

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
16 декабря 2021 (16.12.2021)



(10) Номер международной публикации
WO 2021/251850 A1

(51) Международная патентная классификация:

C07K 5/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01) A61K 38/07 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2021/050257

(22) Дата международной подачи:
10 августа 2021 (10.08.2021)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2020119551 11 июня 2020 (11.06.2020) RU

(71) Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕР-
ВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕ-
ДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.
СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРА-
НЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕ-
НОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ) (FEDERAL STATE
AUTONOMOUS EDUCATIONAL INSTITUTION
OF HIGHER EDUCATION I.M. SECHENOV
FIRST MOSCOW STATE MEDICAL UNIVERSITY
OF THE MINISTRY OF HEALTHCARE OF
THE RUSSIAN FEDERATION (SECHENOV

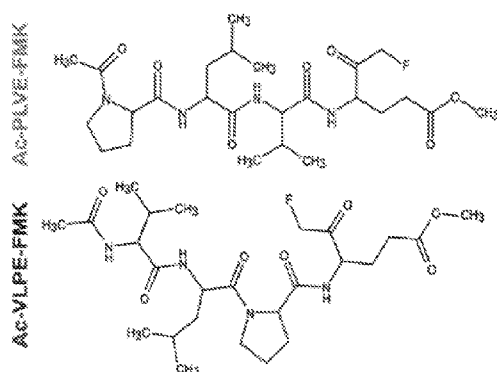
UNIVERSITY)) [RU/RU]; ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
Москва, 119991, Moscow (RU).

(72) Изобретатели: ЗАМЯТНИН, АНДРЕЙ АЛЕКСАН-
ДРОВИЧ (ZAMYATNIN, Andrey Aleksandrovich);
Ленинский проспект, д. 44, кв. 107, Москва,
119334, Moscow (RU). РУДЖИНЬСКА, Магдалена
(RUDZIŃSKA, Magdalena); ул. Озёрная, вл. 2А, к.
233, Москва, 119361, Moscow (RU). ПАРОДИ, Алес-
сandro (PARODI, Alessandro); ул. Озёрная, вл. 2А, к.
236, Москва, 119361, Moscow (RU). САВВАТЕЕВА,
Людмила Владимировна (SAVVATEEVA, Liudmila
Vladimirovna); ул. Ташкентская, д. 19, кв. 69, Москва,
109444, Moscow (RU). ГОРОХОВЕЦ, Неонила Ва-
сильевна (GOROKHOVETS, Neonila Vasilievna); Се-
вастопольский проспект, д. 14/1, кв. 108, Москва,
117447, Moscow (RU). МАКАРОВ, Владимир Алексее-
вич (MAKAROV, Vladimir Alekseevich); ул. 43 Ар-
мии, д. 9, кв. 90, Подольск, 142121, Podolsk (RU). ТА-
РАСОВ, Вадим Владимирович (TARASOV, Vadim
Vladimirovich); Хорошевское шоссе, д. 58, кв. 22,
Москва, 123007, Moscow (RU).

(74) Агент: АСТАХОВА, Екатерина Игоревна
(ASTAKHOVA, Ekaterina Igorevna); ул. Трубецкая, д.
8, стр. 2, Москва, 119991, Moscow (RU).

(54) Title: SPECIFIC PEPTIDE INHIBITORS OF CYSTEINE CATHEPSINS

(54) Название изобретения: СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ



ФИГ. 1

(57) Abstract: The invention relates to bioengineering. The use of synthetic peptides (peptide compounds) as specific inhibitors of cysteine cathepsins is proposed. The synthetic peptides are compounds of general formula R1-PEPT-R2, where PEPT is one of the amino acid sequences: PLVE and VLPE; R1 is one of the protecting groups: acetyl or benzyloxycarbonyl, or is absent; and R2 is derivatives of fluoromethyl ketone (FMK) or chloromethyl ketone (CMK). The proposed peptides have high affinity for the catalytic triad of cysteine cathepsins and can be used to make therapeutic agents which are specific inhibitors of proteolytic processes involving cysteine cathepsins, in particular oncogenic processes.

(57) Реферат: Изобретение относится к биоинженерии. Предложено применение синтетических пептидов (пептидных соединений) в качестве специфических ингибиторов цистеиновых катепсинов. Синтетические пептиды представляют собой соединения с общей формулой R1-PEPT-R2, где PEPT – одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE; R1 – одна из защитных групп: ацетильная, бензилоксикарбонильная или отсутствует; R2 – производные фторметилкетона (ФМК) или хлорметилкетона (СМК). Предложенные пептиды обладают высокой аффинностью к каталитической триаде цистеиновых катепсинов и могут быть использованы для создания терапевтических средств, являющихся специфическими ингибиторами протеолитических процессов с участием цистеиновых катепсинов, в частности, процессов онкогенеза.

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с информацией о просьбе восстановления прав на приоритет в отношении одного или более чем одного притязания на приоритет (правила 26bis.3 и 48.2(b)(vii))
- в черно-белом варианте; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к биоинженерии, а именно к пептидам (пептидным
5 соединениям), обладающим высокой аффинностью к каталитической триаде
цистеиновых катепсинов, и может быть использовано для создания терапевтических
средств, являющихся специфическими ингибиторами протеолитических процессов с
участием цистеиновых катепсинов.

Уровень техники

10 Цистеиновые катепсины являются гомологичными протеиназами клана СА
цистеиновых пептидаз, экспрессирующимися в различных клетках и тканях многих
видов организмов [Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A.,
and Finn, R.D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and
inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic
15 Acids Res.*, 46, D624–D632.]. В геноме человека идентифицировано 11 цистеиновых
катепсинов: В, С, F, H, K, L, O, S, V, W и X(Z), которые проявляют разнообразную
каталитическую активность. Так, катепсины F, O, S, K, V, L и W представляют собой
эндопептидазы с широкой субстратной специфичностью; катепсины H и В обладают
как эндо-, так и экзопептидазной активностью, тогда как катепсины С и Х являются
20 исключительно амино- и карбоксипептидазой соответственно. Наибольшую
активность цистеиновые катепсины проявляют в средах с пониженными значениями
рН, вследствие чего изначально считалось, что функционирование этих ферментов
ограничивается лизосомами и эндосомами. Однако появляется все больше данных о
высокоспецифичной и направленной протеолитической активности катепсинов в
25 других компартментах клеток, таких как секреторные везикулы, цитозоль и ядро, а
также вне клеток [Spira, D., Stypmann, J., Tobin, D.J., Petermann, I., Mayer, C.,
Hagemann, S., Vasiljeva, O., Günther, T., Schüle, R., Peters, C., and Reinheckel, T. (2007)
Cell type-specific functions of the lysosomal protease cathepsin L in the heart, *J. Biol.
Chem.*, 282, 37045-37052.]. Основной функцией катепсинов является
30 низкоспецифичная деградация белков в лизосоме, однако некоторые представители
этой группы ферментов выполняют и другие функции. Так, например, катепсины В,
H, L, S, K задействованы в процессе апоптоза [Boya, P., and Kroemer, G. (2008)
Lysosomal membrane permeabilization in cell death, *Oncogene*, 27, 6434-6451; Repnik,
U., Cesen, M.H., and Turk, B. (2013) The Endolysosomal System in Cell Death and

Survival, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 5, a008755-a008755.], а катепсины S, F, L и V участвуют в презентации антигенов МНС класса II [Sadegh-Nasseri, S., and Kim, A. (2015) MHC class II auto-antigen presentation is unconventional, Front. Immunol., 6, 372.].

5 Таким образом, цистеиновые катепсины выполняют различные функции в клетках и тканях, однако их активность должна строго регулироваться. Совокупность таких факторов как локализация (преимущественно в лизосомах), экспрессия эндогенных ингибиторов (цистатинов) низкие уровни pH (для оптимальной работы) катепсинов ограничивают область их действия и позволяют
10 организму предотвращать деградацию белков цитоплазмы и межклеточного матрикса. Тем не менее любой сбой в регуляции, выраженной, например, в повышении уровня экспрессии и активности катепсинов часто связан с развитием различных патологических состояний, таких как неврологические расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, ожирение, ревматоидный артрит и опухолевые
15 заболевания. В частности, при онкогенезе цистеиновые катепсины детектируются в микроокружении опухолей, где они участвуют в процессах пролиферации, инвазии и метастазирования, обеспечивая деградацию внеклеточного матрикса, разрушение межклеточных взаимодействий и стимулируя ангиогенез. В связи с этим, цистеиновые катепсины являются перспективными мишенями при разработке
20 противоопухолевых препаратов, направленных на ингибирование этих ферментов.

 Известны различные препараты, которые являются ингибиторами цистеиновых катепсинов. В основном это низкомолекулярные соединения, основанные на структурах эпоксисукцинила, винилсульфона или нитрила, действующие по принципу связывания с активным центром ферментов. Кроме того,
25 для некоторых катепсинов были разработаны ингибиторы на основе антител. Однако все эти ингибиторы имеют различную специфичность, а также биологические свойства, связанные с проницаемостью в клетки и обладающие значительными побочными эффектами, ограничивающими возможности применения таких ингибиторов на практике. [Petushkova AI, Savvateeva LV, Korolev DO, Zamyatnin AA
30 Jr. (2019) Cysteine Cathepsins: Potential Applications in Diagnostics and Therapy of Malignant Tumors. Biochemistry (Mosc).; 84(7):746-761.].

 Кроме того, для ингибирования цистеиновых катепсинов (K, S, L) авторами патентов [RU 2692799, RU 2535479, RU 2399613] предложены конкретные соединения непептидного происхождения, которые предлагается использовать для

лечения или профилактики катепсин-зависимых заболеваний или состояний у млекопитающих. Разнообразие представленных модификаций этих соединений также обусловлено их различной специфичностью и биологическими свойствами при тех или иных условиях использования.

- 5 Наиболее близкими к предлагаемому решению являются универсальный ингибитор каспаз, имеющий структуру Z-VAD-FMK (N-бензоилоксикарбонил-Val-Ala-Asp-трифторметилкетон) [Van Noorden CJ. (2001) The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem.* 103(3):241-51], который предотвращает апоптоз, а также пептидные ингибиторы каспаз: z-DEVD.fmk, Ac-YVAD.cmk. Каспазы относятся к семейству цистеиновых протеиназ, расщепляющих белки после аспартата. С помощью пептидных производных фторметилкетонов и хлорметилкетонов (напоминающими место расщепления известных каспазных субстратов), необратимо алкилирующих остаток цистеина в активном участке каспазы, было показано эффективное ингибирование этих ферментов. Ингибирующий эффект z-VAD.fmk, z-DEVD.fmk и Ac-YVAD.cmk также был показан и для катепсинов В и Н [Schotte P. et al. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases //FEBS letters. – 1999. – Т. 442. – №. 1. – С. 117-121. Для бензилоксикарбонил-фенил-аланил-фторметилкетона (z-FA-FMK) помимо подавления процессов апоптоза и воспаления посредством ингибирования некоторых каспаз, также показана способность ингибировать катепсин В [The Cathepsin B Inhibitor, z-FA-FMK, Inhibits Human T Cell Proliferation In Vitro and Modulates Host Response to Pneumococcal Infection In Vivo Clare P. Lawrence, Aras Kadioglu, Ai-Li Yang, William R. Coward, Sek C. Chow *The Journal of Immunology* September 15, 2006, 177 (6) 3827-3836].

- 25 Однако в связи с тем, что вышеуказанные пептидные ингибиторы были созданы для ингибирования членов семейства каспаз, их специфичности может быть не вполне достаточно для эффективного ингибирования ферментов семейства цистеиновых катепсинов.

- 30 Технической проблемой, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, является создание новых пептидных последовательностей, являющихся специфическими ингибиторами цистеиновых катепсинов, т.е. способных ингибировать функциональную (протеолитическую) активность цистеиновых катепсинов, с перспективой использования в разработке противоопухолевых терапевтических средств.

Раскрытие сущности изобретения

Техническим результатом изобретения является создание специфических пептидов (пептидных соединений), обладающих ингибирующим действием на функциональную активность цистеиновых катепсинов.

- 5 Технический результат достигается за счет синтеза специфических пептидных соединений – производных фторметилкетонов или хлорметилкетонов тетрапептидов структуры R1-PEPT-R2, где PEPT – одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE; R1 – одна из защитных групп: ацетильная (Ac), бензилоксикарбонильная (Z) или отсутствует; R2 – производные фторметилкетона
10 (FMK) или хлорметилкетона (CMK), характеризующихся способностью ингибировать протеолитическую активность цистеиновых катепсинов.

- Заявленное изобретение может применяться для приготовления фармацевтических композиций для подавления специфической активности цистеиновых катепсинов, содержащих пептидное соединение и фармацевтически
15 приемлемый носитель. Пептидные соединения могут применяться для приготовления лекарственных средств, вызывающих подавление специфической активности цистеиновых катепсинов, в терапии опухолевых заболеваний.

- Получение таких модифицированных пептидов легко осуществимо стандартными методами пептидного синтеза. Пептидная природа специфических
20 ингибиторов позволяет использовать их в качестве действующего вещества для разработок фармкомпозиций. Преимуществами пептидов перед другими типами препаратов состоит в том, что они, в основном, безопасны, быстро выводятся из организма и имеют значительно меньше побочных эффектов, чем средства непептидной природы. Большинство пептидных лекарств вводят парентеральным
25 путем, но с развитием соответствующих технологий разрабатываются и иные формы введения: пероральный, интраназальный, трансдермальный, т.е. возможен подбор вариантов места действия пептида конкретно под определенные условия применения.

Краткое описание чертежей

- 30 Изобретение поясняется иллюстрациями, где на Фиг. 1 представлены структуры специфических пептидных ингибиторов цистеиновых катепсинов Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK.

На Фиг.2 представлены графики зависимости интенсивности флуоресценции продукта гидролиза (свободной метки 7-Амино-4-метилкумарина (АМК), у.е.)

цистеиновыми катепсинами (CtsB и CtsL) флуорогенного субстрата Ас-PLVQ-АМК от времени (мин), характеризующие ингибирующую активность ферментов, где а) график зависимости для катепсина В (CtsB), б) график зависимости для катепсина L (CtsL), с) график зависимости в отсутствии ферментов (в качестве контроля отсутствия флуоресценции метки); красными линиями показана активность ферментов без добавления ингибиторов, синими – в присутствии пептидного ингибитора структуры Ас-PLVE-FМК, зелеными – в присутствии пептидного ингибитора структуры Ас-VLPE-FМК.

На Фиг.3 представлены изображение и численные показатели результатов «скретч»-теста на монослое опухолевых клеток почки линии 769-Р.

На Фиг.4 представлены изображение и численные показатели результатов «скретч»-теста на монослое опухолевых клеток почки линии А498.

Осуществление изобретения

Изобретение иллюстрируется с использованием соединений R1-РЕРТ-R2, где РЕРТ – одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE; R1 –ацетильная группа (Ас); R2 – производные фторметилкетона (FМК), т.е. Ас-PLVE-FМК (Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu-FМК) и Ас-VLPE-FМК (Acetyl-Val-Leu-Pro-Glu-FМК).

На примере изучения функциональной активности цистеиновой протеиназы пшеницы Тритикаина-альфа были определены аминокислотные последовательности с предпочтительными сайтами расщепления субстратов [Savvateeva LV, Gorokhovets NV, Makarov VA, Serebryakova MV, Solovyev AG, Morozov SY, Reddy VP, Zernii EY, Zamyatnin AA Jr, Aliev G. (2015) Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain- α : feasibility for enzymatic therapy assays. Int J Biochem Cell Biol., 62:115-24.]. На основе полученных данных посредством компьютерного моделирования (с помощью программы PLANTS [Korb, O.; Stutzle, T.; Exner, T.E. Empirical scoring functions for advanced protein– ligand docking with PLANTS. Journal of chemical information and modeling 2009, 49, 84-96.] для моделирования белково-лигандного взаимодействия) были подобраны пептидные последовательности, обладающие наибольшей аффинностью к каталитическому центру цистеиновых протеиназ, в частности тетрапептиды PLVQ(E) и VLPQ(E). Путем конъюгирования фторметилкетонной группы (FМК) к данным пептидам PLVE и VLPE были получены новые высокоспецифические ингибиторы цистеиновых протеиназ (Фиг.1). Механизм необратимого ингибирования осуществляется за счет ковалентного связывания каталитического цистеина с FМК [Rasnick, D. Synthesis of peptide

fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B. Analytical biochemistry 1985, 149, 461-465.].

Пептиды получали стандартными методами химического синтеза (твердофазным или в жидкой фазе), при котором пептиды получают путем
5 соединения различных аминокислот друг с другом с последующей химической модификацией для введения функциональных групп. Способы химического синтеза пептидов широко известны и хорошо описаны с помощью известных в данной области техники методов [US 6015881; Mergler и др., *Tetrahedron Letters* 29, 1988, cc.4005-4008; Mergler и др., *Tetrahedron Letters* 29, 1988, cc.4009-4012; *Peptides, Chemistry and Biology*, под ред. Kamber и др., изд-во ESCOM, Leiden, 1992, cc.525-526; Riniker и др., *Tetrahedron Letters* 49, 1993, cc.9307-9320; Lloyd-Williams и др., *Tetrahedron Letters* 49, 1993, cc.11065-11133, и Andersson и др., *Biopolymers* 55, 2000, cc.227-250].
10

Ингибирующие свойства Ас-PLVE-FMK и Ас-VLPE-FMK оценивали in vitro
15 биохимическими методами и на опухолевых линиях клеток. В качестве модельных ферментов были взяты рекомбинантные цистеиновые катепсины L и В человека (CtsL и CtsB), так как они проявляют как эндо-, так и эндо -/экзопептидазную активность соответственно.

Пример 1. Определение ингибирующей активности Ас-PLVE-FMK и Ас-
20 VLPE-FMK с использованием специфического флуорогенного субстрата.

Активность рекомбинантных катепсинов Cts В и L определяли по способности гидролизовать синтетический модельный пептидный субстрат цистеиновой протеиназы пшеницы тритикаина-альфа Ас-PLVQ-АМК, конъюгированный с 7-Амино-4-метилкумарином (АМК), с определением продуктов
25 гидролиза по интенсивности флуоресценции свободного АМК как описано ранее [Патент RU 2603054.]. Так, к 20 нМ раствору рекомбинантного Cts В или Cts L в 0,1М натрий-ацетатного буфере с содержанием 100 mM NaCl, 0,5% DMSO, 0,6mM ЭДТА, pH 4,6 в присутствии и отсутствии 2 мкМ тетрапептидных ингибиторов Ас-PLVE-FMK (Фиг.2, синие линии) и Ас-VLPE-FMK (Фиг.2, зеленые линии)
30 добавляют 50 μM флуорогенного субстрата (Фиг.2, красные линии) и детектируют интенсивность флуоресценции при комнатной температуре при длине волны возбуждения флуоресценции, равной 360 нм, и длине волны испускания флуоресценции, равной 460 нм (количество гидролизованного субстрата Ас-PLVQ-АМК определяют по интенсивности флуоресценции; скорость реакции при

необходимости определяют по графику зависимости количества субстрата (моль) от времени гидролиза (с) с последующей обработкой полученных данных с применением метода линейной регрессии).

Как видно из рисунка Фиг. 2 и таблицы 1, интенсивность флуоресценции заметно снижалась в присутствии заявляемых тетрапептидов (синие и зеленые линии), что говорит об активной конкуренции субстрата и ингибиторов за активный центр фермента, и, следовательно, свидетельствует о специфичном и эффективном подавлении протеиназной активности цистеиновых катепсинов.

Таблица 1

Время, мин	Интенсивность флуоресценции, у.е.						
	Blank (Субстрат Ac-PLVQ- АМК (Sub) без фермента)	CtsB			CtsL		
		+ Sub	+Sub+ +Ac- PLVE- FMK	+ Sub + Ac- VLPE- FMK	+ Sub	+Sub+ +Ac-PLVE- FMK	+ Sub + Ac-VLPE- FMK
0.3	0	3500	3000	3100	5000	4000	4300
3	0.1	4300	3700	3700	7300	6300	6400
6	0	5600	4700	4600	9500	7200	7800
9	0.1	6300	4900	4800	11300	8200	9100
12	0	7000	5050	4950	14000	9200	9500

Пример 2. Оценка ингибирующей активности Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK с использованием опухолевых клеточных линий.

Известно, что эффективное ингибирование активности цистеиновых катепсинов ассоциировано с изменениями определенных свойств опухолевых клеток, в частности, инвазии и подвижности.

Для исследования влияния Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK на подвижность клеток использовали scratch-тест («скретч-тест»): на монослой клеток рака почки линий 769-P и A498, выращенных в ростовой среде RPMI 1640 с добавлением 10% бычьей сыворотки и 1% содержанием антибиотиков пенициллин-стрептомицин в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C, наносят царапину с помощью наконечника пипетки. Монослой промывают дважды фосфатно-солевым буфером для удаления открепившихся клеток и дебриса и добавляют ингибиторные тетрапептиды Ac-PLVE-FMK и Ac-VLPE-FMK в конечной концентрации 20 мкМ, после чего клетки продолжают наращивать в CO₂-инкубаторе, детектируя «заживание» клеточного

монослоя с использованием микроскопа в определенные временные интервалы (Фиг.3, 4, таблица 2, 3).

Таблица 2

Клетки линии 769-P	Размер повреждения клеток (царапины), мкм		
Время, ч	Ctrl (без добавления специфических пептидных ингибиторов)	Ac-PLVE-FMK	Ac-VLPE-FMK
0	390	389	387
8	236	300	277
24	15	56	80

5 Таблица 3

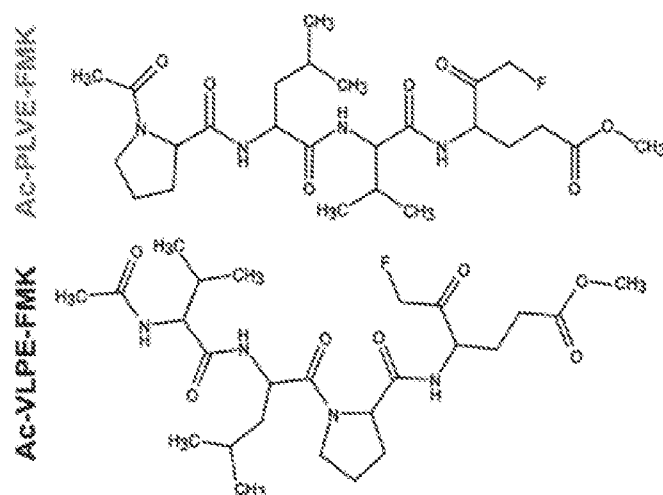
Клетки линии A489	Размер повреждения клеток (царапины), мкм		
Время, ч	Ctrl (без добавления специфических пептидных ингибиторов)	Ac-PLVE-FMK	Ac-VLPE-FMK
0	508	514	520
8	437	467	476
24	282	407	376

Как видно из Фиг. 3, 4 и таблиц 2, 3, добавление тетрапептидов замедляло рост образования монослоя опухолевых клеток, т.е. пептидные ингибиторы эффективно препятствовали «заживлению» (закрытию зазора) как через 8, так и через 24 часа после образования царапины. Для наилучшей репрезентативности данных были построены гистограммы, отражающие процентное соотношение зарегистрированных изменений в размерах повреждения клеточного монослоя по сравнению с контролем (клетки без обработки тетрапептидами). Таким образом, можно утверждать, что ингибирование Cts с использованием тетрапептидов в опухолевых клетках может влиять на адгезию клеток, препятствуя образованию межклеточных контактов.

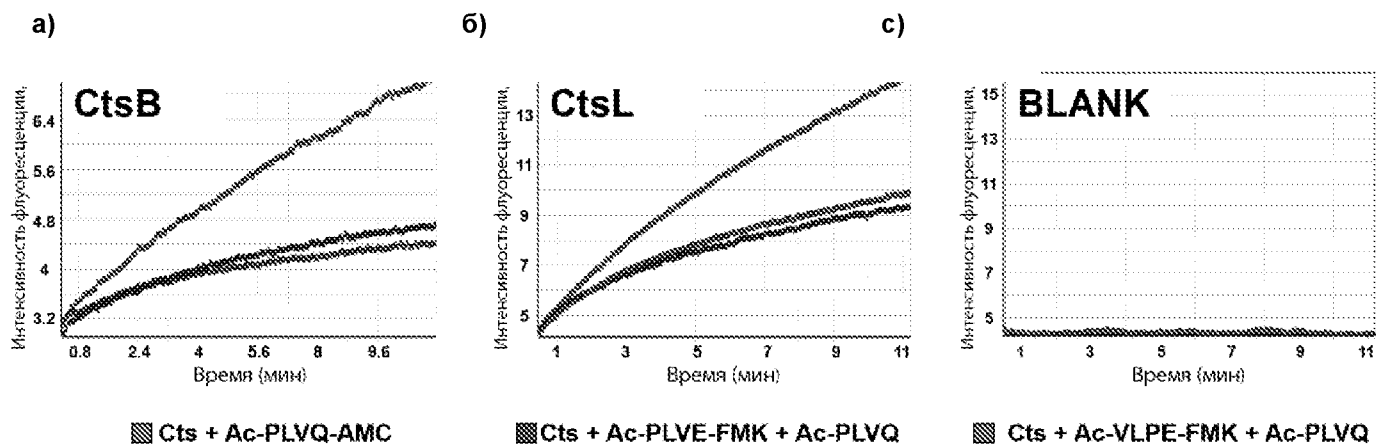
Таким образом, заявленные специфические пептидные ингибиторы, обладающие способностью ингибировать цистеиновые катепсины, могут служить основой фармацевтических композиций для разработки и получения лекарственных средств для лечения заболеваний, связанных с повышенной активностью цистеиновых катепсинов, в частности, противоопухолевых препаратов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

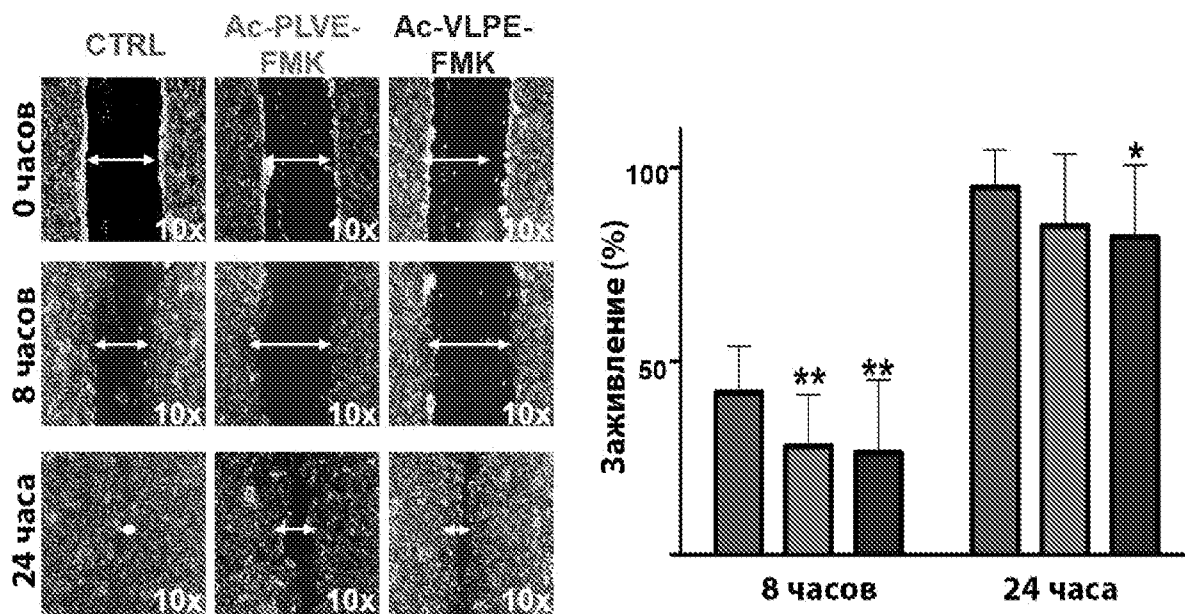
1. Пептидное соединение с общей формулой R1-ПЕРТ-R2, где ПЕРТ – одна из аминокислотных последовательностей: PLVE, VLPE; R1 – одна из защитных групп: ацетильная, бензилоксикарбонильная или отсутствует; R2 – производные фторметилкетона (ФМК) или хлорметилкетона (СМК), характеризующееся способностью ингибировать протеолитическую активность цистеиновых катепсинов.
2. Применение пептидного соединения по п. 1 в качестве ингибитора протеолитической активности цистеиновых катепсинов.
3. Применение пептидного соединения по п. 1 для терапии опухолевых заболеваний.
4. Применение пептидного соединения по п. 1 для приготовления лекарственного средства, вызывающего подавление специфической активности цистеиновых катепсинов.
5. Фармацевтическая композиция для подавления специфической активности цистеиновых катепсинов, содержащая пептидное соединение по п.1, и фармацевтически приемлемый носитель.



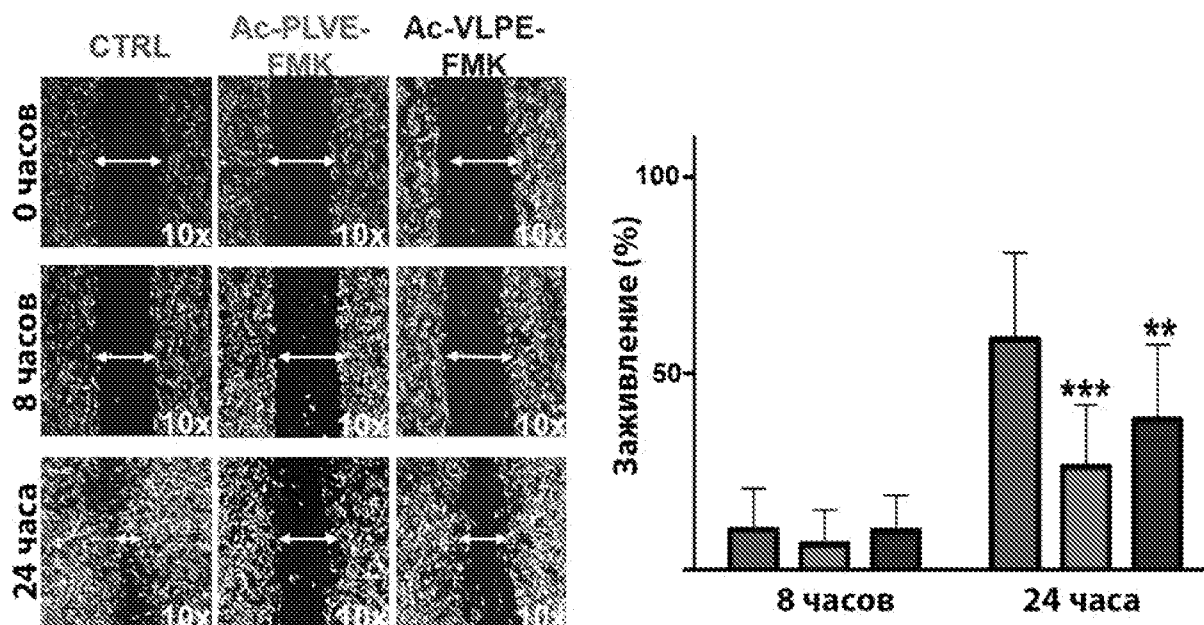
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2021/050257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 5/10 (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**C12N 9/64** (2006.01)**A61K 38/07** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, C12N, A61P, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

E-Library, Espacenet, PatSearch, PATENTSCOPE, RUPTO, NCBI, EMBL-EBI, Google, Google Scholar, PubMed, USPTO, ScienceDirect

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUDZISKA, M. et al. Cysteine Cathepsins Inhibition Affects Their Expression and Human Renal Cancer Cell Phenotype. Cancers, Published: 21 May 2020, v.12, no.5, 1310, p.1-20, doi:10.3390/cancers12051310, in particular, abstract, c.2 last paragraph, chapter 2.2, chapter 2.3, p.11 paragraph 3, p.12 paragraph 2, Fig. 4a, s, d, chapter 5	1-5
A	SCHOTTE R. et al. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. FEBS letters. 1999, v. 442, no.1, p.117-121, abstract, chapter 4 Discussion	1-5
A	GOROKHOVETS N.V. et al. Rational Design of Recombinant P apain-Like Cysteine Protease: Optimal Domain Structure and E xpression Conditions for Wheat-Derived Enzyme Triticain-alpha. Int. J. M ol. Sci. 2017; 18, 1395, p.1-17, doi: 10.3390/ijms18071395, abstract	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2021 (16.11.2021)

Date of mailing of the international search report

18 November 2021 (18.11.2021)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2021/050257

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RASNICK D. Synthesis of peptide fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B. Analytical biochemistry 1985, v.149, p. 461-465, abstract, table1	1-5
A	RAUBER R. et al. The synthesis of peptidylfluoromethanes and their properties as inhibitors of serine proteinases and cysteine proteinases. Biochem. J., 1986, v. 239, p.633-440, abstract, table1	1-5
A	FRANSOLET M. et al. In vitro evaluation of the anti -apopto tic drug Z-VAD-FMK on human ovarian granulosa cell lines for further use in ovarian tissue transplantation. J. Assist. Reprod. Genet. 2015; 32, p.1551-1559. doi: 10.1007/s 10815-015-0536-9, abstract	1-5
A	RU 2692799 C2 (MERK SHARP I DOUM KOPII,), 27.06.2019, the claims	1-5

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2021/050257

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (см. дополнительный лист) Согласно Международной патентной классификации МПК																	
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации) C07K, C12N, A61P, A61K Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) E-Library, Espacenet, PatSearch, PATENTSCOPE, RUPTO, NCBI, EMBL-EBI, Google, Google Scholar, PubMed, USPTO, ScienceDirect																	
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>RUDZISKA, M. et al. Cysteine Cathepsins Inhibition Affects Their Expression and Human Renal Cancer Cell Phenotype. Cancers, Published: 21 May 2020, v.12, no.5, 1310, p.1-20, doi:10.3390/cancers12051310, в особенности, реферат, с.2 последний абзац, раздел 2.2, раздел 2.3, с.11 абзац 3, с.12 абзац 2, рис. 4а, с, d, раздел 5</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SCHOTTE P. et al. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. FEBS letters. 1999, v. 442, no.1, p.117-121, реферат, раздел 4 Discussion</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GOROKHOVETS N.V. et al. Rational Design of Recombinant Papain-Like Cysteine Protease: Optimal Domain Structure and Expression Conditions for Wheat-Derived Enzyme Triticain-alpha. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18, 1395, p.1-17, doi: 10.3390/ijms18071395, реферат</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RASNICK D. Synthesis of peptide fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B. Analytical biochemistry 1985, v.149, p.461-465, реферат, табл.1</td> <td>1-5</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	X	RUDZISKA, M. et al. Cysteine Cathepsins Inhibition Affects Their Expression and Human Renal Cancer Cell Phenotype. Cancers, Published: 21 May 2020, v.12, no.5, 1310, p.1-20, doi:10.3390/cancers12051310, в особенности, реферат, с.2 последний абзац, раздел 2.2, раздел 2.3, с.11 абзац 3, с.12 абзац 2, рис. 4а, с, d, раздел 5	1-5	A	SCHOTTE P. et al. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. FEBS letters. 1999, v. 442, no.1, p.117-121, реферат, раздел 4 Discussion	1-5	A	GOROKHOVETS N.V. et al. Rational Design of Recombinant Papain-Like Cysteine Protease: Optimal Domain Structure and Expression Conditions for Wheat-Derived Enzyme Triticain-alpha. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18, 1395, p.1-17, doi: 10.3390/ijms18071395, реферат	1-5	A	RASNICK D. Synthesis of peptide fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B. Analytical biochemistry 1985, v.149, p.461-465, реферат, табл.1	1-5
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №															
X	RUDZISKA, M. et al. Cysteine Cathepsins Inhibition Affects Their Expression and Human Renal Cancer Cell Phenotype. Cancers, Published: 21 May 2020, v.12, no.5, 1310, p.1-20, doi:10.3390/cancers12051310, в особенности, реферат, с.2 последний абзац, раздел 2.2, раздел 2.3, с.11 абзац 3, с.12 абзац 2, рис. 4а, с, d, раздел 5	1-5															
A	SCHOTTE P. et al. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. FEBS letters. 1999, v. 442, no.1, p.117-121, реферат, раздел 4 Discussion	1-5															
A	GOROKHOVETS N.V. et al. Rational Design of Recombinant Papain-Like Cysteine Protease: Optimal Domain Structure and Expression Conditions for Wheat-Derived Enzyme Triticain-alpha. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18, 1395, p.1-17, doi: 10.3390/ijms18071395, реферат	1-5															
A	RASNICK D. Synthesis of peptide fluoromethyl ketones and the inhibition of human cathepsin B. Analytical biochemistry 1985, v.149, p.461-465, реферат, табл.1	1-5															
☒ последующие документы указаны в продолжении графы C. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении <table border="1"> <tbody> <tr> <td>* Особые категории ссылочных документов:</td> <td>“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</td> <td>“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</td> </tr> <tr> <td>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			* Особые категории ссылочных документов:	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“&” документ, являющийся патентом-аналогом	“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)		“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета		
* Особые категории ссылочных документов:	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение																
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности																
“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста																
“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“&” документ, являющийся патентом-аналогом																
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)																	
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.																	
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета																	
Дата действительного завершения международного поиска 16 ноября 2021 (16.11.2021)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 18 ноября 2021 (18.11.2021)															
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Уполномоченное лицо: Ильченко С.А. Телефон № (8-499) 240-25-91															

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2021/050257

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RAUBER P. et al. The synthesis of peptidylfluoromethanes and their properties as inhibitors of serine proteinases and cysteine proteinases. Biochem. J., 1986, v.239, p.633-440, реферат, табл.1	1-5
A	FRANSOLET M. et al. In vitro evaluation of the anti-apoptotic drug Z-VAD-FMK on human ovarian granulosa cell lines for further use in ovarian tissue transplantation. J. Assist. Reprod. Genet. 2015; 32, p.1551-1559. doi: 10.1007/s10815-015-0536-9, реферат	1-5
A	RU 2692799 C2 (МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП.), 27.06.2019, формула	1-5

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ
Классификация предмета изобретения

Номер международной заявки

PCT/RU 2021/050257

C07K 5/10 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)