

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091461** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

**(43)** Дата публикации заявки  
**2020.09.09**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.12.14**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/04* (2006.01)  
*A61K 38/06* (2006.01)  
*A61K 38/07* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*C07K 5/00* (2006.01)  
*C07K 5/08* (2006.01)  
*C07K 5/10* (2006.01)  
*C07K 7/06* (2006.01)  
*C07K 7/08* (2006.01)  
*C07K 14/435* (2006.01)  
*A61P 1/16* (2006.01)  
*C07K 5/06* (2006.01)

---

**(54) ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ И ФИБРОЗА**

---

**(31)** 17306772.9; 18305797.5

**(32)** 2017.12.14; 2018.06.22

**(33)** EP

**(86)** PCT/EP2018/085071

**(87)** WO 2019/115812 2019.06.20

**(71)** Заявитель:

**ЮНИВЕРСИТЕ ДЕ СТРАСБУР;  
ИНСЕРМ (ЭНСТИТУ НАСЪОНАЛЬ  
ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ  
МЕДИКАЛЬ) (FR)**

**(72)** Изобретатель:

**Марион Венсан (FR)**

**(74)** Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

**(57)** Настоящее изобретение касается пептидов для лечения или профилактики неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы или фиброза, в особенности фиброза печени.

---

**A1**

**202091461**

**202091461**

**A1**

## **ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ И ФИБРОЗА**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, оно касается лечения заболеваний печени, в частности, стеатоза печени, в особенности неалкогольного стеатогепатита, и лечения фиброза.

### **Уровень техники**

NAFLD (неалкогольная жировая болезнь печени), которая определяется наличием накопления триглицеридов в гепатоцитах печени в отсутствие какой-либо другой этиологии заболевания печени, является наиболее распространенной причиной хронических заболеваний печени в западном мире. Её клинико-гистологический фенотип простирается от неалкогольного ожирения печени (NAFL) до неалкогольного стеатогепатита (NASH), характеризующегося воспалением печени и прогрессирующим фиброзом, ведущим к циррозу печени и конечной стадии заболевания печени, а также к гепатоцеллюлярной карциноме.

Хотя предполагаемая распространенность NAFLD колеблется от 6 до 33% среди населения в целом, а распространенность NASH составляет лишь 3-5%, но связанный с NASH цирроз стал вторым по значимости показанием для трансплантации печени в Соединенных Штатах. Госпитализации по поводу NAFLD увеличились на 97% с 2000 г.

В настоящее время нет лекарств, принятых для профилактики или лечения NAFLD или NASH.

Следовательно, существует потребность в новых способах профилактики или лечения неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH) и стеатоза печени (ожирения печени).

Фиброз – это патология, при которой волокнистая соединительная ткань проникает в какой-либо орган, обычно в результате воспаления или другого повреждения. Известно, что некоторые соединения лечат фиброз, но делают это неадекватно. Таким образом, попытки разработать клинически эффективные средства от фиброза были безуспешными, и все еще существует потребность в поиске средств для лечения фиброза.

### **Сущность изобретения**

Неожиданно авторы изобретения получили пептиды из киназного домена PKC $\alpha$  и их производные, которые специфически снижают экспрессию переносчик растворенных веществ, член 2 семейства 27 (SLC27A2), широко известного как FATP2 (белок-2

транспорта жирных кислот) в жировой ткани. Эти пептиды способны, через 3 месяца после однократного введения, уменьшать явления стеатоза в печени, в частности, способны снижать размеры липидных капель в печени, уровни двух биомаркеров повреждения печени (т.е. AST и ALT) и отношение массы печени к массе тела. Кроме того, пептиды способны уменьшать фиброз, о чем свидетельствует их способность подавлять путь липогенеза *de novo* (напр., снижать ACC (ацетил-КоА-карбоксилазу) и снижать содержание и уровень печеночного белка LOXL2 в крови, тем самым останавливая прогрессию фиброза. При обработке пептидами *in vivo* наблюдается значительное снижение содержания триглицеридов в печени и площади зоны фиброза, что свидетельствует об антистеатотическом и антифиброзном действии.

Соответственно, настоящим изобретением предусмотрены пептиды, которые:

- способны снижать экспрессию FATP2 в жировой ткани, в частности, у млекопитающих;
- не содержат одновременно одного метионина, одного пролина и одного аргинина;
- принимают вторичную структуру типа спирали, предпочтительно  $\alpha$ -спирали;
- содержат, состоят в основном или состоят из последовательности сегмента из по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков киназного домена РКС (протеинкиназы C) или из сегмента из от 5 до 40 последовательных остатков киназного домена РКС (протеинкиназы C);
- имеют длину от 5 до 80 аминокислот или от 5 до 60 аминокислот или от 5 до 40 аминокислот; а
- последовательности пептидов могут содержать 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций в пределах данной последовательности сегмента киназного домена РКС.

Предпочтительно пептиды модифицированы посредством химического перекрестного сшивания типа сшивки.

Предпочтительно пептиды имеют длину по меньшей мере в 5 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 25 аминокислот.

Предпочтительно пептиды способны снижать или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ РКС.

Необязательно последовательности пептидов содержат, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:



PEП (SEQ ID NO: 5); XEП (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

Необязательно последовательности пептидов содержат, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

Необязательно последовательности пептидов содержат, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

а) VECTXVEKXVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 20), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H,

L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

b) VECTMVEKRVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 21), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

c) VECTXVEKRVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 22), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

d) VECTMVEKXVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 23), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

и последовательностей любых сегментов из по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков любой из последовательностей a) – d).

Необязательно последовательности пептидов содержат, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

VECTMXEKRVLAX (SEQ ID NO: 24)

VECTXXEKRVLAX (SEQ ID NO: 25)

VECTMXEKXVLAX (SEQ ID NO: 26)

VECTXXEKXVLAX (SEQ ID NO: 27)

VECTXXEKXVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 28)

VECTMXEKRVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 29)

VECTXXEKRVLA $\underline{X}$ LDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 30)

VECTM $\underline{X}$ EKXVLA $\underline{X}$ LDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 31)

где выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые остатки  $\underline{X}$  несут сшивки и представляют собой производные аминокислот, подходящих для сшивания;

причем  $X$  означает любую аминокислоту, кроме M, P и R,

а последовательности необязательно содержат 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций.

Предпочтительно такая PKC выбрана из группы, состоящей из альфа-PKC ( $\alpha$ PKC), бета-PKC ( $\beta$ PKC), включая  $\beta_I$ -PKC и  $\beta_{II}$ -PKC, дельта-PKC, тета-PKC, эта-PKC и эpsilon-PKC. Более предпочтительно такая PKC представлена  $\alpha$ PKC по SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном воплощении последовательности пептидов содержат, в основном состоят или состоят из VECTT $\underline{R}$ EKEVLA $\underline{S}$ LDKAAFLTQLHS (SEQ ID NO: 32), где  $\underline{R}$  и  $\underline{S}$  несут сшивку, предпочтительно это 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин, соответственно;

а последовательности необязательно содержат 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций.

Настоящее изобретение также касается фармацевтических композиций, содержащих пептиды по настоящему изобретению. Оно также касается пептидов по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственных средств. Оно также касается применения пептидов по настоящему изобретению для изготовления лекарственных средств.

Оно также касается пептидов по настоящему изобретению или содержащих их фармацевтических композиций для применения при лечении или профилактике заболеваний, выбранных из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза.

Необязательно заболевание выбирают из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH) и стеатоза печени (ожирения печени). Предпочтительно заболевание представляет собой стеатоз печени (ожирение печени) или неалкогольный стеатогепатит (NASH). Более предпочтительно заболевание представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

Необязательно фиброз представляет собой фиброз печени, включая цирроз, фиброз почек, фиброз сердца, включая фиброз предсердий, фиброз эндомиокарда и застарелый инфаркт миокарда, фиброз легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброз сосудов типа фиброза артерий, фиброз головного мозга, миелофиброз, артрофиброз, фиброз кишечника, фиброз брюшины, забрюшинный фиброз или кожный фиброз. Предпочтительно фиброз представляет собой фиброз печени.

### **Краткое описание фигур**

**Фиг. 1.** Влияние прицельной обработки жировой ткани пептидом PATAD на уровни экспрессии основных переносчиков и рецепторов жирных кислот. В качестве контрольного гена использовали GAPDH, n = 4 животных на группу. Существует 6 изоформ FATP (FATP1-6, также известны как SLC27A1-SLC27A6): Fatp1 (белок-1 транспорта жирных кислот), Fatp2 (белок-2 транспорта жирных кислот), Fatp3 (белок-3 транспорта жирных кислот), Fatp4 (белок-4 транспорта жирных кислот), Fatp5 (белок-5 транспорта жирных кислот), Fatp6 (белок-6 транспорта жирных кислот), FFAR1 (рецептор-1 свободных жирных кислот), FFAR2 (рецептор-2 свободных жирных кислот), FFAR3 (рецептор-3 свободных жирных кислот), FFAR4 (рецептор-4 свободных жирных кислот). “Немного рандомизированные (scramble less)” означает комбинацию двух пептидов с такими же аминокислотными остатками, что и в сшитых формах, но перегруппированных случайным образом с сохранением структуры  $\alpha$ -спирали: последовательности рандомизированного пептида А и последовательности рандомизированного пептида В. “Сшитые (staple)” обозначает комбинацию двух сшитых пептидов: последовательности сшитого пептида А и последовательности сшитого пептида В.

На фиг. 1А представлены уровни экспрессии изоформ FATP и FFAR в обработанной PATAD жировой ткани, причем уровень экспрессии FATP2 значительно снижен.

На фиг. 1В и 1С представлены уровни экспрессии изоформ FATP и FFAR в печени и мышцах после подкожного введения PATAD.

**Фиг. 2.** Пептид ADPIF более активно, чем пептид PATAD, снижает уровень экспрессии FATP2 в жировой ткани и повышает уровень GLP-1 в крови. (А) В этом эксперименте использовали 4-месячных самцов мышей, которым давали корм с высоким содержанием жиров и глюкозы. По оси X – нормализованные уровни экспрессии FATP2 в жировой ткани у различных мышей через 11 дней после указанного состояния. В качестве контрольного гена использовали GAPDH, n = 4 животных на группу. (В) Концентрация GLP-1 в крови у тех же мышей через 11 дней после инъекции свидетельствует о том, что

PATAD и ADPIF способны восстанавливать уровень GLP-1 в крови обратно до уровня в обезжиренном контроле, причем при введении рандомизированных пептидов мышам проявлялось снижение концентрации GLP-1.

Фиг. 3. Влияние на уровни аспартаттрансаминазы (AST) и аланинтрансаминазы (ALT) в печени и крови через 3 месяца после прицельной обработки жировой ткани пептидами PATAD и ADPIF. (А) Флуоресцентное окрашивание криосрезов фиксированной печени у контрольных (слева) и получавших PATAD (справа) мышей через 3 месяца после однократного введения PATAD. (В) Соотношение массы печени и массы тела, деленное на возраст в днях, на графике для  $n = 1$  животного на группу для пептида PATAD. (С) Средние значения AST и ALT при измерении методом ELISA в плазме мышей при указанной обработке,  $n = 4$  образца на группу. PATAD и ADPIF эффективно снижают уровни AST и ALT в крови. ADPIF более активно снижает уровень ALT в крови, что свидетельствует об улучшении поврежденных клеток печени.

Фиг. 4. Пептид ADPIF более активно предотвращает гипергликемию, чем пептид PATAD. (А) Временной ряд в днях через 30 минут после введения глюкозы болюсом натошак у самцов с ожирением (DIO) (корм CTL HFD) и в контроле (корм CTL Chow) после однократного введения PATAD (PATAD 417) или ADPIF (CPC-пептид A-MRP) в день 0. Глюкоза вводится болюсом подкожно, при этом она обходит печень и попадает прямо в кровоток. (В) Влияние пептидов PATAD (PATAD 417) и ADPIF (PATAD 417-MRP) на толерантность к глюкозе натошак у самцов с ожирением (DIO) (корм CTL HFD) и в контроле (корм CTL Chow) по измерениям площади под кривой до (D-5), в момент обработки (D0) и после обработки (D+6) пептидами.

Фиг. 5. ADPIF более активно, чем PATAD, снижает содержание в печени подобного лизилоксидазе белка-2 (LOXL2) и связывающего жирные кислоты белка-4 (FABP4) у самцов мышей DIO. (А) LOXL2 известен как ключевой фактор при развитии фиброза. Результаты по измерению LOXL2 методом ELISA в экстрактах печени через 3 месяца после введения носителя, PATAD или ADPIF в подкожную жировую ткань. Наблюдается значительное снижение содержания белка в печени после обработки PATAD либо ADPIF, причем наиболее эффективен пептид ADPIF,  $n = 4$  мыши на группу. (В) FABP4 является ключевым фактором опосредованных липидами процессов в клетках и повышается в печени при NAFLD. Измеряли содержание белка FABP4 через 3 месяца после однократного введения рандомизированных пептидов либо PATAD или ADPIF. Уровень FABP4 значительно снижается после однократного введения PATAD или ADPIF, причем ADPIF более активен, чем PATAD.

Фиг. 6. Влияние ADPIF на содержание и профиль церамидов в печени. Церамиды –

группа биологически активных липидов, которые вовлечены в NAFLD. Измеряли и определяли влияние введения ADPIF на профиль церамидов после 3 инъекций ADPIF в подкожную жировую ткань с частотой 1 раз в неделю. ADPIF вызывает глобальное снижение содержания церамидов в печени с различиями между разными церамидами.

Фиг. 7. Влияние 3-месячной прицельной обработки жировой ткани ADPIF на содержание триглицеридов в печени. Флуоресцентное окрашивание криосрезов фиксированной печени у контрольных (слева) и получавших ADPIF (справа) мышей через 3 месяца после однократного введения ADPIF показывает снижение диаметра капелек липидов, что указывает на снижение общего уровня триглицеридов в печени. Мыши были представлены самцами мышей DIO в возрасте 7 месяцев под конец эксперимента.

Фиг. 8. Обработка пептидом ADPIF подавляет гены пути липогенеза de novo через 11 дней у самцов мышей DIO. Через 11 дней после введения пептида ADPIF в жировую ткань значительно снижались уровни экспрессии синтазы жирных кислот (Fasn), ацетил-КоА-карбоксилазы (Acc) и связывающего стерол-регулирующий элемент фактора транскрипции-1 (Srebf1) в печени по сравнению с контролем, свидетельствуя о том, что в печени получавших ADPIF мышей подавляется липогенез de novo.

Фиг. 9. Обработка ADPIF уменьшает фиброзные очаги в печени. (A) Снимки при иммуноокрашивании криосрезов печени от необработанных мышей DIO-NASH и обработанных ADPIF мышей DIO-NASH через 3 месяца после введения ADPIF в подкожную жировую ткань. Коллаген IV и LOXL2 сильно экспрессируются у необработанных DIO-NASH и снижаются у обработанных ADPIF мышей DIO-NASH. (B) Поскольку LOXL2 тоже секретируется, измеряли влияние ADPIF на уровень LOXL2 в крови и обнаружили, что при обработке ADPIF (через 3 месяца после однократного введения) уровень LOXL2 снижается наполовину. (C) Анализировали срезы печени методом просвечивающей электронной микроскопии, выявляя фиброзные очаги в печени необработанных мышей DIO-NASH. В печени обработанных ADPIF мышей DIO-NASH через 3 месяца после введения ADPIF в подкожную жировую ткань такие фиброзные очаги не выявлялись.

Фиг. 10. Влияние обработки ADPIF на лизофосфатидилхолиновые (LPC) липиды. Лизофосфатидилхолины (LPCs) являются субстратами для профибротического фермента аутотаксина, который является ключевым ферментом в производстве лизофосфатидной кислоты. Последняя является биоактивным липидом, который играет роль в развитии фиброза, поражающего печень, а также почки и другие мягкие ткани. Поэтому измеряли уровни различных LPC в поджелудочной железе (A), жировой ткани (B), печени (C) и плазме (D). Обработка ADPIF (проводили с частотой - 1 подкожная инъекция в 25 мкг на

мышь на протяжении 3 недель, а затем мышей забивали через 1 неделю после последней инъекции) вызывает избирательное снижение некоторых LPC в различных исследованных тканях. Наибольшее снижение после обработки ADPIF проявлял LPC 18:2 как в поджелудочной железе, так и в жировой ткани и печени.

Фиг. 11. Пептид ADPIF защищает почки от фиброза. Проводили иммуноокрашивание криосрезов из почек мышей DIO-NASH, получавших носитель, и мышей DIO-NASH, получавших ADPIF, на коллаген IV, ZO-1 и ядра. У получавших носитель мышей DIO-NASH наблюдалось больше отложений коллагена IV, чем у получавших ADPIF.

### **Раскрытие сущности изобретения**

Неожиданно авторы изобретения получили пептиды из киназного домена PKC $\alpha$  и их производные, которые специфически снижают экспрессию FATP2 (белка-2 транспорта жирных кислот) в жировой ткани (фиг. 1A). Эти пептиды способны, после 3-месячного введения по 1 разу в день, уменьшать явления стеатоза в печени, в частности, способны снижать размеры капелек липидов в печени, уровень двух биомаркеров повреждения печени (т.е. AST и ALT) и соотношение массы печени к массе тела (фиг. 3). Кроме того, пептиды способны уменьшать фиброз, о чем свидетельствует их способность подавлять путь липогенеза de novo (напр., снижать ACC (ацетил-КоА-карбоксилазу) (фиг. 8) и снижать уровень белка LOXL2 в печени и крови, тем самым останавливая прогрессию фиброза. Пептиды также способны снижать отложение коллагена в почках. При обработке пептидами in vivo наблюдалось значительное снижение площади зоны фиброза, что свидетельствует об антифиброзном действии.

Соответственно, изобретением предусмотрены:

- пептид, как определено здесь;
- фармацевтическая композиция, содержащая пептид, как определено здесь;
- пептид, как определено здесь, для применения в качестве лекарственного средства, либо применение пептида, как определено здесь, для изготовления лекарственного средства;
- пептид или содержащая пептид фармацевтическая композиция для применения при лечении или профилактике заболеваний, выбранных из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого

инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

– применение пептида для изготовления лекарственных средств для лечения или профилактики заболеваний, выбранных из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

– способ лечения или профилактики заболевания у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества пептида, причем заболевание выбрано из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза.

### **Определения**

ALMS1, белок-1 синдрома Альстрёма, представляет собой белок, кодируемый геном *ALMS1*. Установлено, что мутации гена *ALMS1* вызывают синдром Альстрёма. Он описан в нескольких базах данных, а именно: UniProt ID No. Q8TCU4; Gene ID No. 7840, HGNG ID No. 428. Эталонные последовательности приведены в Genbank под номером NM\_015120.4 для мРНК и NP\_055935.4 для белка.

Термины “протеинкиназа С” и “PKC” (EC 2.7.11.13) эквивалентны и относятся к семейству ферментов-протеинкиназ, участвующих в управлении функцией других белков посредством фосфорилирования гидроксильных групп аминокислотных остатков серина и треонина на этих белках. PKC обычно активируются такими сигналами, как повышение

концентрации диацилглицерина (DAG) или ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ). PKC играют важную роль в нескольких каскадах передачи сигналов.

Семейство PKC у человека включает по меньшей мере 15 изозимов, которые подразделяются на три основных подсемейства: стандартные (или классические) PKC, новые PKC и атипичные PKC.

Стандартные (с) PKC включают изоформы  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\gamma$ . Эти PKC требуют  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG и фосфолипида типа фосфатидилсерина для активации.

Новые (н) PKC включают изоформы  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  и  $\theta$ . Эти PKC требуют DAG, но не требуют  $\text{Ca}^{2+}$  для активации.

Атипичные (а) PKC включают изоформы  $\zeta$ ,  $\iota$  и  $\lambda$ . Эти PKC не требуют ни  $\text{Ca}^{2+}$ , ни диацилглицерина для активации.

Протеинкиназа С типа альфа, также называемая  $\alpha$ PKC, PKC-A или PKC-альфа, принадлежит к семейству серин- и треонин-специфичных протеинкиназ, которые могут активироваться кальцием и вторым посредником – диацилглицерином. Она описана в нескольких базах данных, а именно: UniProt ID No. P17252, Gene ID No. 9393, HGNG ID No. 5578. Эталонные последовательности приведены в Genbank под номером NM\_02737.2 для мРНК и NP\_002728.1 для белка. Последовательность белка  $\alpha$ PKC человека приведена в SEQ ID NO: 1.

Киназный домен  $\alpha$ PKC простирается от положения 339 до положения 595, как описано в SEQ ID NO: 1 и представлено в SEQ ID No. 2.

“Состоит из”, “в основном состоит из” или “в основном включает”: описание здесь какого-либо аспекта или воплощения изобретения с использованием таких терминов, как ссылка на какой-то элемент или элементы, служит для обоснования аналогичного аспекта или воплощения изобретения, которое “состоит из”, “в основном состоит из” или “в основном содержит” этот конкретный элемент или элементы, если не указано иначе или явно не противоречит контексту. Например, пептид или белок, описанный здесь как содержащий определенную последовательность, следует также понимать как описывающий пептид или белок, состоящий из этой последовательности, если не указано иначе или явно не противоречит контексту. “В основном состоит из” означает то, что пептид или белок состоит из этой последовательности, но он также может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, вставок, делеций или их комбинаций, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок, делеций или их комбинаций. В частности, “в основном состоит из” может означать то, что пептид может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных аминокислот на N и/или C-конце, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 дополнительных аминокислот, и/или 1, 2 или 3 замены, делеции, вставки или их

комбинации. Предпочтительно количество замен, вставок, делеций или их комбинаций зависит от длины последовательности. Например, процент замен, делеций, вставок либо их комбинаций может составлять не более 30%, предпочтительно не более 25%.

В настоящем изобретении термин “замена” означает замену одной аминокислоты на другую в последовательности пептида.

В настоящем изобретении термин “делеция” означает удаление одной аминокислоты в последовательности пептида.

В настоящем изобретении термины “вставка” или “добавление” эквивалентны и означают добавление одной аминокислоты в последовательность пептида.

Под “заменами, вставками, делециями” подразумевается замена, вставка, делеция одной аминокислоты. Так, когда идет речь об “1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 заменах, вставках, делециях или их комбинациях”, “1, 2, 3, 4 или 5 заменах, вставках, делециях или их комбинациях” или “1, 2 или 3 заменах, делециях, вставках или их комбинациях”, то это означает, соответственно, “1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот из числа замен, вставок, делеций и их комбинаций”, “1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот из числа замен, вставок, делеций и их комбинаций” либо “1, 2 или 3 модификации аминокислот из числа замен, делеций, вставок или их комбинаций”. “1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок, делеций или их комбинаций” также означает “от 1 до 5 замен, вставок, делеций или их комбинаций”. “1, 2 или 3 замены, вставки, делеции или их комбинации” также означает “от 1 до 3 замен, вставок, делеций или их комбинаций”.

В последовательностях приведенных здесь пептидов аминокислоты представлены их однобуквенными кодами по следующей номенклатуре: А: аланин; С: цистеин; D: аспарагиновая кислота; Е: глутаминовая кислота; F: фенилаланин; G: глицин; H: гистидин; I: изолейцин; K: лизин; L: лейцин; M: метионин; N: аспарагин; P: пролин; Q: глутамин; R: аргинин; S: серин; T: треонин; V: валин; W: триптофан и Y: тирозин.

В настоящем изобретении термин “идентичность последовательностей” или “идентичность” означают точное соответствие двух пептидов по каждой аминокислоте. Степень идентичности можно определить путем прямого сравнения информации о последовательностях между двумя молекулами путем совмещения последовательностей, подсчета точного количества совпадений между двумя совмещенными последовательностями, деления на длину более короткой последовательности и умножения результата на 100.

Идентичность последовательностей можно определить путем совмещения последовательностей двух пептидов с помощью алгоритмов глобального или локального совмещения в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности

близкой длины предпочтительно совмещают с помощью алгоритмов глобального совмещения (напр., Needleman-Wunsch), которые оптимально совмещают последовательности по всей длине, тогда как последовательности существенно различной длины предпочтительно совмещают с помощью алгоритмов локального совмещения (напр., Smith-Waterman). При этом последовательности могут именоваться как “практически идентичные” или “существенно близкие”, если они (при оптимальном совмещении, к примеру, программой GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) имеют хотя бы некоторый минимальный процент идентичности последовательностей. GAP использует алгоритм глобального совмещения Needleman-Wunsch для совмещения двух последовательностей по всей длине, максимизируя количество совпадений и минимизируя количество пробелов. Глобальное совмещение обычно применяется для определения идентичности последовательностей, когда две последовательности имеют близкую длину.

“Повышается”, “повышение” или “усиление” означает то, что показатель повышается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с измерением, проведенным в отсутствие исследуемой молекулы в тех же условиях. “Снижается” или “снижение” означает то, что показатель снижается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с измерением, проведенным в отсутствие исследуемой молекулы в тех же условиях.

В настоящем изобретении термин “лечение”, “лечить” или “обработка” относится к любым действиям, предназначенным для улучшения состояния здоровья пациентов, типа излечения, облегчения или замедления заболевания. Оно включает и профилактическое, и терапевтическое лечение. Например, это может означать замедление или блокирование перехода от NAFLD к NASH, от NASH к NASH с фиброзом, от NASH до цирроза, от NASH или цирроза до гепатоцеллюлярной карциномы. Термин “лечение” обозначает, в частности, коррекцию, замедление или уменьшение стеатоза печени. Термин “лечение” также обозначает улучшение стеатоза печени, воспаления печени, фиброза печени, печеночных ферментов (аминотрансфераз типа AST и ALT) и/или индекса ожирения печени (Bedgni et al., BMC Gastroenterol. 2006 Nov 2, 6:33). В частности, лечение снижает или уменьшает или замедляет развитие стеатоза печени, воспаления печени, фиброза печени, печеночных ферментов (аминотрансфераз типа AST и ALT) и/или индекса ожирения печени. В контексте фиброза это может означать замедление или блокирование развития фиброза. В частности, термин “лечение” обозначает, в частности, коррекцию, замедление или уменьшение фиброза.

В настоящем изобретении термин “эффективное количество” означает такое

количество пептида по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, которое лечит или замедляет развитие или возникновение неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), фиброза печени, воспаления печени, цирроза или гепатоцеллюлярной карциномы. Оно также может означать такое количество пептида по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, которое лечит или замедляет фиброз.

В настоящем изобретении термины “активное начало”, “активный ингредиент” и “активный фармацевтический ингредиент” эквивалентны и относятся к компоненту фармацевтической композиции, обладающему терапевтическим эффектом.

В настоящем изобретении термин “терапевтический эффект” обозначает эффект, вызванный активным ингредиентом типа пептида по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, который способен лечить или замедлять развитие или возникновение заболевания типа неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), фиброза печени, воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы или фиброза.

В настоящем изобретении термин “наполнитель или фармацевтически приемлемый носитель” относится к любым ингредиентам, кроме активных ингредиентов, которые присутствуют в фармацевтической композиции. Их добавление может быть направлено на придание конечному продукту определенной консистенции либо других физических или вкусовых свойств. Наполнитель или фармацевтически приемлемый носитель должен быть лишен каких-либо взаимодействий, в частности химических, с активными ингредиентами.

В настоящем изобретении термины “субъект”, “индивид” или “пациент” взаимозаменяемы и относятся к животным, предпочтительно к млекопитающим, еще более предпочтительно к людям, включая взрослых, детей, новорожденных и людей на пренатальной стадии.

В настоящем изобретении термин “примерно” обозначает диапазон значений  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, “около 50” включает значения  $\pm 10\%$  от 50, то есть значения в диапазоне от 45 до 55. Предпочтительно термин “примерно” обозначает диапазон значений  $\pm 5\%$  от указанного значения.

В настоящем изобретении “неалкогольная жировая болезнь печени” и “NAFLD” означают заболевание, определяемое наличием макрососудистого стеатоза при употреблении менее 20 г алкоголя в день. NAFLD является наиболее распространенным

заболеванием печени в США и обычно связано с инсулинорезистентностью/сахарным диабетом 2 типа и ожирением. NAFLD проявляется стеатозом, стеатогепатитом, циррозом и иногда гепатоцеллюлярной карциномой. См. обзор по NAFLD: Tolman and Dalpiaz (2007) Ther. Clin. Risk Manag., 3(6): 1153-1163, полное содержание которого включено сюда путем ссылки.

В настоящем изобретении термины “стеатоз”, “стеатоз печени” и “ожирение печени” означают накопление триглицеридов и других жиров в клетках печени.

В настоящем изобретении термин “неалкогольный стеатогепатит” или “NASH” обозначает воспаление и повреждение печени, вызванное накоплением жира в печени. NASH входит в группу заболеваний, называемых неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). NASH похож на алкогольное заболевание печени, но встречается у людей, которые пьют мало или вообще не употребляют алкоголь. Главным признаком NASH является жир в печени, вместе с воспалением и повреждением. Большинство людей с NASH чувствуют себя хорошо и не знают, что у них есть проблемы с печенью. Тем не менее, NASH может быть тяжелым и может привести к циррозу, при котором печень повреждается перманентно и покрывается рубцами и больше не может работать должным образом. NASH обычно впервые предполагается у лиц, у которых выявляется повышение уровня при печеночных тестах, входящих в стандартные комплекты анализов крови типа аланинаминотрансферазы (ALT) или аспартатаминотрансферазы (AST). Если при дальнейшем обследовании не проявляется явная причина заболевания печени (типа лекарств, вирусного гепатита или чрезмерного употребления алкоголя) и если при рентгенографии или томографии печени выявляется жир, то предполагается NASH. Единственным способом подтверждения диагноза NASH и отделения его от простого ожирения печени является биопсия печени.

В настоящем изобретении термин “цирроз” при гистологическом определении означает диффузный процесс в печени, характеризующийся фиброзом и превращением нормальной структуры печени в структурно аномальные узелки.

NAFLD можно отличить от NASH по шкале активности NAFLD (NAS), то есть сумме баллов при гистопатологии биоптата печени по стеатозу (от 0 до 3), лобулярном воспалении (от 0 до 2) и гепатоцеллюлярном выпячивании (от 0 до 2). NAS <3 соответствует NAFLD, 3-4 соответствует пограничному NASH и > 5 соответствует NASH. Биоптат также оценивают на фиброз (от 0 до 4).

### **Пептиды**

Пептиды по настоящему изобретению проявляют следующие признаки:

- они не содержат одновременно одного метионина, одного пролина и одного

аргинина;

- предпочтительно принимают вторичную структуру типа спирали, предпочтительно  $\alpha$ -спирали;

- они содержат, состоят в основном или состоят из последовательности сегмента киназного домена РКС (протеинкиназы С), предпочтительно сегмента из по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков киназного домена РКС (протеинкиназы С) или из сегмента от 5 до 40 последовательных остатков киназного домена РКС (протеинкиназы С);

- последовательности пептидов могут содержать 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций в пределах данной последовательности сегмента киназного домена РКС.

Пептиды также могут проявлять один или несколько из следующих признаков:

- они имеют длину менее 80 аминокислот, более предпочтительно менее 60 аминокислот, еще более предпочтительно менее 40 аминокислот и даже еще более предпочтительно менее 30 аминокислот;

- они имеют длину по меньшей мере 5 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 25 аминокислот;

- они модифицированы посредством перекрестного сшивания;

- они способны нарушать взаимодействие ALMS1-РКС, в частности, снижать или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ РКС; или же они не способны нарушать взаимодействие ALMS1-РКС, в частности, снижать или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ РКС;

- они модифицируют уровни экспрессии FATPs в жировой ткани, предпочтительно снижают экспрессию FATP2 в жировой ткани;

- они уменьшают стеатоз печени, количество жира в печени, размеры капелек жира в печени и/или индекс ожирения печени;

- они индуцируют уровни экспрессии оксигеназы гема 1 в адипоцитах.

Пептиды также могут проявлять один или несколько из следующих признаков:

- они имеют длину менее 80 аминокислот, более предпочтительно менее 60 аминокислот, еще более предпочтительно менее 40 аминокислот и даже еще более предпочтительно менее 30 аминокислот;

- они имеют длину по меньшей мере 5 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 25 аминокислот;

- они модифицированы посредством перекрестного сшивания;
- они не способны нарушать взаимодействие ALMS1-РКС, в частности, снижать или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ РКС;
- они модифицируют уровни экспрессии коллагена IV и LOXL2 (гомолога-2 лизилоксидазы), предпочтительно они снижают экспрессию коллагена IV и LOXL2, в частности экспрессию LOXL2 в печени и/или плазме;
- они уменьшают фиброз;
- они способны снижать содержание липида лизофосфатидилхолина (LPC) в тканях и в кровотоке, предпочтительно LPC 18:2.

В одном аспекте пептиды по настоящему изобретению содержат, в основном состоят или состоят из последовательности сегмента киназного домена РКС (протеинкиназы С). РКС может быть выбрана из стандартных РКС, новых РКС и нетипичных РКС. В частности, РКС может быть выбрана из стандартных РКС. Предпочтительно РКС может быть выбрана из группы, состоящей из  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\gamma$ -РКС. Более предпочтительно РКС может быть выбрана из группы, состоящей из  $\alpha$ ,  $\beta_1$  и  $\beta_2$ -РКС. Еще более предпочтительно РКС представлена  $\alpha$ -РКС, предпочтительно  $\alpha$ -РКС человека, более предпочтительно  $\alpha$ РКС человека по SEQ ID NO: 1. Киназный домен  $\alpha$ РКС человека приведен в SEQ ID NO: 2.

Сегмент киназного домена РКС содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков киназного домена РКС. В одном аспекте сегмент киназного домена РКС содержит от 5 до 40 последовательных остатков киназного домена РКС (необязательно от 5 до 30 или от 5 до 25, либо от 7 до 25 или от 8 до 25, либо от 9 до 25 или от 10 до 25, либо от 11 до 25 или от 12 до 25).

Киназный домен РКС, из которого выбирают сегмент, предпочтительно по меньшей мере на 40% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2, более предпочтительно по меньшей мере на 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно последовательность данного сегмента киназного домена РКС соответствует по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% последовательности пептида. В предпочтительном воплощении последовательность пептида по настоящему изобретению состоит из последовательности сегмента SEQ ID NO: 1.

Если сегмент киназного домена РКС содержит один метионин и/или один пролин и/или один аргинин, то последовательность можно модифицировать (т.е. путем введения

замен) с тем, чтобы удалить все остатки пролина и/или все остатки метионина и/или все остатки аргинина. Например, последовательность можно модифицировать (путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина. С другой стороны, последовательность можно модифицировать (путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки метионина. Или же последовательность можно модифицировать (путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки аргинина. В одном аспекте последовательность можно модифицировать (путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина и метионина. В другом аспекте последовательность можно модифицировать (путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина и аргинина. В дополнительном аспекте последовательность можно модифицировать (путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки метионина и аргинина. Более предпочтительно последовательность можно модифицировать (путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина, все остатки метионина и все остатки аргинина.

Предпочтительно пептиды содержат не более 20, предпочтительно не более 15, более предпочтительно не более 10 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций. В особенно предпочтительном воплощении пептид может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5, более предпочтительно 1, 2 или 3.

Например, пептиды по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичны последовательности сегмента киназного домена РКС, предпочтительно по SEQ ID NO: 2. В одном воплощении часть последовательности пептидов, соответствующая SEQ ID NO: 2, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% идентична последовательности сегмента по SEQ ID NO: 2.

Например, последовательность сегмента киназного домена РКС может относиться к последовательности между положениями 339 и 432 в SEQ ID NO: 1, между положениями 434 и 544 в SEQ ID NO: 1, между положениями 546 и 561 в SEQ ID NO: 1, между положениями 563 и 565 в SEQ ID NO: 1 или между положениями 568 и 595 в SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении последовательность сегмента киназного домена РКС может не включать следующие остатки: G433, E545, S562, S566 из SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте пептиды по настоящему изобретению имеют структуру альфа-спирали. В настоящем изобретении термины “альфа-спираль”, “ $\alpha$ -спираль”, “классическая  $\alpha$ -спираль Полинга-Кори-Брансона” и “спираль 3.613” эквивалентны и соответствуют друг другу. Термин “альфа-спираль” обозначает общий мотив во вторичной структуре белков,

который представляет собой закрученную вправо или спиральную конформацию (спираль), в которой каждая группа N-H в остове образует водородную связь с группой C=O аминокислоты, расположенной на три или четыре остатка перед ней вдоль последовательности белка. Альфа-спираль имеет среднее число остатков на 1 виток спирали около 3,6 остатков, и в кольцо, образованное водородной связью, входят 13 атомов.

В предпочтительном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют структуру альфа-спирали и/или их последовательность предполагает структуру альфа-спирали. Методы определения структуры пептидов хорошо известны специалистам в данной области, как-то методы кругового дихроизма или ЯМР. Точно так же специалистам хорошо известны методы прогнозирования альфа-спиральной структуры пептидов типа STRIDE (Frishman D., Argos P., *Proteins*, vol. 23, no. 4, 1995, p. 566-579); DEFINE (Richards F.M., Kundrot C.E., *Proteins*, vol. 3, no. 2, 1988, p. 71-84); DSSP (Touw et al., *Nucleic Acids Research* 2015, 43: D364-D368; Kabsch & Sander, *Biopolymers* 1983, 22, 2577-2637).

Альфа-спирали в киназном домене располагаются в следующих местах: 372-377; 381-392; 425-432; 437-456; 466-468; 502-504; 507-510; 518-533; 543-552; 563-572; 577-579; 587-593 и 595-597 по SEQ ID NO: 1.

Соответственно, пептид может содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

- VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3);
- LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4);
- LDN;
- PDY;
- PEII (SEQ ID NO: 5);
- SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6);
- EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7);
- PAK;
- GERDVRE (SEQ ID NO: 8);
- AFF.

В предпочтительном воплощении пептид может содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

- VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3);
- GERDVRE (SEQ ID NO: 8).

Необязательно пептид может содержать, в основном состоять или состоять из

по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); LDN; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7); EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); LDN; AFF; PDY; XDY; PEII (SEQ ID NO: 5); XEII (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R. Предпочтительно X – аминокислота, благоприятствующая вторичной структуре  $\alpha$ -спирали. Например, X может быть выбран из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y. В одном аспекте пептиды могут содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7); EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R. В частности, пептиды могут содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R. Например, пептиды могут содержать по меньшей мере одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA или VECTTVEKEVLA (SEQ ID NO: 19).

Необязательно пептид содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, делеций, вставок или их комбинаций, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 замен, делеций, вставок или их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 замены.

Необязательно пептид может содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями

аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXHYHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; AFF; PDY; XDY; PEI (SEQ ID NO: 5); XEI (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R. Предпочтительно X – аминокислота, благоприятствующая вторичной структуре  $\alpha$ -спирали. Например, X может

быть выбран из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

В одном аспекте пептиды могут содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXUHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R. Предпочтительно X – аминокислота, благоприятствующая вторичной структуре  $\alpha$ -спирали. Например, X может быть выбран из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

В частности, пептиды могут содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2 или 3

модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R. Предпочтительно X – аминокислота, благоприятствующая вторичной структуре  $\alpha$ -спирали. Например, X может быть выбран из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

Например, пептиды могут содержать по меньшей мере одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA или VECTTVEKEVLA (SEQ ID NO: 19).

В одном аспекте пептиды могут содержать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

а) VECTXVEKXVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 20), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

б) VECTMVEKRVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 21), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

с) VECTXVEKRVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 22), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую

вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

d) VECTMVEKXVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 23), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

и последовательностей любых сегментов из по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков любой из последовательностей a)–d).

В другом предпочтительном воплощении пептиды по настоящему изобретению конструируют или модифицируют так, чтобы они оставались в  $\alpha$ -спиральной конформации. Как известно, это может достигаться различными способами, включая модификации аминокислотной последовательности с заменами аминокислот, не играющих решающей роли в биологических эффектах, использование неприродных аминокислот, циклизацию пептидов и модификации остова пептидов либо добавление химических связей между аминокислотами в пептидной цепи. Такие модификации пептидов могут проводиться, к примеру, для повышения их термической стабильности и устойчивости к протеазам.

В частности, пептиды по настоящему изобретению модифицируют посредством химического сшивания. Например, пептиды могут быть сшитыми пептидами. В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению являются сшитыми. В настоящем изобретении термин “сшитый пептид” или “прошитый пептид” относится к таким искусственно модифицированным пептидам, у которых вторичная структура пептида стабилизирована одной или несколькими искусственными молекулярными поперечными связями (мостиками), соединяющими соседние витки  $\alpha$ -спиралей в пептиде. Методы получения сшитых пептидов хорошо известны в данной области, к примеру, это Verdine & Hilinski (2012, *Methods Enzymol.*, 503, 3-33), WO 10033617 и WO 10011313, содержание которых включено сюда путем ссылки.

В одном воплощении сшивки у сшитых пептидов настоящего изобретения

представлены сшивками между аминокислотами  $i+3$  и/или  $i+4$  и/или  $i+7$ . В пептидах “сшивка  $i+3$ ” означает сшивку между “ $i$ -й” аминокислотой и другой аминокислотой, находящейся на расстоянии 3 аминокислотных остатков от  $i$ -й аминокислоты. В пептидах “сшивка  $i+4$ ” означает сшивку между “ $i$ -й” аминокислотой и другой аминокислотой, находящейся на расстоянии 4 аминокислотных остатков от  $i$ -й аминокислоты. В пептидах “сшивка  $i+7$ ” означает сшивку между “ $i$ -й” аминокислотой и другой аминокислотой, находящейся на расстоянии 7 аминокислотных остатков от  $i$ -й аминокислоты.

Для самых коротких последовательностей, в частности содержащих 3-4 остатка, сшивка представлена  $i+3$  и  $i+4$  и она вводится между остатками, которые находятся за пределами этой последовательности. Когда последовательности достаточно длинные, то предпочтительной является сшивка  $i+7$ .

Для иллюстрации этого аспекта на одном конкретном пептиде этот пептид может содержать, состоять в основном или состоять из одной из следующих последовательностей:

VECTMXEKRVLAX (SEQ ID NO: 24)

VECTXXEKRVLAX (SEQ ID NO: 25)

VECTMXEKXVLAX (SEQ ID NO: 26)

VECTXXEKXVLAX (SEQ ID NO: 27)

VECTXXEKXVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 28)

VECTMXEKRVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 29)

VECTXXEKRVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 30)

VECTMXEKXVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 31)

где выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые остатки X несут сшивки и представляют собой производные аминокислот, подходящих для сшивания;

причем X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y;

а последовательности необязательно содержат 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций.

К примеру, в контексте сшивки  $i+7$  первый X представляет собой 2-(7-октенил)-аминокислоту (к примеру, 2-(7-октенил)аланин или 2-(7-октенил)аргинин), а второй X представляет собой 2-(4-пентенил)аминокислоту (к примеру, 2-(4-пентенил)аланин или 2-(4-пентенил)серин). Конкретные комбинации: 2-(7-октенил)аланин и 2-(4-пентенил)-

аланин; 2-(7-октенил)аланин и 2-(4-пентенил)серин; 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)аланин; или 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин.

В предпочтительном воплощении пептиды могут представлять собой:

VECTTREKEVLASLDKAAFLTQLHS (SEQ ID NO: 32),

где **R** и **S** несут сшивку, предпочтительно это 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин, соответственно;

а последовательности необязательно содержат 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций.

В предпочтительном воплощении пептид по настоящему изобретению представляет собой циклический пептид. В настоящем изобретении термины “циклический пептид” или “кольцевой пептид” эквивалентны и относятся к пептидам, у которых N-конец и C-конец, либо N-конец и боковая цепь другой аминокислоты, предпочтительно C-концевой аминокислоты, либо C-конец и боковая цепь другой аминокислоты, предпочтительно N-концевой аминокислоты, либо боковая цепь одной аминокислоты, предпочтительно N-концевой аминокислоты, и боковая цепь другой аминокислоты, предпочтительно C-концевой аминокислоты, соединены ковалентной связью, образующей кольцевую структуру. В настоящем изобретении термины “N-конец”, “аминный конец”, “NH<sub>2</sub>-конец”, “N-концевой” и “аминоконцевой” являются эквивалентными и относятся к свободной аминогруппе (-NH<sub>2</sub>), находящейся на первой аминокислоте пептида. В настоящем изобретении термины “C-конец”, “карбоксильный конец”, “COOH-конец”, “C-концевой” и “карбоксиконцевой” являются эквивалентными и относятся к свободной карбоксигруппе (-COOH), находящейся на последней аминокислоте пептида.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют длину менее 80 аминокислот, более предпочтительно менее 60 аминокислот, еще более предпочтительно менее 40 аминокислот и даже еще более предпочтительно менее 30 аминокислот. В одном предпочтительном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют длину менее 25 аминокислот. В другом предпочтительном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют длину менее 20 аминокислот, предпочтительно менее 15 аминокислот. Предпочтительно пептиды имеют минимальную длину более 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. Например, пептиды имеют длину по меньшей мере в 4 аминокислоты и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере в 4 аминокислоты и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере в 6 аминокислот и менее 25 аминокислот.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению способны нарушать взаимодействие ALMS1-ПКС, в частности, снижать или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ ПКС. Иными словами, пептиды по настоящему изобретению способны блокировать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ ПКС. Или же, с другой стороны, пептиды по настоящему изобретению не способны нарушать взаимодействие ALMS1-ПКС, в частности, снижать или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ ПКС. Иными словами, пептиды по настоящему изобретению способны и не блокировать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ ПКС.

Для определения влияния пептидов на связывание  $\alpha$ ПКС с ALMS1 может применяться любая технология, известная специалистам в данной области, в частности, любые методы, пригодные для определения межбелковых взаимодействий. Например, на чипе для поверхностного плазмонного резонанса можно связать рекомбинантный или очищенный нативный ALMS1 или  $\alpha$ ПКС, а поверх чипа пропускать другую молекулу для оценки сродства связывания, к примеру, на приборе Biacore (General Electric, США).

Влияние пептидов на связывание  $\alpha$ ПКС с ALMS1 определяется путем измерения связывания  $\alpha$ ПКС с ALMS1 в отсутствие и в присутствии исследуемого пептида и сравнения результатов по связыванию  $\alpha$ ПКС с ALMS1.

В частности, можно проводить анализ методом иммунопреципитации, используя ALMS1 в качестве наживки. Анализ можно проводить на клетках, в частности, на адипоцитах, культивируемых в отсутствие и/или в присутствии инсулина, предпочтительно в отсутствие инсулина. Исследуемые пептиды добавляются в культуральную среду. Затем проводится иммунодетектирование  $\alpha$ ПКС.

Под “снижается”, “снижение” или “предотвращение” подразумевается снижение связывания по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению со связыванием, измеренным в отсутствие исследуемой молекулы в таких же условиях.

В одном воплощении пептид по настоящему изобретению способен снижать экспрессию FATP2 в жировой ткани.

FATP2 также называют представителем-2 семейства-27 переносчиков растворенных веществ (SLC27A2). Этот белок приведен в базе данных UniProtKB под номером O14975. А ген приведен в базе данных UniGene под номером Hs.11729. Эталонные последовательности приведены в NCBI под номерами NP\_003636.2 и NM\_003645.3 для изоформы 1 и NP\_001153101.1 и NM\_001159629.1 для изоформы 2.

Под “снижается” или “снижение” подразумевается снижение экспрессии по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с экспрессией, измеренной в отсутствие пептида в таких же условиях. Экспрессия может быть измерена

либо на уровне белка (напр., с помощью антител), либо на уровне мРНК.

Экспрессия может быть измерена на уровне белка любым доступным методом типа иммуногистохимии, полуколичественного вестерн-блота или с помощью матрицы белков или антител. Антитела против FATP2 коммерчески доступны, к примеру, от Origene, кат. № TA350424 или TA333990; либо Santa Cruz Biotechnology, кат. № sc-393906.

Экспрессия также может быть измерена на уровне мРНК любым доступным методом. Предпочтительно уровень экспрессии FATP2 определяют путем измерения количества транскриптов мРНК методом количественной ОТ-ПЦР, количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, ПЦР по технологии Nanostring или по технологии высокопроизводительного секвенирования типа RNA-Seq или технологии секвенирования в микрожидкостной системе. Более предпочтительно экспрессия измеряется методом, приведенным в разделе «Примеры».

В предпочтительном воплощении влияние пептидов на экспрессию FATP2 в жировой ткани предпочтительно специфично для FATP2. В этом воплощении пептид может совсем или почти не влиять на экспрессию других FATP, то есть FATP1, FATP3, FATP4, FATP5 и FATP6 в жировой ткани, в особенности млекопитающих.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению способны уменьшать стеатоз печени, количество жира в печени, размеры капелек жира в печени и/или индекс ожирения печени.

В одном предпочтительном воплощении пептид по настоящему изобретению проявляет следующие признаки:

- он не содержит одновременно одного метионина, одного пролина и одного аргинина;
- предпочтительно принимает вторичную структуру типа спирали, предпочтительно  $\alpha$ -спирали;
- он содержит, состоит в основном или состоит из последовательности сегмента киназного домена РКС (протеинкиназы С);

а также проявляет один, два, три, четыре или все из следующих признаков:

- он модифицирует уровни экспрессии FATPs в жировой ткани, предпочтительно снижает экспрессию FATP2 в жировой ткани;
- он уменьшает стеатоз печени, количество жира в печени, размеры капелек жира в печени и/или индекс ожирения печени;
- он имеет длину по меньшей мере 4 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислот и менее 25 аминокислот;

- он принимает вторичную структуру типа спирали, предпочтительно  $\alpha$ -спирали;
- он модифицирован посредством перекрестного сшивания.

В более предпочтительном воплощении пептид по настоящему изобретению проявляет следующие признаки:

- он уменьшает стеатоз печени, количество жира в печени, размеры капелек жира в печени и/или индекс ожирения печени;
- он не содержит одновременно одного метионина, одного пролина и одного аргинина;
- он имеет длину по меньшей мере 4 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислот и менее 25 аминокислот;
- предпочтительно принимает вторичную структуру типа спирали, предпочтительно  $\alpha$ -спирали.

В другом более предпочтительном воплощении пептид по настоящему изобретению проявляет следующие признаки:

- он снижает экспрессию FATP2 в жировой ткани;
- он не содержит одновременно одного метионина, одного пролина и одного аргинина;
- он имеет длину по меньшей мере 4 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислот и менее 25 аминокислот;
- он принимает вторичную структуру типа спирали, предпочтительно  $\alpha$ -спирали.

В одном воплощении пептид по настоящему изобретению способен снижать экспрессию коллагена, в частности, коллагена IV, и LOXL2. Предпочтительно он снижает экспрессию LOXL2, в частности, экспрессию LOXL2 в печени и/или плазме.

Он может снижать содержание липида лизофосфатидилхолина (LPC) в тканях и в кровотоке, предпочтительно LPC 18:2.

Пептид по настоящему изобретению также может содержать фрагмент, облегчающий его поглощение или проникновение в клетки, в частности PTD (домен трансдукции белков). PTD обычно содержит определенную аминокислотную последовательность из 10-20 аминокислот (Matsushita and Matsui (2005), J Mol. Med. 83, 324-328; Vivès et al., Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1786, 126-138). PTD в основном состоит из основных аминокислот типа аргинина или лизина, а типичные примеры PTD включают богатые аргинином пептиды типа поли-R<sub>8</sub> (RRRRRRRR, SEQ ID NO: 33) или RRPRRPRRPRRPRR (SEQ ID NO: 34), пептиды antennapedia или пенетратин типа

RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 35) либо HIV-Tat (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO: 36).

Пептид по настоящему изобретению может состоять из природных аминокислот и/или неприродных аминокислот. Термин “неприродные аминокислоты” определяется как аналоги или производные природных аминокислот (т.е. аланина, валина, глицина, лейцина, изолейцина, лизина, аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, тирозина, фенилаланина, триптофана, серина, пролина, треонина, цистеина, метионина). Они содержат модифицированные боковые цепи, напр., более короткие, более длинные или с другими функциональными группами. Предусмотрены изомеры D и L, в частности, потому, что изомеры D не чувствительны к протеазам. Кроме того, также предусмотрены модификации в некоторых или всех пептидных связях для повышения устойчивости к протеолизу, в частности: (-CO-NH-) на (-CH<sub>2</sub>-NH-), (-NH-CO-), (-CH<sub>2</sub>-O-), (-CH<sub>2</sub>-S-), (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), (-CO-CH<sub>2</sub>-), (-CHON-CH<sub>2</sub>-), (-N=N-) и/или (-CH=CH-). Пептиды могут содержать карбоксильный C-конец (-COO-) и амидный N-конец (-CONH<sub>2</sub>). Пептиды также могут иметь D-ретроинверсную последовательность описанных здесь пептидов. N-конец может быть модифицирован, особенно с помощью ацетильного радикала.

Необязательно пептид может быть ПЭГилирован для повышения их стабильности. Также необязательно пептиды могут быть заключены в неводные растворы протонных растворителей типа пропиленгликоля и полиэтиленгликоля. Пептид также может быть заключен в состав депо типа микросфер из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты. Существует много систем доставки с замедленным высвобождением, и многие из них подходят для применения в настоящем изобретении. Например, подходят композиции на основе полимеров с замедленным высвобождением, на основе таких разлагаемых полимеров, как PLGA, полилактат или полигликолят, а также композиции типа депо на основе липидов типа описанных в WO 2005/117830 и/или WO 2006/075124, полное содержание которых включено сюда путем ссылки. Заключение активных средств в составы типа депо из биоразлагаемых полимеров общепринято и хорошо известно в данной области, поэтому пептиды по настоящему изобретению могут быть заключены в них известными способами. Предпочтительно композиции по настоящему изобретению способны высвобождать пептиды в функциональной концентрации в течение по меньшей мере 1 месяца.

В дополнительном аспекте пептид по настоящему изобретению снижает явления стеатоза и другие печеночные расстройства, связанные с NAFLD или NASH в печени. Явления стеатоза в печени можно оценивать любым способом, известным специалистам в

данной области. В частности, способом, описанным в разделе «Примеры». Например, стеатоз можно измерить при помощи томографии или биопсии. Пептиды, снижающие явления стеатоза в печени, можно обнаружить обычным образом по любой технологии, известной в данной области. В частности, способ оценки стеатоза в печени может включать любые методы, пригодные для измерения жира в печени, размера липидных капель в печени и/или измерения индекса ожирения печени (Bedgni et al., BMC Gastroenterol. 2006 Nov 2, 6: 33).

Под “пептидом” подразумевают пептид, описанный выше, или комбинации различных пептидов, описанных выше. Например, можно использовать 2, 3, 4, 5 или 6 различных пептидов, предпочтительно 2 или 3, более предпочтительно 2.

### **Комбинации**

Пептиды по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами, к примеру, противодиабетическими средствами, гиполипидемическими средствами, средствами от ожирения, антигипертензивными средствами, средствами против стеатоза, противовоспалительными средствами и агонистами рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом.

Соответственно, настоящим изобретением предусмотрены:

- пептид или фармацевтическая композиция, содержащая описанный здесь пептид, для применения при лечении или профилактике заболеваний в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами, в частности, приведенными здесь, причем заболевания выбирают из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

- фармацевтическую композицию, содержащие описанный здесь пептид и одно или несколько дополнительных активных средств, в частности, приведенных здесь, для применения при лечении или профилактике заболеваний, выбранных из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного

ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

– продукт, комбинированный препарат или набор, содержащие пептиды по настоящему изобретению и одно или несколько дополнительных активных средств, в частности, приведенных здесь, для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении или профилактике заболеваний, выбранных из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

– применение пептида для изготовления лекарственных средств для лечения или профилактики заболеваний в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами, в частности, приведенными здесь, причем заболевания выбирают из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

– применение представленного здесь пептида и одного или нескольких дополнительных активных средств, в частности, приведенных здесь, для изготовления

лекарственных средств для лечения или профилактики заболеваний, выбранных из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

– способ лечения или профилактики заболеваний у субъектов, включающий введение терапевтически эффективного количества представленного здесь пептида и терапевтически эффективного количества одного или нескольких дополнительных активных средств, в частности, приведенных здесь, причем заболевания выбирают из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза;

– способ лечения или профилактики заболеваний у субъектов, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей представленный здесь пептид и одно или несколько дополнительных активных лекарственных средств, в частности, приведенных здесь, причем заболевания выбирают из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза, в особенности фиброза, выбранного из группы, состоящей из фиброза печени, включая цирроз, фиброза почек, фиброза сердца, включая фиброз предсердий, фиброза эндомиокарда и застарелого инфаркта миокарда, фиброза легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброза сосудов типа фиброза артерий, фиброза головного мозга, миелофиброза, артрофиброза, фиброза

кишечника, фиброза брюшины, забрюшинного фиброза или кожного фиброза.

В частности, можно использовать терапевтически или субтерапевтически эффективное количество одного или нескольких дополнительных активных лекарственных средств. Под “субтерапевтическим” подразумевается такое количество, которое может составлять, к примеру, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10% от стандартной терапевтической дозы (в частности, для того же показания и/или того же способа введения и/или частоты введения).

Противодиабетическим средством может быть, к примеру, инсулин, производные и миметики инсулина; стимуляторы секреции инсулина типа сульфонилмочевины (напр., хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, толбутамид, глибурид, глимепирид, глипизид); такие глифлозины, как эмпаглифлозин и дапаглифлозин; глибурид и амарил; лираглутид (NN2211); лиганды рецепторов инсулинотропных сульфонилмочевин типа меглитинида, напр., натеглинид и репаглинид; тиазолидиндионы (напр., росиглитазон (AVANDIA), троглитазон (REZULIN), пиоглитазон (ACTOS), балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, троглитазон, энглитазон, циглитазон, адаглитазон, дарглитазин, которые усиливают действие инсулина, напр., путем сенсibilизации к инсулину, тем самым способствуя утилизации глюкозы в периферических тканях; ингибиторы тирозиновой протеинфосфатазы-1В (PTP-1B) типа PTP-112; ингибиторы белка-переносчика эфиров холестерина (CEPT) типа торцетрапиба; ингибиторы GSK3 (киназы-3 гликогенсинтазы) типа SB-517955, SB-4195052, SB-216763, NN-57-05441 и NN-57-05445; лиганды RXR типа GW-0791 и AGN-194204; ингибиторы натрий-зависимого котранспортера глюкозы типа T-1095 или канаглифлозина; ингибиторы гликогенфосфорилазы А типа BAY R3401; бигуаниды типа метформина и другие средства, действующие путем усиления утилизации глюкозы, снижения продукции глюкозы в печени и/или уменьшения выработки глюкозы в кишечнике; ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы типа акарбозы и миглитола и другие средства, замедляющие расщепление углеводов и тем самым всасывание из кишечника и уменьшающие гипергликемию после приема пищи; GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1), аналоги GLP-1 типа эксендина-4 и миметики GLP-1; и ингибиторы DPPIV (дипептидилпептидазы IV) типа вильдаглиптина. Это также могут быть противодиабетические средства, описанные в Expert Opin. Investig. Drugs 2003, 12(4): 623-633, фиг. 1-7. Противодиабетические средства также могут включать молекулы, предотвращающие связывание  $\alpha$ PKC и ALMS1 типа тех, что описаны в WO 2015/114062, содержание которой включено сюда путем ссылки.

Гиполипидемическим средством могут быть, к примеру, ингибиторы редуктазы 3-гидрокси-3-метилглутарилкофермента А (HMG-CoA), напр., ловастатин, питавастатин,

симвастатин, правастатин, церивастатин, мевастатин, велостатин, флувастатин, дальвастатин, аторвастатин, розувастатин и ривастатин; ингибиторы скваленсинтазы; лиганды FXR (X-рецептора фарнезоидов) и LXR (X-рецептора печени) типа обетихоловой кислоты; секвестранты желчных кислот типа холестирамина и колесевелама; фибраты; никотиновая кислота и аспирин; арамхол, агонист сопряженного с G-белком трансмембранного рецептора-5 (TGR5).

Средством против ожирения может быть, к примеру, орлистат, римонабант, фентермин, топирамат, кюнекса и локасерин.

Антигипертензивным средством могут быть, к примеру, петлевые диуретики типа этакриновой кислоты, фуросемида и торсемида; ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ACE), как-то беназеприл, каптоприл, эналаприл, фосиноприл, лизиноприл, мозексиприл, перинодоприл, квинаприл, рамиприл и трандолаприл; ингибиторы мембранного насоса Na,K-АТФазы типа дигоксина; ингибиторы нейтральной эндопептидазы (NEP) типа сакубитрила; ингибиторы ACE/NEP типа омапатрилата, сампатрилата и фасидотрила; антагонисты ангиотензина II, как-то кандесартан, эпросартан, ирбесартан, лосартан, телмисартан и валсартан, в особенности валсартан; комбинации ингибиторов NEP и антагонистов ангиотензина II типа сакубитрила и валсартана (напр., Entresto); ингибиторы ренина, как-то дитекирен, занкирен, терлакирен, алискирен, RO 66-1132 и RO-66-1168; блокаторы  $\beta$ -адренергических рецепторов, как-то ацебутолол, атенолол, бетаксоллол, бисопролол, метопролол, надолол, пропранолол, соталол и тимолол; инотропные средства типа дигоксина, добутамина и милринона; блокаторы кальциевых каналов, как-то амлодипин, бепридил, дильтиазем, фелодипин, никардипин, нимодипин, нифедипин, нисолдипин и верапамил; антагонисты альдостероновых рецепторов; и ингибиторы альдостеронсинтазы.

Агонистом рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом, может быть, к примеру, фенофибрат, пиоглитазон, росиглитазон, тесаглитазар, BMS-298585, L-796449, соединения, конкретно описанные в патентной заявке WO 2004/103995, т.е. соединения из примеров 1-35 или же соединения, перечисленные в п. 21 формулы изобретения, либо соединения, конкретно описанные в патентной заявке WO 03/043985, т.е. соединения из примеров 1-7 или соединения, перечисленные в п. 19 формулы изобретения, в особенности (R)-1-{4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)оксазол-4-илметокси]бензолсульфонил}-2,3-дигидро-1H-индол-2-карбоновая кислота или её соли.

Могут представлять интерес и другие средства, к примеру, ценикривирок, симтузумаб, селонсертиб, эмрикасан. В предпочтительном воплощении одно или несколько дополнительных активных средств, используемых в комбинации с пептидами,

можно выбрать из аналогов GLP-1 типа лираглутида, обетихоловой кислоты, глифлозина, симтузумаба (GS 6624), ценикривирока, арамхола, ингибиторов галектина-3 типа GR-MD-02, агонистов TGR5 или двойных агонистов FXR/TGR5 типа INT-777 или INT-767, и эмрикасана.

Противовоспалительным средством могут быть любые препараты, известные как нестероидные противовоспалительные средства (NSAID), включая салициловую кислоту, ибупрофен в его различных формах и напроксен в его различных формах, стероидные противовоспалительные средства типа кортикостероидов, противовоспалительные антитела против  $\alpha$ -TNF и их комбинации.

Форма фармацевтических композиций, способ введения, дозировка и схема введения, естественно, зависят от подлежащего лечению заболевания, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента и т.п.

Фармацевтические или терапевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутриглазного введения и т.п.

Пептид, используемый в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, присутствует в терапевтически эффективном количестве.

Фармацевтические композиции, содержащие пептиды, составляют в соответствии со стандартной фармацевтической практикой (Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and JC Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York), известной специалистам в данной области.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены стабильные лекарственные формы для парентерального введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению, содержащих пептид либо его соль, причем пептид высушивают, а затем восстанавливают в растворителе перед применением. Пептид (или в тех воплощениях, где композиция содержит два или несколько пептидов, каждый из пептидов) смешивают с нелетучим буфером и высушивают до сухого пептидного порошка. Подходящие буферы включают, без ограничения, глициновые буферы, цитратные буферы, фосфатные буферы и их смеси. В одном воплощении буфер представляет собой глициновый буфер. В другом воплощении буфер представляет собой смесь цитратного буфера и фосфатного буфера. В некоторых воплощениях, в которых композиция содержит два или несколько пептидов, первый и второй буферы одинаковы. В некоторых воплощениях, в которых композиция содержит два или несколько пептидов, первый и второй буфер различны. В качестве альтернативы фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут храниться

в водном состоянии. Раствор может содержать, если нужно, дополнительные добавки или наполнители, которые должны быть совместимы с активным началом, а если они не удаляются на стадии лиофилизации, то они должны быть совместимы и со способом введения. Для парентерального введения композиции можно вводить внутривенно, подкожно, внутримышечно или внутримышечно. Предпочтительно композиции или пептиды вводят подкожно, в частности, в жировую ткань.

Предпочтительно они могут находиться в миниосмотическом насосе или другом устройстве контролируемой доставки, имплантированном в организм. Предпочтительно их можно смешивать с другими соединениями для получения композиций с замедленным высвобождением. Предпочтительным способом введения является подкожная инъекция, к примеру, с помощью одноразового или многокомпонентного дозирующего устройства, подобного инсулиновой ручке. Пептиды также можно вводить при помощи устройства, позволяющего подкожное введение без какой-либо иглы, неинвазивно.

Кроме того, пептиды можно вводить при помощи любой доступной системы доставки лекарств. В частности, предусматривается применение рекомбинантного фермента – гиалуронидазы *hhuRN20* человека для обеспечения и оптимизации подкожной доставки препаратов для соответствующих комбинированных способов лечения.

По этой технологии некоторые биопрепараты и соединения, которые вводятся внутривенно, можно вместо этого вводить подкожно, то есть под кожу, что потенциально обеспечивает большее удобство для пациентов и повышает эффективность системы здравоохранения за счет сокращения времени введения, боли при инъекции и реакций на месте введения.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению можно смешивать с другими соединениями для получения лекарственной формы в виде депо с замедленным высвобождением. Затем её можно вводить подкожно, получая депо с замедленным высвобождением.

Для перорального введения композиции можно составить в виде стандартных пероральных дозовых форм типа таблеток, капсул, порошков, гранул и жидких препаратов типа сиропов, эликсиров и концентрированных капель. Можно использовать нетоксичные твердые носители или разбавители, включающие, к примеру, фармацевтические марки маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, талька, целлюлозы, глюкозы, сахарозы, магния, карбоната и т.п. Для прессованных таблеток также необходимы связующие вещества, то есть вещества, которые придают порошкообразным материалам когезионные свойства. Например, в качестве связующих веществ можно использовать крахмал, желатин, такие сахара, как лактоза или декстроза, и

природные или синтетические смолы. В таблетках также нужны разрыхлители, способствующие разрушению таблеток. Разрыхлители включают крахмалы, глины, целлюлозы, альгины, камеди и сшитые полимеры. Кроме того, в таблетки также включают смазывающие и скользящие вещества, чтобы предотвратить прилипание материала таблеток к поверхностям в процессе производства и улучшить сыпучесть порошкообразного материала в процессе производства. В качестве скользящего вещества чаще всего применяется коллоидный диоксид кремния, а в качестве смазывающих веществ чаще всего применяются такие соединения, как тальк или стеариновые кислоты.

Для трансдермального введения композиции могут быть составлены в виде мази, крема или геля, а для облегчения проникновения можно использовать подходящие пенетранты или детергенты, такие как диметилсульфоксид, диметилацетамид и диметилформамид.

Для трансмукозального введения можно использовать назальные распылители, внутрилегочные ингаляции, ректальные или вагинальные свечи. В одном воплощении изобретения их можно вводить внутрилегочно в виде сухого порошка либо жидкого состава, вводимого с помощью устройства для внутрилегочной доставки лекарств в соответствии с известными способами. Активное соединение может быть включено в любые известные основы свечей известными методами. Примеры таких основ включают масло какао, полиэтиленгликоли (карбоваксы), моностеарат полиэтиленсорбитана и их смеси с другими совместимыми материалами для модификации температуры плавления или скорости растворения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для высвобождения активного средства практически сразу после введения или в любое заданное время или период времени после введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать один или несколько пептидов по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемыми наполнителями и/или носителями. Эти наполнители и/или носители выбирают в соответствии со способом введения, как описано выше.

В предпочтительном воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат от 0,01 нг до 10 г пептида по настоящему изобретению. В одном воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат от 0,1 нг до 1 г пептида по настоящему изобретению.

Все приведенные в данной заявке ссылки, включая научные статьи и рефераты, опубликованные патентные заявки, выданные патенты и любые другие ссылки полностью включены сюда путем ссылки, включая все результаты, таблицы, фигуры и тексты этих

ссылок.

Хотя термины “включающий”, “имеющий”, “состоящий из” и “содержащий” могут иметь различные значения, они могут заменять друг друга по всей заявке.

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения будут описаны в нижеследующих примерах, которые следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничительные.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Влияние прицельной обработки жировой ткани пептидом PATAD на уровни экспрессии основных переносчиков и рецепторов жирных кислот через 11 дней после введения**

Поскольку подкожное введение PATAD связано с восстановлением всасывания глюкозы в жировой ткани, то авторы изобретения измеряли уровни экспрессии всех 6 изоформ FATP (1-6) (белков транспорта жирных кислот 1-6) и 4 изоформ FFAR (рецептора свободных жирных кислот), чтобы оценить любые влияния на эти гены.

Интересно, что введение PATAD вызывало очень специфическое и резкое снижение FATP2 в жировой ткани, что позволяет коррелировать эффект применения PATAD непосредственно с падением экспрессии FATP2 (фиг. 1A). Поскольку ранее было показано, что пептид PATAD не циркулирует в организме, что его действие ограничивается жировой тканью, а также исходя из его механизма действия, который заключается в нарушении взаимодействия ALMS1-ПКС, то снижение FATP2 в жировой ткани является новым действием PATAD. Уровни экспрессии переносчиков и рецепторов в двух других важных органах могут быть связаны с косвенным действием (фиг. 1B-C).

### **Пример 2. Пептид ADPIF более активно, чем пептид PATAD, снижает уровень экспрессии FATP2 в жировой ткани**

Мышам вводили однократную дозу либо рандомизированного пептида, либо PATAD или ADPIF. Через 11 дней после введения мышей забивали и брали образцы жировой ткани для выделения РНК и проведения ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии FATP2 был близок к обезжиренному контролю, тогда как PATAD, хотя и эффективно снижал уровень экспрессии FATP2 в жировой ткани, оказался менее эффективным, чем ADPIF (фиг. 2A).

### **Пример 3. ADPIF эффективно повышает уровень GLP-1 в крови через 11 дней после введения в жировую ткань**

Мышам вводили однократную дозу либо рандомизированного пептида, либо PATAD или ADPIF. Через 11 дней после введения мышей забивали, получали плазму крови и использовали для определения уровня GLP-1 у мышей с указанной обработкой.

PATAD и ADPIF оба восстанавливали высокие уровни GLP-1 в кровотоке, причем ADPIF вызывал большее повышение, чем PATAD (фиг. 2B).

**Пример 4. Защитное действие на печень через 3 месяца после прицельной обработки жировой ткани пептидом PATAD или ADPIF при однократном введении**

Указанных мышей забивали и брали образцы крови и органов для анализа. Определяли соотношение массы печени к массе тела, деленное на возраст в днях, которое представлено на фиг. 3B. Размеры печени в ответ на обработку PATAD четко снижались по сравнению с контролем, которым служили диабетические самцы DIO, получавшие только носитель. Затем проводили окрашивание криосрезов печени с помощью Adipored и DAPI для определения уровня липидных капель. У мышей, обработанных PATAD или ADPIF, четко проявлялось снижение размера липидных капель в печени (фиг. 3A, справа; фиг. 7, справа). Функцию печени оценивали по двум сильным биомаркерам, связанным с печенью, а именно: AST (аспартатаминотрансфераза) и ALT (аланинаминотрансфераза), уровни которых повышаются пропорционально повреждению печени. Интересно, что у мышей, обработанных PATAD или ADPIF (через 3 месяца после однократной подкожной инъекции пептида), наблюдается резкое снижение этих двух надежных печеночных биомаркеров (фиг. 3C), что указывает на защитное действие PATAD и ADPIF на печень в связи с уменьшением явления стеатоза. PATAD и ADPIF оба эффективно снижают уровни AST и ALT в крови. ADPIF более активно снижает уровень ALT в крови, что свидетельствует об улучшении поврежденных клеток печени.

**Пример 5. Пептид ADPIF более активно предотвращает гипергликемию, чем пептид PATAD**

Проводили ряд тестов на толерантность к глюкозе (GTT) и использовали данные из двух временных точек, а именно 30 мин и 120 мин, для построения этих кривых для контрольных и обработанных PATAD диабетических мышей с вызванным диетой ожирением (DIO) и самцов мышей C57/B6 дикого типа (контроль).

Эти данные показывают, что пептид на основе ADPIF проявляет лучший эффект в тесте на толерантность к глюкозе, чем пептид PATAD (фиг. 4).

**Пример 6. Пептид ADPIF более активно снижает уровни белков LOXL2 и FABP4 в печени, чем пептид PATAD**

LOXL2 – фермент, способствующий возникновению фиброзных очагов посредством полимеризации коллагена, а FABP4 – белок, участвующий в метаболизме липидов, уровень которого повышается с усилением отложения липидов в печени. Через 3 месяца после обработки при однократном введении исследовали экстракты печени от указанных мышей и оказалось, что пептид ADPIF более эффективно снижает уровень

LOXL2 в печени, чем PATAD, тем самым уменьшая способность образовывать больше фиброзных очагов в печени, и снижает уровень FABP4, что коррелирует со снижением уровня триглицеридов в печени (фиг. 5).

**Пример 7. Профиль липидов в крови в ответ на введение ADPIF в жировую ткань**

Неожиданно оказалось, что введение ADPIF в жировую ткань защищает печень, судя по специфическому снижению уровня экспрессии FATP2 в жировой ткани вместе с профилем FATP и FFAR в мышцах и печени. На эти изменения влияют популяции различных липидов в крови. Церамиды – это группа биологически активных липидов, которые задействованы в NAFLD. Мы измеряли и определяли влияние введения ADPIF на профиль церамидов после 3 инъекций ADPIF в подкожную жировую ткань с частотой один раз в неделю. ADPIF вызывает глобальное снижение содержания церамидов в печени с различиями между разными церамидами (фиг. 6).

**Пример 8. ADPIF эффективно снижает размеры липидных капель в печени**

На фиг. 7 окрашивание криосрезов печени обработанных мышей (при такой же дозировке, что и в примере 6) на липидные капли свидетельствует о глобальном снижении размеров липидных капель в печени после обработки ADPIF, что указывает на снижение накопления липидов в печени.

**Пример 9. Обработка ADPIF жировой ткани неожиданно подавляет уровни экспрессии ключевых и модулирующих ферментов липогенеза в печени**

ACC и FASN входят в состав пути липогенеза, посредством которого в печени синтезируются жирные кислоты, вместе с Srebf1, который является ключевым белком, участвующим в обработке липидов. После обработки ADPIF эти ферменты были подавлены, указывая на то, что действие ADPIF после его введения в жировую ткань способно блокировать липогенез de novo в печени (фиг. 8).

**Пример 10. Обработка ADPIF жировой ткани блокирует развитие фиброза печени на модели у мышей DIO-NASH**

Использовали криосрезы печени от обработанных ADPIF мышей (тех же, что и в примере 8) для иммунодетектирования LOXL2 или коллагена IV и оказалось, что ADPIF эффективно предотвращает появление маркеров фиброза (фиг. 9A). Уровни секретируемого LOXL2 в плазме также значительно снижались (фиг. 9B). В результате снижения LOXL2 и уменьшения коллагеновых отложений фиброзные очаги, которые легко выявлялись в печени необработанных DIO-NASH (фиг. 9C, левая панель) при просвечивающей электронной микроскопии, больше не выявлялись в печени обработанных ADPIF мышей.

### **Пример 11. ADPIF избирательно снижает целевые лизофосфатидилхолины (LPC) в печени и других тканях**

Анализировали содержимое липидов на LPC через 3 месяца после введения ADPIF в жировую ткань, чтобы узнать, как ADPIF влияет на уровни LPC, известного субстрата для аутоаксина – ключевого секретируемого фермента, играющего роль в развитии фиброза. Вне ожидания, ADPIF эффективно снижал отдельные LPCs в исследуемых органах, причем наиболее заметное снижение проявлял LPC 18:2 в поджелудочной железе, жировой ткани и печени (фиг. 10).

### **Пример 12. Пептид ADPIF эффективно предотвращает отложение коллагена IV в почках и тем самым защищает почки от фиброза**

Проводили иммуноокрашивание криосрезов почек от получавших носитель мышей DIO и получавших ADPIF мышей DIO через 3 месяца после обработки на отложение коллагена IV и на плотные контакты с помощью антитела ZO-1, чтобы оценить влияние пептида ADPIF на развитие фиброза в других мягких тканях. Вне ожидания, в почках мышей, получавших ADPIF, наблюдалось четкое снижение коллагена IV по сравнению с мышами, получавшими носитель, указывая на то, что пептид ADPIF также эффективно защищает почки от фиброза (фиг. 11).

#### **Материалы и методы**

##### Содержание мышей

Для этого исследования брали мышей на генетическом фоне C57/BL6. Всех животных содержали в помещении с контролируемой температурой и влажностью, с циклом в 12 ч. освещения /12 ч. темноты, с подачей в течение всей фазы корма с высоким содержанием жира в 60% фирмы Research Diets (D12492) и водопроводную воду ad libitum. Мышей кормили и регулярно проводили тест на толерантность к глюкозе, а когда они становились нетолерантными к глюкозе, их использовали для обработки.

##### Последовательности пептидов и синтез

Название PATAD дано ряду пептидов, происходящих из  $\alpha$ -изоформы РКС, которые биологически активны и способны запускать всасывание глюкозы, особенно в жировой ткани.

Последовательность сшитого пептида A: VECTM-[2-(4-пентенил)аланин]-EKRVL A-[2-(4-пентенил)аланин]-LDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 49).

Последовательность сшитого пептида B: S-[2-(4-пентенил)аланин]-CKG LMT-[2-(4-пентенил)аланин]-HPAKRLGCGPEG (SEQ ID NO: 50).

Последовательность рандомизированного пептида A:

KEVPVDTCHLTMLLFRSVALKQHPE (SEQ ID NO: 51).

Последовательность рандомизированного пептида В: SAECKGRHGTPPGKLMICKGL (SEQ ID NO: 22).

Название ADPIF дано ряду пептидов, происходящих из  $\alpha$ -изоформы PKC, которые являются производными пептида PATAD и содержат две специфические мутации.

Последовательность сшитого пептида ADPIF: VECTTREKEVLASLDKAAFLTQLH S (SEQ ID NO: 32), где R и S несут сшивку, предпочтительно это 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин, соответственно.

Сшитые и рандомизированные пептиды приобретали у фирмы CPC, USA, с чистотой 95%.

Все пептиды сначала растворяли в DMSO, а затем разбавляли в стерильном физрастворе до концентрации 10 нг/мкл. Смешивали по 2,5 мкл каждого пептида (сшитого или рандомизированного), а затем вводили непосредственно в подкожную жировую ткань каждой мыши.

#### Режим дозирования пептидов

Контрольным мышам вводили либо рандомизированные контроли (Scramble), либо носитель (0,9% раствор NaCl) (забрюшинная жировая клетчатка/подкожное введение: одна инъекция в D0) и проводили указанные тесты. Обработанным мышам вводили смесь двух сшитых пептидов PATAD, а со сшитым пептидом ADPIF следовали той же процедуре, что и с пептидами PATAD (забрюшинная жировая клетчатка/подкожное введение: одна инъекция в D0) и проводили указанные тесты. Во второй серии экспериментов ADPIF вводили в подкожную жировую ткань в забрюшинной области 1 раз в неделю в дозе 25 мкг на мышь в течение 3 недель, а через 1 неделю после последней инъекции мышей забивали. Мышей забивали, брали образцы тканей и выделяли плазму и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего тестирования.

#### Выделение РНК, синтез кДНК, к-ПЦР и Taqman

Получали тотальную РНК из различных тканей и клеток с помощью набора RiboPure™ (Ambion, кат. № AM1924), а затем обрабатывали ДНКазой TURBO™ DNA-free (Ambion, кат. № AM1907). Определяли целостность РНК методом гель-электрофореза и концентрацию РНК на фотометре Eppendorf Biophotometer Plus с лотковой ячейкой Hellma® Tray Cell (Hellma, кат. № 105.810-uvs). Проводили обратную транскрипцию 1 мкг тотальной РНК в кДНК с помощью набора для синтеза кДНК Script™ фирмы BioRad (BioRad, кат. № 170-8891). Проводили амплификацию методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени на установке BioRad CFX96™ Real Time System, используя смесь iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, кат. № 170-8886) и

наборы праймеров, оптимизированных для исследуемых мишеней для ПЦР в реальном времени на основе SYBR Green. Проводили анализ Taqman с определением конкретных генов с помощью смеси Taqman® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, кат. № 4444557). Рассчитывали нормализованный уровень экспрессии целевых генов методом сравнительного порога цикла ( $C_t$ ) путем нормирования  $C_t$  целевой мРНК по значениям для GAPDH с помощью программы CFX Manager версии 1.5 и проверяли с помощью программы Lin-Reg (Ruijter et al., 2009). Все пары праймеров приобретали либо у BioRad, либо у Quantitect.

Характеристики праймеров приведены в нижеследующей таблице.

Название гена	Название праймера	Последовательность	SEQ ID NO:	Размер фрагмента
Fatp1	Mu_Slc27a1-RT-ex3F	TGCTTTGGTTTCTGGGACTT	37	156 п.н.
	Mu_Slc27a1-RT-ex4R	GCTCTAGCCGAACACGAATC	38	
Fatp2	Mu_Slc27a2-RT-ex4F	TGGACAAAGTAGACGGAGTGTC	39	165 п.н.
	Mu_Slc27a2-RT-ex5R	TAGCAAGGCCTGTCCCATAC	40	
Fatp3	Mu_Slc27a3-RT-ex9F	TGAGAACTTGCCACCGTATG	41	171 п.н.
	Mu_Slc27a3-RT-ex10R	GGCAGGTAGGCCCTATATC	42	
Fatp4	Mu_Slc27a4-RT-ex2F	GTTTCATCCGGGTCTTCATC	43	184 п.н.
	Mu_Slc27a4-RT-ex3R	GTGTCTGTGCCCTCGAAAAT	44	
Fatp5	Mu_Slc27a5-RT-ex4F	AAGTTCTCTGCCTCCCGATT	45	191 п.н.
	Mu_Slc27a5-RT-ex5R	CAAAGCGTTGCTGGAAGTTT	46	
Fatp6	Mu_Slc27a6-RT-ex1F	TCGATTCCTCCTACACTGC	47	204 п.н.
	Mu_Slc27a6-RT-ex2R	TTGGTGGTACTGGCTCATCA	48	

Праймеры фирмы Quantitect: для Srebfl: QT00167055, для Acc: QT01554441, для Fasn: QT00149240.

#### Окрашивание срезов печени с помощью AdipoRed

Выделяли печень и быстро промывали в буфере PBS (pH 7,4). После взвешивания высушенной печени для определения соотношения массы печени к массе тела помещали срезы образцов печени в 4% параформальдегид (в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2) на 15 мин, промывали в PBS и инкубировали с красителем AdipoRed (1/25; Lonza, Швейцария) и 30 мкМ DAPI (Aldrich, США) в течение 15 мин. После 3 промывок PBS размещали образцы на предметных стеклах и получали снимки с помощью микроскопа Zeiss.

#### Иммунофлуоресцентные эксперименты

Для экспериментов по иммунофлуоресценции свежие образцы печени и почек заключали в компаунд с оптимальной температурой нарезания (Optimal Cutting Temperature Compound: OCT™, кат. № 4583, Tissue-Tek® OCT™, Sakura® Finetek,

Torrance, California, США) и делали криосрезы в 7 мкм с помощью криостата Leica CM1950. Криосрезы промывали 1 раз PBS и фиксировали в 4% растворе формальдегида в течение 15 мин (кат. № F555-4L, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, США), а затем пермеабелизовали в 0,02% SDS-PBS в течение 30 сек. Блокировали 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS. Первичные антитела разводили в блокирующем растворе и инкубировали в течение ночи, а указанные вторичные антитела разводили в PBS на 30 мин. Проводили контрастное окрашивание ядер с помощью Hoechst (кат. № D1306, Invitrogen, Carlsbad, California, США). Затем на предметные стекла помещали заливочную среду Vectashield® (кат. № H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, California, США). Получали снимки с помощью микроскопа Zeiss Imager.Z2 и анализировали их с помощью встроенной программы Zeiss AxioVision или Zeiss ZEN 2012 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Германия).

Использовали антитело Ab6586 против коллагена IV от Abcam и антитело GTX 105085 против LOXL2 от GeneTex.

Для электронной микроскопии срезов печени погружали образцы в глутаральдегид (2,5%) и параформальдегид (2,5%) в какодилатном буфере (0,1 М, pH 7,4). Образцы подвергали постфиксации в 1% тетроксиде осмия, дегидратировали через набор спиртов (50, 70, 90 и 100%) и пропиленоксид по 30 мин и заключали в Epon 812. Делали полутонкие срезы в 2 мкм на ультрамикротоме (Leica Ultracut UCT) и ультратонкие срезы в 70 нм, контрастировали с помощью уранилацетата и цитрата свинца и исследовали при 70 кВ с помощью электронного микроскопа Morgagni 268D. Получали цифровые снимки с помощью камеры Mega View III (Soft Imaging System).

#### Биохимический анализ

##### Определение AST и ALT в плазме методом ELISA

Использовали образцы плазмы от указанных мышей для определения содержания в плазме AST (аспартатаминотрансферазы) либо ASL (аланинаминотрансферазы), двух надежных индикаторов повреждения печени, которые измеряли с помощью коммерческих наборов для ELISA. Эти параметры определяли по методике производителя:

– SEB214Mu (96 тестов): набор для твердофазного иммуноферментного анализа на аспартатаминотрансферазу (AST), Cloud Clone Corp.

– SEA207Mu (96 тестов): набор для твердофазного иммуноферментного анализа на аланинаминотрансферазу (AST), Cloud Clone Corp.

Для измерения LOXL2 и GLP-1 по методикам производителя использовали два коммерчески доступных набора:

– набор для твердофазного иммуноферментного анализа подобного лизилоксидазе

белка-2 (LOXL2), Mus musculus, SEF552Mu, Cloud Clone Corp.

– набор RayBio для иммуноферментного анализа GLP-1 человека/мыши/крысы, EIA-GLP1, RayBiotech.

Для измерений в экстрактах печени использовали тот же набор для LOXL2, а для FABP4 использовали коммерческий набор для ELISA на связывающий жирные кислоты белок-4 адипоцитов (FABP4), SEB693Mu, Cloud Clone Corp.

Для липидного состава в различных тканях и плазме все образцы подвергали флэш-заморозке во время отбора проб, сразу же после забоя, и отправляли в Центр липидомии в Дижоне (Plateforme de Lipidomique-Bourgogne, INSERM UMR866/Labex LipSTIC).

### **Пример 13. Исследование эффективности пептида ADPIF in vivo на модели СТАМ неалкогольного стеатогепатита**

#### **Материалы и методы**

##### Исследуемые вещества

Пептид представлял собой пептид ADPIF, как описано выше. Дозирующий раствор готовили в соответствии с инструкциями по рецептуре.

##### Индукция NASH

NASH индуцировали у 12 самцов мышей путем однократной подкожной инъекции 200 мкг стрептозотоцина (STZ, Sigma-Aldrich, США) в растворе через 2 дня после рождения, а через 4 недели давали корм с высоким содержанием жира (HFD, 57% ккал жира, кат. № HFD32, CLEA Japan, Inc., Япония).

##### Способ введения препарата

Пептид вводили подкожно в жировую ткань в объеме 100 мкл на мышшь.

##### Доза при обработке

Пептид вводили в дозе 25 мкг на мышшь один раз в неделю.

##### Животные

Мышей C57BL/6 (самок с 14-дневной беременностью) получали от Japan SLC, Inc. (Япония). Всех животных, использовавшихся в исследовании, содержали и ухаживали за ними в соответствии с Директивами Японского фармакологического общества по использованию животных.

Животных содержали в SPF-помещении в условиях контролируемой температуры ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), влажности ( $45 \pm 10\%$ ), освещения (12-часовой цикл искусственного освещения и темноты; освещение с 8:00 до 20:00) и воздухообмена. В экспериментальной комнате поддерживали высокое давление, чтобы предотвратить загрязнение объекта.

Животных содержали в клетках из TPX (CLEA Japan), максимум по 3 мыши на клетку. Для подстилки использовали стерилизованный Paper-Clean (Japan SLC) и сменяли

его раз в неделю.

Стерилизованный корм HFD давали *ad libitum*, подавая в металлическую крышку на верхней части клетки. Чистую воду давали *ad libitum* из бутылки с водой, снабженной резиновой пробкой и пробкой для соски. Бутылки с водой меняли раз в неделю, очищали и стерилизовали в автоклаве и использовали повторно.

Мышей идентифицировали по ушным биркам. Каждая клетка была маркирована определенным идентификационным кодом.

#### Биохимические измерения в плазме

Для биохимии плазмы брали кровь не натощак в полипропиленовые пробирки с антикоагулянтом (Novo-Heparin, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Япония) и центрифугировали при  $1000 \times g$  15 мин при  $4^{\circ}C$ . Собирали супернатанты и хранили при  $-80^{\circ}C$  до использования. Уровень ALT в плазме измеряли с помощью FUJI DRI-CHEM 7000 (Fujifilm, Япония).

#### Измерение содержания триглицеридов в печени

Общие экстракты липидов печени получали методом Фолча (Folch J. et al., J. Biol. Chem. 1957, 226:497). Образцы печени гомогенизировали в смеси хлороформ-метанол (2:1, об./об.) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. После промывки смесью хлороформ-метанол-вода (8:4:3, об./об./об.) экстракты упаривали досуха и растворяли в изопропанол. Содержание триглицеридов в печени измеряли с помощью Е-теста на триглицериды (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Япония).

#### Гистологические анализы

Для окрашивания гематоксилином (HE) делали срезы залитых парафином блоков ткани печени, фиксировали в растворе Буэна и окрашивали HE по Лилли-Майер (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Япония) и раствором эозина (Wako Pure Chemical Industries). Рассчитывали показатель активности NAFLD (NAS) в соответствии с критериями Клейнера (Kleiner DE et al., Hepatology, 2005, 41: 1313).

Для визуализации отложений коллагена проводили окрашивание фиксированных по Буэну срезов печени с помощью раствора Sirius Red (Вальдек, Германия). Для количественного анализа области фиброза получали светлопольные снимки окрашенных Sirius Red срезов вокруг центральной вены с помощью цифровой камеры (DFC295; Leica, Германия) при 200-кратном увеличении и измеряли положительные участки по 5 полей на срез с помощью программы ImageJ (National Institute of Health, США).

#### Получение образцов

Для образцов плазмы собирали оставшуюся плазму и хранили при  $-80^{\circ}C$  для дальнейшего анализа.

Для образцов печени отбирали левую боковую долю и разрезали на 6 частей. Два куска левой боковой доли, левые и правые медиальные доли и хвостовую долю быстро замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа. Другие 2 куска левой боковой доли фиксировали в растворе Буэна, а затем заливали парафином. Образцы хранили при комнатной температуре для гистологии. Оставшиеся куски левой боковой доли заливали компаундом OCT и быстро замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа.

#### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента на GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., USA). Значения  $p < 0,05$  считались статистически значимыми. Когда односторонний критерий Стьюдента давал значения  $p < 0,1$ , предполагалась тенденция или склонность. Результаты выражали в виде среднего значения  $\pm$  SD (стандартное отклонение).

#### **План экспериментов и обработка**

##### Экспериментальные группы

##### Группа 1. Пептид ADPIF

Шести мышам с NASH вводили подкожно в жировую ткань носитель с добавлением пептида ADPIF в дозе 25 мкг на мышь один раз в неделю от 4-недельного до 9-недельного возраста.

##### Группа 2. Носитель

Шести мышам с NASH вводили подкожно в жировую ткань носитель [DMSO в физрастворе] в объеме 100 мкл на мышь один раз в неделю от 4-недельного до 9-недельного возраста.

В нижеследующей таблице приведены схемы обработки.

Группа	Кол-во мышей	Мыши	Исслед. вещество	Доза (мкг на мышь)	Объем (мкл на мышь)	Схема	Забой (нед.)
1	6	STAM	пептид	25	100	п/к, 1/нед., 4-9 нед.	9
2	6	STAM	носитель	–	100		9

#### Мониторинг и забой животных

Ежедневно отслеживали жизнеспособность, клинические признаки и поведение. Перед обработкой отмечали массу тела. Мышей наблюдали на наличие значительных клинических признаков токсичности, болезненности и смертности примерно 60 минут после каждого введения. Животных забивали в 9-недельном возрасте путем обескровливания посредством прямой пункции сердца под изофлурановой анестезией (Pfizer Inc.).

## Результаты

### Изменения массы тела и общее состояние

- Изменения массы тела

Средняя масса тела во всех группах постепенно возрастала в период обработки. Не было существенных отличий по средней массе тела в любые дни в период обработки между группой пептида ADPIF и группой носителя.

В период обработки во всех группах не было мертвых животных. В настоящем исследовании ни одно из животных не проявляло ухудшения общего состояния.

- Триглицериды в печени

В группе пептида ADPIF проявлялось значительное снижение содержания триглицеридов в печени по сравнению с группой носителя.

**Таблица 1. Биохимия**

Параметр (среднее $\pm$ SD)	Исследуемый пептид (n=6)	Носитель (n=6)
ALT в плазме (ед./л)	54 $\pm$ 9	55 $\pm$ 7
Триглицериды в печени (мг/г печени)	35,1 $\pm$ 17,8	75,5 $\pm$ 33,0

- Окрашивание Sirius Red и зона фиброза

Срезы печени из группы носителя проявляли повышенное отложение коллагена в периферической области долек печени. Группа пептида ADPIF проявляла значительное снижение площади зоны фиброза (зоны, положительной по Sirius Red) по сравнению с группой носителя.

**Таблица 2. Площадь зоны фиброза**

Параметр (среднее $\pm$ SD)	Исследуемый пептид (n=6)	Носитель (n=6)
Зона, положительная по Sirius Red (%)	0,62 $\pm$ 0,17	0,92 $\pm$ 0,23

## Заключение

При обработке пептидом ADPIF проявляется значительное снижение содержания триглицеридов в печени и площади зоны фиброза по сравнению с группой носителя. Пептид ADPIF значительно снижает площадь зоны фиброза по сравнению с группой носителя, что свидетельствует об антифиброзном действии в настоящем исследовании.

В заключение, пептид ADPIF проявляет антифиброзные эффекты на этой модели NASH.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Пептид, который:
  - способен снижать экспрессию FATP2 в жировой ткани;
  - не содержит одновременно одного метионина, одного пролина и одного аргинина;
  - принимает вторичную структуру, которая является спиралью, предпочтительно  $\alpha$ -спиралью;
  - содержит по меньшей мере 5 последовательных остатков киназного домена РКС (протеинкиназы С);
  - имеет длину от 5 до 60 аминокислот; ипоследовательность пептида может содержать от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций в пределах данной последовательности сегмента киназного домена РКС.
2. Пептид по п. 1, при этом пептид модифицирован посредством химической перекрестной сшивки.
3. Пептид по п. 1 или 2, при этом пептид имеет длину по меньшей мере в 5 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 25 аминокислот.
4. Пептид по любому из пп. 1-3, при этом пептид способен снижать или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ РКС.
5. Пептид по любому из пп. 1-4, при этом последовательность пептида включает одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXVHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их

комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; AFF; PDY; XDY; PEI (SEQ ID NO: 5); XEI (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

6. Пептид по любому из пп. 1-4, при этом последовательность пептида включает одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7); EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

7. Пептид по любому из пп. 1-4, при этом последовательность пептида содержит, в основном состоит или состоит из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

a) VECTXVEKXVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 20), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

b) VECTMVEKRVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 21), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

c) VECTXVEKRVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 22), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций;

d) VECTMVEKXVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 23), где X означает любую

аминокислоту, кроме М, Р и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций; и

е) пептид содержит последовательность любого сегмента из по меньшей мере от 5 до 25 последовательных остатков любой из последовательностей а)–d).

8. Пептид по любому из пп. 1-7, при этом последовательность пептида включает одну из следующих последовательностей:

VECTMXEKRVLAX (SEQ ID NO: 24)

VECTXXEKRVLAX (SEQ ID NO: 25)

VECTMXEKXVLAX (SEQ ID NO: 26)

VECTXXEKXVLAX (SEQ ID NO: 27)

VECTXXEKXVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 28)

VECTMXEKRVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 29)

VECTXXEKRVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 30)

VECTMXEKXVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 31)

где выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые остатки **X** несут сшивки и представляют собой производные аминокислот, подходящих для сшивания;

причем X означает любую аминокислоту, кроме М, Р и R,

при этом, последовательность необязательно содержит от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций.

9. Пептид по любому из пп. 5-8, при этом X означает аминокислоту, благоприятствующую вторичной структуре  $\alpha$ -спирали, либо аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из А, D, N, С, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, или же аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из А, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

10. Пептид по любому из пп. 1-7, при этом данная РКС выбрана из группы, состоящей из альфа-РКС ( $\alpha$ РКС), бета-РКС ( $\beta$ РКС), включая  $\beta_1$ -РКС и  $\beta_2$ -РКС, дельта-РКС, тета-РКС, эта-РКС и эпсилон-РКС.

11. Пептид по п. 10, при этом данная РКС представлена  $\alpha$ РКС по SEQ ID NO: 1.

12. Пептид по любому из пп. 1-11, при этом последовательность пептида включает:

VECTTREKEVLASLDKAAFLTQLHS (SEQ ID NO: 32),

где **R** и **S** несут сшивку;

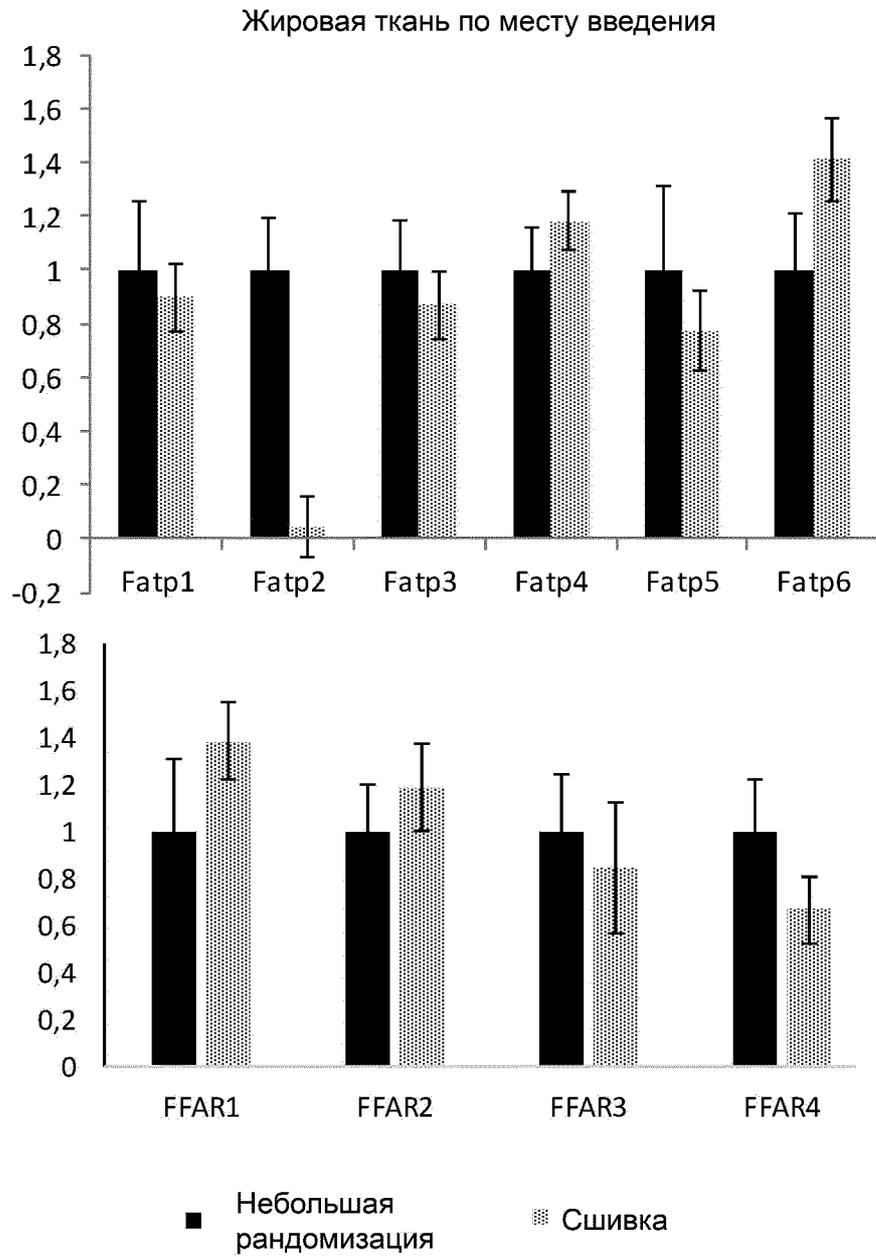
причем пептид необязательно также содержит от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот из числа замен, делеций, вставок и их комбинаций.

13. Пептид по п. 12, содержащий 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-12.

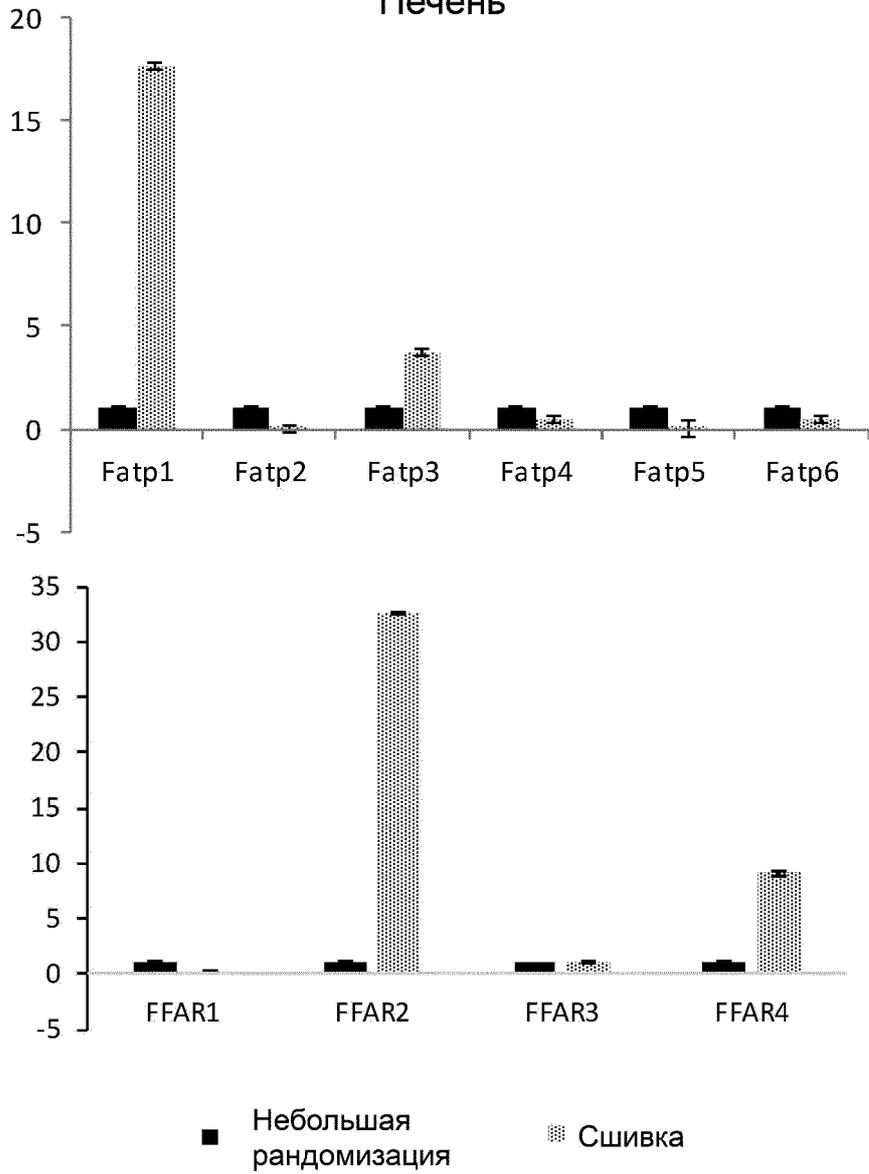
15. Пептид по любому из пп. 1-13 или фармацевтическая композиция по п. 14 для применения при лечении или профилактике заболевания, выбранного из группы, состоящей из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного ожирения печени (NAFL), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени (ожирения печени), воспаления печени, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и фиброза.

16. Пептид или фармацевтическая композиция для применения по п. 15, при этом фиброз представляет собой фиброз печени, включая цирроз, фиброз почек, фиброз сердца, включая фиброз предсердий, фиброз эндомиокарда и застарелый инфаркт миокарда, фиброз легких, включая муковисцидоз и индуцированный облучением фиброз легких, фиброз сосудов типа фиброза артерий, фиброз головного мозга, миелофиброз, артрофиброз, фиброз кишечника, фиброз брюшины, забрюшинный фиброз или кожный фиброз.



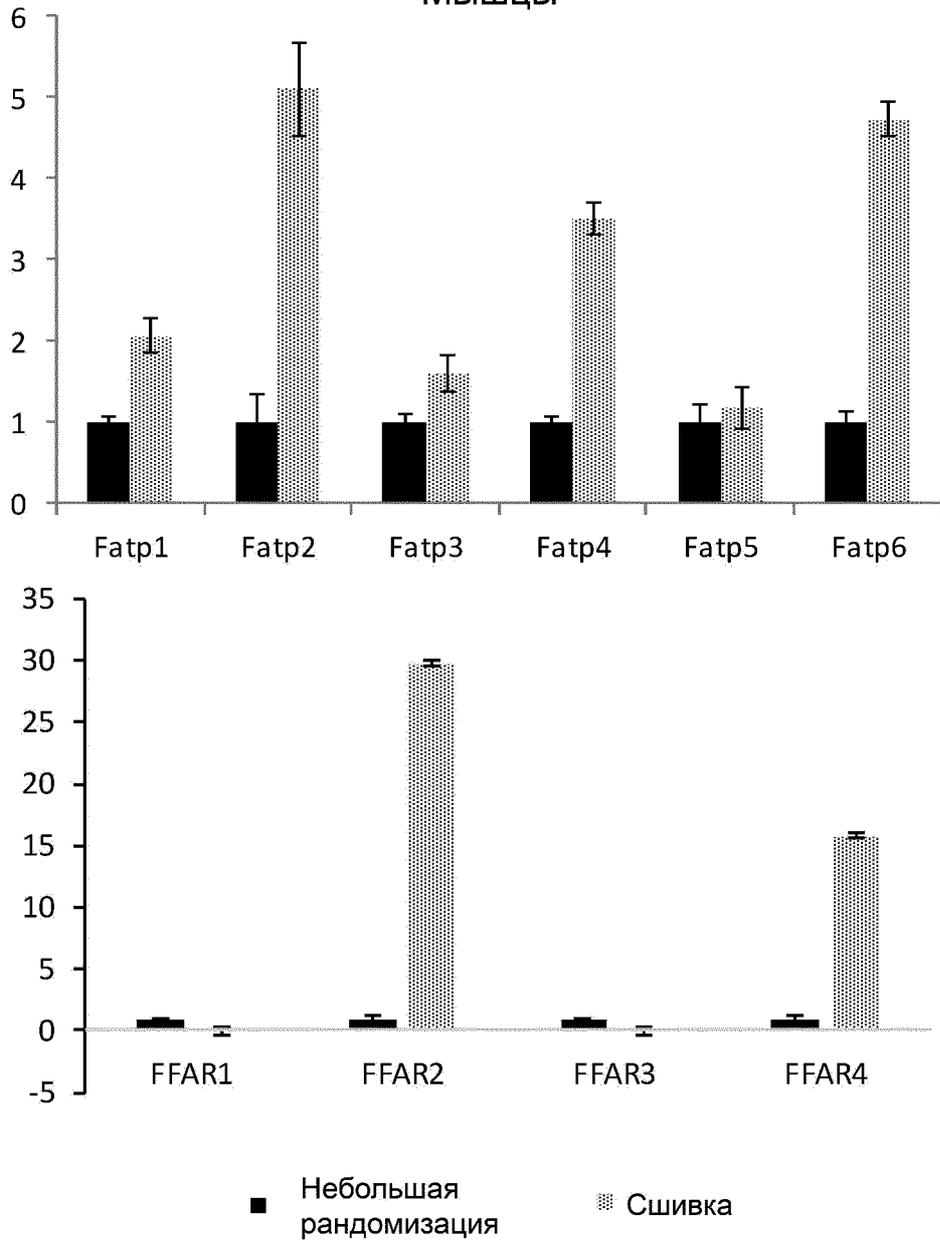
Фиг. 1А

Печень

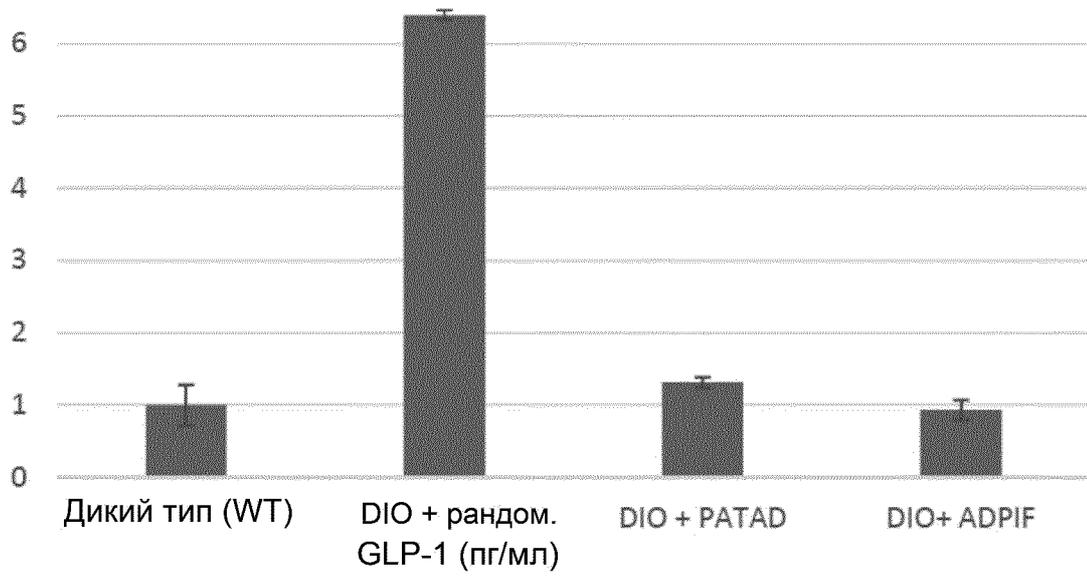


Фиг. 1В

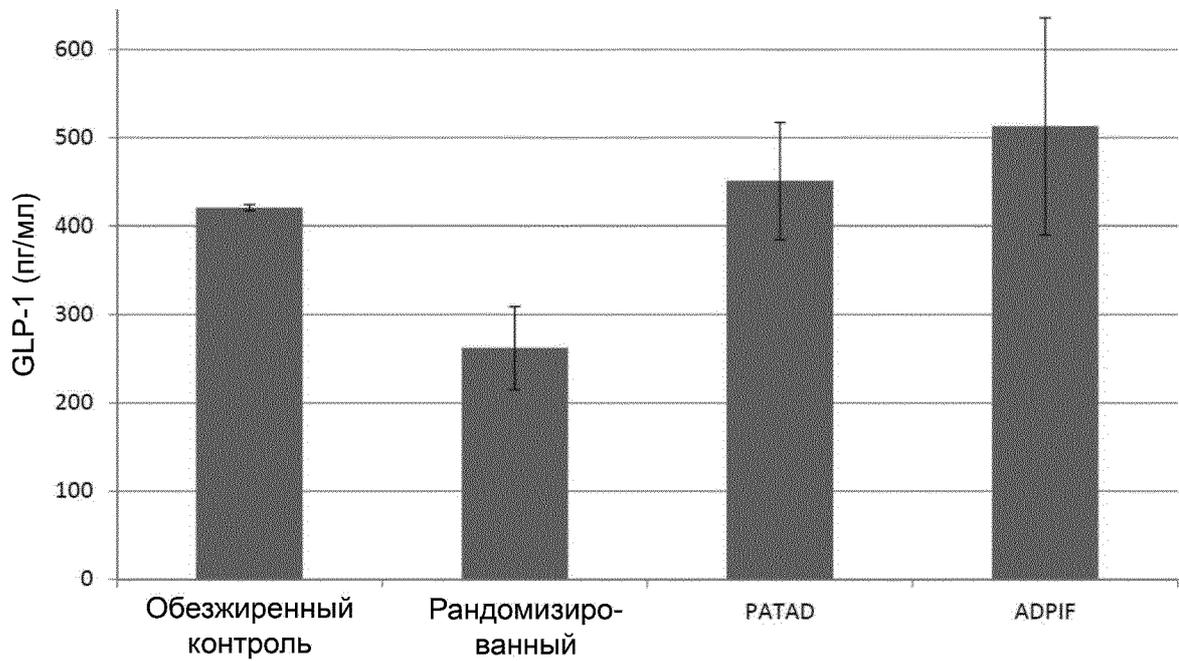
Мышцы



Фиг. 1С

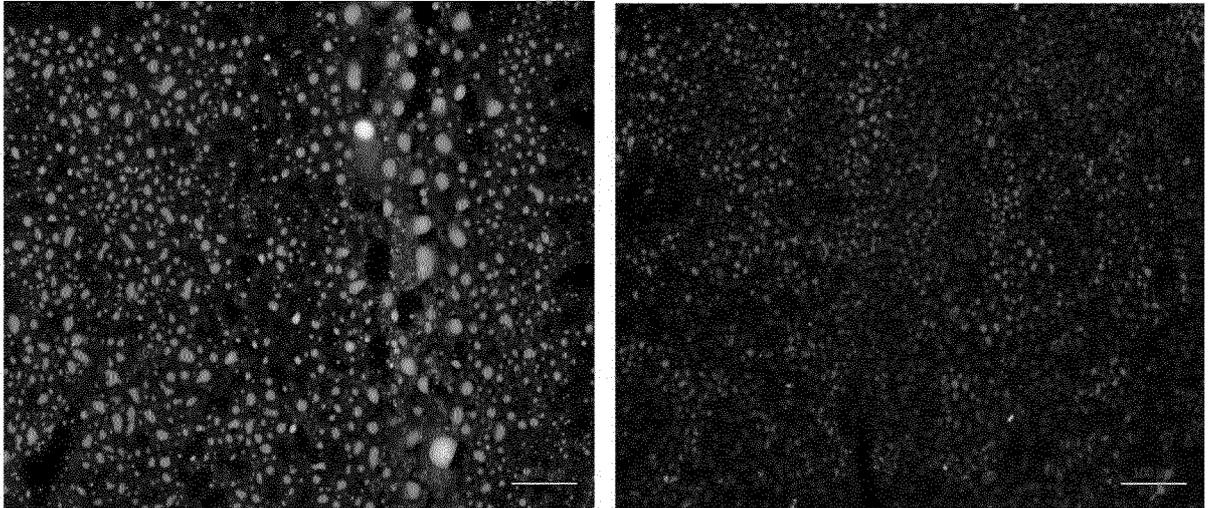


Фиг. 2А - FATP2



Фиг. 2В - GLP-1

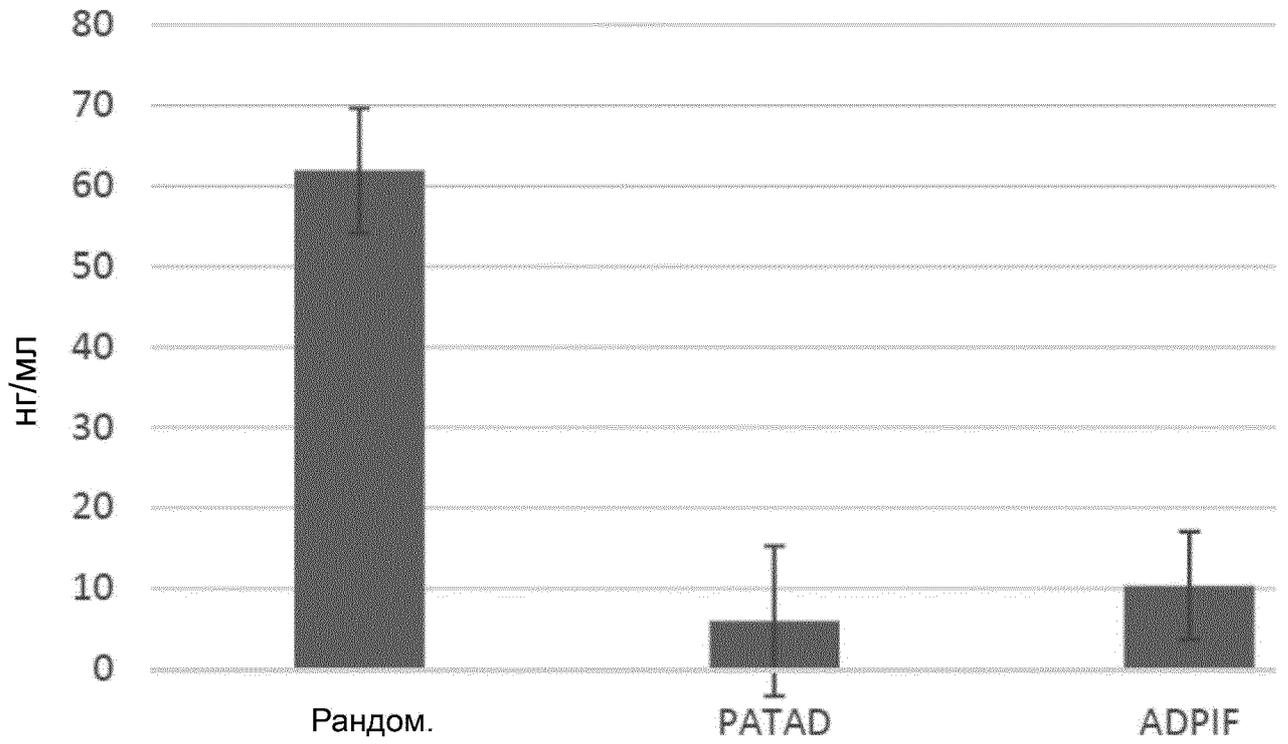
Окрашивание AdipoRed



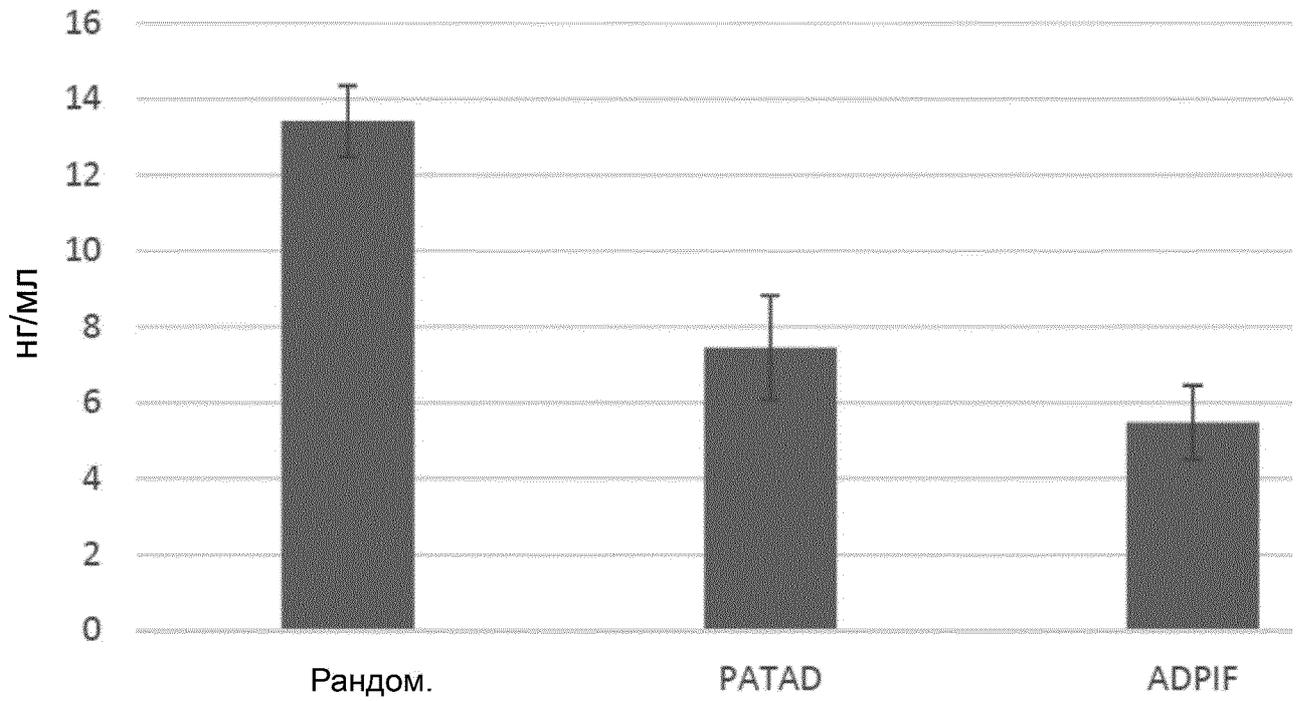
Фиг. 3А



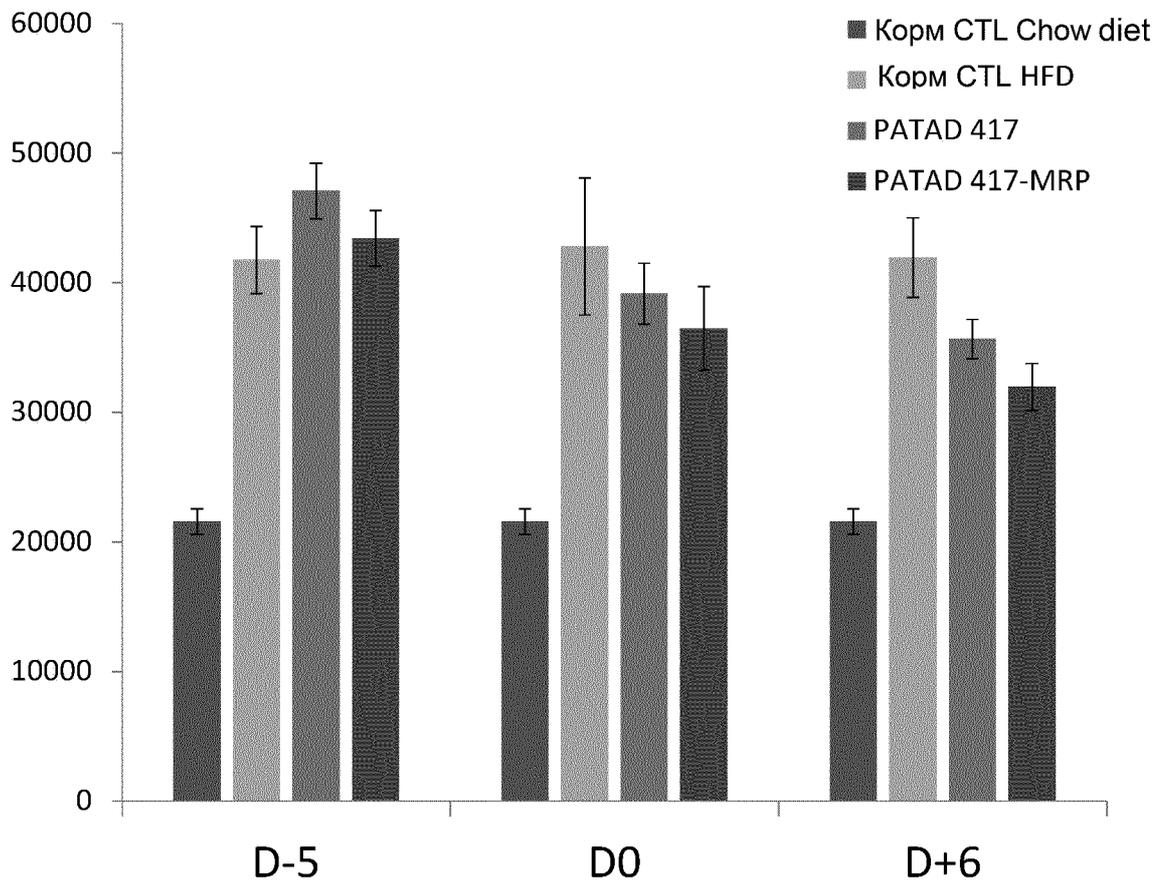
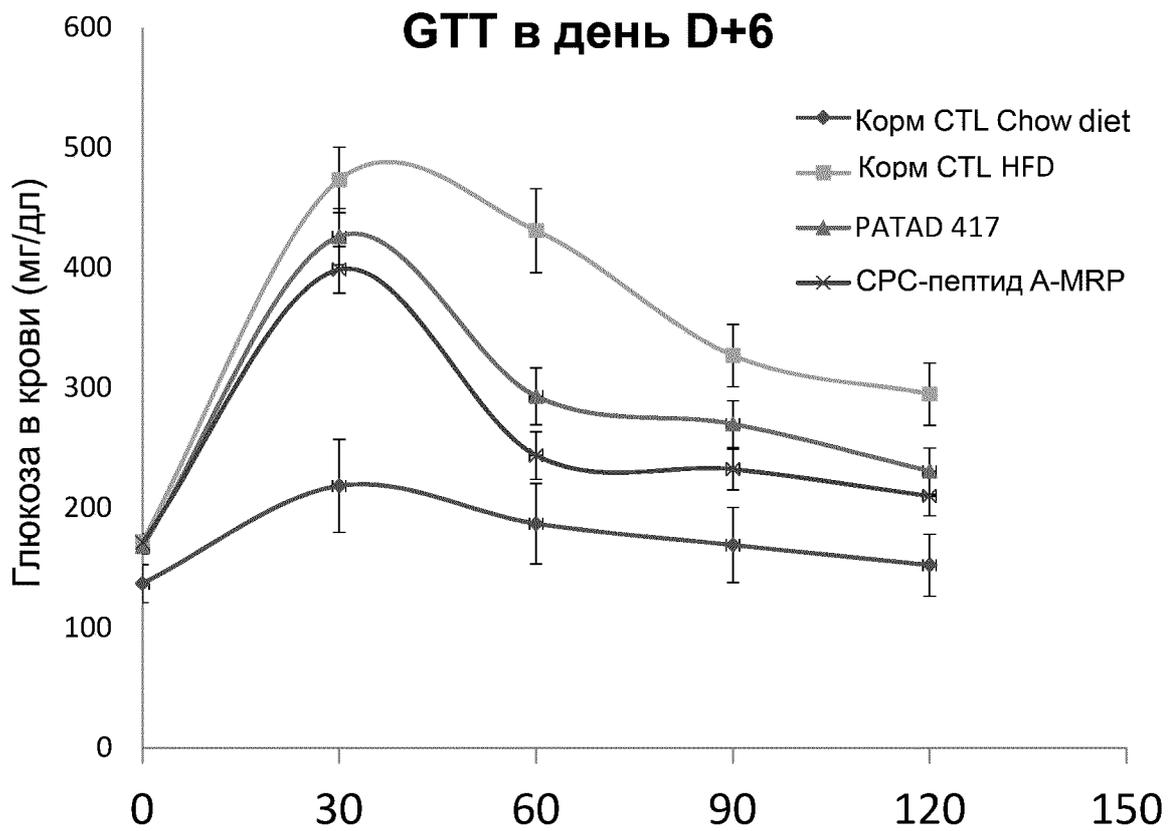
Фиг. 3В

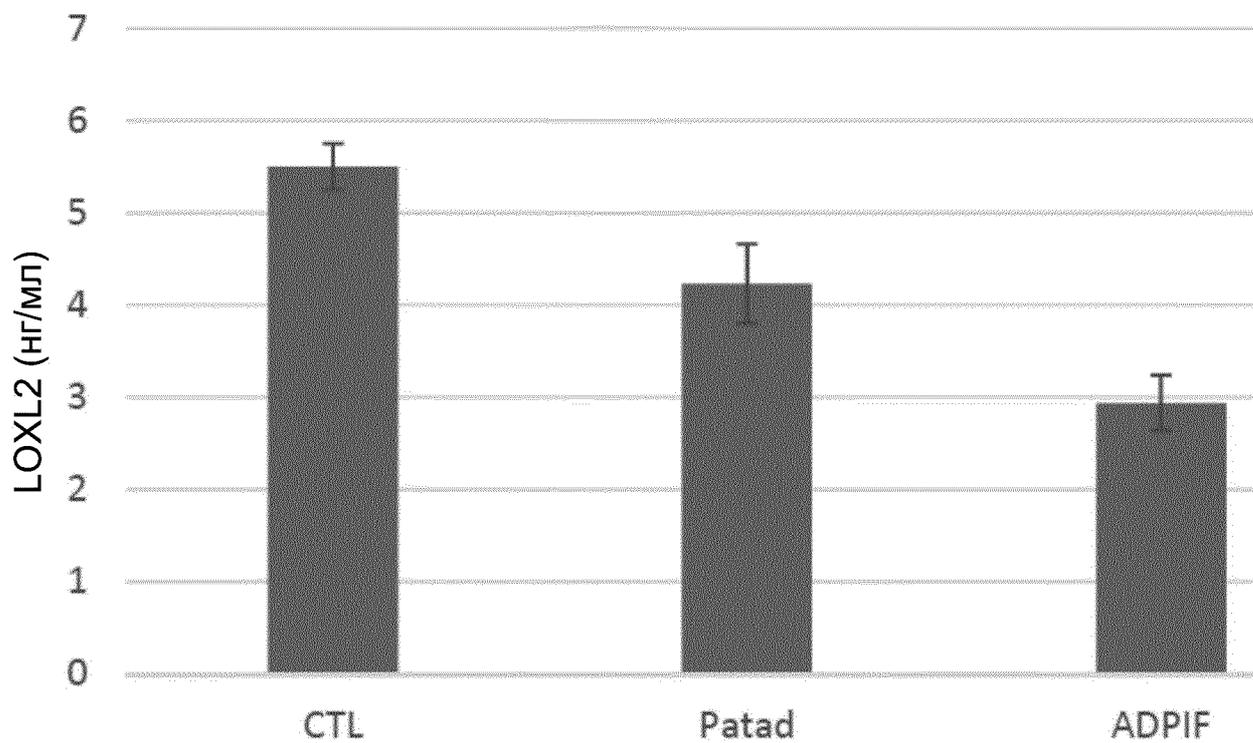


ФИГ. 3С - AST ALT

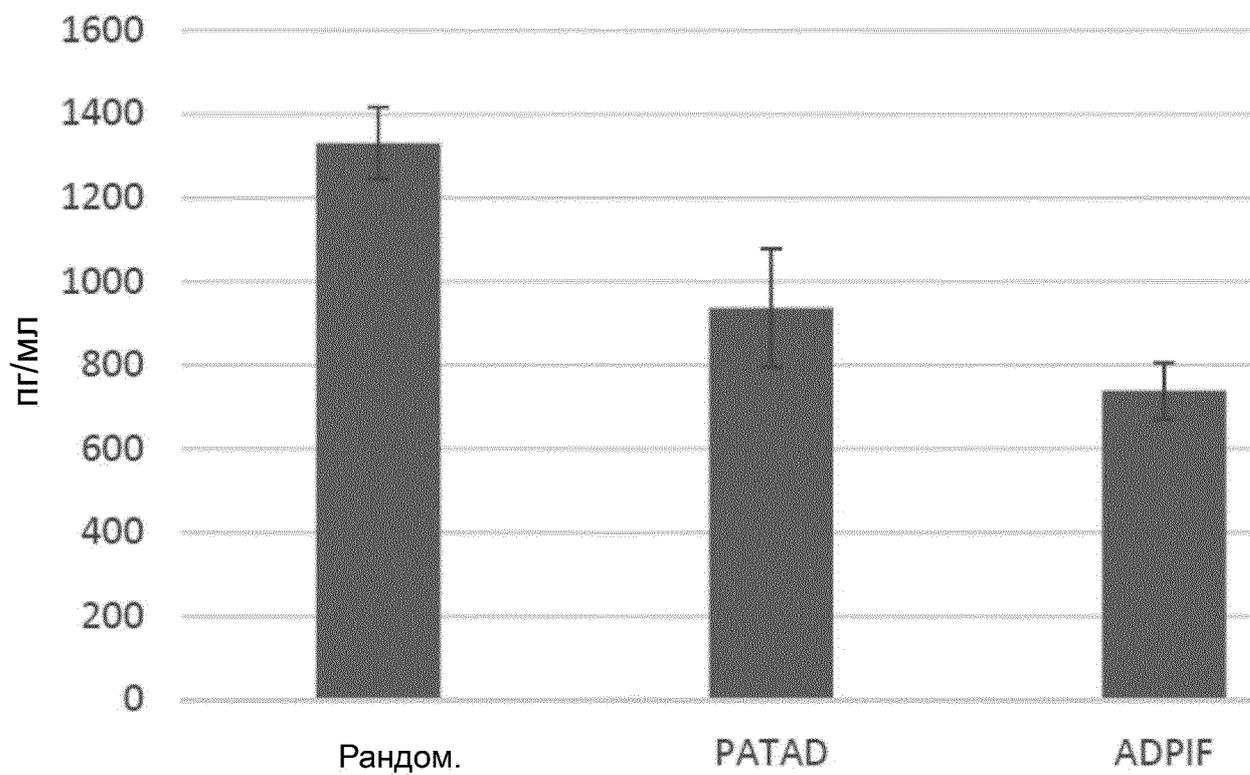


ФИГ. 3D -ALT

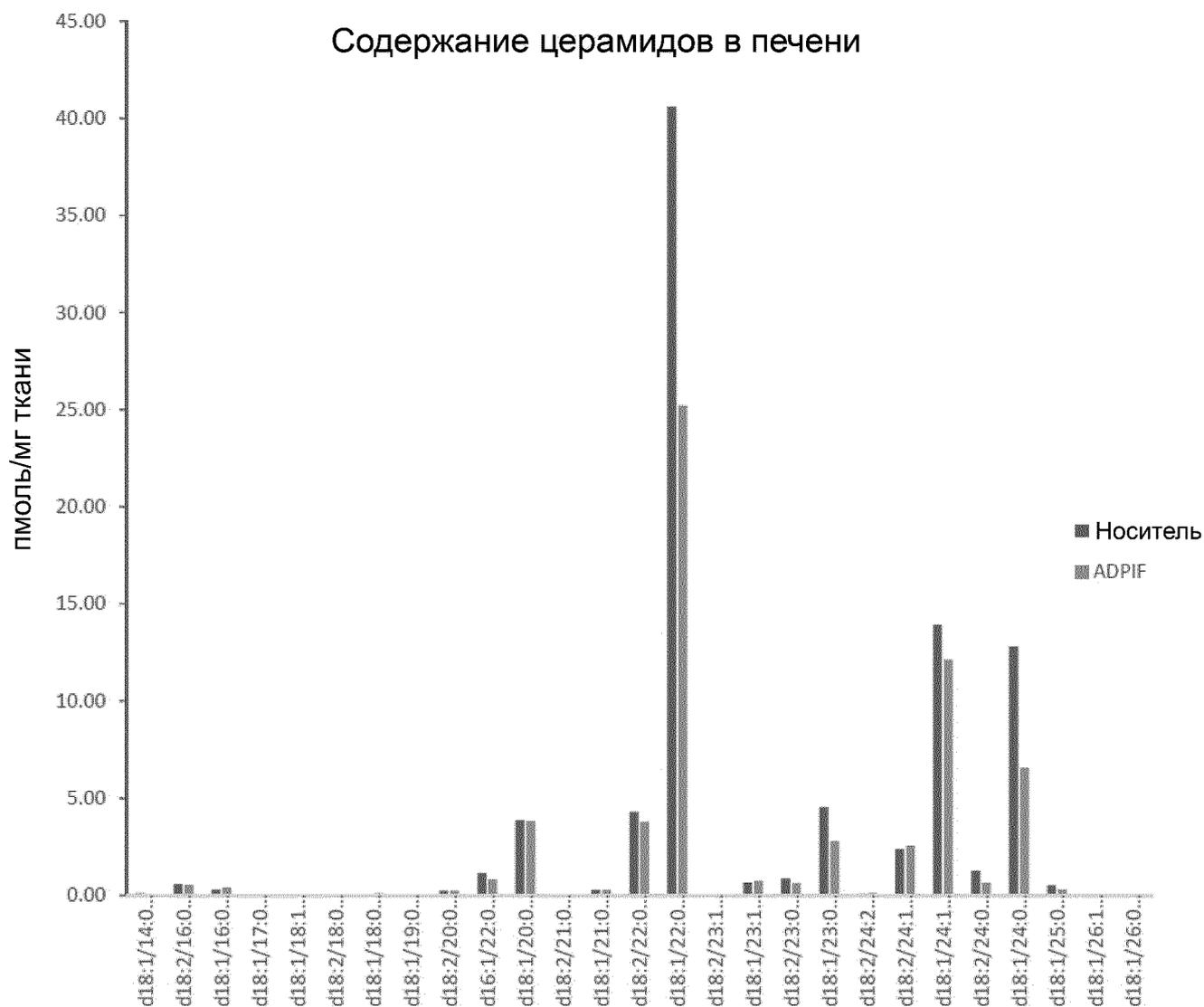




Фиг. 5А – LOXL2



Фиг. 5В – Fabp4

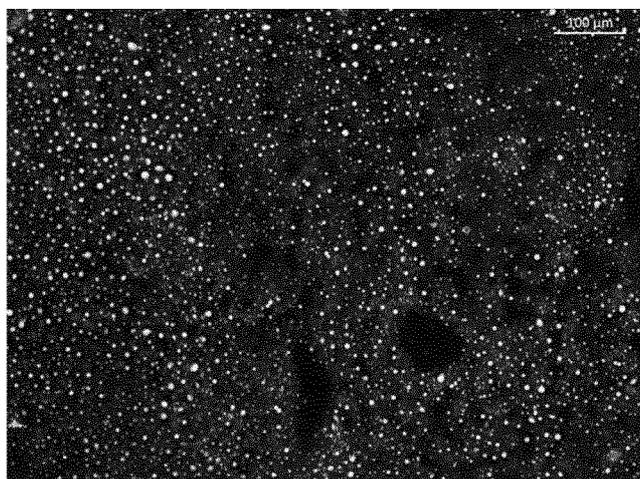


Фиг. 6

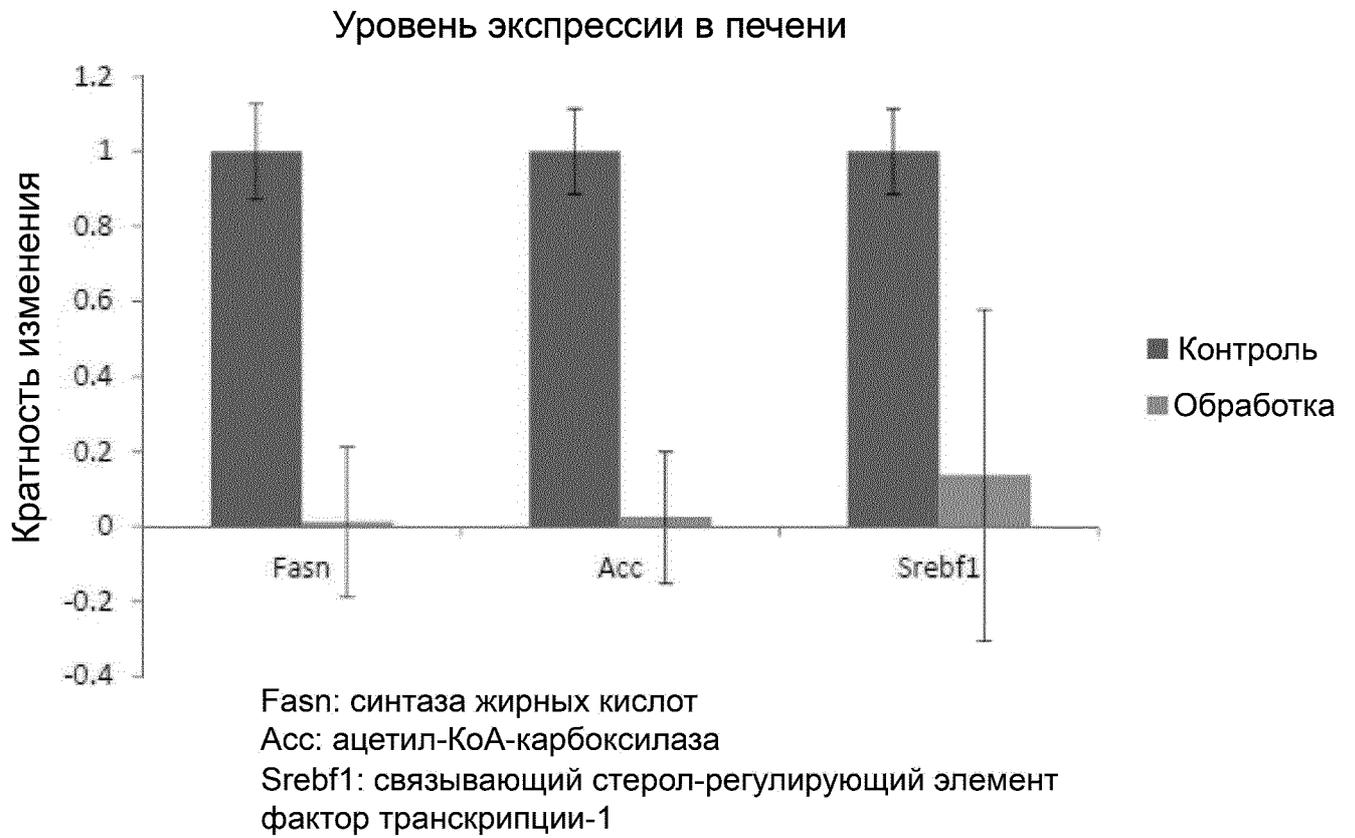
Обработка DIO + носитель



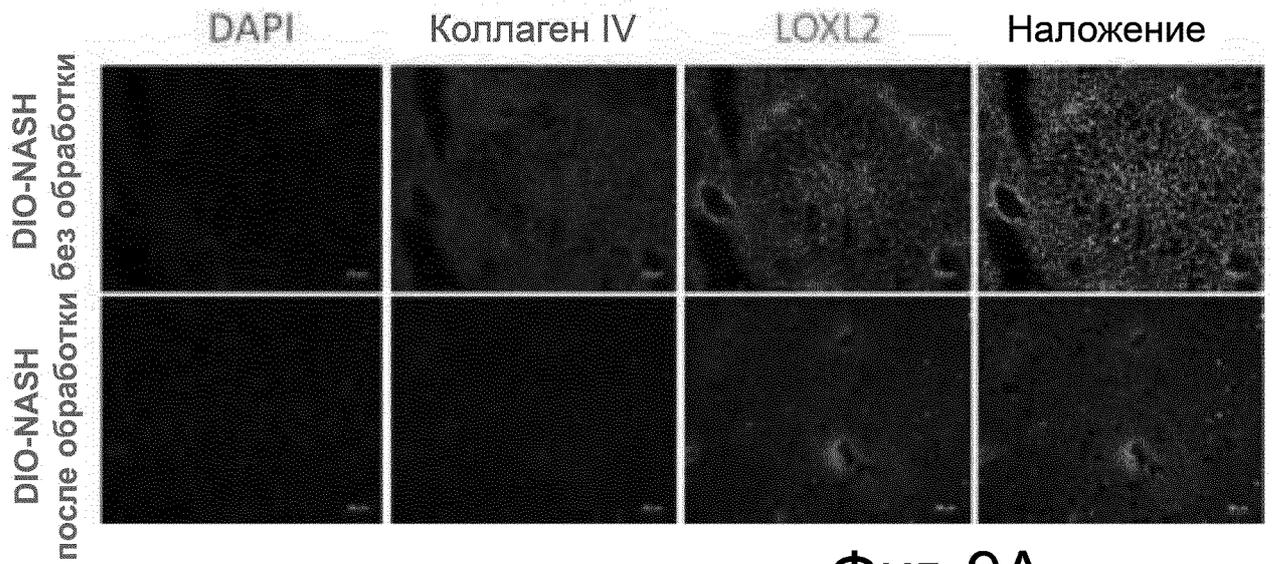
Обработка DIO + ADPIF



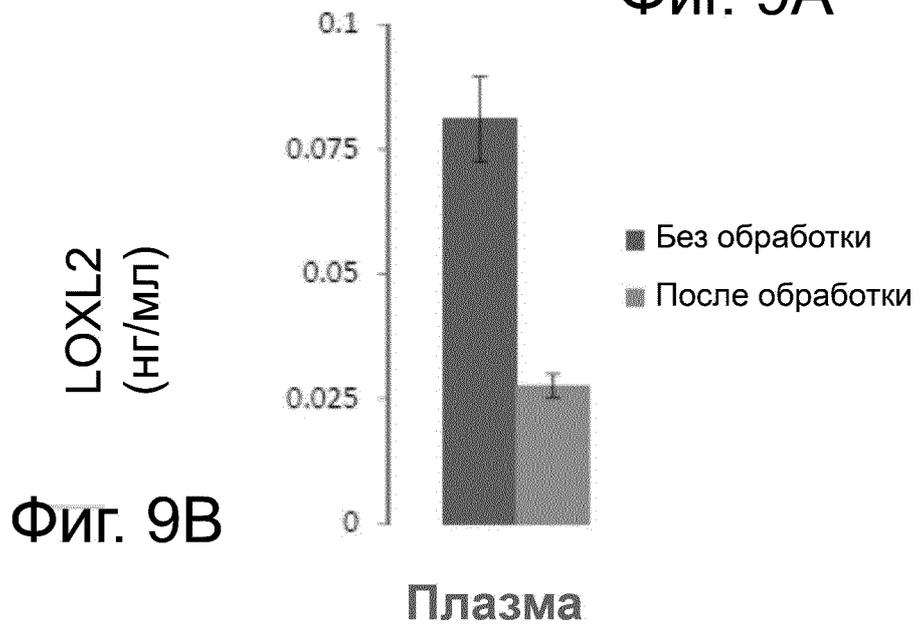
Фиг. 7



Фиг. 8



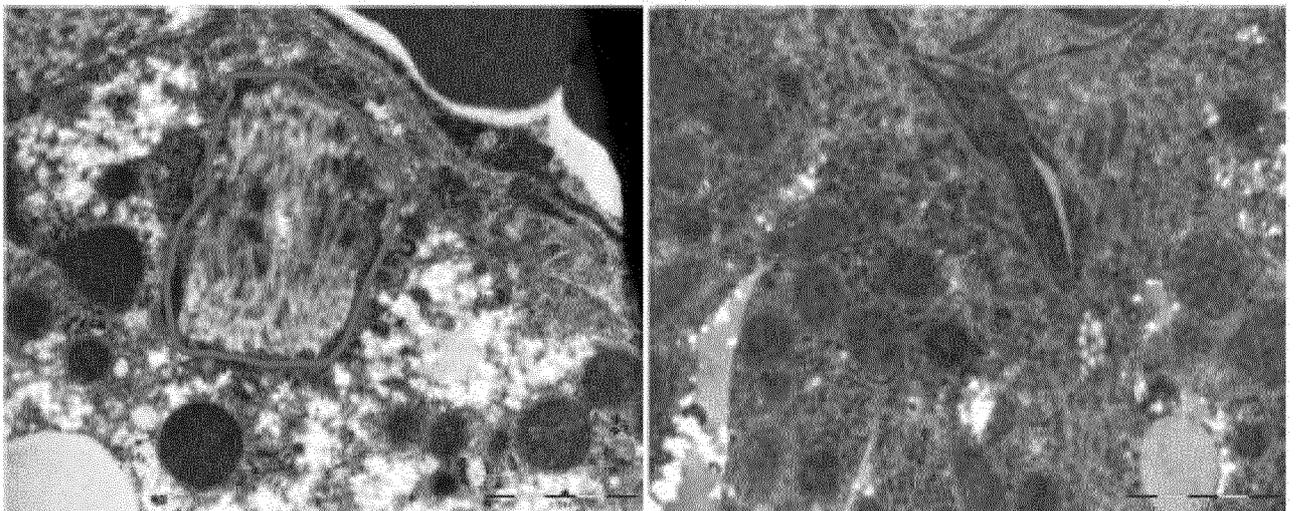
Фиг. 9А



Фиг. 9В

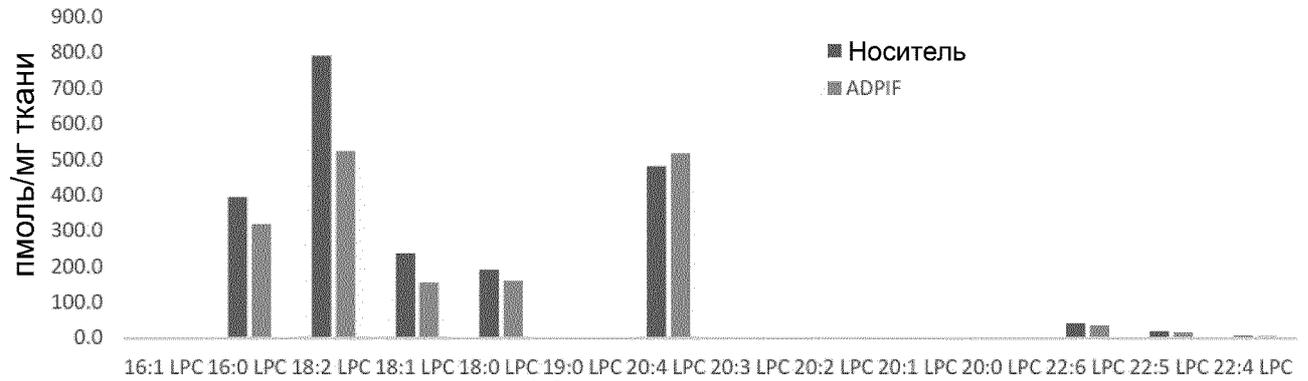
DIO-NASH без обработки

DIO-NASH после обработки

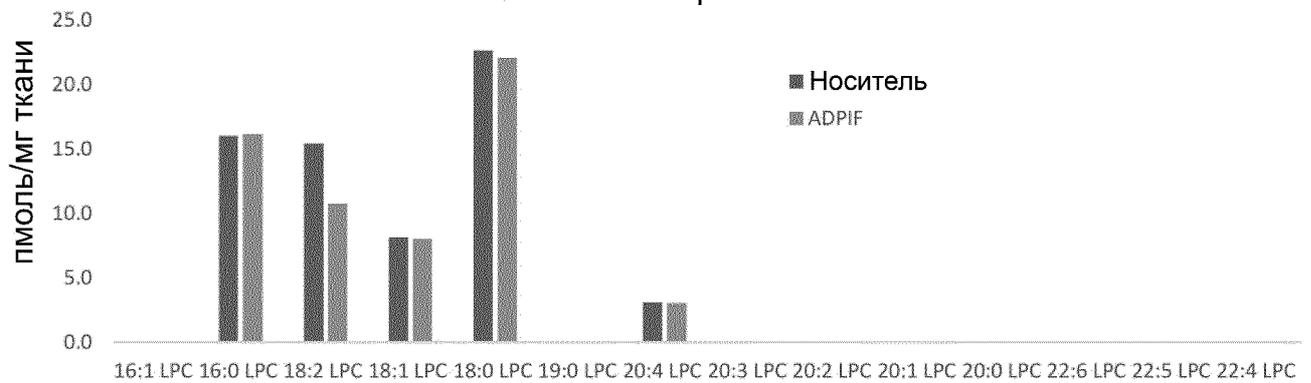


Фиг. 9С

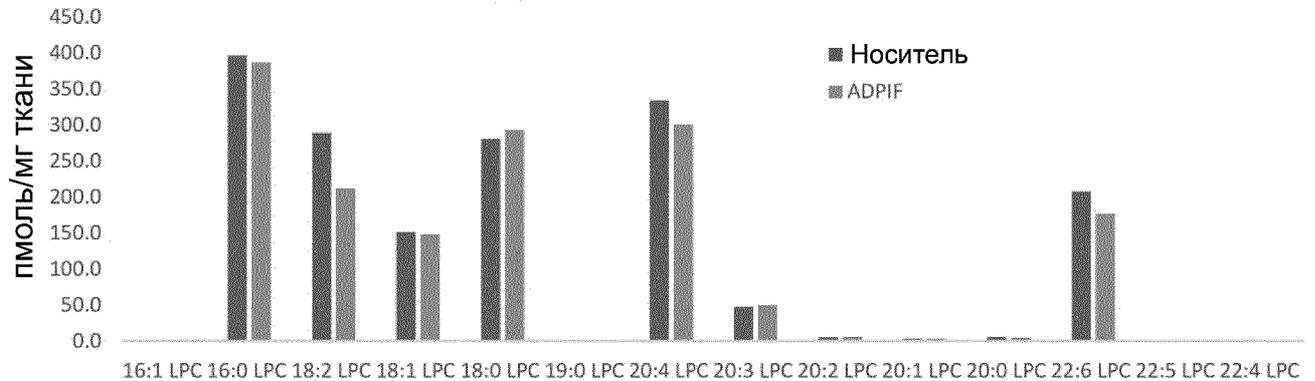
Фиг. 10А - Поджелудочная железа



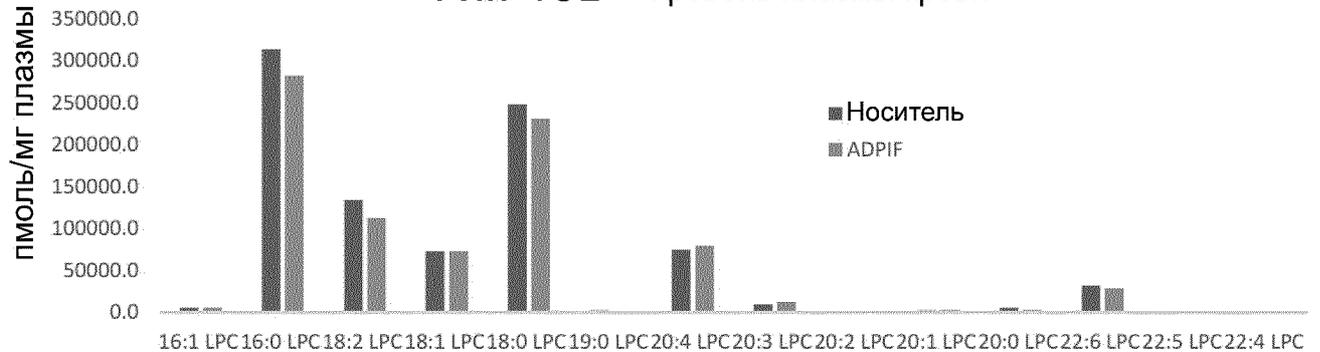
Фиг. 10В - Жировая ткань



Фиг. 10С - Печень



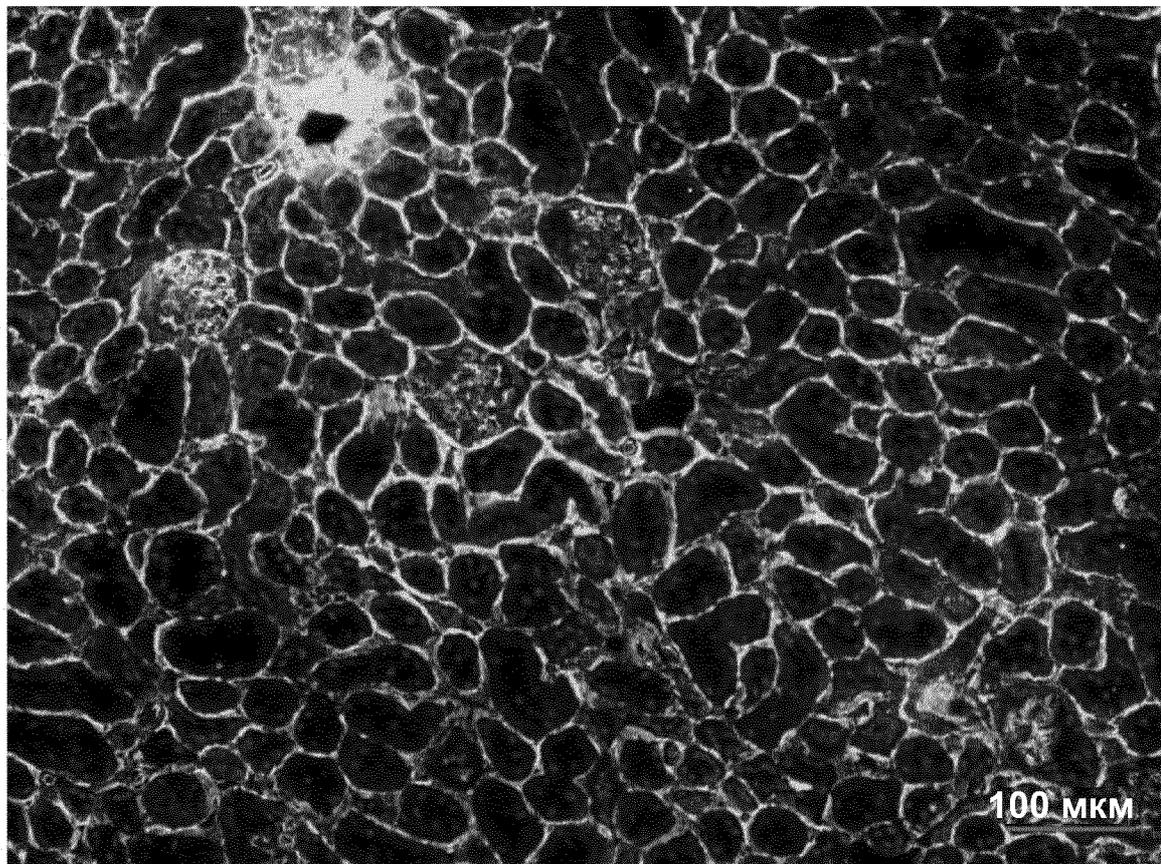
Фиг. 10D - Уровень плазмы крови



13/13

# Фиг. 11

DIO + носитель



DIO + ADPIF

