

(19)



(10) **LT 5328 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5328**

(51) Int. Cl. (2006): **C12N 9/64**
C07K 7/00

(21) Paraiškos numeris: **2004 079**

(22) Paraiškos padavimo data: **2004 08 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2005 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2006 03 27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/EP03/00659**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2003 01 23**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2004 08 23**

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Matthias RATH, NL
Shrirang NETKE, CA
Aleksandra NIEDZWIECKI, US

(73) Patent savininkas:

Matthias RATH, Twentepoort Oost 3a, 7609 RG-Almelo, NL

(74) Patentinis patikėtinis:

Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B, Biurų centras VICTORIA, LT-01112 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Sintetiniai peptidai ir jų panaudojimas vėžio invazijos ir metastazių gydymui ir profilaktikai

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su sintetiniais peptidais, kurie rodo inhibicinį aktyvumą prieš vėžio atsiradimą ir metastazes. Šio išradimo peptidai apima PRKPKWDK (SEQ ID:2) peptidą, atitinkantį matricinės metalproteinazės-2 (MMP-2) 85-92 aminorūgštis, ir SEQ ID:2 fragmentus, analogus ir homologus. Šis išradimas taip pat yra susijęs su tokių peptidų, kaip žmogaus vėžio atsiradimo ir metastazių inhibitorių, panaudojimu, o taip pat ir su terapiniu panaudojimu vėžio ir kitų su ekstraląstelinės matricos degradacija MMP poveikyje susijusių pataloginių būklių prevencijai ir gydymui.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su sintetiniais peptidais, kurie rodo inhibicinį aktyvumą prieš vėžio atsiradimą ir metastazavimą. Šio išradimo peptidai turi savyje PRKPKWDK (SEQ ID:2) peptidą, atitinkantį matricinės metalproteinazės-2 (MMP-2) 85-92 aminorūgštis, ir SEQ ID:2 fragmentus, analogus ir homologus. Šis išradimas taip pat yra susijęs su tokių peptidų, kaip žmogaus vėžio atsiradimo ir metastazavimo inhibitorių, panaudojimu, o taip pat ir su panaudojimu vėžio ir kitų su ekstraląstelinės matricos degradacija MMP poveikyje susijusių patologinių būklių prevencijai ir gydymui.

Išradimo prielaidos

Įvairios patologinės būklės, įskaitant neoplazines ligas, yra susijusios su padidintu matricinių metalproteinazių (MMP) aktyvumu. MMP yra grupė serino proteinazių, kurios gali ardyti ekstraląstelinę matricą (ECM). MMP yra išskiriamos ekstraląstelinėje matricoje jų zimogeninėje formoje. Aktyvacijos metu MMP fermentinis aktyvumas padidėja ir yra skaldoma ECM – procesas, kuris, kaip yra parodyta, vaidina pagrindinį vaidmenį vėžio metastazių susidaryme.

MMP šeimoje yra bent keletas proteinazių; į jų tarpą patenka MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 ir MMP-13. Vėžio atveju MMP-2 yra susijusi su pirminio auglio augimu, o taip pat ir su auglio metastazavimu. Ši konkreti MMP gali skaldyti kolageną ir kitus ekstraląstelinės matricos (ECM) baltymus ir tai yra pirminė sąlyga vystytis vėžiui, jam atsirandant ir susidarant metastazėms.

Nors buvo padėta daug pastangų priešvėžiniams agentams sukurti ir išbandyti, (žiūr., pavyzdžiui, Tarptautinės paraiškos publikaciją WO 90/10228), išlieka pastovus poreikis netoksiško terapinio agento, kuris galėtų efektyviai blokuoti MMP tarpininkaujamą ECM skaldymą, tokiu būdu sumažindamas vėžio ir kitų ligų plitimą.

Išradimo santrauka

Šis išradimas apima sintetinius peptidus, kurie gali efektyviai blokuoti vėžinių ląstelių atsiradimą. Šių agentų ir antikūnų prieš juos nauda yra galimybė juos panaudoti klinikoje vėžio atsiradimo ir metastazių blokavimui.

Šio išradimo tikslas yra pateikti sintetinį oligopeptidą, kurio aminorūgščių seka yra analogiška matricinei metalproteinazei 2 būdingai aminorūgščių sekai (85-92), kuri efektyviai blokuoja vėžio atsiradimą ir vėžio metastazes.

Šio išradimo tikslas yra pateikti sintetinius peptidus, kurie tinka vėžio atsiradimui ir metastazavimui blokuoti, turinčius aminorūgščių seką PRKPKWEDK.

Kitas šio išradimo tikslas yra sintetinių peptidų, aprašytų šioje paraiškoje, panaudojimo būdas vėžinių susirgimų prevencijai ir gydymui. Dar kitas šio įgyvendinimo aspektas yra tai, kad sintetinių peptidų efektyvus kiekis yra naudojamas vėžio atsiradimo ir metastazavimo blokada.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti oligopeptidą, turintį PRKPKWDK (SEQ ID: Nr.2).

Pageidautina, kad polipeptidas būtų iš maždaug 6-20 liekanų. Geriausia, kai polipeptidas yra iš maždaug 8-10 liekanų.

Pageidautina, kad sintetinio peptido koncentracija būtų nuo 1 μ M iki 500 μ M. Geriausia, kai sintetinio peptido koncentracija yra nuo 50 μ M iki 200 μ M.

Kitas šio išradimo tikslas yra imunogeninis oligopeptidas, kuris įeina į farmacinę kompoziciją, sudarytą iš farmaciniu požiūriu priimtino nešiklio ir oligopeptidų. Šis oligopeptidas gali būti naudojamas kaip vakcina. Oligopeptido turinti farmacinė kompozicija gali būti naudojama imuniniam atsakui prieš baltymo epitopą, kuriame yra šio oligopeptido seka (pvz. SEQ.ID.2), sukelti.

Kitas šio išradimo tikslas yra tai, kad kompozicijos ir būdai būtų realizuojami ir *in vivo*, ir *in vitro*.

Šiame išradime pateikiamas sintetinis oligopeptidas, turintis žmogaus MMP-2 analogišką aminorūgščių seką.

Šiame išradime taip pat pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija išimant vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų N-baigmės gale.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija išimant vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų C-baigmės gale.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija išimant vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų N-baigmės ir C-baigmės galuose.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija pakeičiant vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų duotoje sekoje, neatsižvelgiant į pakeistos liekanos krūvį ir poliškumą.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija pakeičiant vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų duotoje sekoje panašaus krūvio ir(arba) poliškumo aminorūgščių liekanomis.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija išimant vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų iš duotos sekos.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija įvedant dvi arba daugiau modifikacijas.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, modifikacija pakartojant oligopeptidų sekas vieną arba daugiau kartų, kur kiekviena iš jų yra kovalentiškai prijungta prie vienos arba daugiau kartojamų oligopeptidinių sekų.

Kitas šio išradimo tikslas yra sintetinių peptidų panaudojimas imunogenais antikūnams gaminti, kad tokie pasigaminę antikūnai galėtų efektyviai blokuoti vėžio atsiradimą ir metastazes.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas tiesioginiam arba konkurenciniam MMP-2 metabolinio veikimo arba sąveikos sumažinimui arba blokavimui, įvedant juos į veną arba kitu terapiniu požiūriu priimtiniu būdu.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas netiesioginiam MMP metabolinio veikimo arba sąveikos blokavimui, panaudojant juos kaip vakcinas poodiniu arba kitu terapiniu požiūriu

priimtinu būdu specifiniam imuniniam atsakui, kuris gali dalinai arba pilnai blokuoti MMP metabolinę sąveiką, stimuliuoti. Tinkamiausias įgyvendinimo variantas apima MMP-2.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas, kur oligopeptidai yra kopuliuoti su haptenuis imuniniam atsakui, o tuo pačiu ir terapiniam efektyvumui, sustiprinti.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas, kad oligopeptidai funkcionuotų kaip grįžtamojo ryšio reguliatoriai specifiniam MMP-2 baltymų sintezės ląsteliniame lygyje sustabdymui arba jos greičio sumažinimui.

Šiame išradime yra pateikiamas vienas arba daugiau oligopeptidų, kurie gali blokuoti vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, kaip vakcina specifiniams antikūnams, skirtiems ligos, kuri yra susijusi su MMP-2, diagnozavimui arba klinikiniam šios ligos progresavimo arba regresijos monitoringui, produkuoti.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, panaudojimas vėžio prevencijai ir gydymui.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, panaudojimas, kur šie oligopeptidai gali būti duodami pacientui kaip vakcina, injekcijomis, infuzija, inhaliaciniu būdu, kaip žvakutės arba su kitais farmaciniais nešikliais ir(arba) kitais įvedimo būdais.

Trumpas brėžinių aprašymas

FIG.1 pavaizduota MMP2 fermento aminorūgščių seka. Lengvesniam identifikavimui inhibicinio aktyvumo tyrimams pasirinktos aminorūgščių sekos apvestos rėmeliais. Etalonu buvo naudojama aminorūgščių seka TMRKPRCGNPDVAN (taip pat apvesta rėmeliu), kuri, kaip parodė kiti (Loitta and Associates), inhibuoja MMP2 aktyvumą.

FIG.2 parodytas įvairių tirtų oligopeptidų inhibicinių efektų palyginimas. Oligopeptidas PRKPKWDK labai efektyviai blokuoja vėžinių ląstelių įsiskverbimą naudojant matrigelio testą su žmogaus melanomos vėžinėmis ląstelėmis A2058.

FIG.3 parodytas oligopeptido PRKPKWDK inhibicinis poveikis blokuojant vėžinių ląstelių įsiskverbimą, naudojant matrigelio testą su žmogaus melanomos vėžinėmis ląstelėmis A2058.

FIG.4 parodytas oligopeptido PRKPKWDK inhibicinis poveikis blokuojant vėžinių ląstelių įsiskverbimą, naudojant matrigelio testą su žmogaus krūties vėžinėmis ląstelėmis MCF7.

Smulkus išradimo aprašymas

Apibrėžimai: Čia naudojamas terminas "peptidas" reiškia organinius junginius, susidedančius iš dviejų arba daugiau aminorūgščių, kovalentiškai sujungtų peptidinėmis jungtimis; peptidais gali būti dipeptidas (kuris turi dvi aminorūgščių liekanas), tripeptidas (tris aminorūgščių liekanas) ir t.t.

Čia naudojamas terminas "oligopeptidas" reiškia peptidą, kurio ilgis yra paprastai mažesnis nei 30 liekanų. Oligopeptidų ilgis šiam išradimui nėra lemiamas tol, kol yra išlaikomas tinkamas epitopas. Pageidautina, kad oligopeptidas būtų kaip galima mažesnis, kol dar išsilaiko iš esmės pilnas didelio oligopeptido biologinis aktyvumas ir kol jis veiksmingai blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazes.

Šioje paraiškoje "oligopeptidas" yra naudojamas pakaitomis su "sintetinis peptidas". Šiame išradime naudojami oligopeptidai yra "izoliuoti", bet "biologiškai gryni" sintetiniai peptidai.

Čia naudojami vienos raidės simboliai aminorūgščių liekanoms pažymėti yra: A (alaninas), R (argininas), N (asparaginas), D (asparto rūgštis), C (cisteinas), Q (glutaminas), E (glutamo rūgštis), G (glicinas), H (histidinas), I (izoleucinas), L (leucinas), K (lizinas), M (metioninas), F (fenilalaninas), P (prolinas), S (serinas), T (treoninas), W (triptofanas) ir Y (tirozinas).

Aminorūgščių pakeitimai yra paprastai vienos liekanos pakeitimas. Oligopeptidui gauti gali būti daromi pakeitimai, iškirpimai, įterpimai arba bet koks jų derinys. Konservatyvius aminorūgščių pakeitimus sudaro vienos aminorūgšties pakeitimas kita panašaus krūvio, dydžio ir/arba hidrofobiškumo aminorūgštimi, toks kaip, pavyzdžiui, glutamo rūgšties (E) pakeitimas asparto rūgštimi (D). Nekonservatyvius pakeitimus sudaro vienos arba daugiau aminorūgščių pakeitimas aminorūgštimis, turinčiomis nepanašų krūvį, dydį ir/arba hidrofobiškumą, toks kaip,

pavyzdžiui, glutamo rūgšties (E) pakeitimas valinu (V). Šis išradimas apima konservatyvius oligopeptido pakeitimus pakeitimų, iškirpimų, įterpimų arba bet kokio jų derinio požiūriu tol, kol iš esmės nepakinta jo vėžinių ląstelių atsiradimo ir metastazių blokavimo efektyvumas.

Rath ir kt. (J. Applied Nutr. 44:62-69, 1992; J. Orthomolecular Med. 8:11-20, 1993) padarė prielaidą, kad didelio hidrofiliškumo maksimumo ir konformacijos bei elektrinio krūvio oligopeptidų sekos gali tarpininkauti įvairių ligų patogenezėje. Pagal šią prielaidą, pasirinktos MMP fermento aminorūgščių sekos gali blokuoti fermento poveikį prisijungdamos prie substrato komplementarios sekos. Ši koncepcija visiškai skiriasi nuo koncepcijos, kurią detalizavo Liota ir bendraautoriai (U.S. Pat. No. 5,372,809), kurioje oligopeptidas blokuoja cinko molekulę fermente. Eksperimentiniai duomenys, rodantys, kad įvairių tipų baltymų kompleksai ląstelėse gali modifikuoti baltymų aktyvumą ląstelėje (Gavin ir bendraautoriai, Nature 415:141-147, 2002) iš esmės patvirtina šį postulatą. Čia cituoti literatūros šaltiniai yra pridedami pilnos apimties.

Šiame išradime mes identifikavome galimas oligopeptidų sekas MMP-2 aminorūgščių sekoje ir radome, kad šios oligopeptidų sekos veiksmingai stabdo MMP-2 funkcinį aktyvumą, naudojant *in vitro* vėžinių ląstelių įsiskverbimą į ECM kaip tyrimo modelį.

Neapsiribojant kokia nors teorija arba mechanizmu, šiame išradime yra pateikiami oligopeptidai, kurie gali efektyviai blokuoti vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazes.

Vienas veikimo mechanizmas gali būti tai, kad MMP-2 prisijungia prie tikslinių ECM molekulių per specifines surišimo vietas. Tokiu būdu blokuojant šias surišimo vietas galima išvengti MMP-2 susirišimo su ECM substrato molekulėmis, sulaukyti ECM destrukciją ir taip išvengti vėžio ir kitų ligų išpildymo organizme.

MMP-2 fermente buvo identifikuota keletas surišimo vietų; šiame išradime pateikiama, kad sintetiniai šių oligopeptidų sekų analogai veiksmingai apsaugo nuo ECM destrukcijos. Buvo parodyta, kad vienas iš terapinių oligopeptidų yra PRKPKWDK, kuris inhibuoja vėžinių ląstelių įsiskverbimą maždaug 90 %.

Be to, šiame išradime pateikiamas šio oligopeptido terapinis panaudojimas kitoms su MMP susijusioms ligoms. Kadangi MMP-2 gali naudoti tas pačias vietas susirišimui su jos tikslinėmis molekulėmis ECM-oje, šiame išradime aprašytas

oligopeptidas gali taip pat stabdyti kitas ligas. Taigi, čia aprašytų oligopeptidų prevencinis ir terapinis panaudojimas neapsiriboja vėžiu, bet jie taip pat gali būti naudojami širdies ir kraujagyslių ligos ir kitų patologinių būklių, kurios yra susiję su ECM destrukcija veikiant MMP, atveju. Šie oligopeptidai gali būti įvedami pacientams kaip vakcina, injekcijų, infuzijų, inhaliacijų, žvakučių pavidalu arba su kitais farmaciškai priimtinais nešikliais ir/arba naudojant kitas įvedimo priemones.

Šio išradimo peptidų ir kompozicijų įvedimo būde yra naudojama daugybė žinomų vartojimo būdų, tokių kaip peroralinis, i.v., subkutaninis, transkutaninis ir vietinis vartojimo būdai. Tinkamiausiame šio išradimo būde yra naudojamos farmacinės kompozicijos parenteriniam įvedimui.

Šiame išradime yra pateikiami oligopeptidai, kurie taip pat gali būti naudojami kaip vakcinos sukelti antikūnams, skirtiems panaudoti ligų, kuriose dalyvauja MMP (ypatingai MMP-2), diagnozei, o taip pat klinicinei tokios ligos progresavimo arba regresijos kontrolei analizuojant kraują arba naudojant kitus tinkamus diagnostinius testus.

Šiame išradime realizuojami sintetiniai peptidai, kurie veiksmingai blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą. Tokių agentų ir antikūnų prieš juos privalumai yra galimybė juos pritaikyti klinikoje vėžio atsiradimo ir metastazių prevencijai ir gydymui. Geriau, kai vėžio atsiradimo ir metastazių blokavimui yra naudojami sintetiniai oligopeptidai, kurie turi SEQ ID.2 aminorūgštis. Dar geriau, kai vėžio atsiradimo ir metastazių blokavimui naudojami sintetiniai oligopeptidai yra įterpti farmacinėje kompozicijoje.

Oligopeptidas gali būti iš maždaug 6-20 liekanų. Geriau, kad oligopeptidas būtų iš maždaug 8-10 liekanų. Visų geriausia, kad sintetinis oligopeptidas būtų 8 aminorūgščių liekanų ilgio.

Pageidautina, kad sintetinių peptidų koncentracija būtų nuo 1 μM iki 500 μM . Geriausia, kai sintetinių peptidų koncentracija yra nuo 50 μM iki 200 μM .

Kitas šio išradimo tikslas yra šių sintetinių peptidų panaudojimas imunogenais antikūnams generuoti taip, kad tokie generuoti antikūnai galėtų efektyviai blokuoti vėžio atsiradimą ir metastazes.

Pageidautina, kad sintetinio oligopeptido ilgis būtų 8 aminorūgščių liekanos. Kitas šio išradimo tikslas yra imunogeninis oligopeptidas, kuris yra įterptas į farmacinę kompoziciją, susidedančią iš farmaciniu požiūriu priimtino nešiklio ir

oligopeptidų. Oligopeptidas gali būti naudojamas kaip vakcina. Oligopeptido turinti farmacinė kompozicija gali būti naudojama imuniniam atsakui sukelti prieš baltymą, kuris apima epitopą, turintį šio oligopeptido seką (pvz. SEQ.ID.2).

Kitas šio išradimo tikslas yra tai, kad kompozicijos ir būdai būtų realizuojami *in vivo*, ir *in vitro*.

Šiame išradime yra pateikiamas sintetinis oligopeptidas, turintis aminorūgščių seką, analogišką aminorūgščių sekai, esančiai žmogaus MMP-2 baltyme.

Sintetinio oligopeptido amino- ir(arba) karboksi-gale gali būti atitinkamai aminogrupė ($-NH_2$) arba karboksigrupė ($-COOH$). Kitu atveju oligopeptido amino-galas gali, pavyzdžiui, reikšti hidrofobinę grupę, įskaitant, bet neapsiribojant, karbobenzilo, dansilo, t-butoksikarbonilo, dekanolio, naftolio arba kitą karbohidrato grupę; acetilo grupę, 9-fluorenilmetoksikarbonilo (Fmoc) grupę; arba modifikuotą, negamtinės aminorūgšties liekaną. Kitu atveju oligopeptido karboksi-galas gali, pavyzdžiui, reikšti amidogrupę; t-butoksikarbonilo grupę; arba modifikuotą, negamtinės aminorūgšties liekaną. Kitu atveju, šis išradimas apima sintetinius oligopeptidus, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazes, su išimta amino liekana N-baigmės gale arba C-baigmės gale. Šiame išradime taip pat pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazes, modifikacija pakeičiant aminorūgšties liekaną duotoje sekoje neatsižvelgiant į pakeičiamos liekanos krūvį ir poliškumą.

Reikėtų suprasti, kad šis išradimas taip pat apima peptidinius analogus, kuriuose vienas arba daugiau amidinių ryšių gali būti pakeisti neamidiniu ryšiu, geriausia pakeistu amidu arba amido izostere. Taigi, nors aminorūgščių liekanos peptiduose paprastai yra aprašomos išreiškiant aminorūgštimis ir tinkamiausiuose šio išradimo įgyvendinimo variantuose duodami peptidų pavyzdžiai, specialistas supras, kad neamidinių ryšių turinčiuose įgyvendinimo variantuose čia naudojamas terminas "aminorūgštis" arba "liekana" reiškia kitas bifunkcines liekanas, turinčias grupes, kurių struktūra yra panaši į šonines aminorūgščių grandines. Be to, aminorūgščių liekanos gali būti blokuotos arba neblokuotos.

Šiame išradime pateikiama oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazes, modifikacija pakartojant oligopeptidų sekas vieną arba daugiau kartų, kur kiekviena iš jų yra kovalentiškai prijungta prie vienos arba daugiau kartojamų oligopeptidinių sekų.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas tiesioginiam arba konkurenciniam MMP-2 metabolinio veikimo arba sąveikos sumažinimui arba blokavimui, įvedant juos į veną arba kitu terapiniu požiūriu priimtiniu būdu.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas netiesioginiam MMP metabolinio veikimo arba sąveikos blokavimui, panaudojant juos kaip vakcinas poodiniu arba kitu terapiniu požiūriu priimtiniu būdu specifiniam imuniniam atsakui, kuris gali dalinai arba pilnai blokuoti MMP metabolinę sąveiką, stimuliuoti. Tinkamiausias įgyvendinimo variantas apima MMP-2.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas, kur oligopeptidai yra kopuliuoti su haptenuis imuniniam atsakui, o tuo pačiu ir terapiniam efektyvumui, sustiprinti.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų prevencinis arba terapinis panaudojimas, kad oligopeptidai funkcionuotų kaip grįžtamojo ryšio reguliatoriai specifiniam MMP-2 baltymų sintezės ląsteliniame lygyje sustabdymui arba jos greičio sumažinimui.

Šiame išradime yra pateikiamas vienas arba daugiau oligopeptidų, kurie gali blokuoti vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, kaip vakcina specifiniams antikūnams, skirtiems susijusios su MMP-2 ligos diagnozavimui arba klinikiniam šios ligos progresavimo arba regresijos monitoringui, produkuoti.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų, kurie blokuoja žmogaus ligą, įskaitant, bet neapsiribojant, vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, panaudojimas vėžio prevencijai arba gydymui; pavyzdžiui, infekcinių ligų, širdies ir kraujagyslių ligų ir degeneracinių ligų prevencijai arba gydymui.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, panaudojimas ligų, kuriose dalyvauja MMP-2, prevencijai arba gydymui.

Šiame išradime yra pateikiamas vieno arba daugiau oligopeptidų, kurie blokuoja vėžinių ląstelių atsiradimą ir metastazavimą, panaudojimas, kur šie oligopeptidai gali būti įvedami pacientui kaip vakcina, injekcijomis, infuzijomis, inhaliacijomis, kaip žvakutės arba su kitais farmaciniais nešikliais ir(arba) kitais įvedimo būdais.

Šio išradimo kompozicijos gali būti peptido arba peptidų derinių su bent vienu kitu agentu, tokiu kaip stabilizuojantis junginys, formos, kurios gali būti įvedamos bet kokiame steriliame biosuderinamame farmaciniame nešiklyje, įskaitant, bet neapsiribojant, fiziologinį druskos tirpalą, buferinį druskos tirpalą, dekstrozę ir vandenį. Kompozicijas pacientas gali vartoti vienas arba derinyje su kitais agentais, vaistais arba hormonais. Farmaciniu požiūriu priimtini nešikliai taip pat gali apimti pagalbines ir papildomas medžiagas, kurios palengvina veikliojo junginio pavertimą preparatu, kuris gali būti naudojamas farmacijoje. Kitos receptūrų ir vartojimo metodikų detalės gali būti rastos vėliausiame "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton, Pa. leidinyje, kurio turinys pridedamas kaip literatūros šaltinis. Farmacinės kompozicijos gali būti pateikiamos druskų pavidalu ir gali būti sudaromos su daugeliu rūgščių, įskaitant, bet neapsiribojant, hidrochlorido, sulfato, acto, pieno, vyno, obuolių, gintaro ir t.t. Druskos linkę geriau tirpti vandeniniuose arba kituose protoniniuose tirpikliuose nei atitinkamos laisvų bazių formos.

Šiame išradime yra pateikiami oligopeptidai, kurie taip pat gali būti naudojami kaip vakcinos sukelti antikūnams, skirtiems panaudoti ligų, kuriose dalyvauja MMP (ypatingai MMP-2), diagnozei, o taip pat klinikinei tokios ligos progresavimo arba regresijos kontrolei analizuojant kraują arba naudojant kitus tinkamus diagnostinius testus.

Toliau duodami pavyzdžiai yra skirti išradimo praktikai pailustruoti ir nelaikoma, kad jie apriboja šį išradimą.

Oligopeptidų sekos

Didelio hidrofiliškumo maksimumo MMP-2 aminorūgščių seka, praturtinta krūvį turinčiomis aminorūgštimis, buvo identifikuota panaudojant kompiuterinę programą. Šio išradimo oligopeptidai gali būti sintezuojami arba pagaminami pagal specialistams gerai žinomas metodikas (Žr., pavyzdžiui, Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y.), kuris čia duodamas kaip literatūros šaltinis pilnos apimties. Šiame išradime pagaminti ir naudoti oligopeptidai yra išvardinti 1 lentelėje.

Šių oligopeptidų įsiskverbimas į matrigelį ir įvairių vėžinių ląstelių migracija per matrigelio membraną buvo įvertinta panaudojant "pagerintą skverbimosi per matrigelį kamerą" (Becton Dickinson, JAV). Etaloniniu standartu oligopeptidams buvo naudojamas oligopeptidas TMRKPRCONPDVAN, kuris, kaip parodė Liotta ir bendraautoriai, pasižymi anti-MMP-2 aktyvumu.

1 lentelė: Įvairios oligopeptidų sekos, identifikuotos ir naudotos šiuose tyrimuose

Oligopeptidas	Sekos numeris
GDVAPKTDKE	SEQ ID. 1
PRKPKWDK	SEQ ID. 2
EDYDRDKKY	SEQ ID. 3
GRSDGLM	SEQ ID. 4
NYDDDRKW	SEQ ID. 5
LPPDVQRVD	SEQ ID. 6
RYNEVKKKMDP	SEQ ID. 7

Bendros eksperimento sąlygos

Identifikuoti oligopeptidai buvo sintezuoti įprastu būdu. Po to jie buvo naudojami skverbimosi per matrigelį tyrimuose.

(a). Skverbimos per matrigelį tyrimai

Šie tyrimai buvo atlikti panaudojant "pagerintas skverbimosi per matrigelį kameras" (Becton Dickinson, JAV).

Tyrimuose su žmogaus melanomos ląstelėmis žmogaus fibroblastai – NHDF (Clonetics) buvo pasėti ant "Matrigel" įdėklo ir laikyti tol, kol buvo pasiektas susiliejimas. Tai buvo atlikta tam, kad būtų galima artimai imituoti *in vivo* sąlygas, apsupančias vėžines ląsteles organizme. Po to ant įdėklo buvo pasėtos žmogaus melanomos ląstelės A2058. Į kamerą pridėta kondicionuotos terpės nuo fibroblastų kultūros su įvairiais pasirinkto oligopeptido kiekiais. Sistema buvo inkubuojama maždaug 24 valandas. Šio laikotarpio pabaigoje viršutinio dominančio paviršiaus ląstelės buvo nubraukiamos. Ląstelės, kurios įsiskverbė į matrigelio membraną ir nukeliavo į žemesnį įdėklo paviršių buvo nudažytos "quick stain" dažais ir suskaičiuotos po mikroskopu. Inhibicijos procentai buvo apskaičiuoti iš skaičiaus ląstelių, kurioms nepavyko pereiti per membraną, lyginant su kontrole ("0" kiekis

oligopeptido). Kontrolės inhibicinis aktyvumas buvo priimamas už "0". Šiek tiek terpės iš įsiskverbimo tyrimų buvo pasiliekiama zimogramų tyrimams.

Tyrimuose su žmogaus krūties vėžio ląstelėmis MCF7 metodika buvo iš esmės panaši į metodiką, naudotą melanomos ląstelių atveju, išskyrus tai, kad vietoj NHDF buvo naudojami MRC5 (ATCC) fibroblastai.

Tyrimuose su žmogaus krūties vėžio ląstelėmis MDA-MB 231 fibroblastų MRC5 (ATCC) ląstelės buvo paskleistos duobutėse. Likusi metodikos dalis buvo tokia pat, kaip ir tyrimuose su MCF7 ląstelėmis.

(a) Zimogramų tyrimai

Terpė (25-30 μ l) iš įvairių įsiskverbimo tyrimų duobučių buvo užpilta ant "Novex" zimogramų gelių (Invitrogen). Geliai buvo ryškinami ir nudažomi pagal gamintojo rekomendacijas. Matricinės metalproteinazės (MMP) buvo identifikuotos remiantis jų žinomomis molekulinėmis masėmis.

1 pavyzdys

Įvairių oligopeptidinių sekų inhibicinis poveikis į melanomos ląstelių A2058 skverbimąsi ir migraciją per matrigelį

Buvo tirtas 7 oligopeptidų (jų aminorūgščių sekos duotos 1 lentelėje) inhibuojantis poveikis į žmogaus melanomos vėžinių ląstelių įsiskverbimą. PRKPKWDK aminorūgščių seką turintis oligopeptidas rodė blokavimo aktyvumą. TMRKPRCGNPDVAN seką turintis oligopeptidas rodė maždaug 11 % inhibavimą, lyginant su 73 %, kurį rodė PRKPKWDK (Fig.1).

Oligopeptidas VI, turintis aminorūgščių seką LPPDVQRVD, taip pat turėjo tam tikrą blokavimo aktyvumą (t.y. apie 20 %). Oligopeptidas "I", turintis aminorūgščių seką GDVAPKTDKE, nerodė jokio aktyvumo iki 100 μ m koncentracijos (Fig.2 neparodyta), lyginant su 63 %, kuriuos rodo tokios pat koncentracijos PRKPKWVDK.

2 pavyzdys

PRKPKWDK oligopeptido inhibicinis poveikis į melanomos A2058 ląstelių skverbimąsi ir migraciją per matrigelį

Šiuose tyrimuose PRKPKWDK koncentracija terpėje buvo tarp 0 ir 150 μM . Matyti, kad oligopeptidas didėjančiai inhibuoja melanomos ląstelių įsiskverbimą (Fig.3) nuo maždaug 37 % esant 50 μM koncentracijai iki 73 %, esant 150 μM koncentracijai.

Matrigelio membrana yra analogiška ECM ir vėžinių ląstelių sugebėjimas prasibrauti ir nukeliauti į kitą membranos pusę atvaizduoja vėžinių ląstelių sugebėjimą sukelti metastazes organizme. Šis oligopeptidas gali žymiai sumažinti trijų skirtingų tipų vėžinių ląstelių įsiskverbimą. Šioje tyrimų sistemoje aktyvumas yra nukreiptas prieš ECM. Mes darome išvadą, kad todėl mūsų tyrimai aiškiai rodo, kad oligopeptidas gali sulaikyti ECM degradaciją organizme ir tokiu būdu daryti priešingą poveikį ligų, kuriose ECM suirimas yra pagrindinis pažeidimas, progresavimą.

3 pavyzdys

Šiuose tyrimuose buvo nustatyti PRKPKWDK inhibiciniai poveikiai į žmogaus krūties vėžinių ląstelių MCF7 (ATCC) įsiskverbimą į matrigelį ir migraciją. Kaip ir melanomos ląstelių atveju šis oligopeptidas inhibavo vėžinių ląstelių atsiradimą. Inhibicija, esant 150 μM koncentracijai, buvo apie 70 %. Ji padidėjo iki 90 %, esant 200 μM koncentracijai (fig.4).

4 pavyzdys

Šiuose tyrimuose buvo nagrinėjamas PRKPKWDK inhibicinis aktyvumas bandyme su kita žmogaus krūties ląstelių linija MDA-MB-231. Inhibavimas, esant 150 μM koncentracijai, buvo apie 94 %.

5 pavyzdys

Toliau mes tyrėme, ar šie oligopeptidai gali trukdyti fermento poveikiui po jo sekrecijos. Zimogramų tyrimai neparodė jokio PRKPKWDK inhibicinio poveikio į įvairių vėžinių ląstelių išskiriamos MMP-2 kiekį.

Buvo aprašyta keletas šio išradimo įgyvendinimo variantų. Vis dėlto, reikėtų suprasti, kad gali būti padarytos įvairios modifikacijos nenukrypstant nuo išradimo prasmės ir sferos. Taigi, kiti įgyvendinimo variantai įeina į šio pateikiamo išradimo apimtį.

Nors pateiktas aprašymas yra gana smulkus, sekos yra pateiktos paaiškinimui, ir nėra apribojančios. Aukščiau aprašytos technologijos modifikacijos ir patobulinimai, įskaitant ekvivalentus, kurie įeina į veikimo sritį ir šios srities galimybes, yra pateikti pridedamoje apibrėžtyje. Specialistai turėtų suprasti, kad gali būti padaryta įvairiausių modifikacijų, pakeitimų ir atmainų aukščiau duoto aprašymo specifikos požiūriu nenukrypstant nuo čia aprašyto išradimo koncepcijos. Pavyzdžiui, čia aprašytų pagrindinių sekų modifikacijos (tiek cheminės, tiek ir fermentinės) taip pat patenka į išradimo sferą. Pavyzdžiui, aprašyta seka gali būti dipeptidas arba tripeptidas. Be to, aprašytos sekos gali būti modifikuotos įvedant šią liekaną peptidų amino- arba karboksi-galuose. Sekos taip pat gali būti chemiškai modifikuotos jų aktyvumui padidinti (pvz. sekos dalies karboksi-galo amidinimas). Peptidai gali būti chemiškai modifikuoti jų aktyvumui padidinti (pvz. sekos dalies karboksi-galo amidinimas arba glicino arba alanino liekanos įvedimas kuriame nors gale). Taigi, reikėtų suprasti, kad gali būti padarytos įvairios modifikacijos nenukrypstant nuo šio išradimo prasmės ir sferos, ir kad tokie pakeitimai turi būti laikomi įeinantys į šio išradimo apimtį, kaip išdėstyta toliau duodamoje apibrėžtyje.

Išradimo apibrėžtis

1. Oligopeptidas, apimantis oligopeptido seką, parinktą iš grupės, susidedančios iš:

- a) oligopeptido sekos, parodytos SEQ ID Nr. 2 arba 6;
- b) oligopeptido, gebančio indukuoti imuninį atsaką prieš SEQ ID Nr. 2 epitopą;
- c) oligopeptido sekos iš 8-10 aminorūgščių ilgio, apimančios bet kurią iš a) arba b) sekų;
- d) oligopeptido sekos, apimančios oligopeptido seką iš bet kurios a) – c) dalies, kur viena ar daugiau aminorūgščių yra pakeistos aminorūgštimis, turinčiomis panašų krūvį, dydį ir/arba hidrofobiškumo charakteristikas, su sąlyga, kad oligopeptido seka geba blokuoti vėžio ląstelių invaziją ir metastazes;
- e) oligopeptido sekos, apimančios oligopeptido seką iš bet kurios a) – c) dalies, kur N- arba C—gale yra praleista aminorūgšties liekana, su sąlyga, kad oligopeptido seka geba blokuoti vėžio ląstelių invaziją ir metastazes; ir
- f) oligopeptido sekos, apimančios oligopeptido sekos pagal bet kurią iš a) – e) dalies vieną arba daugiau pasikartojimų, surištų vienas su kitu kovalentiniu būdu.

2. Oligopeptidas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas oligopeptidas yra sujungtas su haptenais, stiprinančiais imuninį atsaką.

3. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima oligopeptidą pagal 1 arba 2 punktą.

4. Diagnostinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima oligopeptidą pagal 1 arba 2 punktą.

5. Vakcina, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima oligopeptidą pagal 1 arba 2 punktą.

6. Oligopeptido pagal 1 arba 2 punktą panaudojimas gamyboje farmacinės kompozicijos, skirtos vėžio infekcinių ligų, širdies ir kraujagyslių ligų, degeneracinių

ligų arba patologinių būklių, susijusių su ECM skaldymu MMP-ėmis, prevencijai arba gydymui.

7. Panaudojimas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta farmacinė kompozicija skiriama pacientui kaip vakcina, kaip injekcija, infuzija, inhaliacija arba žvakutė.

8. Panaudojimas pagal 6 arba 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto oligopeptido koncentracija kompozicijoje yra 1-500 μM arba 50-200 μM intervale.

1	A	P	S	P	I	I	K	F	P	G	D	V	A	P	K	T	D	K	E	L	A	V	Q	L	F	F	Q	Y	L	P	N	T	F	Y	G
31	C	P	K	N	S	E	T	Q	D	P	W	E	F	L	K	D	T	L	K	K	M	Q	N	A	V	F	F	L	P	Q	T	G	D	L	
61	D	Q	N	N	N	T	I	S	I	V	F	T	T	D	L	N	P	C	T	P	A	D	E	T	I	M	V	D	D	F	A	G	D	F	
91	D	K	N	S	S	Q	I	I	I	V	T	Y	T	T	D	L	N	P	C	T	P	A	D	E	T	I	M	V	D	D	F	A	G	D	
121	V	W	N	S	Y	L	K	G	Y	C	S	E	T	S	A	S	T	H	T	A	S	T	G	G	L	R	I	F	I	G	R	S	D	G	L
151	D	E	L	K	G	Y	C	S	E	T	S	A	S	T	H	T	A	S	T	G	G	L	R	I	F	I	G	R	S	D	G	L	R	S	
181	D	E	L	K	G	Y	C	S	E	T	S	A	S	T	H	T	A	S	T	G	G	L	R	I	F	I	G	R	S	D	G	L	R	S	
211	N	G	Y	C	S	E	T	S	A	S	T	H	T	A	S	T	G	G	L	R	I	F	I	G	R	S	D	G	L	R	S	D	G	L	
241	K	Y	C	S	E	T	S	A	S	T	H	T	A	S	T	G	G	L	R	I	F	I	G	R	S	D	G	L	R	S	D	G	L	R	
271	T	S	Y	C	S	E	T	S	A	S	T	H	T	A	S	T	G	G	L	R	I	F	I	G	R	S	D	G	L	R	S	D	G	L	
301	G	F	Y	C	S	E	T	S	A	S	T	H	T	A	S	T	G	G	L	R	I	F	I	G	R	S	D	G	L	R	S	D	G	L	
331	Y	E	P	M	I	U	T	W	A	F	I	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		
361	C	L	D	Q	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	
391	L	D	Q	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	
421	D	Q	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	
451	Q	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	
481	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	
511	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	
541	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	
571	P	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	
601	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	
631	C	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		

Fig.1. MMP2 fermento aminorūgščių seka.
Identifikacijai palengvinti atrinktos sekos apvestos rėmeliais

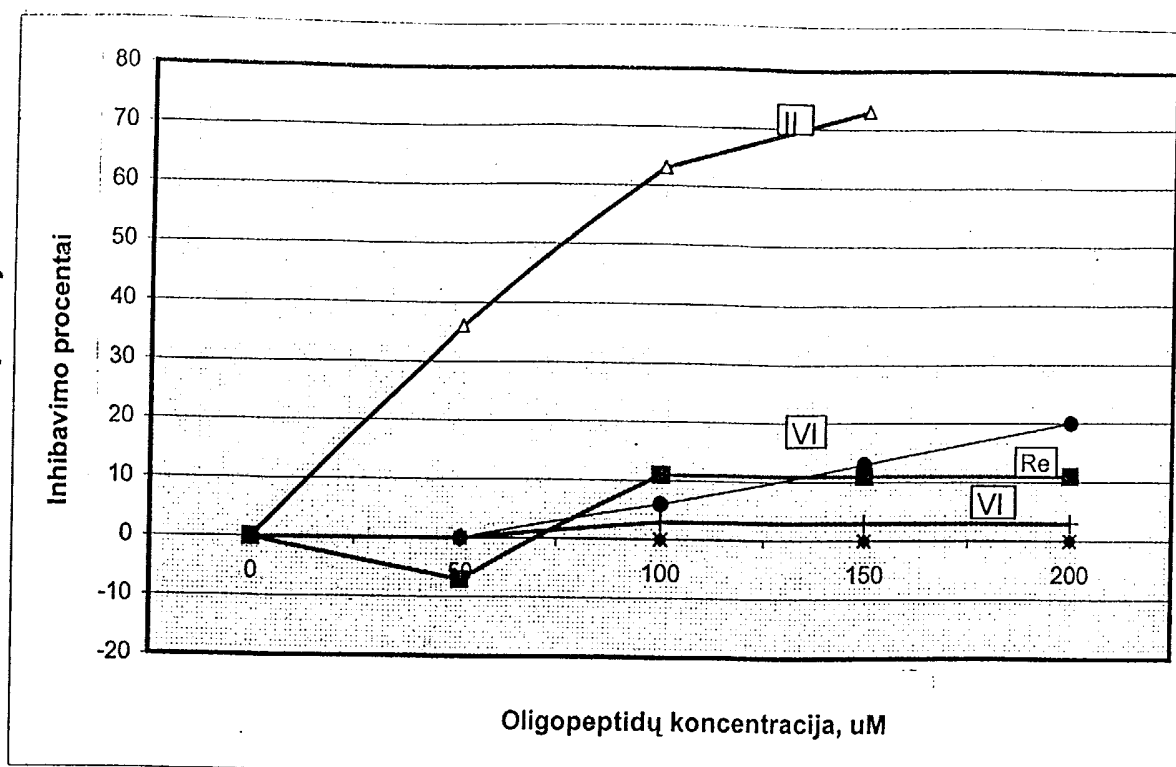


Fig.2. MMP2 atrinktų sekų atrinktų oligopeptidų inhibavimo aktyvumo palyginimas: II – PRKPKWDK; III – EDYDRDKKY; IV – GRSDGLM; V – NYDDDRKW; VII – RYNEVKKKMDP; Ref. – TMRKPRCGNPDVAN

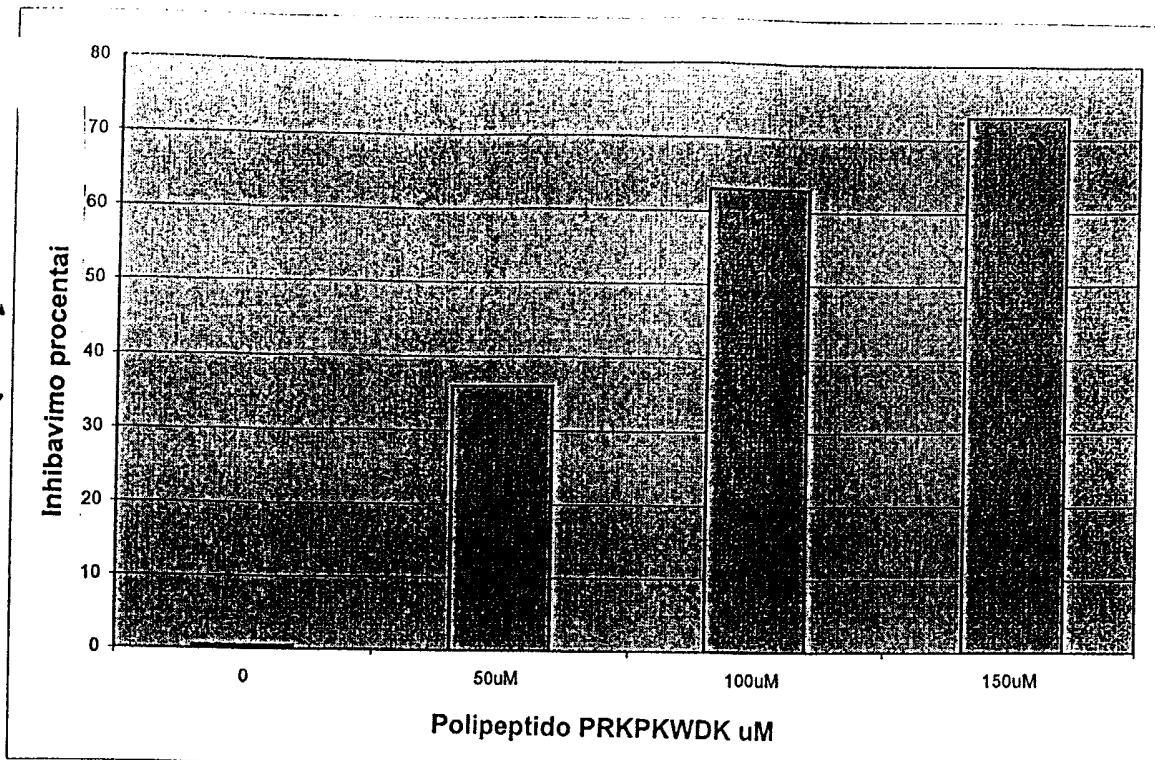


Fig.3. Polipeptido PRKPKWDK inhibicinis poveikis į žmogaus melanomos ląstelių A2058 įsiskverbimą ir keliavimą per matrigelį

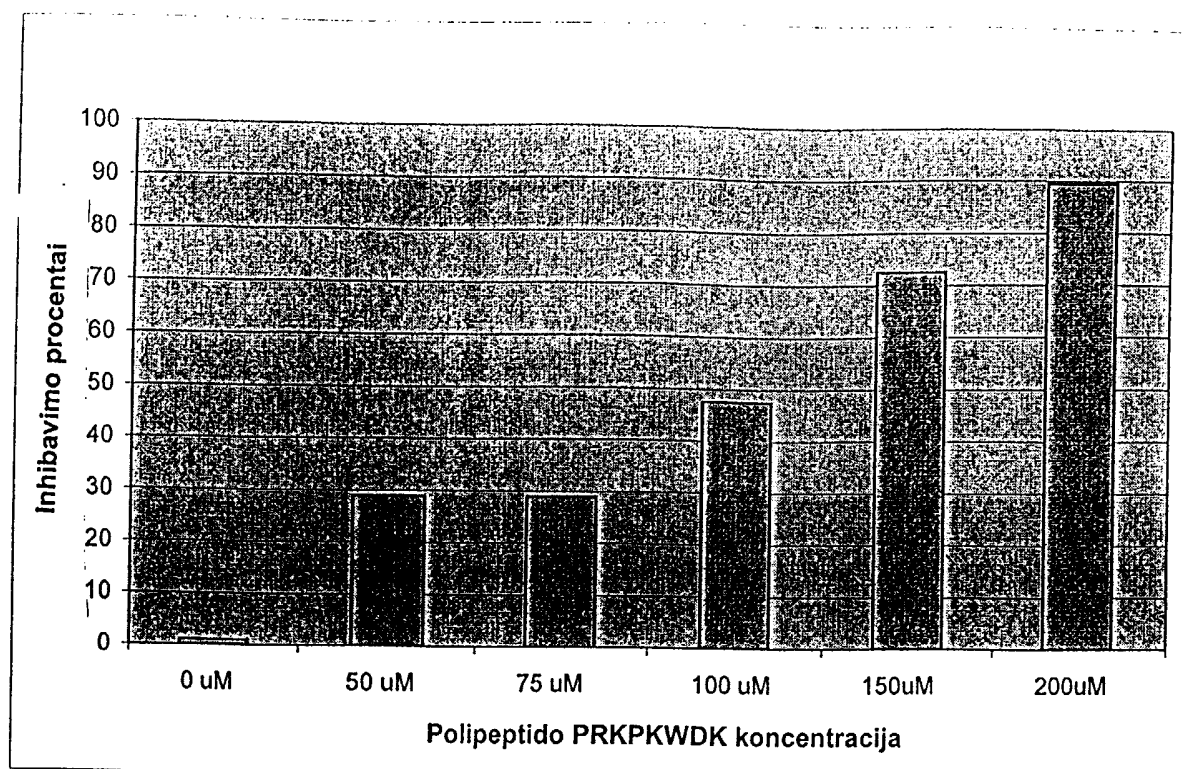


Fig.4. Polipeptido PRKPKWDK inhibicinis poveikis į žmogaus krūties vėžinių ląstelių MCF7 įsiskverbimą ir keliavimą per matrigelį