

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042132**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.01.18**

(21) Номер заявки  
**201992304**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.02.14**

(51) Int. Cl. **C07K 7/06** (2006.01)  
**A23L 33/18** (2016.01)  
**A61K 8/64** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)

(54) **ПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ ЦИТОПРОТЕКТОРНЫМ ЭФФЕКТОМ ПРОТИВ  
ДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ ВЕЩЕСТВ, И ЕГО  
ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **10-2017-0040514**

(32) **2017.03.30**

(33) **KR**

(43) **2020.02.25**

(86) **PCT/KR2018/001953**

(87) **WO 2018/182172 2018.10.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**КАРЕДЖЕН КО., ЛТД. (KR)**

(72) Изобретатель:  
**Чунг Йонг Жи, Ким Эюн Ми, Ли  
Эюн-Джи (KR)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) NAKAMURA, CHIKASHI ET AL., "Dioxin-binding Pentapeptide for Use in a High-sensitivity on-bead Detection Assay", *Analytical Chemistry*, 2005, vol. 77, no. 23, pages 7750-7757, See pages 7750 and 7756-7757

PANDINI, ALESSANDRO ET AL., "Detection of the TCDD Binding-fingerprint within the Ah Receptor Ligand Binding Domain by Structurally Driven Mutagenesis and Functional Analysis", *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 25, pages 5972-5983, See pages 5972 and 5979-5982

KR-A-1020060035432

US-A1-20080038838

JP-A-2003231697

(57) Предложен пептид с цитопротекторным эффектом против загрязняющих окружающую среду веществ и его применение. Пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, напрямую связывается с 2,3,7,8-тетрахлордибензо-п-диоксином (далее называемым ТХДД), известным как наиболее токсичное соединение в классе диоксинов, предупреждая проникновение через кожу и механизм активации AhR ТХДД и полициклическими ароматическими углеводородами, содержащимися в мелкой пыли. Такой прямой цитопротекторный эффект против действия загрязняющих окружающую среду веществ отличается от ранее существующих способов, которые направлены на не прямое блокирование возможности контакта с этими веществами или на снижение токсичности за счет усиления барьерной функции.

**B1**

**042132**

**042132  
B1**

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к пептиду с цитопротекторным эффектом против загрязняющих окружающую среду веществ и к его применению.

### **Уровень техники**

Загрязняющие окружающую среду вещества называются так называемыми "эндокринными разрушителями" и включают в себя такие типы веществ, как хлорорганические соединения, такие как диоксины, пестициды, фталаты, бензопирены, различные фенолы (от пентафенолов до нонилфенолов), бисфенол А, тяжелые металлы, димеры и тримеры стирола и т.п. Эти соединения являются очень стабильными химически и сохраняются в окружающей среде в течение длительного времени, тем самым имея возможность попасть в организм человека через пищевую цепь вследствие высокой степени биоаккумуляции.

Из этих соединений диоксинами обычно называют хлорированные углеводородные соединения, имеющие сходную химическую структуру, а именно полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД) и полихлорированные дибензофураны (ПХДФ), и существует 75 различных типов изомеров ПХДД и 135 различных типов изомеров ПХДФ в зависимости от числа замещенных атомов хлора.

Диоксины выделяются или образуются при сжигании отходов, в процессе отбеливания бумаги или целлюлозы, при производстве пластмасс, при производстве хлорорганических пестицидов и в аналогичных процессах. Поскольку при комнатной температуре диоксины представляют собой бесцветные кристаллические твердые вещества, термохимически стабильные и легко растворимые в жирах, при попадании в живые организмы они накапливаются в жировой ткани. Их воздействие на организм человека может включать нарушение репродуктивной функции, невынашивание беременности, аномальное развитие плода, изменения гормональных регуляторных функций, развитие диабета, аномалии в иммунной системе, повреждение иммунной системы, потенциальную канцерогенность и т.п.

Мелкая пыль состоит из диоксида серы, оксидов азота, свинца, озона, оксида углерода и т.п. Мелкая пыль с диаметром частиц 10 мкм или ниже называется крупнодисперсными аэрозольными частицами (PM10). Ультратонкая пыль с диаметром частиц 2,5 мкм или ниже называется мелкодисперсными аэрозольными частицами (PM2,5). Источники мелкой пыли могут быть природными, например почвенная пыль, морская соль или пыльца растений, или могут быть антропогенными, например дым, образующийся при сжигании ископаемого топлива, выхлопные газы автомобилей, пыль со строительных площадок, порошковое сырье и вспомогательные материалы на заводах, а также дым от мусоросжигательных заводов.

Такая мелкая пыль, имеющая очень маленький диаметр, составляющий примерно от 1/7 до 1/5 толщины человеческого волоса, глубоко проникает в тело человека при прохождении через полость носа, рта и бронхи, избегая фильтрации. Попадающая в организм человека мелкая пыль, которая включает вышеописанные токсичные вещества, может вызывать воспалительные реакции таких органов, как дыхательные пути, легкие, сердечно-сосудистая система и мозг, вызывая тем самым респираторные заболевания и сердечно-сосудистые заболевания. В октябре 2013 г. Международное агентство по исследованию рака при Всемирной организации здравоохранения отнесло мелкую пыль к канцерогенам 1-й группы.

Известно, что как диоксины, так и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), содержащиеся в мелкой пыли, проникают в клетки и активируют рецептор арильных углеводородов (AhR). Через механизм активации AhR в клетках происходит увеличение количества активных форм кислорода (ROS), а гетеродимерный комплекс AhR и ARNT связывается с элементом ксенобиотического ответа (XRE), усиливающим экспрессию различных медиаторов воспаления, ассоциированного с микрофталмией фактора транскрипции, (MITF), который представляет собой связанный с синтезом меланина фактор транскрипции, и матриксной металлопротеиназы (ММП), которая представляет собой фермент, способствующий образованию морщин, вследствие чего на коже возникают дерматит, пигментная гиперплазия (пятна и веснушки), морщины и аналогичные поражения.

В доступных ранее продуктах против действия загрязняющих соединений использовались вещества, которые предотвращают адсорбцию мелкой пыли на коже или укрепляют кожный барьер с помощью электрического заряда. Однако они обеспечивают только непрямой защитный эффект вместо прямого ингибирования механизмов, активируемых загрязняющими окружающую среду веществами, такими как диоксины или мелкая пыль. Исходные вещества или продукты, препятствующие неблагоприятному воздействию загрязняющих окружающую среду веществ при контакте с кожей, еще не разработаны.

### **Описание вариантов осуществления**

#### **Техническая проблема**

Соответственно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, напрямую связывается с 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксином (в дальнейшем указывается как ТХДД), известным как наиболее токсичное соединение из диоксинов, тем самым предупреждая его проникновение через кожу и механизм активации арилуглеводородного рецептора (AhR) ТХДД, и полициклическими ароматическими углеводородами, содержащимися в мелкой пыли.

Таким образом, целью настоящего изобретения является пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Еще одной целью настоящего изобретения является фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами, причем фармацевтическая композиция включает по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Еще одной целью настоящего изобретения является пищевая композиция для облегчения и/или ослабления заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами, причем пищевая композиция включает по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в качестве действующего ингредиента.

Еще одной целью настоящего изобретения является создание косметической композиции для улучшения состояния кожи, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в качестве действующего ингредиента.

Еще одной целью настоящего изобретения является способ предупреждения или лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами.

Еще одной целью настоящего изобретения является пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, для предупреждения или лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами.

### **Решение проблемы**

Настоящее изобретение относится к пептиду с цитопротекторным эффектом против загрязняющих окружающую среду веществ и к его применению. Было подтверждено, что пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, напрямую связывается с 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксином, известным как наиболее токсичное соединение из диоксинов, тем самым предупреждая его проникновение через кожу и механизм активации арилуглеводородных рецепторов (AhR) содержащимися в мелкой пыли ТХДД и полициклическими ароматическими углеводородами. Такой прямой цитопротекторный эффект против действия загрязняющих окружающую среду веществ отличается от ранее существующих способов, которые направлены на не прямое блокирование возможности контакта с этими веществами или на снижение токсичности за счет усиления барьерной функции.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

Аспект настоящего изобретения относится к пептиду, состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Пептид может представлять собой пептид с N-концевой и/или C-концевой модификацией, затрагивающей участок аминокислотной последовательности и повышающей его активность. Такая N-концевая и/или C-концевая модификация может значительно улучшить стабильность пептида по настоящему изобретению, например увеличить время полужизни введения пептида *in vivo*.

N-концевая модификация может быть получена путем присоединения защитной группы, выбранной из группы, состоящей из ацетильной группы, флуореонилметоксикарбонильной группы, формильной группы, пальмитоильной группы, миристильной группы, стеарильной группы и полиэтиленгликоля (ПЭГ) к N-концу пептида. Защитная группа действует для защиты пептида по настоящему изобретению от расщепляющего белка фермента в живом организме.

Модификация C-конца может быть получена путем связывания гидроксильной группы (-OH), аминогруппы (-NH<sub>2</sub>), азидной группы (-NHNH<sub>2</sub>) или т.п. с C-концом пептида, без ограничения указанными вариантами.

Согласно варианту осуществления пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, напрямую связывается с 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксином, тем самым предупреждая его проникновение через кожу и механизм активации AhR ТХДД, и полициклическими ароматическими углеводородами, содержащимися в мелкой пыли.

Полициклический ароматический углеводород при попадании в клетку связывается с AhR и перемещается в ядро, а затем образует комплекс с ядерным транслокатором AhR (ARNT), который связывается с чувствительным к диоксину элементом (DRE), индуцируя экспрессию зависимых генов. Зависимые гены включают CYP1A1 и различные воспалительные факторы. CYP1A1 участвует в метаболизме различных канцерогенных предшественников, таких как бензопирен, и образующиеся при этом метаболиты реагируют с ДНК, вызывая мутации. Кроме того, повышается экспрессия воспалительных факторов, таких как циклооксигеназа 2 (COX2), фактор некроза опухоли альфа (TNF-α) и интерлейкин-1 бета (IL-1β), что приводит к местной воспалительной реакции в области контакта и системному воспалению.

Эти результаты указывают на то, что пептид по настоящему изобретению обладает превосходными эффектами в отношении профилактики и/или лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции для профилак-

тики или лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Заболевания, вызванные диоксиноподобными веществами, являются очень сложными, и их примеры включают, но не ограничиваются ими, кожные заболевания, включая хлоракне, снижение количества сперматозоидов, рак яичка, рак простаты, гиперплазию эндометрия, рак молочной железы, гепатотоксичность, ослабленный иммунитет, гиперлипидемию, гипоспадию, крипторхизм, врожденные пороки развития, повреждение кровеносных сосудов, гепатоцеллюлярную карциному, гепатомегалию, аденофиброз, потерю веса, выпадение волос, отек полости рта, блефарему и язву слизистой желудка (Carter et al., Science, 188:738(1975); Fourth Annual Report on Carcinogens, NTP 85-002:170, 185(1985)).

Используемый в настоящем описании термин "диоксин", обычно используемый в средствах массовой информации, используется в качестве сокращения "2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксина" (далее именуемого ТХДД). Однако ТХДД является членом семейства полихлорированных дибензо-*p*-диоксинов (далее ПХДД), а ПХДД включает 75 различных типов родственных соединений с различным положением и числом атомов хлора. В отношении биологических объектов ТХДД известен как наиболее токсичный из ПХДД.

Между тем, в литературе опубликованы данные о других ароматических углеводородах, имеющих аналогичные биологические характеристики, что и у ТХДД, например о семействе полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ) и семействе полихлорированных бифенилов (ПХБ).

Таким образом, термин "диоксин", используемый в данном документе, относится ко всем соединениям, включенным в ПХДД, а термин "диоксиноподобные вещества" включает ПХДД, ПХДФ и ПХБ, описанные выше, и относится к веществам, обладающим такими же клеточными эффектами, что и ПХДД.

Было опубликовано, что диоксин как канцерогенное вещество вызывает серьезные заболевания, такие как нарушение репродуктивных процессов и процессов развития, нарушение иммунной системы и нарушение гормональной регуляции (Yang, J.H. et al., Carcinogenesis. 20:13-18(1999), Lee, Y.W. et al., Toxicol. Lett., 102-103:29-83(1998)).

Агентство по охране окружающей среды США (EPA) собрало статистические данные о неблагоприятном воздействии диоксинов и диоксиноподобных веществ на организм человека и опубликовало данные о том, что за последние 50 лет количество сперматозоидов у мужчин снизилось примерно на 50%, заболеваемость раком яичка увеличилась примерно в 3 раза, а раком простаты - в 2 раза. Кроме того, было подтверждено увеличение случаев возникновения гиперплазии эндометрия и рака молочной железы, вызванных диоксином и аналогичными соединениями, по сравнению с таковыми в прошлом.

Фармацевтическая композиция может включать фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выбранного из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Кроме того, фармацевтическая композиция может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой любое вещество, обычно используемое в фармацевтических препаратах, и его примеры включают, но не ограничиваются этим, лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, гумиарабик, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло. Подходящие фармацевтически приемлемые носители и препараты подробно описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (19<sup>th</sup> ed., 1995).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать в дополнение к ингредиентам, но не ограничиваясь этим, смазывающее вещество, смачивающий агент, подсластитель, ароматизатор, эмульгатор, суспензию и консервант.

Фармацевтическую композицию можно вводить перорально или парентерально, предпочтительно парентерально. При парентеральном введении можно использовать внутримышечную инъекцию, внутривенную инъекцию, подкожную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, местное введение, трансдермальное введение и т.п., без ограничения вышеуказанными способами.

Дозировка фармацевтической композиции может представлять собой количество (но не ограничивается этим) в диапазоне от 0,0001 до 1000 мкг, от 0,001 до 1000 мкг, от 0,01 до 1000 мкг, от 0,1 до 1000 мкг или от 1,0 до 1000 мкг в день, и может назначаться в различных вариантах в зависимости от таких факторов, как форма препарата, способ введения, возраст, вес, пол и заболевание пациента, питание, время введения, путь введения, скорость выведения и степень реакции.

Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде однодозовой или многодозовой лекарственной формы с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или вспомогательного вещества хорошо известным в данной области способом.

Состав может представлять собой раствор в масле или водной среде, суспензию, эмульсию, экстракт, порошок, гранулы, таблетку или капсулу и может дополнительно включать способствующее рас-

падаемости вещество или стабилизатор.

Другой аспект настоящего изобретения относится к пищевой композиции, противодействующей диоксиноподобным веществам, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в качестве действующего ингредиента.

Другой аспект настоящего изобретения относится к пищевой композиции для облегчения и/или ослабления заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в качестве действующего ингредиента.

Заболевания, вызываемые диоксиноподобными веществами, могут включать, но не ограничиваются ими, снижение количества сперматозоидов, рак яичка, рак простаты, гиперплазию эндометрия, рак молочной железы, гепатотоксичность, ослабление иммунитета, гиперлипидемию, гипоспадию, крипторхизм, врожденные пороки развития, повреждение кровеносных сосудов, гепатоцеллюлярную карциному, гепатомегалию, аденофиброз, потерю веса, выпадение волос, отек полости рта, блефарему и язву слизистой желудка.

Пищевой продукт может представлять собой различные пищевые продукты, напитки, пищевые добавки и т.п.

Количество пептида в качестве действующего ингредиента, содержащегося в пищевой композиции, конкретно не ограничено и может быть соответствующим образом подобрано в соответствии с типом пищевого продукта, его назначением и т.п., например, в диапазоне от 0,01 до 15 мас.% в расчете на общую массу пищевого продукта или в диапазоне от 0,02 до 10 г, предпочтительно от 0,3 до 1 г в расчете на 100 мл композиции функционального напитка.

Когда пищевой продукт представляет собой напиток, жидкие ингредиенты конкретно не ограничены при условии, что пептид содержится в качестве основного ингредиента в заданном соотношении. Кроме того, напиток может включать дополнительные ингредиенты, такие как различные ароматизаторы или натуральные углеводы.

Примеры природных углеводов включают обычные подсластители, например моносахариды, такие как глюкоза и фруктоза, дисахариды, такие как мальтоза и сахароза, и полисахариды, такие как декстрин и циклодекстрин, и сахарный спирт, такой как ксилит, сорбит и эритрит.

В дополнение к описанным выше веществам, в качестве ароматизатора могут быть эффективно использованы натуральные ароматизаторы (например, тауматин и экстракт стевии, например ребаудиозид А и глицирризин) и синтетические ароматизаторы (например, сахарин и аспартам). Количество природных углеводов может составлять от примерно 1 до примерно 20 г, предпочтительно от примерно 5 до примерно 12 г в расчете на 100 мл композиции по настоящему изобретению.

Пищевая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать питательные вещества, витамины, минералы, ароматизаторы, такие как синтетические ароматизаторы и натуральные ароматизаторы, красители и наполнители (сыр, шоколад и т.п.), пектиновую кислоту и ее соли, альгиновую кислоту и ее соли, органическую кислоту, защитные коллоидные загустители, регуляторы pH, стабилизаторы, консерванты, глицерин, спирт и газообразующие агенты, используемые в газированных напитках.

Пищевая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать фруктовую мякоть для приготовления натуральных фруктовых соков, напитков из фруктовых соков и напитков из овощей. Эти ингредиенты могут использоваться независимо или в комбинации. Количество добавок не важно, но может находиться в диапазоне от 0 до примерно 20 мас.ч. в расчете на 100 мас.ч. композиции по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к косметической композиции для улучшения состояния кожи, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Косметическая композиция может включать (а) косметически эффективное количество пептида по настоящему изобретению, описанное выше, и/или (b) косметически приемлемый носитель, не ограничиваясь ими.

Используемый в данном документе термин "косметически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для достижения эффекта композиции по настоящему изобретению в отношении улучшения состояния кожи.

Косметическая композиция может быть изготовлена в виде любой композиции, обычно используемой в данной области. Например, косметическая композиция может быть изготовлена в виде, но не ограничена этим, раствора, суспензии, эмульсии, пасты, геля, крема, лосьона, порошка, мыла, содержащего поверхностно-активное вещество средства для умывания, масла, порошкообразного тонального средства, эмульсионного тонального средства, воскового тонального средства и спрея. Более конкретно, косметическая композиция может быть изготовлена в виде смягчающего лосьона, питательного лосьона, питательного крема, массажного крема, эссенции, крема для глаз, очищающего крема, очищающей пены, очищающей воды, пакета, спрея или порошка.

Когда косметическая композиция по настоящему изобретению изготовлена в виде пасты, крема или геля, носителем может быть животное масло, растительное масло, воск, парафин, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоль, силикон, бентонит, диоксид кремния, тальк, оксид цинка и т.п.

Когда косметическая композиция по настоящему изобретению изготовлена в виде порошка или спрея, носителем может быть лактоза, тальк, диоксид кремния, гидроксид алюминия, силикат кальция или порошок полиамид. В частности, в спрее может дополнительно использоваться пропеллент, такой как хлорфторуглерод, пропан/бутан или диметилэфир.

Когда косметическая композиция по настоящему изобретению изготовлена в виде раствора или эмульсии, носитель может представлять собой растворитель, солюбилизатор или эмульгатор, такой как вода, этанол, изопропанол, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутилгликоль, масло, алифатический эфир глицерина, полиэтиленгликоль или эфир жирной кислоты и сорбита.

Когда косметическая композиция по настоящему изобретению изготовлена в виде суспензии, носитель может представлять собой жидкий разбавитель, такой как вода, этанол или пропиленгликоль, суспендирующий агент, такой как этоксилированный изостеариловый спирт, сложный эфир полиоксиэтиленсорбитола и сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар и трагакант.

Когда косметическая композиция по настоящему изобретению изготовлена в виде содержащего поверхностно-активное вещество средства для умывания, носителем может быть сульфат алифатического спирта, сульфат простого эфира алифатического спирта, сульфосукциновый сложный моноэфир, изотионат, производные имидазолина, метилтаурат, саркозинат, сульфат эфира амида жирной кислоты, алкиламидобетанин, алифатический спирт, глицерид жирной кислоты, диэтаноламид жирной кислоты, растительное масло, производные ланолина или сложный эфир этоксилированного глицерина и жирной кислоты.

Косметическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать, помимо пептида и носителя в качестве действующих ингредиентов, другие компоненты, обычно используемые в косметических композициях. Например, в композицию могут быть включены стандартные адъюванты, такие как антиоксидант, стабилизатор, солюбилизатор, витамины, пигмент и ароматизатор.

Используемый в настоящем документе термин "улучшение состояния кожи" в широком смысле относится к процессам лечения, устранения и облегчения поражений кожи, вызванных внутренним или внешним фактором, и эффекты улучшения, например, можно интерпретировать как наблюдаемый эффект облегчения или ослабления кожного воспаления, но не ограниченные этим.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу предупреждения лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами.

Способ может включать осуществление контакта фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, с субъектом.

Фармацевтическая композиция описана выше.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, для предупреждения или лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами.

Пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, описан выше.

Во всем описании термин "пептид" относится к линейной молекуле, состоящей из аминокислотных остатков, связанных пептидными связями. Пептид по настоящему изобретению может быть получен в соответствии с любыми известными способами химического синтеза, в частности методами твердофазного синтеза (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54 (1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2<sup>nd</sup> ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)) или методами жидкофазного синтеза (патент США № 5516891).

Используемый в настоящем документе термин "стабильность" относится не только к стабильности *in vivo*, но также к стабильности при хранении (например, к стабильности при хранении при комнатной температуре).

Во всем описании термин "фармацевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для достижения эффекта или действия пептида.

#### **Полезный эффект изобретения**

Настоящее изобретение относится к пептиду с цитопротекторным эффектом против загрязняющих окружающую среду веществ и к его применению. Было подтверждено, что пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, напрямую связывается с 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксином (далее называемым ТХДД), известным как наиболее токсичное соединение в классе диоксинов, тем самым предупреждая проникновение через кожу и активацию арилуглеводородного рецептора (AhR) содержащимися в мелкой пыли ТХДД и полициклическими ароматическими углеводородами. Такой прямой цитопротекторный эффект в отношении загрязняющих окружающую среду веществ



осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 6С представляет собой график, показывающий результаты теста на ядерную транслокации AhR для пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 7А представляет собой график, показывающий результаты ОТ-ПЦР на CYP1A1 и воспалительные молекулы при использовании пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 7В представляет собой график, показывающий результаты ОТ-ПЦР на CYP1A1 и воспалительные молекулы при использовании пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 7С представляет собой график, показывающий результаты ОТ-ПЦР на CYP1A1 и воспалительные молекулы при использовании пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

#### **Лучший вариант осуществления изобретения**

Настоящее изобретение относится к пептиду, состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Вариант осуществления изобретения.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на нижеследующие примеры. Однако эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия.

Пример изготовления.

Синтез пептидов из списка последовательностей.

70 г хлор-третилхлоридной смолы (смола СТС, Nova biochem, кат. № 01-64-0021) добавляли в реактор и туда добавляли 490 мл метилхлорида (МС) с последующим перемешиванием в течение 3 мин. Затем после удаления из него раствора добавляли 490 мл диметилформамида (DMF), смесь перемешивали в течение 3 мин и из нее удаляли растворитель. В реактор добавляли 700 мл раствора дихлорметана, а затем в него добавляли 200 ммоль Fmoc-Тур(tBu)-ОН (Bachem, Swiss) и 400 ммоль диизопропилэтиламина (DIEA). Смесь растворяли при перемешивании и выдерживали в течение 1 ч при перемешивании. После промывки полученного продукта метанолом и DIEA (2:1) его растворяли в дихлорметане (DCM) и выдерживали в течение 10 мин, а затем полученный продукт промывали избытком смеси DCM/DMF (1:1). Затем после удаления раствора к нему добавляли 490 мл DMF и смесь перемешивали в течение 3 мин, а затем из нее удаляли растворитель. В реактор добавляли 700 мл раствора для снятия защиты (20%-ный пиперидин в DMF) и перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем раствор удаляли. После повторного добавления того же количества раствора для снятия защиты и инкубации в течение 10 мин раствор удаляли и полученный продукт дважды промывали DMF, один раз МС и один раз DMF, каждый раз в течение 3 мин, чтобы получить Тур(tBu)-CTL смолу.

В новый реактор добавляли 700 мл раствора DMF и к нему добавляли 200 ммоль Fmoc-Arg(Pbf)-ОН (Bachem, Swiss), 200 ммоль НоVt и 200 ммоль НВTu и растворяли при перемешивании. В реактор двумя порциями добавляли 400 ммоль DIEA и смесь перемешивали в течение по меньшей мере 5 мин, чтобы полностью растворить все твердое вещество. Растворенную смесь аминокислот добавляли в реактор, включая смолу со снятой защитой, и выдерживали в течение 1 ч при перемешивании при комнатной температуре. После удаления реакционного раствора полученный продукт перемешивали с раствором DMF три раза, каждый раз в течение 5 мин, а затем из него удаляли раствор DMF. Отбирали небольшое количество реакционной смолы и степень прохождения реакции проверяли с помощью теста Кайзера (нингидринового теста). Реакцию снятия защиты проводили дважды одинаковым образом с использованием раствора для снятия защиты, таким образом получая смолу Arg(Pbf)-Тур(tBu)-CTL. Смолу в достаточной степени промывали DMF и МС и снова проверяли с помощью теста Кайзера с последующим тестом на связывание аминокислот, как описано выше. В соответствии с выбранной аминокислотной последовательностью цепные реакции проводили в следующем порядке: Fmoc-Gly-ОН, Fmoc-Gly-ОН, Fmoc-Gly-ОН, Fmoc-Trp-ОН и Fmoc-Lys(Вос)-ОН. После того как для удаления Fmoc-защитной группы продукт два раза обрабатывали раствором для снятия защиты, каждый раз в течение 10 мин, раствор для снятия защиты удаляли промывкой. Пептидильную смолу промывали DMF, МС и метанолом по три раза каждым растворителем и сушили в медленном токе азота, а затем полностью досушивали над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в вакууме. Затем добавляли 1900 мл отщепляющего раствора [81,5% трифторуксусной кислоты, 5,0% дистиллированной воды, 5,0% тиоанизола, 5,0% фенола, 2,5% этандитиола (EDT) и 1,0% триизопропилсилана (TIS)] и реакционную смесь оставляли при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании. Смолу отфильтровывали, промывали небольшим количеством раствора TFA и смешивали с маточным раствором. Холодный эфир добавляли к 2090 мл маточного раствора, чтобы получить осадок, смесь центрифугировали для сбора осадка, а затем дважды промывали холодным эфиром. После удаления маточного раствора полученный продукт сушили в атмосфере азота в достаточной степени, чтобы получить до очистки 70,8 г пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (выход: 97,0%). Молекулярная масса пептида, составляющая 822,9 (теоретическое значение: 822,9), была полу-

чена с помощью измерения молекулярной массы.

Пептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, синтезируют таким же образом, что и описанный выше способ.

Таблица 1

SEQ ID NO:	Последовательность	Анализируемое значение (масс-спектрометрия)	
		Полученное значение	Теоретическое
1	KWGGGRY	822,9	822,9
2	ILGRWCG	803,9	803,9
3	DVENTS	663,6	663,6

Пример 1. Анализ связывания *in vitro*.

Каждый из пептидов, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, смешанных с буфером для покрытия (20 мМ фосфат натрия, pH 9,6) в концентрации 1,8 мМ, вносили в лунки планшета для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем пептид промывали фосфатно-солевым буферным раствором с Tween-20 (PBST) и блокировали 3%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания PBST в каждую лунку добавляли 2 мкМ 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксина (далее называемого ТХДД) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем после промывания PBST добавляли антитела к ТХДД, конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), в соотношении антитело:PBST, равном 1:100, и полученную смесь инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем после промывания PBST измеряли эмиссию при 520 нм после возбуждения при 488 нм с использованием флуоресцентного спектрофотометра, и результаты показаны на фиг. 1А-1С и приведены в табл. 2.

Таблица 2

SEQ ID NO:	Контроль	50 мкМ	500 мкМ	1000 мкМ	2000 мкМ
1	100%	193%	360%	394%	575%
2	100%	128%	264%	358%	405%
3	100%	159%	253%	400%	420%

Как видно из фиг. 1А-1С и табл. 2, было подтверждено, что пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, напрямую связывается с ТХДД.

Пример 2. Тест на ядерную транслокацию AhR.

Клетки HaCaT (клетки кератиноцитов человека) высевали на 6-луночный планшет с плотностью  $3 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем в культуральную среду добавляли 10 нМ ТХДД и 50 мкМ пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3. После 30-минутной реакции клетки обрабатывали в течение 1 ч и собирали для получения ядерных и цитоплазматических белков, отделенных друг от друга. Вестерн-блоттинг проводили с использованием антител к арилуглеводородному рецептору (AhR) (Santa Cruz Biotechnology, США) для идентификации активации ядерной транслокации AhR, и результаты показаны на фиг. 2А-2F и приведены в табл. 3.

Таблица 3

SEQ ID NO:	Контроль	ТХДД	ТХДД+пептид	
			5 мкМ	50 мкМ
1	1	5,8-кратное увеличение	1,9-кратное увеличение s	1,9-кратное увеличение
2	1	5,7-кратное увеличение	2,5-кратное увеличение	0,9-кратное увеличение
3	1	5,9-кратное увеличение	3-кратное увеличение	1,5-кратное увеличение

Как видно из фиг. 2А-2F и табл. 3, было подтверждено, что пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, ингибирует ядерную транслокацию AhR, вызываемую ТХДД.

Пример 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание ТХДД.

Клетки HaCaT (клетки кератиноцитов человека) высевали на 6-луночный планшет с плотностью  $3 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем в культуральную среду добавляли 50 нМ ТХДД и 50 мкМ пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3. После 30-минутной реакции клетки обрабатывали в течение 5 мин и иммобилизовали 4%-ным парафор-

мальдегидом в течение 30 мин. Затем, после трехкратной промывки, клетки обрабатывали 0,5%-ным Triton X-100 в течение 15 мин и трижды промывали. Затем клетки блокировали 3%-ным BSA в течение 1 ч и окрашивали первичными антителами к ТХДД, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (в разведении 1:100), при 4°C в течение ночи. Клетки окрашивали 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), монтировали и наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа. Результаты показаны на фиг. 3А-3С.

Как показано на фиг. 3А-3С, пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, ингибировал входение ТХДД в клетки.

Пример 4. Анализ на ROS в клетках.

Клетки HaCaT (клетки кератиноцитов человека) высевали на 6-луночный планшет с плотностью  $3 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем в культуральную среду добавляли 10 нМ ТХДД и 50 мкМ пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3. После 30-минутной реакции клетки обрабатывали в течение 24 ч и дополнительно обрабатывали DCFH-DA в течение 30 мин. Затем клетки собирали и анализировали методом флуоресцентно-активируемой проточной цитометрии (FACS), чтобы измерить изменение средних значений в канале FL1 (зеленая флуоресценция), и результаты показаны на фиг. 4А-4С.

Как показано на фиг. 4А-4С, пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, снижает уровень ROS в клетках, повышающийся при действии ТХДД.

Пример 5. Анализ CYP1A1 и воспалительных молекул с помощью ОТ-ПЦР.

Клетки HaCaT (клетки кератиноцитов человека) высевали на 6-луночный планшет с плотностью  $3 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем в культуральную среду добавляли 10 нМ ТХДД и 50 мкМ пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3. После 30-минутной реакции клетки обрабатывали в течение 6 или 24 ч и собирали для выделения от них РНК. После количественного определения РНК синтезировали кДНК с использованием набора для синтеза кДНК (Intron, Корея). Затем проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием набора PCR PreMix (Intron, Корея) и праймеров для каждого из CYP1A1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  и COX-2, показанных в табл. 4. Затем полученные продукты разделяли на 5%-ном агарозном геле и проводили сравнение уровней экспрессии мРНК факторов роста в образцах с различными условиями обработки, и результаты показаны на фиг. 5А-5С.

Таблица 4

SEQ ID NO:	Праймер	Последовательность (5'-3')
4	CYP1A1_F	GGATCTTTCTCTGTACCCTGG
5	CYP1A1_R	AGCATGTCCTTCAGCCCAGA
6	TNF- $\alpha$ _F	CGTCAGCCGATRTGCTATCT
7	TNF- $\alpha$ _R	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
8	IL-6_F	AAAGAGGCACTGCCAGAAAA
9	IL-6_R	ATCTGAGGTGCCCATGCTAC
10	IL-1 $\beta$ _F	TTCGACACATGGGATAACGA
11	IL-1 $\beta$ _R	TCTTCAACACGCAGGACAG
12	COX-2_F	ATCATTCACCAGGCAAATTGC
13	COX-2_R	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG

Как показано на фиг. 5А-5С, пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, обладает эффектом ингибирования экспрессии CYP1A1 и различных воспалительных факторов, индуцированной ТХДД.

Пример 6. Тест на ядерную транслокацию AhR.

Клетки HaCaT (клетки кератиноцитов человека) высевали на 6-луночный планшет с плотностью  $3 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. 10 нМ городских пылевидных частиц (PM, Sigma Aldrich, США) и 50 мкМ пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, добавляли в культуральную среду. После 30-минутной реакции клетки обрабатывали в течение 1 ч и собирали для получения ядерных и цитоплазматических белков, отделенных друг от друга. Затем проводили Вестерн-блоттинг с использованием антител к арилуглеводородному рецептору (AhR) (Santa Cruz Biotechnology, США) для идентификации активации ядерной транслокации AhR, и результаты показаны на фиг. 6А-6С.

Как показано на фиг. 6А-6С, пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, ингибировал ядерную транслокацию AhR, вызываемую частицами.

Пример 7. Анализ CYP1A1 и воспалительных молекул с помощью ОТ-ПЦР.

Клетки HaCaT (клетки кератиноцитов человека) высевали на 6-луночный планшет с плотностью  $3 \times 10^5$  клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Затем в культуральную среду добавляли 10 нМ пылевидных частиц (PM) и 50 мкМ пептида, состоящего из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 1, 2 или 3. После 30-минутной реакции клетки обрабатывали в течение 6 или 24 ч и собирали для выделения от них РНК. После количественного определения РНК синтезировали кДНК с использованием набора для синтеза кДНК (Intron, Корея). Затем проводили ПЦР с использованием набора PCR PreMix (Intron, Корея) и праймеров для каждого из CYP1A1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  и COX-2, показанных в табл. 5. Затем полученные продукты разделяли на 5%-ном агарозном геле и проводили сравнение уровней экспрессии мРНК факторов роста в образцах с различными условиями обработки, и результаты показаны на фиг. 7А-7С.

Таблица 5

SEQ ID NO:	Праймер	Последовательность (5'-3')
4	CYP1A1_F	GGATCTTTCTCTGTACCCTGG
5	CYP1A1_R	AGCATGTCCTTCAGCCCAGA
6	TNF- $\alpha$ _F	CGTCAGCCGATTRTGCTATCT
7	TNF- $\alpha$ _R	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
8	IL-6_F	AAAGAGGCACTGCCAGAAAA
9	IL-6_R	ATCTGAGGTGCCCATGCTAC
10	IL-1 $\beta$ _F	TTCGACACATGGGATAACGA
11	IL-1 $\beta$ _R	TCTTTCAACACGCAGGACAG
12	COX-2_F	ATCATTCACCAGGCAAATTGC
13	COX-2_R	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG

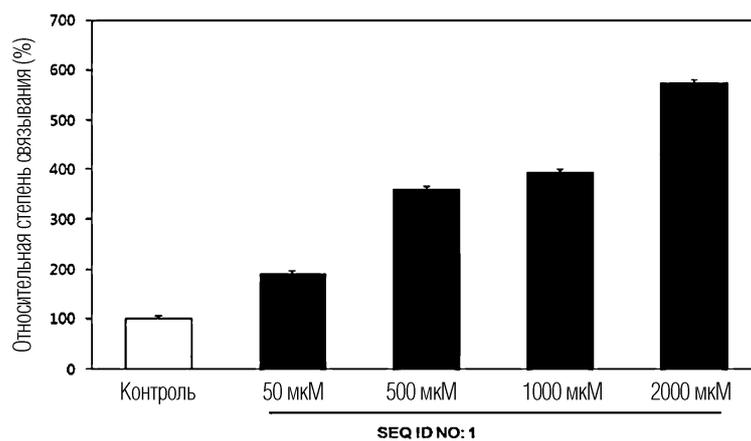
Как показано на фиг. 7А-7С, пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, обладает эффектом ингибирования экспрессии CYP1A1 и различных воспалительных факторов, индуцируемой пылевидными частицами.

#### Промышленное применение

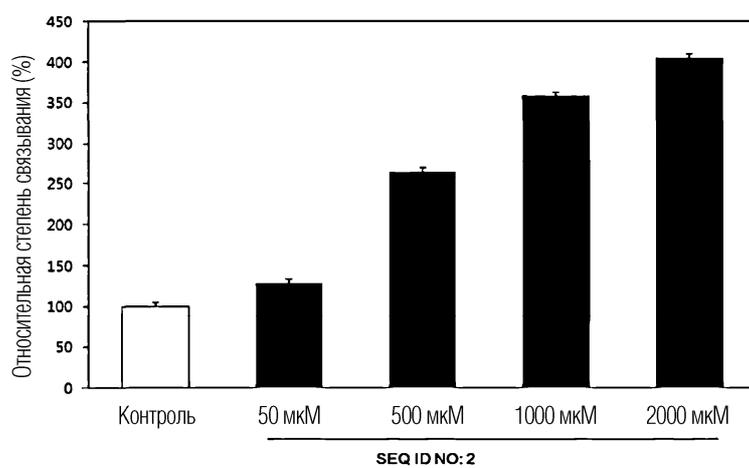
Настоящее раскрытие относится к пептиду с цитопротекторным эффектом против загрязняющих окружающую среду веществ и к его применению.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

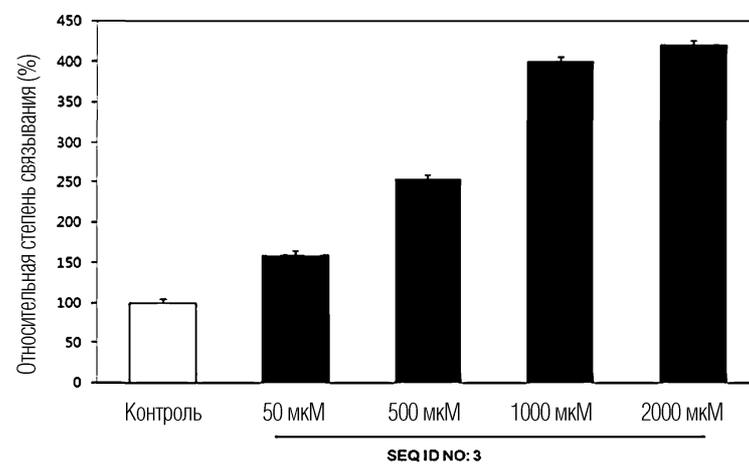
1. Пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.
2. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболеваний, вызванных диоксиноподобными веществами, причем фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в качестве действующего ингредиента, где диоксиноподобные вещества включают по меньшей мере одно вещество, выбранное из группы, состоящей из полихлорированного дибензо-п-диоксина (ПХДД), полихлорированного дибензофурана (ПХДФ) и полихлорированного бифенила (ПХБ).
3. Фармацевтическая композиция по п.2, где заболевания, вызываемые диоксиноподобными веществами, включают кожные заболевания, включая хлоракне, снижение количества сперматозоидов, рак яичка, рак простаты, гиперплазию эндометрия, рак молочной железы, гепатотоксичность, ослабленный иммунитет, гиперлипидемию, гипоспадию, крипторхизм, врожденные пороки развития, повреждение сосудов, гепатоцеллюлярную карциному, гепатомегалию, аденофиброз, потерю веса, выпадение волос, отек полости рта, блефарему и язву слизистой желудка.
4. Фармацевтическая композиция по п.2, где полихлорированный дибензо-п-диоксин представляет собой 2,3,7,8-тетрахлордибензо-п-диоксин (ТХДД).
5. Пищевая композиция, противодействующая диоксиноподобным веществам, причем пищевая композиция содержит по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в качестве действующего ингредиента, где диоксиноподобные вещества включают по меньшей мере одно вещество, выбранное из группы, состоящей из полихлорированного дибензо-п-диоксина (ПХДД), полихлорированного дибензофурана (ПХДФ) и полихлорированного бифенила (ПХБ).
6. Косметическая композиция для улучшения состояния кожи, содержащая по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, состоящих из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3, в качестве действующего ингредиента.



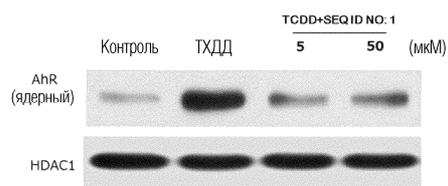
Фиг. 1А



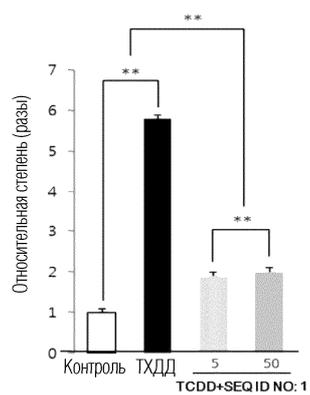
Фиг. 1В



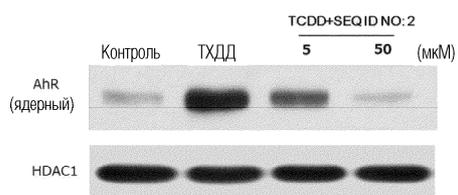
Фиг. 1С



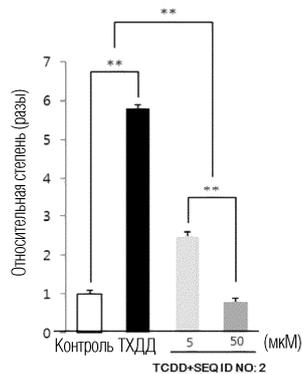
Фиг. 2А



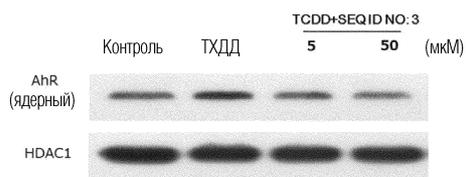
Фиг. 2B



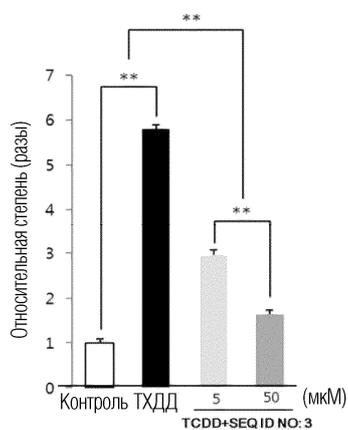
Фиг. 2C



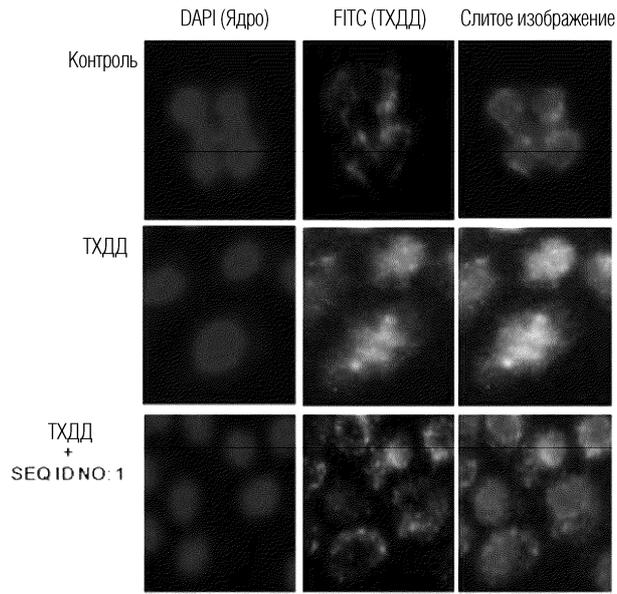
Фиг. 2D



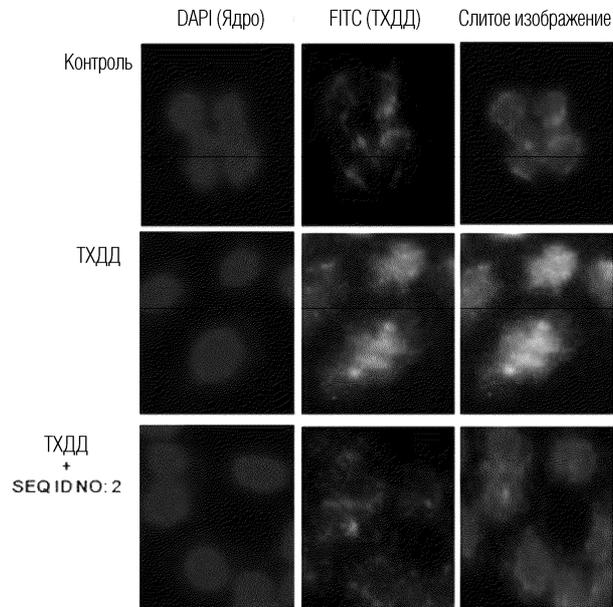
Фиг. 2E



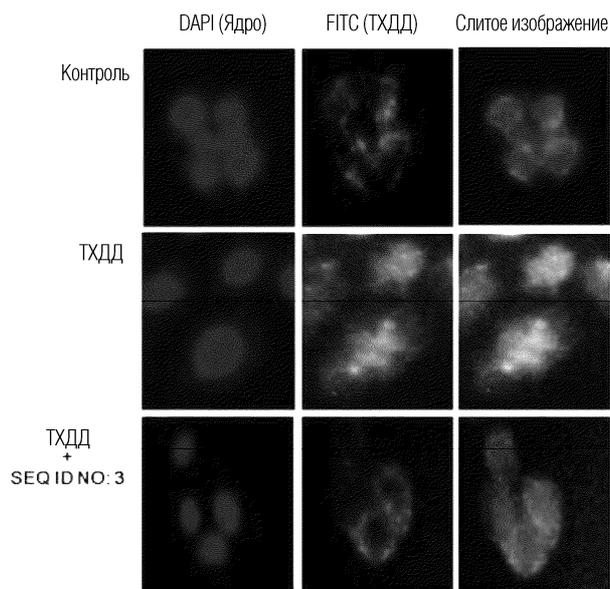
Фиг. 2F



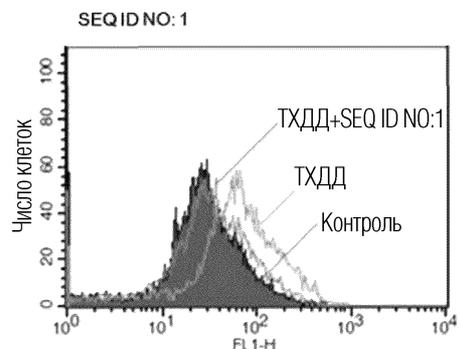
Фиг. 3А



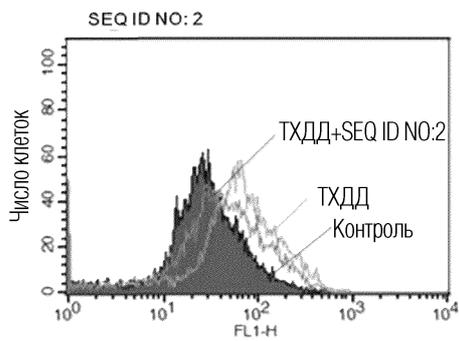
Фиг. 3В



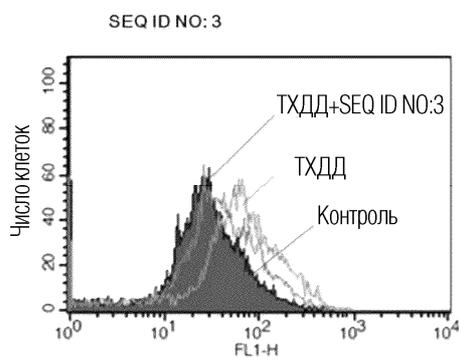
Фиг. 3С



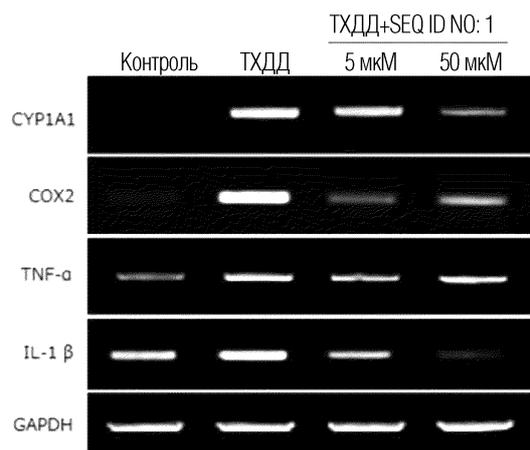
Фиг. 4А



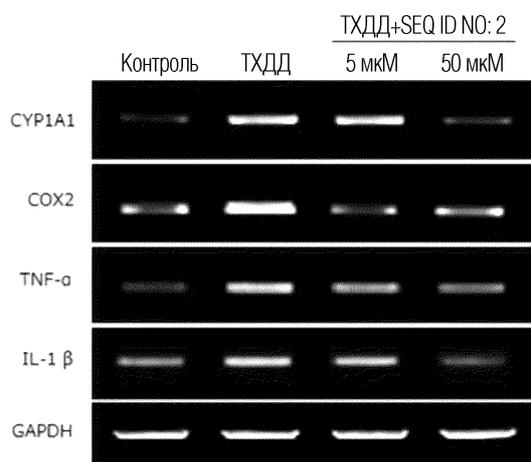
Фиг. 4В



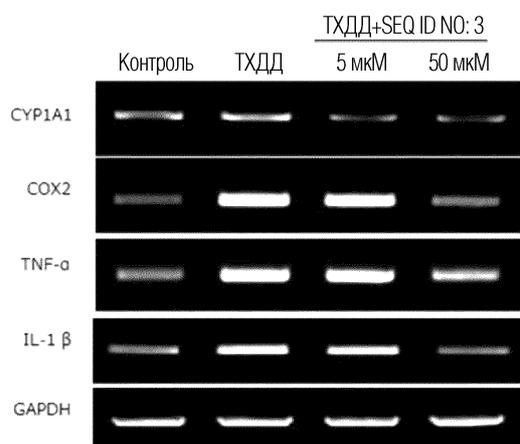
Фиг. 4С



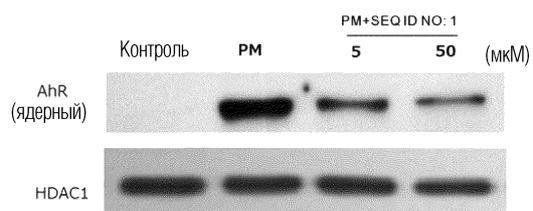
Фиг. 5А



Фиг. 5В

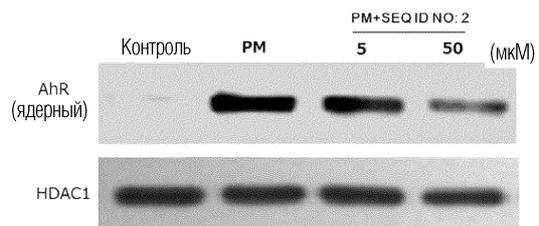


Фиг. 5С

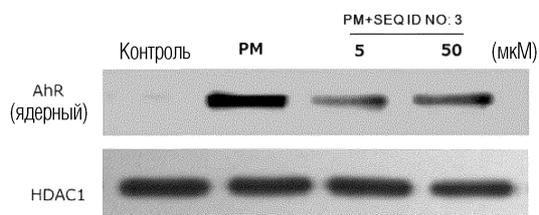


Фиг. 6А

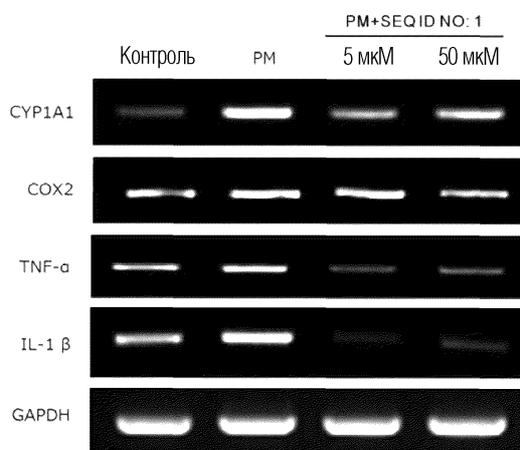
042132



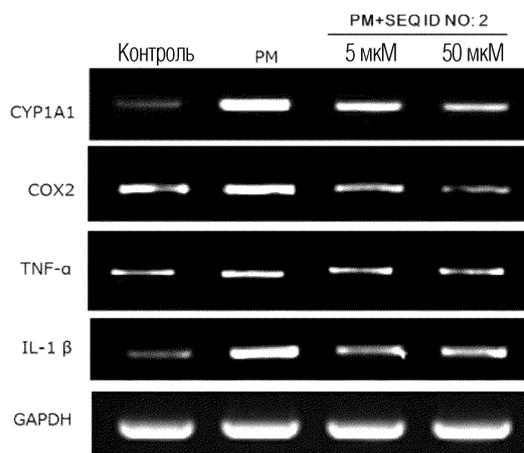
Фиг. 6B



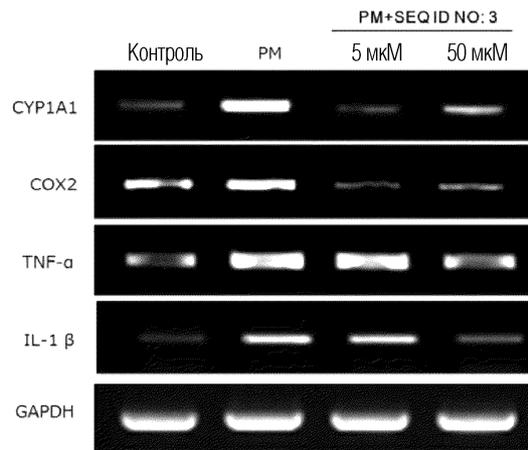
Фиг. 6C



Фиг. 7A



Фиг. 7B



Фиг. 7С