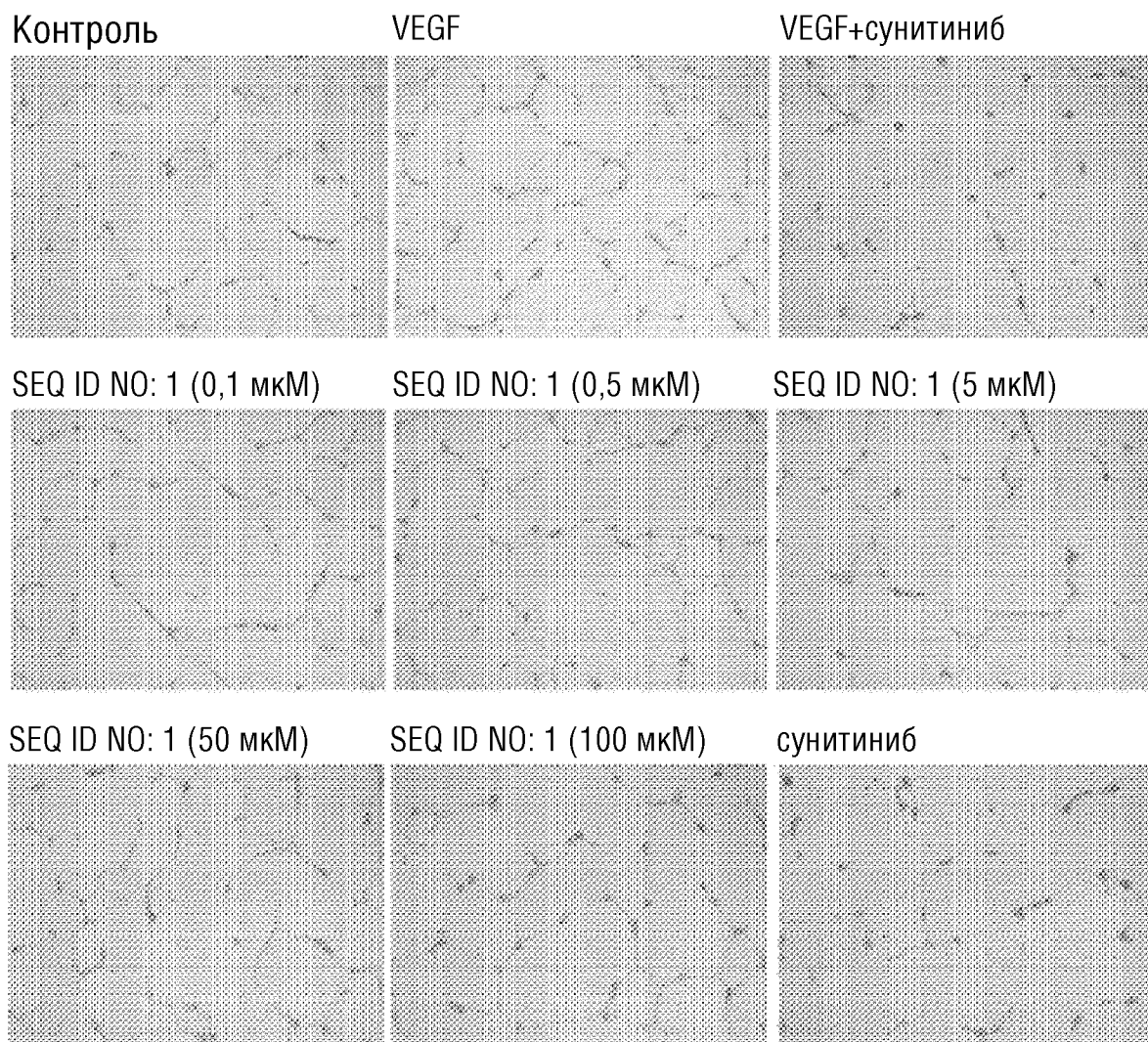
ФИГ.1



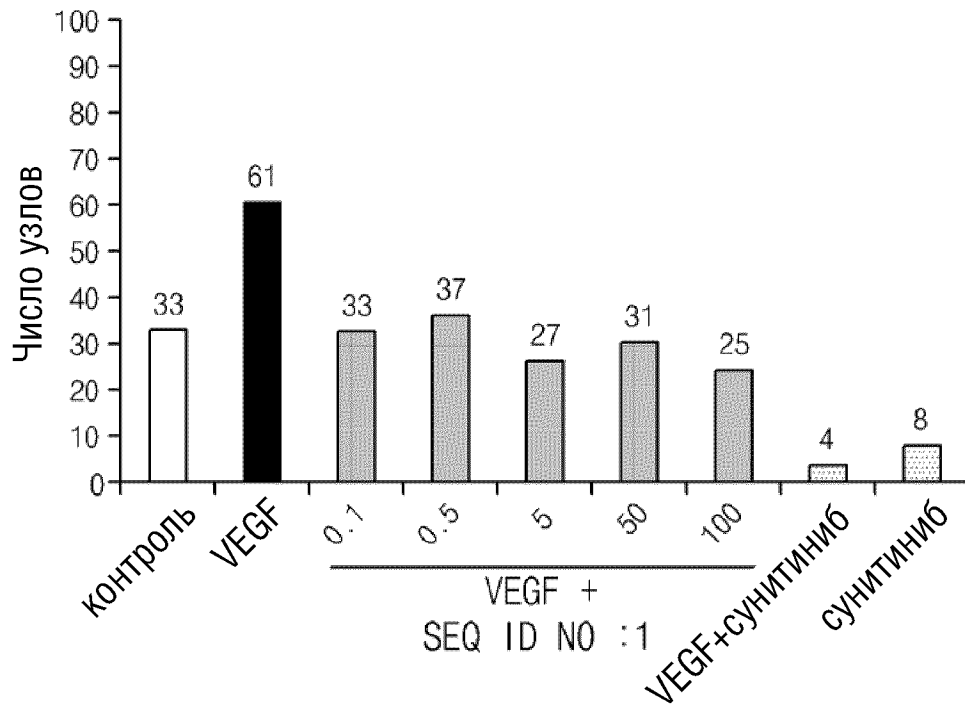
ФИГ.2



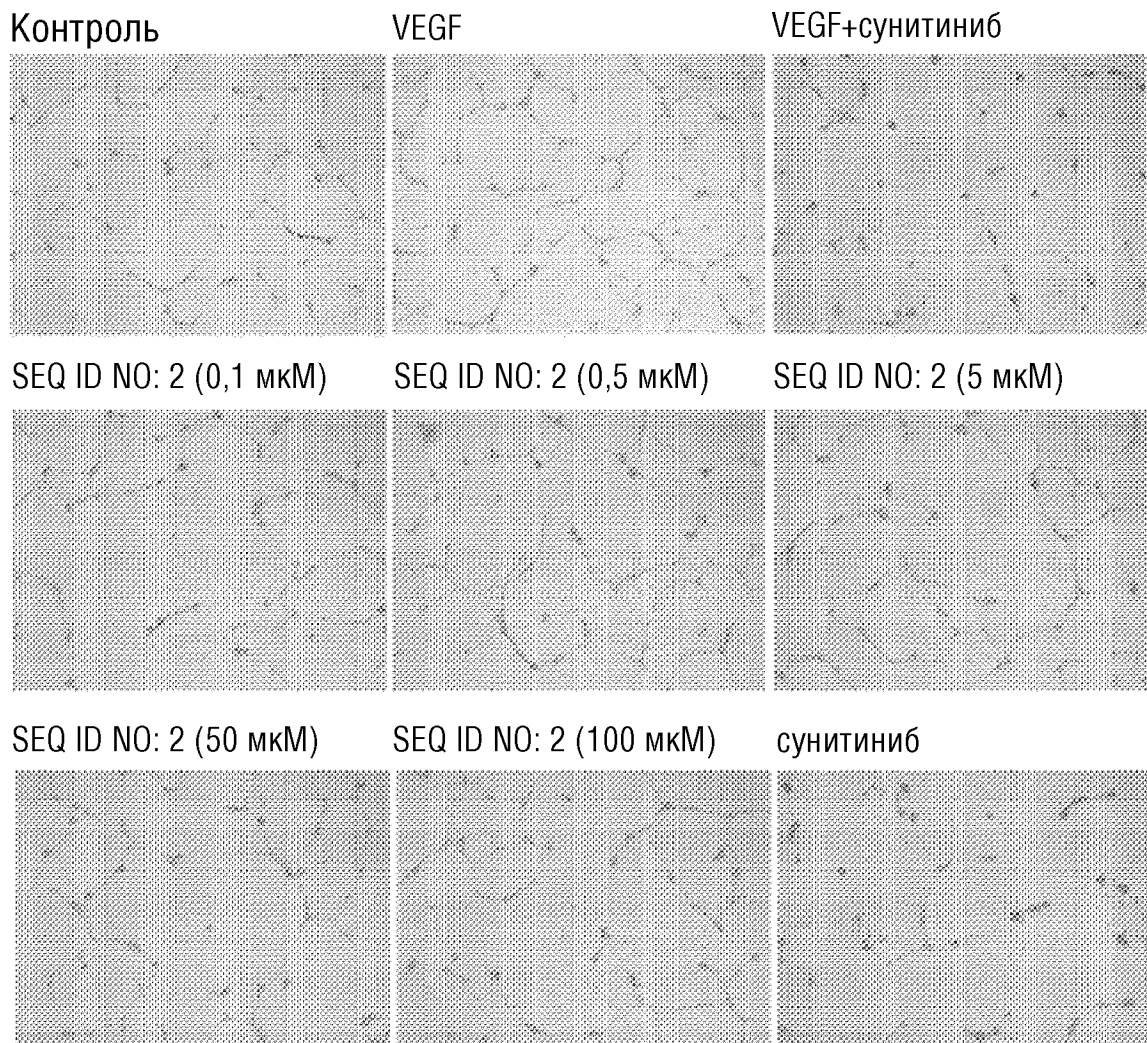
ФИГ.3а



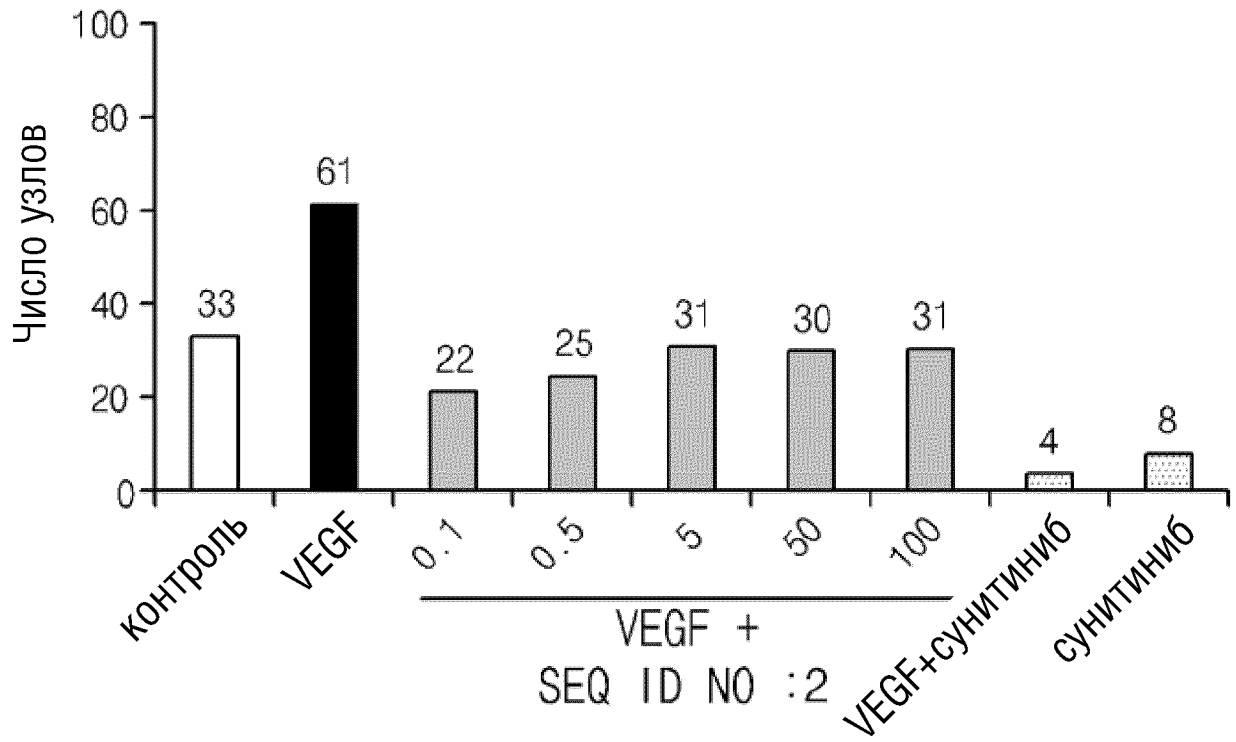
ФИГ.3б



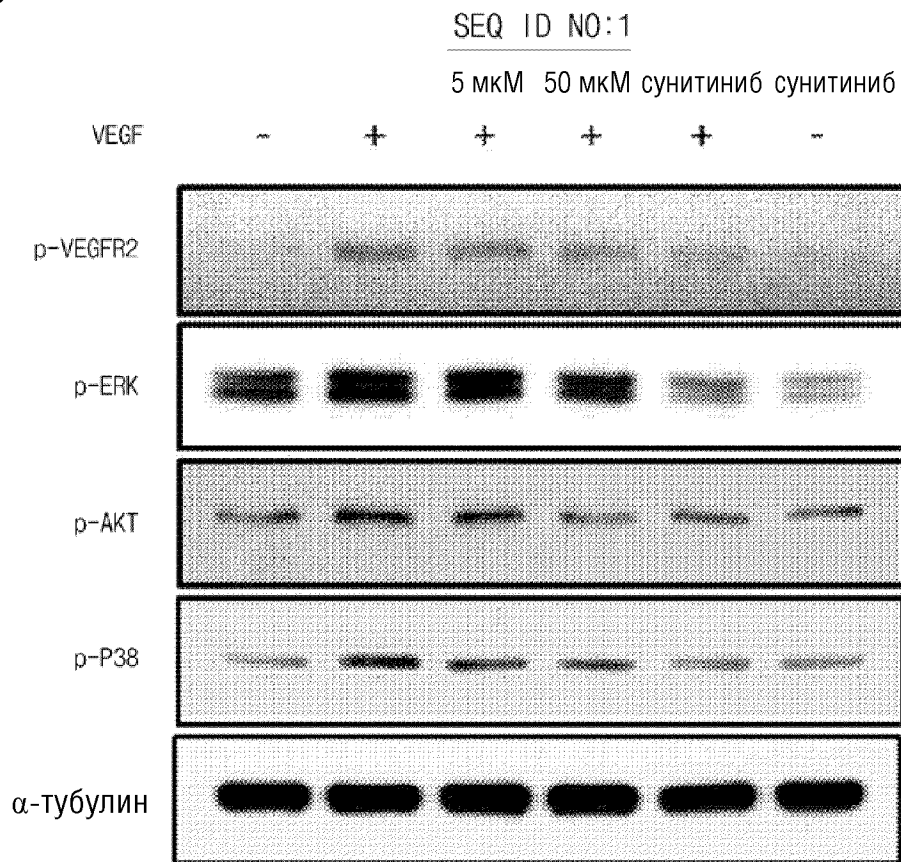
ФИГ.4а



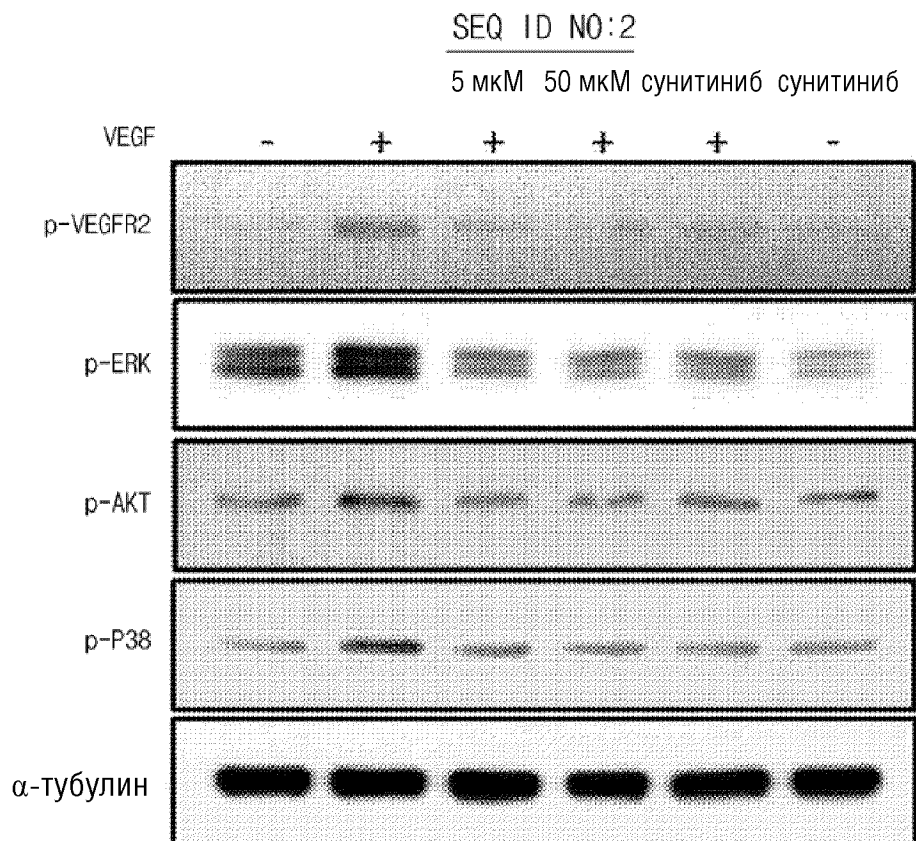
ФИГ.4b



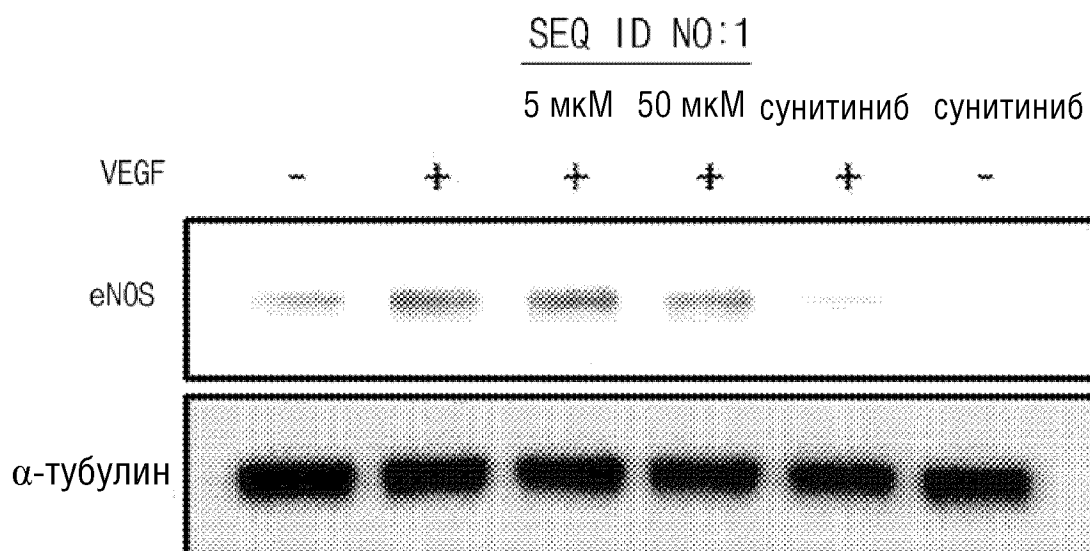
ФИГ.5



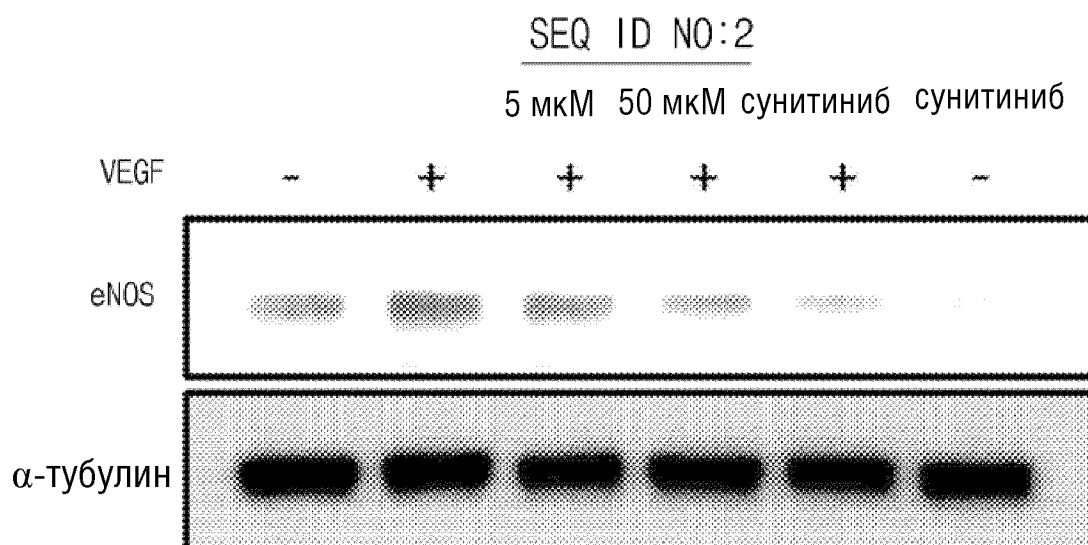
ФИГ.6



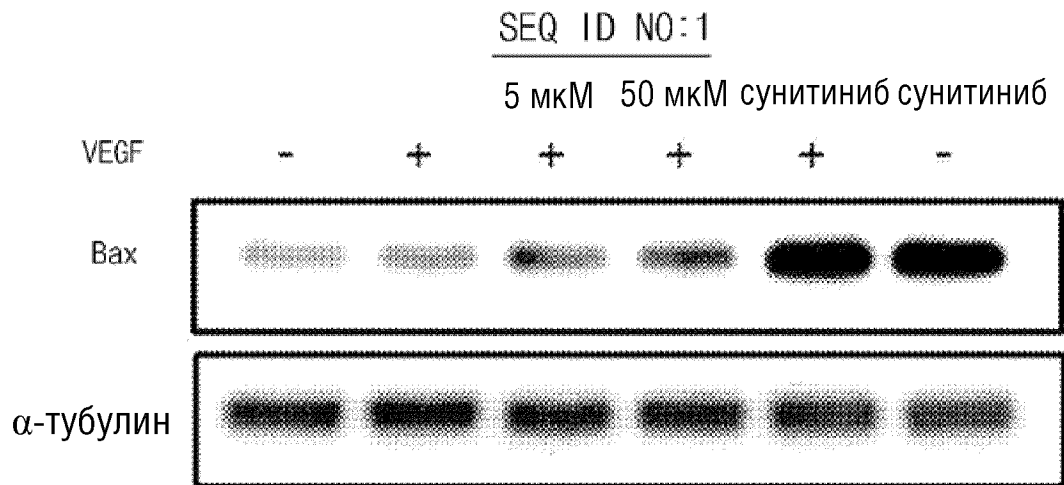
ФИГ.7



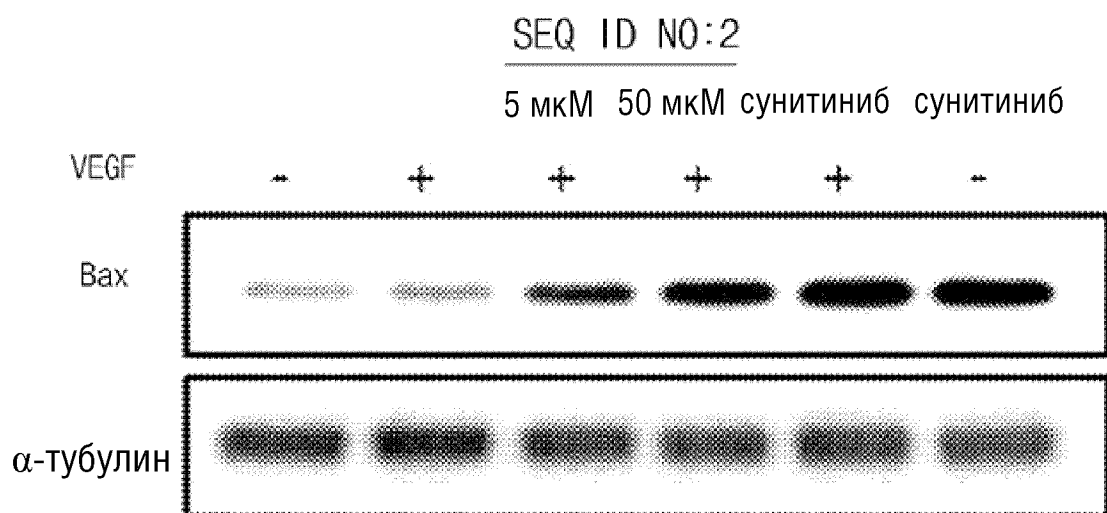
ФИГ.8



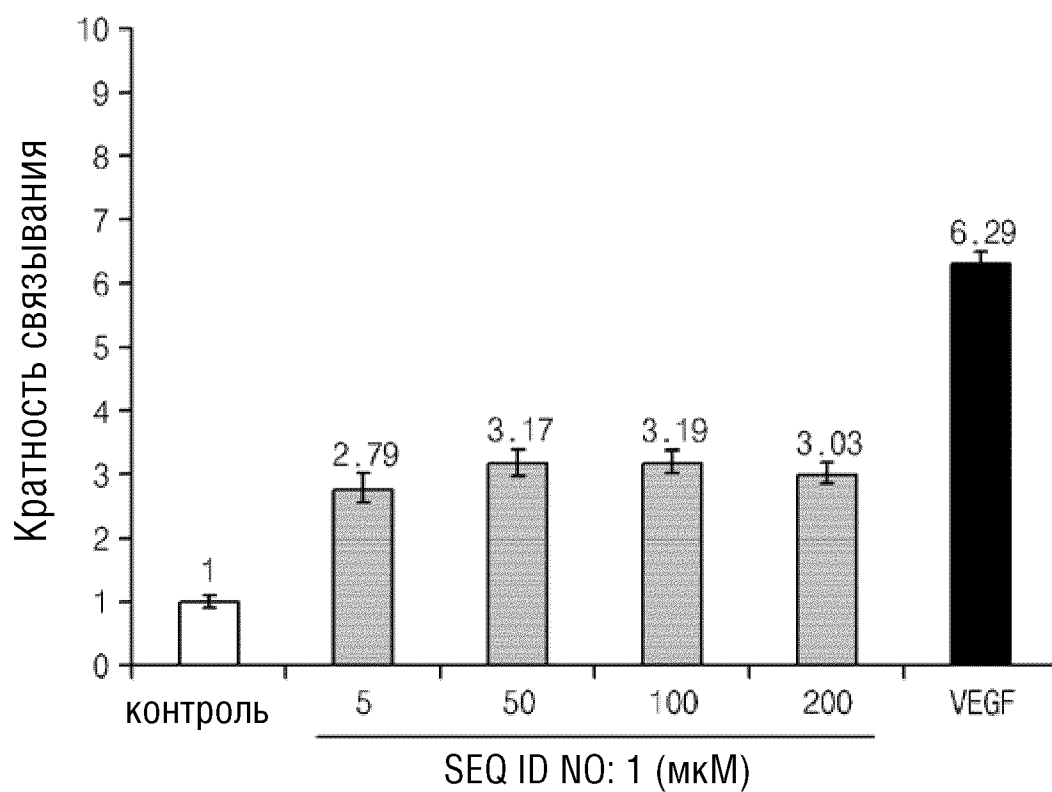
ФИГ.9



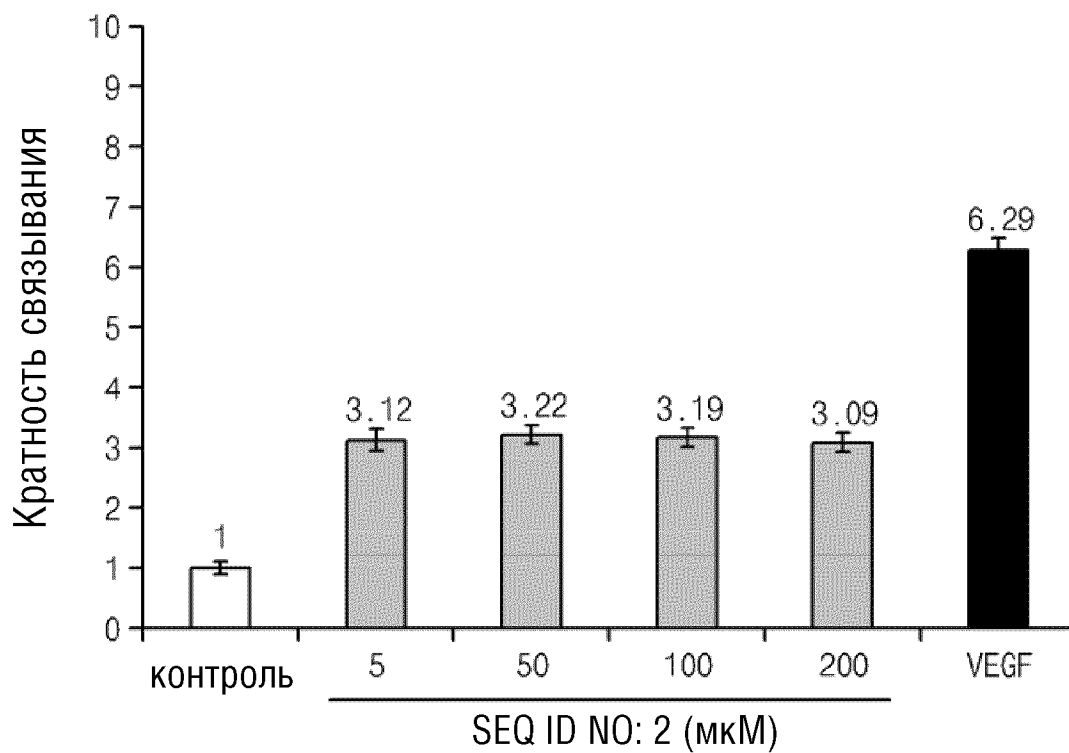
ФИГ.10



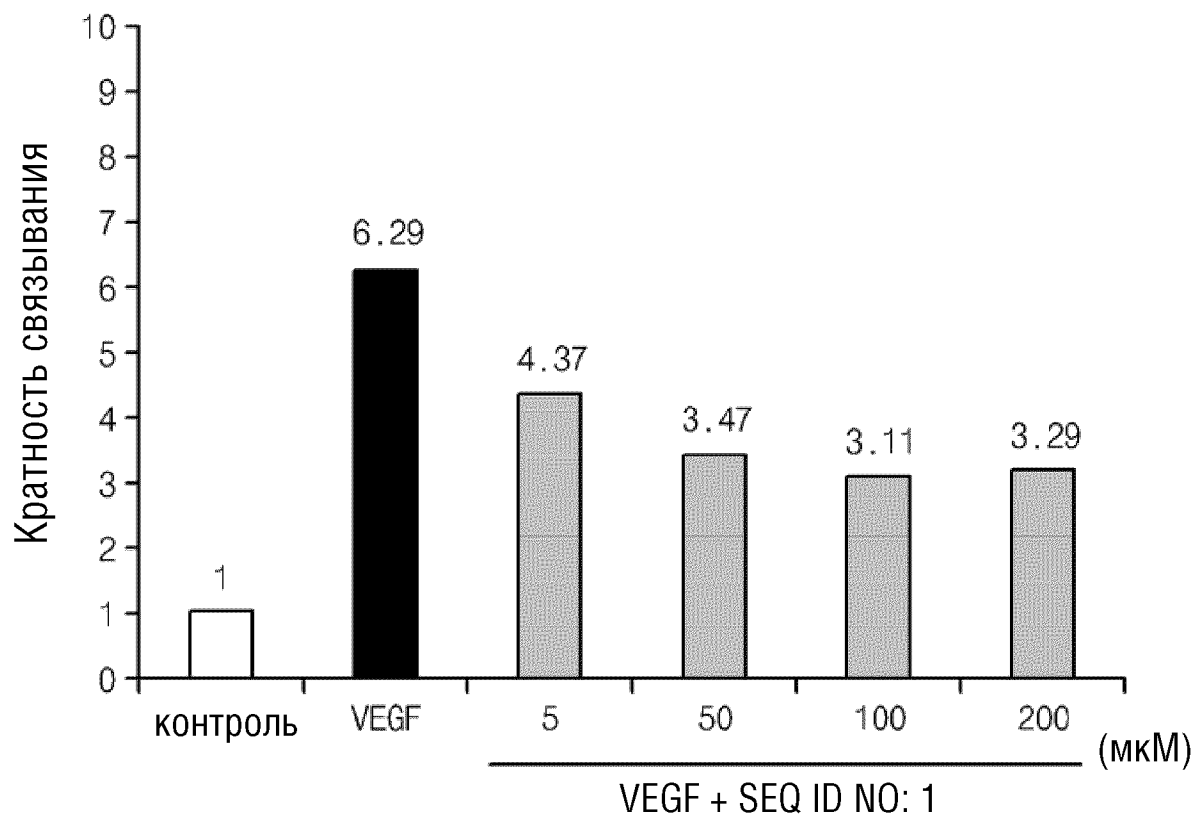
ФИГ.11



ФИГ.12



ФИГ.13



ФИГ.14

