



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007115411/04, 22.09.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
22.09.2005

(30) Конвенционный приоритет:  
24.09.2004 CU 2004-0207

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2008

(45) Опубликовано: 20.07.2009 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2199548 C2, 27.03.2003. WO 9711966 A1, 03.04.1997. WO 0143691 A2, 21.06.2001. RAMMENSEE HANS-GEORG; ET AL "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs", IMMUNOGENETICS, 1999, v.50, №3-4, p.213 -219. SINGH H; RAGHAVA G P S "ProPred: prediction of HLA-DR binding sites", BIOINFORMATICS, 2001, v.17, №12, p. (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 24.04.2007

(86) Заявка РСТ:  
CU 2005/000008 (22.09.2005)

(87) Публикация РСТ:  
WO 2006/032216 (30.03.2006)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.лов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ДОМИНГЕС ОРТА Мария Дель Кармен (CU),  
ПАДРОН ПАЛОМАРЕС Габриэль Рамон (CU),  
ЛОПЕС МАРИН Нелия (CU),  
ЛОРЕНСО ПЕРЕС Норайлис (CU),  
БАРБЕРА БЕТАНКУРТ Ариана (CU),  
ЭРНАНДЕС ГАРСИЯ Ариадна (CU),  
МОРЕРА КОРДОВА Вивиан (CU),  
КОСМЕ ДИАС Карелия (CU),  
МЕРИНО ГАРСИА Нельсон Х. (CU),  
ВАСКЕС БОНАЧЕА Ариель (CU),  
СУАРЕС АЛЬБА Хосе (CU)

(73) Патентообладатель(и):

СЕНТРО ДЕ ИНЖЕНЬЕРИЯ ГЕНЕТИКА  
И БИОТЕХНОЛОГИА (CU)

(54) ПЕПТИДЫ HSP60 И ИХ APL-ПРОИЗВОДНЫЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

(57) Реферат:

Предложены пептиды белка теплового шока человека 60 кДа, которые представляют собой эпитопы для Т-клеток, а также их пептидные производные, которые модифицированы по участкам контакта с молекулами МНС, способные индуцировать механизмы периферической толерантности, в

частности механизмы анергии или механизмы, опосредуемые клонами регуляторных Т-клеток у пациентов с ревматоидным артритом. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим указанные пептиды для лечения ревматоидного артрита. 6 н. и 3 з.п. ф-лы, 14 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

1236-1237. QUINTANA F J; ET AL "DNA Fragments of the human 60-kDa Heat Shock Protein (HSP60) Vaccinate Against Adjuvant Arthritis: Identification of Regulatory YSP60 Peptide". JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 2003, v.171, №7, p.3533-3541. PRAKKEN B J; ET AL "Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA 2004, v.101, №12, p.4228-4233. KAMPHUIS S S; ET AL "V1.2 TECOGNITION OF MULTIPLE HSP60 EPITOPES IN PATEINTS WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS OPENS THE WAY FOR ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY", ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, 2001, v.60, Suppi 2, p.II-7-II-15. JOOSTEN I; ET AL "Direct binding of autoimmune disease related T cell epitopes to purified Lewis rat MHC class II molecules", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, 1994, v.6, №5, p.751-759. REIZIS B; ET AL "The peptide binding specificity of the MHC class II I-A molecule of the Lewis rat, RT1.B<sup>I</sup>", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, 1996, v.8, №12, p.1825-1832.

R U 2 3 6 1 8 7 7 C 2

R U 2 3 6 1 8 7 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007115411/04, 22.09.2005**

(24) Effective date for property rights:  
**22.09.2005**

(30) Priority:  
**24.09.2004 CU 2004-0207**

(43) Application published: **27.10.2008**

(45) Date of publication: **20.07.2009 Bull. 20**

(85) Commencement of national phase: **24.04.2007**

(86) PCT application:  
**CU 2005/000008 (22.09.2005)**

(87) PCT publication:  
**WO 2006/032216 (30.03.2006)**

Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**DOMINGES ORTA Marija Del' Karmen (CU),  
PADRON PALOMARES Gabriehl' Ramon (CU),  
LOPES MARIN Nelija (CU),  
LORENZO PERES Norajlis (CU),  
BARBERA BETANKURT Ariana (CU),  
EhRNaNDES GARSIJa Ariadna (CU),  
MORERA KORDOVA Vivian (CU),  
KOSME DIAS Kareljia (CU),  
MERINO GARSIA Nel'son Kh. (CU),  
VASKES BONACHEA Ariel' (CU),  
SUARES AL'BA Khose (CU)**

(73) Proprietor(s):

**SENTRO DE INZhEN'ERIA GENETIKA I  
BIOTEKNOLOGIA (CU)**

(54) **HSP60 PEPTIDES AND THEIR APL-DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: proposed are 60 kDa human heat shock protein peptides, which are an epitope for T-cells, as well as their peptide derivatives, which are modified on sections for contact with MHC molecules, capable of inducing peripheral tolerance mechanisms, particularly energy mechanisms or

mechanisms, mediated by clones of T-cells in patients with rheumatoid arthritis. This invention also relates to pharmaceutical compositions containing the said peptides for treating rheumatoid arthritis.

EFFECT: increased effectiveness of compositions and treatment method.

9 cl, 14 dwg, 18 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к пептидам белка теплового шока человека 60 кДа (сокращенно *hHsp60*) и полученным из них измененным пептидным лигандам (сокращенно APL). Кроме того, изобретение связано с фармацевтическими  
5 композициями для лечения ревматоидного артрита (РА), включающими указанные пептиды.

Уровень техники

РА - аутоиммунная болезнь неизвестной этиологии, которая затрагивает приблизительно 1% мирового населения. Это - синдром, характеризующийся  
10 хроническим воспалением суставов, хотя могут также наблюдаться системные явления. Эта болезнь начинается с воспаления синовиальной мембраны и часто вызывает эрозийное разрушение смежного хряща и кости, которое приводит к умеренной нетрудоспособности 80% пациентов и ранней смертности (Moctezuma J.F. (2002) Manifestaciones articulares de la Artritis Reumatide. Revista Mexicana de Reumatologia  
15 17:211-219). РА может проявляться в любом возрасте, без различий расовых или этнических групп, но максимальная частота возникновения указанного заболевания встречается между 25 и 55 годами. Среди людей с РА женщины опережают мужчин в пропорции три к одному (Emery P. (2002). Early referral recommendation for newly  
20 diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of to clinical guide. Ann Rheum Dis. 61:290-297).

Причина РА неизвестна. Это - болезнь, которая включает присутствие генетических, экологических, иммунологических и гормональных факторов. С тенденцией к развитию РА связаны определенные гены, играющие роль в иммунной  
25 системе. В то же время, некоторые люди с РА не имеют этих генов, а у других людей, имеющих эти гены, болезнь никогда не развивается. Поэтому предположили, что генетический фон важен, но не является решающим.

В моделях аутоиммунного заболевания микробные антигены со структурой, подобной собственным антигенам, могут вызывать перекрестный ответ на аутоантигены, производя изменение в механизмах толерантности и фиксируя  
30 аутоиммунный ответ. В общем смысле, повреждение и местный некроз в ткани, вызванные инфекционным агентом, могут выявить скрытую аутоантигенную детерминанту, которая способна активизировать аутореактивные Т-клетки (Albert L.J. (1999) Mechanisms of Disease: Molecular Mimicry and autoimmunity. N Engl J Med 341: 2068-2074).

Фаза перехода Т-лимфоцита между толерантностью и иммунной/аутоиммунной активностью регулируется на различных уровнях. Двумя важными параметрами в указанном переходе являются состояние созревания антиген-презентирующих клеток (сокращенно APC) и уровни аутоантигенов, которые детектируются иммунной  
40 системой (Ohashi, P.S. (2002) Making and breaking tolerance. Current Opinion in Immunology 14:744-759).

Одна из текущих гипотез, которая пытается объяснить развитие аутоиммунных заболеваний, отмечает, что APC в отсутствие сигналов врожденной иммунной системы или сигналов опасности остаются относительно незрелыми и вызывают  
45 толерантность аутореактивных Т-клеток, когда им презентуются собственные пептиды (Steiman R.M. (2000) The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. J Exp Med. 191:411-416). Индукция периферической толерантности также коррелирует с концентрацией собственного антигена (Kurts, C. (1999) CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. PNAS 96:12703-12707). Повышение уровня презентирования собственных антигенов из-за повышения  
50 уровней их экспрессии позволяет аутореактивным некомпетентным Т-клеткам детектировать их. Если уровни собственных антигенов увеличены в отсутствие явлений, которые ускоряют созревание APC, толерантность к этим антигенам сохраняется, в противном случае в присутствии провоспалительных сигналов или

других явлений, которые ускоряют созревание APC, толерантность нарушается активацией некомпетентных Т-клеток и развиваются аутоиммунные заболевания (Janeway С.А. (2002) *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*. 20:197-216). Инфекционными агентами, которые были объектом исследования как причина RA, являются среди прочих: вирус Эпштейна-Барра, ретровирус, вирус гепатита С, *Mycobacterium tuberculosis* (сокращенно Mt), а также *Helicobacter pilory*.

Патогенез RA характеризуется совместным действием различных типов клеток, которые вызывают прогрессивное разрушение хряща и кости. В нормальных условиях существует баланс между воспалительными цитокинами, такими как: TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 и IFN $\gamma$ , и противовоспалительными, такими как IL-4, IL-11, IL-13 и антагонистами IL-1 или TNF $\alpha$ . В случае RA указанный баланс перемещается, однако, в пользу воспалительных цитокинов (Arend W.P. (2001) *Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of interleukin-1 receiving antagonist*. *Semin Arthritis Rheum* 30 (2):1-6).

Узнавание экзогенного антигена или аутоантигена вероятно является причиной ряда событий, которые вызывают разрушение суставов у пациентов с RA. Это явление вызывает активацию CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которая наряду со стимуляцией различных цитокинов ведет к их дифференцировке в Th1-клетки с последующим высвобождением провоспалительных цитокинов (IL-2 и INF $\gamma$ ) (Simón A.J. (2001) *Biological therapy in Rheumatoid Arthritis*. *Magazine of Clinical Investigation* 53 (5):452-459). Многие исследователи соглашаются с тем, что хроническое воспаление суставов вызвано указанными активированными Т-клетками, которые проникают в синовиальную мембрану. Действие этих цитокинов на макрофаги вызывает выработку большого количества TNF $\alpha$  и IL-1. Они вызывают ряд местных и общих эффектов, таких как регулирование экспрессии молекул адгезии в эндотелиальных клетках (LFA1, ICAM-1), которые привлекают другие клетки к участкам воспаления. Они также стимулируют макрофаги, фибробласты, хондроциты и остеокласты к высвобождению других медиаторов воспаления, таких как IL-15 и IL-8. TNF $\alpha$  и IL-1 стимулируют пролиферацию синовиальной мембраны, что вызывает формирование паннуса, они могут также вызвать дифференцировку В-лимфоцитов в клетки, продуцирующие антитела, которые потенциально участвуют в разрушении сустава. Они также ингибируют выработку противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-14), вырабатываемых Th2-клетками, и стимулируют гепатоциты к выделению IL-6. IL-6 способствует выработке белков острой фазы, которые участвуют в данном процессе, усиливая иммунный ответ (Forre O. (2000) *New possibilities of treatment in AR*. *Scand J Rheumatol* 29 (2):73-84).

Среди аутоантигенов, вовлеченных в патогенез RA, присутствует белок *Hsp60*, который принадлежит семейству Hsp-белков, которые являются иммуногенными белками с исключительной эволюционной консервативностью. Иммунный ответ против чужеродного *Hsp* - важный механизм защиты против бактериальных инфекций. Антитела против этих белков могут присутствовать в изобилии и у здоровых людей, и у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, и они могут перекрестно реагировать с собственными антигенами (Chen W. (1999) *Human 60-kDa Heat-Shock Protein: To Danger Signal to the Innate Immune System*. *J Immunol*. 162:3212-3219).

*Hsp65* из Mt гомологичен *Hsp60* млекопитающих. Это означает, что *Hsp60* может быть признан как аутоантиген у пациента с RA. У пациентов с RA, по сравнению с пациентами с остеоартритом, имеется увеличение пролиферативного ответа В-лимфоцитов в синовиальной жидкости на *Hsp65* микобактерий. Интенсивность ответа коррелирует с синовиальным воспалением. Данный ответ не является специфическим для RA по сравнению с другими воспалительными заболеваниями (Life P. (1993) *Responses to Gram negative enteric bacterial antigens by synovial T cells from patients with juvenile chronic arthritis: recognition of heat shock protein*

hsp60. J Rheumatol. 20:1388-1396).

Концентрация *Hsp* является возможным сигналом опасности для иммунной системы, который высвобождается из мертвых клеток, и может индуцировать воспалительный ответ и вызвать созревание APC. *Hsp*-белки являются

5 внутриклеточными белками, которые не только не экспрессируются в клеточной мембране, но и не секретируются, поэтому *Hsp* являются привлекательными кандидатами на роль молекул, которые представляют собой сигналы опасности (Van den Berg, WB. (1998): Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. Springer Semin Immunopathol. 20:149-164).

10 Для лечения некоторых аутоиммунных патологий были предложены несколько препаратов, в которых используется *Hsp60* или производные от него пептиды. Например, в патенте EPO262710 предложено использование нескольких пептидов *Hsp60* из *Mt* для лечения и диагностики аутоиммунных заболеваний, особенно артритных состояний. Данное изобретение основано на том факте, что предыдущие

15 инфекции, вызванные несколькими бактериями, могут инициировать развитие аутоиммунных заболеваний у генетически восприимчивых людей, например: пациенты с RA могут показать высокую реактивность к микробным антигенам. Эти же авторы в патенте EPO322990 предлагают использование других пептидов *Hsp60* из *Mt* с той же самой целью, как и в предыдущем патенте. В заявке на патент WO 9610039

20 предполагается использование пептида *Hsp60* из *Mt* для диагностики и лечения аутоиммунного артрита.

В заявке на патент WO 9711966 авторы предполагают использование пептидов из неконсервативных областей *hHsp60*, которые не совпадают с *Hsp60* бактерий, что может вызвать толерантность Т-клеток у пациентов с RA.

25 В заявке на патент WO 0143691 предлагается использование фармацевтических композиций, специфически составленных из пептидов *hHsp60* и их вариантов для профилактики воспалительных заболеваний, таких как RA.

В патенте US 6180103 авторами предполагается использование пептида *Hsp60*, обозначенного p277, и его аналогов для диагностики и профилактики диабета типа I.

30 Патент US 5993803 защищает использование *Hsp60*, пептида p277 и группы пептидов-производных указанного белка для уменьшения тяжести иммунного ответа во время трансплантации органов.

Недавно было установлено, что атеросклероз обнаруживает ряд особенностей, подобных аутоиммунным процессам. В заявке на патент WO 0072023 авторы

35 предлагают способ лечения и диагностики атеросклероза и коронарных заболеваний с использованием препарата, который включает белок *Hsp60*.

В заявке на патент WO 02057795 защищен новый метод для диагностики и лечения остеопороза с использованием белков семейства *Hsp* и белков из патогенных микроорганизмов, таких как вирусы и бактерии.

40 В настоящее время лечения для RA не существует. Современные способы лечения сосредоточены на облегчении боли, уменьшение воспаления, замедление повреждений суставов и на улучшение самочувствия пациентов. Недавно были разработаны иммуномодулирующие лекарственные препараты, которые блокируют цитокины, участвующие в развитии и поддержании воспалительного ответа при RA, с целью

45 остановки или замедления прогрессирования заболевания. Для данного вида терапии существуют два типа лекарственных препаратов: блокирующие действие фактора некроза опухолей (сокращенно TNF $\alpha$ ), и те, которые ингибируют действие интерлейкина 1 (IL-1).

Хотя при терапиях с анти-TNF $\alpha$  и анти-IL-1 результаты являются

50 многообещающими, процент инфекций высок. У многих пациентов, лечившихся этими препаратами, развиваются тяжелые инфекции, которые являются в некоторых случаях фатальными, включая другие аутоиммунные заболевания, неоплазии и т.д. Кроме того, они являются очень дорогими лекарственными средствами (Breshinan B. (1998)

Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human antiinterleukin-1 antagonist. *Arthritis Reum.* 41:2196-2204).

Оральная толерантность была предложена как способ создания периферической толерантности по отношению к определенным антигенам. Она может быть вызвана механизмами активной супрессии, анергии или делеции клона, в зависимости от доз и частоты введения антигена. Указанным способом можно индуцировать регуляторные Т-клетки, которые специфическим образом активируются антигеном, но проявляют свое действие независимо (активная супрессия). Поскольку имеет место регулирующее действие, нет необходимости вводить не только потенциально патогенный антиген, но и любой другой, способный вызвать активную супрессию в центре воспаления при ингибировании деятельности патогенных эффекторных клеток. Коллаген типа II (сокращенно СII) является аутоантигеном, который наиболее часто используется в указанном направлении. Результаты исследований, проведенных с пациентами, страдающими РА, с использованием куриного и бычьего СII дали противоречивые результаты (Trentham D.E. (1993) Effects of oral administration of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Science* 261:1727-1730; Sieper J. (1996) Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis: to double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Arthritis Rheum.* 39:41-51).

Патент US 6153200 предполагает использование пептида из *Hsp70*, белка, принадлежащего семейству *Hsp*, для индуцирования толерантности оральным путем у пациентов с РА.

Другой вариант, который был предложен для индукции толерантности посредством APL-пептидов, основан на том, что Т-клетки активируются, если CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, специфичные к определенному антигенному пептиду, узнают антиген, презентированный компетентными APC. Тем не менее, если та же самая Т-клетка изначально активирована другой формой антигена, в котором один из участков контакта с TcR слегка изменен, это может привести к неполной активации или даже инактивации Т-клеток. Эти антигены называют APL. APL подобны иммуногенным пептидам, которые запускают каскад необходимых событий для полной активации Т-клеток, с одной или несколькими заменами в положениях, существенных для контакта с TcR или с МНС.

По существу, среди других воздействий, для усиления ответа Т-клеток на специфические антигены могут быть разработаны APL со свойствами, подобными свойствам иммуногенного пептида (агониста). Этот эффект выгоден при патологических состояниях, таких как инфекционные заболевания. Также могут быть разработаны пептиды с антагонистическими свойствами по отношению к иммуногенному пептиду, которые могут быть полезными в контроле над аутоиммунными заболеваниями, так как они могут блокировать ответ Т-клеток, действуя в роли антагонистов к TcR (M. De Magistris (1992) Antigen analog-major complex histocompatibility complexes act as antagonist of the T cell receptor. *Cell* 68:625-634), частичных агонистов или индукторов популяции регуляторных Т-клеток, которые опосредуют активную супрессию (Evavold B.D. (1991) Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell ligand. *Science* 252:1308-1310). Возможность экспериментально регулировать характерные свойства пептидных лигандов позволяет изменять природу, направление и силу иммунного клеточного ответа, соответственно.

До настоящего времени на людях были проведены два клинических испытания с использованием пептидов APL-типа для лечения аутоиммунных заболеваний. В обоих испытаниях пептиды происходили из эпитопа в положении 83-93 из основного белка миелина. В одном из этих испытаний участвовало 142 пациента с рассеянным склерозом, но оно было приостановлено, так как у 9% пациентов развилась гиперчувствительность (Ludwig Kapposi (2000) Induction of non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in to placebo controlled, randomized phase II trial. *Nature Medicine* 10:1176-1182).

Другое испытание включало 25 пациентов и было также прервано, потому что у трех пациентов наблюдалось обострение болезни (Bibiana Bielekova (2000) Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: Results of to phase II clinical trial with an altered peptide ligand. Nature Medicine 6:1167-1175). Главный автор указанной работы анализирует возможные факторы, которые определили эти отрицательные результаты, и отмечает, что изменения, произведенные в сайтах APL, могут образовать новые участки связывания с HLA (как это случилось в случае связывания APL с DRB1\*0404, как показано у пациента I), комплекс APL-HLA может также стимулировать Т-клетки, не исключенные при отрицательной селекции, и которые могут быть перекрестно активированы нативным аутоантигеном. В данном испытании использовались фармацевтические композиции с высокими концентрациями APL, которые могут стимулировать Т-клетки с высоким сродством к аутоантигену и вызывать гетероклитический Т-клеточный ответ (Bibiana Bielekova and Roland Martin (2001) Antigen-specific immunomodulation via altered peptide tying. J Mol Med. 79:552-556).

Для того чтобы провести эти два клинических испытания, авторы предварительно не анализировали у пациентов Т-клеточный ответ на APL *in vitro*. Они также не оценивали типы молекул HLA, экспрессируемые у подвергнутых лечению пациентов.

Главная проблема в лечении аутоиммунных заболеваний состоит в разработке терапевтических стратегий, с помощью которых можно специфично устранить патогенные Т-клетки, не затрагивая другие Т-клетки. Таким образом, терапевтический поиск должен дать безопасный, специфичный и эффективный способ выключения развитого аутоиммунного процесса. Настоящее изобретение, в отличие от предыдущего уровня техники, предлагает использование пептидов *hHsp60* и их APL-производных, которые специфическим путем индуцируют ингибиторные молекулярные механизмы в процессе РА.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на решение вышеуказанной задачи по обеспечению пептидами белка теплового шока человека 60 кДа, несущими эпитопы Т-клеток, для индукции механизмов толерантности, в частности механизмов индукции анергии или механизмов, опосредованных клоном регуляторных Т-клеток у пациентов с РА, и которые представлены следующими последовательностями:

E18-12 MGPKGRTVIIIEQSWGSPKVTK (SEQ. ID. NO:1)

E18-3 SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG (SEQ. ID. NO:2)

F19-6 IIDPTKVVRTALLDAA (SEQ. ID. NO:3)

В заявке на патент WO 9711966 предложено использование пептидов *hHsp60* из *Mt*, основанное на том факте, что они могут индуцировать толерантность у Т-клеток и предотвращать РА. Указанные авторы подтверждают определенное улучшение в ходе болезни при введении этих пептидов мышам (артрит был предварительно вызван пристином). В противоположность указанной заявке авторы изобретения продемонстрировали, что пептиды по изобретению индуцируют механизмы активной супрессии, которые вызывают периферическую толерантность очень эффективным способом, подтверждая существенное увеличение IL-10 в двух животных моделях артрита так же, как и в анализах "*ex vivo*" с использованием мононуклеарных клеток пациентов.

Известно, что основной ответ Т-клеток в модели адьювант-индуцированного артрита (AIA) направлен против *Hsp60*. С помощью указанной модели авторы изобретения установили, что пептиды по изобретению, производные *hHsp60*, проявляют весьма заметную терапевтическую защиту, вызывая увеличение уровней IL-10 и уменьшение уровней TNF $\alpha$ . Такой же терапевтический эффект, вызванный этими пептидами, авторы также регистрировали на животной модели коллаген-индуцированного артрита (CIA), где основной ответ направлен против коллагена типа II.

Эти факты указывают на то, что терапевтические возможности пептидов по изобретению независимы от индуцирующего агента и могут опосредовать механизмы активной супрессии в участке воспаления, которые могут быть распространены на другие аутоантигены, присутствующие в суставах и которые прогрессивно содействуют иммунопатогенному процессу, имеющему место в процессе РА. Эти результаты подтверждают возможности терапевтического использования наших препаратов для лечения РА.

Согласно настоящему изобретению указанные пептиды в особенности полезны для разработки вариантов пептидных APL-производных E18-12 (SEQ. ID. NO:1) и E18-3 (SEQ. ID. NO:2), модифицированных по сайтам взаимодействия с молекулой МНС человека и APL-производных пептида F19-6 (SEQ. ID. NO:3), модифицированных по сайтам взаимодействия с молекулой МНС крысы. Далее приведены соответствующие аминокислотные последовательности:

**MGRPGRTVIIIEQSWGSPKVTK (SEQ. ID. NO: 1)**

1 2 3 4 5 6 7

где аминокислота в положении 1 замещена на: A,F,I,L,M,V,W, или Y  
 в положении 2 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 3 на: A,K,V,R,T,I,P,L,N,S,G,Y, или M  
 в положении 4 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 5 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, или Y  
 в положении 6 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 7 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, или Y

**SIDLKDKKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA (SEQ.ID. NO: 2)**

1 2 3 4 5 6 7 8

где аминокислота в положении 1 замещена на: L,I,V,M,Y,W,F, или A  
 в положении 2 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 3 на: A,F,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 4 на: L,I,V,M,Y,W,F, или A  
 в положении 5 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 6 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 7 на: A,F,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W, или Y  
 в положении 8 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, или Y

**IIDPTKVVVRTALLDAA (F19-6) (SEQ.ID. NO: 3)**

1 2

где аминокислота в положении 1 замещена на H и аминокислота в положении 2 замещена на E.

В частных случаях выполнения пептидные производные APL-типа имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ. ID. NO:4, SEQ. ID. NO:5, SEQ. ID. NO:6, SEQ. ID. NO:7, SEQ. ID. NO:8, SEQ. ID. NO:9, SEQ. ID. NO:10, SEQ. ID. NO:11, SEQ. ID. NO:12, SEQ. ID. NO:13, SEQ. ID. NO:14, SEQ. ID. NO:15, SEQ. ID. NO:16, SEQ. ID. NO:17, SEQ. ID. NO:18, SEQ. ID. NO:19, SEQ. ID. NO:20 и SEQ. ID. NO:21.

Пептиды по настоящему изобретению могут быть получены стандартными способами пептидного синтеза. Определенный состав каждого пептида может быть оценен по уровню и качеству иммунного ответа, который указанный пептид вызывает в экспериментах, как это описано в примерах, которые будут представлены далее.

Все последовательности, описанные выше, и последовательности в примерах являются перспективными и могут также использоваться в качестве основы для разработки и синтеза пептидных производных с улучшенными свойствами.

Изобретение также включает фармацевтические композиции, которые включают один или несколько вышеперечисленных пептидов и, необязательно, фармацевтически

приемлемый носитель.

Введение фармацевтических препаратов пациентам может осуществляться в соответствии с молекулами HLA класса II, которые экспрессируются у каждого конкретного пациента.

5 Способ введения фармацевтических композиций будет зависеть от профиля цитокинов, который эти препараты индуцируют в тестах "ex vivo". Фармацевтические препараты, включающие APL-пептиды, индуцирующие регуляторный ответ, будут вводиться внутривенно или подкожно. Фармацевтические препараты, включающие исходные пептиды, вызывающие TH1-ответ, могут быть введены орально.

10 Дозы пептидов в фармацевтических композициях настоящего изобретения эквивалентны дозам, вызывающим эффективный иммунный ответ в организме-хозяине. Эффективная доза является дозой, которая при введении индуцирует молекулярные механизмы, которые значительно снижают показатели воспалительных симптомов RA и останавливают рост показателей разрушения суставов в процессе заболевания. Количество фармацевтической композиции, вводимой организму-хозяину, может также изменяться в зависимости от нескольких факторов, которые включают: используемые пептиды, ACR-шкалу (Американская Коллегия Ревматологии, сокращенно ACR), HLA типа II, время течения болезни, возраст, пол, общее состояние здоровья, а также уровень иммунного ответа в целом.

15 Настоящее изобретение также относится к способу лечения RA, который включает введение пациенту эффективных доз пептидов или фармацевтических композиций, описанных выше.

#### Краткое описание чертежей

Результаты частично представлены графически на следующих чертежах:

25 Фиг.1: Оценка клинических признаков артрита у крыс, обработанных внутривенно пептидами F19-6 и F19-7 в AIA модели.

Фиг.2: Модуляция уровней TNF $\alpha$ , индуцированных пептидами F19-6 и F19-7 в мононуклеарных клетках крыс в AIA модели на 15 день после индукции болезни.

30 Фиг.3: Модуляция уровней IL-10, индуцированных пептидами F19-6 и F19-7 в мононуклеарных клетках крыс в AIA модели на 15 день после индукции болезни.

Фиг.4: Оптическая микроскопия среза сустава, принадлежащего больному животному, не получавшему лечения. IS: внутрисуставное пространство, EC: эрозия хряща, P: паннус. Окрашено гематоксилин-эозином.

35 Фиг.5: Оптическая микроскопия среза сустава, принадлежащего животному, подвергнутому воздействию пептида F19-7, введенного внутривенно. IS: внутрисуставное пространство. Окрашено гематоксилин-эозином.

Фиг.6: Модуляция уровней TNF $\alpha$ , индуцированных пептидами F19-6 и F19-7 в мононуклеарных клетках крыс в CIA модели на 21 день после индукции болезни.

40 Фиг.7: Модуляция уровней IL-10, индуцированных пептидами F19-6 и F19-7 в мононуклеарных клетках крыс в CIA модели на 21 день после индукции болезни.

Фиг.8: Модуляция уровней TNF $\alpha$ , пептидами F19-6 и F19-7 в мононуклеарных клетках пациентов с RA.

Фиг.9: Модуляция уровней TNF $\alpha$ , пептидами E18-3 и E18-12 в мононуклеарных клетках пациентов с RA.

45 Фиг.10: Модуляция уровней IL-10, пептидами E18-3 и E18-12 в мононуклеарных клетках пациентов с RA.

Фиг.11: Модуляция уровней IL-10, индуцированных пептидами E18-3 и E18-12 и их APL-производными в мононуклеарных клетках пациентов с RA.

50 Фиг.12: Модуляция уровней TNF $\alpha$ , индуцированных пептидами E18-3 и E18-12 и их APL-производными в мононуклеарных клетках пациентов с RA.

Фиг.13: Соотношение уровней IL-10 и TNF $\alpha$ , индуцированных пептидами E18-3 и E18-12 и их APL-производными.

Фиг.14: Оценка клинических признаков артрита у крыс, подвергнутых воздействию

пептидов E18-12 и E18-12APL1, введенных внутрикожным путем, в модели A1A.

Подробное описание настоящего изобретения

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1

#### 5 Пептиды *hHsp60*, презентируемые человеческим HLA

Были отобраны те пептиды *hHsp60*, для которых подтверждалось, что они являются эпитопами Т-клеток человека в соответствии с используемыми программами: SYFPEITHI (Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor and Stefan Stevanovic. 1999. Immunogenetics 50:213-219. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs, (access via: <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>)) and ProPred (Singh H. and Raghava, G.P.S. 2001. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics, 17(12): 1236-37). Последовательности, соответствующие этим пептидам, показаны в таблице 1.

15

Последовательность пептидов <i>hHsp60</i> , презентируемых человеческим HLA			Таблица 1
Пептиды	Положение в последовательности	Аминокислотная последовательность	
E18-12	55-75	MGPKGRTVIIIEQSWGSPKVTK (SEQ. ID. NO:1)	
E18-3	83-110	SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG (SEQ. ID. NO:2)	

### 20 Пример 2

#### Пептид *hHsp60* для эпитопа крыс Льюиса

Начиная с последовательности *hHsp60*, отбирают пептид, который связывается с молекулой MHC-II крысы RT1.BI в соответствии с участком последовательности, описанной в базе данных SYFPEITHI (Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic. 1999. Immunogenetics 50:213-219. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs (access via: <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>)).

30 Программа, которая анализирует все пептиды из 9 аминокислот, была разработана для поиска тех пептидов, которые отвечают указанному участку. Авторы изобретения также включали варианты, которые в одном из положений не были включены в указанные остатки в качестве якорных или предпочтительных. Последовательность, соответствующая одному из этих пептидов (F19-6), показана в таблице 2.

35

Последовательность пептидов <i>hHsp60</i> , отобранных для крыс			Таблица 2
Пептид	Положение в последовательности	Аминокислотная последовательность	
F19-6	518-533	IDPTKVVRTALLDAA (SEQ. ID. NO:3)	

### Пример 3

#### 40 Конструирование APL с модификациями аминокислот, включенных в связывание с MHC

Начиная с пептидов, отобранных в примерах 1 и 2, изменили положения, включенные в связывание с определенным MHC (положения 1, 3, 4, 6, 8 или 9), с целью увеличить аффинность пептида к молекуле HLA. Эти пептиды были проанализированы на наличие оптимальных остатков в каждом из этих положений, которые могут представлять собой якорные остатки в том случае, если бы пептид был отобран методом, использующим участки связывания (SYFPEITHI), либо остатки, способные увеличить рейтинг пептида как лиганда MHC, если пептид был выбран с использованием другого типа алгоритма (ProPred). В результате этих исследований в пептиде E18-12 были проведены замены в положениях 1-7 каждой из аминокислот, которые перечислены далее:

50 **MGPKGRTVIIIEQSWGSPKVTK (SEQ. ID. NO: 1)**

1 2 3 4 5 6 7

где аминокислота в положении 1 замещена на: A,F,I,L,M,V,W или Y

в положении 2 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W или Y

в положении 3 на: A,K,V,R,T,I,P,L,N,S,G,Y или M

в положении 4 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W или Y

в положении 5 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V или Y

5 в положении 6 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W или Y

в положении 7 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V или Y

**SIDLKDKKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 2)**

1 2 3 4 5 6 7 8

10 где аминокислота в положении 1 замещена на: L,I,V,M,Y,W,F или A в положении 2 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W или Y

в положении 3 на: A,F,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W или Y

в положении 4 на: L,I,V,M,Y,W,F или A

в положении 5 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W или Y

15 в положении 6 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W или Y

в положении 7 на: A,F,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W или Y

в положении 8 на: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W или Y

В пептиде F19-6 по положениям 1 и 2 были осуществлены замены на аминокислоты, перечисленные далее:

20 **IIDPTKVVRTALLDAA (F19-6)**

1 2

где аминокислота в положении 1 замещена на H,

а аминокислота в положении 2 замещена на E.

#### Пример 4

25 Индукция артрита адьювантом и коллагеном у крыс Льюиса

В эксперименте использовались инбредные самки крыс Льюиса (RT1.VI MHC), предоставленные Национальным Центром Производства Лабораторных Животных (CENPALAB, Cuba). Крысы с приблизительным весом 101-120 г и 5-8 недель возраста были отобраны случайным образом.

30 Одним из агентов-индукторов болезни был Mt (H37Ra, Difco, England) в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) (Sigma, USA). Другим агентом-индуктором артрита являлся бычий коллаген типа II в IFA.

В настоящем примере для развития артрита у крыс, вызванного иммунным ответом против двух различных аутоантигенов, использовались два различных индуцирующих агента. Хорошо известно, что в животной модели артрита, в которой в качестве индуктора болезни используется Mt, фундаментальный ответ Т-клеток направлен против Hsp60 (Anderton, SM (1995) Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J. Exp. Med.* 181: 943-952). В модели, в которой в качестве индуктора используется коллаген, заметный ответ антител, а также клонов Т-клеток развивается против указанного антигена (M Griffiths (1988) Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats. *Inten. Rev. Immunology* 4:1-15).

45 Основная цель изобретения получения этих двух животных моделей состояла в том, чтобы оценить пептиды по изобретению на обеих моделях с целью демонстрации того, являлся ли защитный эффект этих пептидов независимым или нет по отношению к аутоантигену, используемому в качестве агента индукции артрита у крыс.

#### Пример 5

##### Оценка клинических признаков

50 Уровень воспаления, связанный с развитием артрита, который показывала каждая крыса, был оценен в соответствии со следующим средним значением, подготовленным для этой цели:

0 единиц: нормальная лапка.

1 единица: Легкая, но характерная краснота лодыжки или очевидная краснота и воспаление, ограниченное отдельным пальцем, независимо от количества затронутых

пальцев.

2 единицы: Умеренная краснота и воспаление лодыжки.

3 единицы: Тяжелая краснота и воспаление целой лапки, включая пальцы.

4 единицы: Максимальное воспаление и деформация лапки, вовлекающие большое количество суставов.

Четыре лапки были оценены по отдельности согласно установленной шкале, причем каждая лапка могла получить до 4 пунктов. Таким образом, каждая крыса могла получить максимум 16 пунктов.

Визуальная оценка проводилась после индукции болезни каждые пять дней.

Клиническая оценка признаков артрита демонстрировала, что были существенные статистические различия между животными, соответствующими здоровой контрольной группе (группа IV), где болезнь не была вызвана, и животными, соответствующими больной контрольной группе (группа III), где болезнь была вызвана, но им не вводили пептиды, как это показано на фиг.1.

#### Пример 6

##### Синтез пептидов

Пептиды синтезировали в соответствии со стратегией Fmoc/tBu в шприцах. Использовали смолу Fmoc-AM-MBHA (0,54 ммоль/г), и протокол синтеза был продолжен с механическим перемешиванием. После обработки ТФУ, пептид был лиофилизирован и охарактеризован с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

#### Пример 7

##### Внутрикожное введение пептидов

Животные были разделены на четыре группы по 12 крыс в каждой. Болезнь была вызвана в трех группах животных (группы I- III), причем двум группам вводили пептиды, а одна группа являлась контролем индукции болезни. Две группы животных, которым вводили пептиды, получили 200 мкг пептида на каждую крысу в 100 мкл PBS, на 12, 17 и 22 дни после индукции болезни при помощи Mt. Животные, разделенные на четыре группы, были подвергнуты терапии следующим образом:

- группа I: животные, подвергнутые обработке пептидом F19-6;

- группа II: животные, подвергнутые обработке пептидом F19-7;

- группа III: животные, не подвергнутые обработке пептидами (контроль индукции болезни);

- группа IV: животные, у которых не была вызвана болезнь и которые не подверглись обработке пептидами (отрицательный контроль).

В дни 15, 21, 28 и 35 после индукции в группе умерщвляли по три животных, извлекали селезенку и отбирали пробы из суставов для гистопатологического анализа.

Как это показано на фиг.1, признаки, связанные с развитием артрита, развивались постепенно. У животных группы III, по сравнению с контрольной группой развития болезни, с 10 дня после индукции артрита стало наблюдаться развитие

воспалительного процесса, который начался с легкой красноты нижнего сустава и который продвинулся, распространяясь в остальную часть сустава, пока не стал тяжелым у некоторых крыс. Из указанной фигуры видно, что введение пептида F19-6,

соответствующего исходному эпитопу *hHsp60*, и их варианту APL F19-7, вызвало существенное уменьшение клинических признаков артрита у животных, подвергнутых

обработке обоими пептидами. Среди групп, подвергнутых обработке пептидами F19-6 и F19-7, были получены статистически существенные различия, и эта группа была взята в качестве положительного контроля болезни ( $P < 0,05$ ).

Результаты, полученные в данном исследовании, подтверждают, что пептиды F19-6 и F19-7 проявляют защитный эффект у животных, подвергнутых обработке, так как у крыс можно было наблюдать почти полную ремиссию заболевания.

#### Пример 8

##### Выделение мРНК

Мононуклеарные клетки, выделенные из селезенки крыс, инкубировали в течение

приблизительно 20 часов. Затем отбросили супернатант и в каждую лунку добавили 1 мл реактива: TRI REAGENT TM (SIGMA, USA) и оставили на 5 минут при комнатной температуре. После чего выделение мРНК выполнили по методике, рекомендованной фирмой-производителем.

5 Пример 9

Обратная транскрипция РНК

Для получения комплементарной ДНК была использована система Gene Amp RNA PCR Kit (Perkin-Elmmer, USA). По методике использовали 1 мг мРНК, соответствующей каждому образцу, после чего опыт провели по методике, рекомендованной фирмой-производителем. Реакция была проведена в амплификаторе (Minicycler, MJ Research, USA) по следующей схеме: первый цикл 1 час при 42°C, затем 5 минут при 95°C и 5 минут при 4°C.

Пример 10

Полимеразная цепная реакция

15 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была проведена в отношении цитокинов: TNF $\alpha$  и IL-10, а также конститутивного гена, кодирующего фермент GAP-DH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу, сокращенно GAP-DH).

В каждой реакции использовали 10 пмоль каждого из праймеров, 5 мл ДНК матрицы, 0,25 мл термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-Pol) (Perkin-Elmmer, США) в буфере, рекомендованном фирмой-производителем (KCl 50 mM, Трис-HCl 10 mM, pH 9,0, Тритон X-100 до 0,1% и 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) в конечном объеме 25 мкл.

Реакция для GAP-DH была проведена в амплификаторе (Minicycler, MJ Research, U.S) согласно следующей программе: первый цикл 3 мин при 94°C (температура денатурации), 1 мин при 94°C, 1 мин при 58°C (температура отжига) и 1 мин при 72°C (температура элонгации), далее 35 циклов: 1 мин при 94°C, 1 мин при 58°C и 1 мин при 72°C в каждом цикле. В заключении стадия достройки 3 мин при 72°C.

Для цитокинов была использована предыдущая схема, только с изменением температуры отжига. Для IL-10, 54°C и для TNF $\alpha$  64°C.

Пример 11

30 Анализ ПЦР-продуктов с помощью электрофореза в агарозном геле

Продукт ПЦР был проанализирован с помощью электрофореза в агарозном геле. Изображения электрофореза были зафиксированы и проанализированы с помощью Molecular Program Analyst (BioRad). Результаты были представлены как относительные уровни мРНК для каждого цитокина.

35 Пример 12

Статистический анализ относительных уровней мРНК для каждого цитокина

Чтобы определить различия между профилем цитокинов (в соответствии с относительными уровнями мРНК для каждого) среди групп обработанных животных, были использованы тесты Крускала-Валлиса и  
40 Стьюдента-Ньюмана-Кеулса (Statistical package Sigma Stat v 2 1997, GraphPad Software, Inc).

Статистические исследования показали, что на 15 день после индукции болезни пептиды значительно снижают уровни TNF $\alpha$  по сравнению с контрольной группой заболевания.

45 Эти результаты показаны на фиг.2, где GI соответствует животным, обработанным пептидом F19-6, GII представляет собой группу крыс, подвергнутых обработке пептидом F19-7, GIII представляет группу не подвергнутых обработке больных животных, и GIV включает здоровых животных. Было четко подтверждено, что терапия пептидами вызвала уменьшение относительных уровней указанного цитокина, в наибольшей мере ответственного за стимуляцию воспалительного  
50 процесса у животных. Среди групп, обработанных пептидами, и в группе, используемой в качестве положительного контроля болезни, наблюдались статистически существенные различия в случае цитокина TNF $\alpha$ . Не было

зафиксировано существенное различие среди различных групп, обработанных пептидами, и группой, взятой в качестве отрицательного контроля болезни. Этот результат показывает, что введение этих двух пептидов вызвало снижение уровней TNF $\alpha$  фактически до нормальных уровней указанного цитокина, как у

5

здоровых животных. Для того чтобы определить, могут ли пептиды, используемые в этом исследовании, стимулировать выработку противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10, были оценены относительные уровни мРНК, соответствующие указанному цитокину.

10

IL-10 включен в индукцию периферической толерантности через ответ, опосредованный Т-клетками. IL-10 непосредственно регулирует Т-клетки таким образом, чтобы ингибировать выработку IL-2, IL-5 и TNF $\alpha$ .

15

На фиг.3 показано количественное измерение уровней экспрессии IL-10 в различных группах ерапии на 15 день после индукции болезни. На данной фигуре GI соответствует животным, обработанным пептидом F19-6, GII представляет группу крыс, подвергнутых обработке пептидом F19-7, GIII представляет группу не подвергнутых обработке больных животных, и GIV включает здоровых животных.

20

Обработка животных этими пептидами вызывает прирост относительных уровней экспрессии IL-10. Авторы изобретения не получали статистически существенных различий между группами, подвергнутыми обработке обоими пептидами, но между этими группами и животными, которые составляют положительный и отрицательный контроли, существуют различия. Начиная с этих результатов, можно сделать такой вывод, что воздействие пептидов вызывает изменение в функциональном фенотипе Т-клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, при этом увеличиваются уровни выработки противовоспалительных цитокинов, как в случае IL-10, и уменьшаются

25

уровни выработки провоспалительных цитокинов, таких как TNF $\alpha$ .

#### Пример 13

##### Гисто-патологический анализ

30

С целью подтверждения клинических признаков, наблюдаемых у животных данной животной модели, и с целью анализа способности обоих пептидов возвращать к

30

прежнему состоянию или уменьшать деструктивный процесс, вызванный Mt, был выполнен патологический анализ суставов животных каждой группы.

Пласты, соответствующие суставам, были проанализированы группой Патологии SIGB.

35

Суставы были зафиксированы в нейтральном буфере с 10% формалина и декальцинированы. Ткани были обезвожены в градиенте спирта, абсорбированы в парафине и нарезаны на срезы по 5 мкм. Позже образцы установили на стеклянных пластинках, окрасили смесью гематоксилин-эозин и наблюдали в оптическом микроскопе. Результаты гистологического анализа показаны в таблице 3.

40

Таблица 3								
Результат гистологического анализа суставов животных из групп I-IV								
Группы	№ животного	День умерщвления	P	EC	IM	HO	G	PMN
I (F19-6)	1	15			X	X		X
	2					x/-	X	
	3							
I (F19-6)	1	21					x/-	
	2					x/-	X	
	3				X	X	x/-	X
I (F19-6)	1	28			X	X		
	2		X	x/-	X	X	x/-	X
	3							
I (F19-6)	1	35	X	x/-	X	X	X	X
	2		X		X		x/-	
	3		X	X	X	X	X	X

50

	II (F19-7)	16	15						
		17							
		18							
5	II (F19-7)	16	21			X	X	x/-	X
		17				X	X	x/-	X
		18				X	X	x/-	X
	II (F19-7)	16	28	X	X	X	X	x/-	X
		17		X	X	X	X	x/-	X
		18							
10	II (F19-7)	16	35						
		17		X	X	X		x/-	X
		18							
	III	46	15	X	X	X	X	X	
		47		X	X			X	
		48		X	X	X	X	X	
15	III	46	21	X	X	X	X	X	
		47		X	X	X	X	X	
		48		X	X	X	X	X	X
	III	46	28	X	X	X	X	X	X
		47				X	X	X	X
		48		X	X	X	X	X	X
20	III	46	35	X	X	X	X	X	
		47				X	X	X	X
		48		X	X	X	X	X	

В таблице 3 Р: представляет собой паннус; ЕС: эрозия хряща; ИМ: инвазия костного мозга; НО: гиперплазия остеокластов; G: гранулематозная реакция; PMN: полиморфноядерные.

У животных группы III, включая тех, которых умерщвили на 15 день, было очевидным присутствие паннуса, который вызывает эрозию хряща и инвазию костного мозга. Кроме того, наблюдалась типичная гранулематозная реакция при индукции с Mt и частичная гиперплазия остеокластов, которые представляют собой гигантские клетки, оказывающие большое разрушительное действие на костную ткань. Эти гистологические результаты воспроизводят характерные признаки изменений в суставе, происходящих у пациентов с РА, и демонстрируют, что авторы изобретения разработали животную модель, пригодную для оценки фармакологических кандидатов.

Фиг.4А соответствует суставу животного из группы III. Можно наблюдать присутствие паннуса, который захватывает целое внутрисуставное пространство и распространяется к хрящу, в котором наблюдается эрозия, так же, как и инвазия костного мозга. На фиг.4В показано увеличение области, соответствующей костному мозгу, где отчетливо наблюдается паннус в виде грануляционной ткани, богатой клетками фагоцитов.

При терапии пептидом F19-7, вводимым внутрикожным путем (группа II), умерщвленное на 15 день животное, как показано на фиг.5, не демонстрировало гистологические изменения, а показывало только присутствие полиморфноядерных и избыточной рубцовой ткани; в отличие от остальной части животных группы III, которые были охарактеризованы для того, чтобы продемонстрировать тяжелые гистологические признаки.

Как это показано в таблице 3, группы животных, обработанных пептидами F19-6 и F19-7, фактически не показывали гистологических проявлений в течение первого теста. Более высокая защита от развития артрита наблюдалась у животных, прошедших терапию пептидом F19-7. Половина крыс, включенных в эту группу терапии (6 крыс), не показывала никаких гистологических признаков, в соответствии с группой животных, обработанных F19-6, где только две крысы не проявляли гистопатологическое повреждение. В группах, прошедших терапию пептидами F19-6 и F19-7, не наблюдалось присутствие паннуса на дни 15 и 21 после индукции артрита,

что указывает на то, что введение этих пептидов вызвало задержку в появлении показателей клеточных осложнений воспалительной реакции во время развития артрита. Было существенно то, что у животных, получавших пептид F19-7 и которых умерщвили на 35 день после индукции артрита, только одна крыса демонстрировала 5 показатели гистологических проявлений развития заболевания. Эти результаты указывают на то, что терапия этим пептидом вызвала у животных, помимо задержки в клиническом проявлении заболевания, фактически полную ремиссию гисто-патологических признаков артрита, показывая терапевтическое превосходство F19-7 APL по сравнению с пептидом, включающим исходный 10 эпитоп F19-6.

#### Пример 14

Оценка *in vitro* образца цитокина, индуцированного пептидами F19-6 и F19-7, с использованием моноклеарных клеток крыс, в которых артрит был вызван коллагеном типа II

15 В этом тесте использовались больные крысы, у которых артрит был вызван с использованием бычьего коллагена типа II в IFA. Была извлечена селезенка каждой анализируемой крысы и были выделены моноклеарные клетки.

Моноклеарные клетки, выделенные из селезенки, культивировали в 1,5 мл RPMI 1640 в 24-луночных планшетах (Costar, USA). Тест был проведен трижды, и в общей 20 сложности  $3 \times 10^6$  клеток на лунку культивировали в течение 24 часов с пептидами F19-6 и F19-7 при концентрации 5 мг/мл, при этом инкубацию вели при 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки, культивируемые без пептидов, использовались в качестве отрицательного контроля.

25 Позже была выделена мРНК, и таким же образом, как описано в предыдущих примерах, были проведены реакции обратной транскрипции нуклеиновой кислоты и ПЦР. Анализы продуктов реакции были выполнены с помощью электрофореза в агарозных гелях, как описано в примере 12. Для определения различий в профиле цитокинов, в соответствии с относительными уровнями мРНК в каждой пробе, использовались статистические тесты, как описано в примере 13.

30 На фиг.6 показаны уровни TNFα в клетках, культивируемых без пептида, и в клетках, соответствующих 21 дню после индукции заболевания, стимулированных *in vitro* пептидами F19-6 и F19-7. Буква А обозначает уровни TNFα в клетках, культивируемых без пептида, буква В обозначает уровни указанного цитокина, когда 35 клетки стимулируются пептидом F19-6, и буква С соответствует уровням TNFα при стимуляции клеток пептидом F19-7. На данной фигуре СII обозначает группу животных, в которой артрит был вызван коллагеном типа II, а Контроль представляет собой группу здоровых животных.

На фиг.7 показаны уровни IL-10 клеток, культивируемых без пептида и стимулированных *in vitro* пептидами F19-6 и F19-7, в соответствии с 21 днем после 40 индукции болезни, буква А обозначает уровни IL-10 в клетках, культивируемых без пептида, буква В обозначает уровни указанного цитокина, когда клетки стимулируются пептидом F19-6, и буква С соответствует уровням IL-10 при 45 стимуляции клеток пептидом F19-7. На данной фигуре СII обозначает группу животных, в которой RA был вызван коллагеном типа II, а контроль представляет собой группу здоровых животных.

Как видно на этих двух фигурах, пептиды F19-6 и F19-7 уменьшают уровни TNFα *in vitro*, но в случае уровней IL-10, только пептид F19-7 увеличивает их значительно.

50 Эти результаты указывают на то, что пептид F19-7 способен модулировать профиль цитокинов, аналогичный контрольному фенотипу в животной модели, в которой артрит вызван коллагеном. Таким образом, можно подтвердить, что иммуномодулирующее действие указанного пептида, полученного из *hHsp60 in vitro*, может быть распространено на животные модели артрита, где агент индукции, участвующий в развитии болезни, не является Mt или родственными аутоантигенами.

Такие результаты предполагают, что пептид F19-7 может вызывать толерантность к структурно родственным антигенам, и способен при этом вызывать *in vivo* активную супрессию в участке воспаления.

С этими результатами можно предположить, что пептид F19-7 вызывает защиту против артрита, вызванного Mт или коллагеном типа II у животных, который опосредован регуляторными Т-клетками, вырабатывающими IL-10. Этот эффект может распространиться на другие аутоантигены, присутствующие в суставах, и которые вносят существенный вклад в иммунопатогенный процесс, который имеет место в процессе РА.

#### 10 Пример 15

#### Измерение уровня цитокина, индуцированного пептидами F19-6 и F19-7 у пациентов с РА

Анализ на измерение цитокинов: TNF $\alpha$ , IFN $\delta$  и IL-10 был выполнен с использованием крови пациентов с РА. В данном анализе была оценена  
15 потенциальная возможность пептидов *hHsp60* увеличивать или уменьшать уровни различных цитокинов, вовлеченных в патогенез болезни.

Кровь каждого пациента, начиная с 10 мл, была разбавлена 1/2 PBS 1X, 5 мл от указанного разбавления были добавлены к 3 мл Ficoll-Paque (Amersham) в центрифужных пробирках по 15 мл, которые центрифугировали в течение 30 мин  
20 при 1200 об/мин. Было выделено кольцо, соответствующее мононуклеарным клеткам. Затем клетки были дважды промыты 15 мл PBS 1X и после каждой промывки отцентрифугированы при 900 об/мин. Наконец, осадок клеток был ресуспендирован в RPMI 1640, содержащем 10% бычьей эмбриональной сыворотки с добавлением пенициллина (100 Ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), NERES 25 мМ/л и L-глутамин 2  
25 мМ (все получено от Gibco BRL). Полученные мононуклеарные клетки были высеяны в количестве 10<sup>6</sup> клеток на лунку в 24-луночные планшеты (Costar) в объеме 800 мкл. Затем были добавлены пептиды *hHsp60* в диапазоне концентрации от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл, с целью определения оптимальной концентрации каждого пептида, чтобы регулировать уровни цитокинов. Фитогемагглютинин (РНА) 1% использовался в  
30 качестве положительного контроля клеточной стимуляции, тогда как только RPMI 1640 использовали как контроль роста базальных клеток.

Клетки культивировали в течение 24 часов, затем из каждой лунки отобрали супернатант, разбавили в 1/2 раз, после чего при помощи специальных наборов (Quantikine®, R&D Системы), согласно рекомендациям производителей была  
35 определена концентрация цитокина.

Уровни TNF $\alpha$ , модулированные пептидами F19-6 и F19-7 в мононуклеарных клетках пациентов с РА, представлены на фиг.8. На данной фигуре буква А обозначает культивируемые *in vitro* без пептидов клетки; тогда как В обозначает клетки, *in vitro*  
40 стимулируемые пептидом F19-6, и С обозначает клетки, *in vitro* стимулируемые пептидом F19-7. На фигуре, когда существует статистически существенное различие между уровнями цитокинов, секретируемых клетками, которые стимулируются пептидами, и уровнями цитокинов в не стимулируемых клетках, то в столбцах для уровней соответствующего цитокина подписывают другую букву.

У пациентов, обозначенных P19 и P21, по сравнению с не стимулируемыми  
45 клетками, как это видно на фиг.8, уровни TNF $\alpha$  значительно снижались пептидами F19-6 и F19-7, хотя у пациента P19 снижение уровня указанного цитокина более существенно с пептидом F19-7.

У пациента, обозначенного P13, уровни TNF $\alpha$  были увеличены пептидом F19-6, однако уровни данного цитокина значительно понижаются, когда мононуклеарные  
50 клетки указанного пациента стимулируют пептидом F19-7. Эти результаты доказывают, что хотя пептид F19-7 был разработан, чтобы презентироваться МНС крысы, он может понижать уровни указанного цитокина, который является в значительной степени ответственным за показатели воспалительного процесса при

РА, таким образом, указанный пептид является потенциальным терапевтическим кандидатом для лечения данной болезни.

#### Пример 16

#### Измерение уровня цитокинов, индуцированных пептидами E18-12 и E18-3, у пациентов с РА

Анализы на измерение цитокинов TNF $\alpha$ , IFN $\delta$  и IL-10 были выполнены с использованием крови пациентов с РА. В данном анализе была оценена способность пептидов *hHsp60* повышать или снижать уровни различных цитокинов, вовлеченных в патогенез заболевания.

У каждого пациента было отобрано 10 мл крови, которая была разбавлена 1 к 2 в PBS 1X. К 5 мл указанного раствора в 15 мл центрифужных пробирках добавили 3 мл Ficoll-Paque (Amershan) и центрифугировали в течение 30 мин при 1200 об/мин. Было выделено кольцо, соответствующее мононуклеарным клеткам. Затем клетки были дважды промыты 15 мл PBS 1X и после каждой промывки отцентрифугированы при 900 об/мин. Наконец, осадок был ресуспендирован в среде RPMI 1640, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, с добавлением пенициллина (100 Ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), NEPES 25 мМ/л и L-глутамина 2 мМ (все получено от Gibco BRL). Полученные мононуклеарные клетки были высеяны в количестве 10<sup>6</sup> клеток на лунку в 24-луночных планшетах (Costar) в объеме 800 мкл. Впоследствии были добавлены пептиды *hHsp60* в диапазоне концентрации от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл, с целью определения оптимальной концентрации каждого пептида, чтобы модулировать уровни цитокина. Фитогемагглютинин (РНА) 1% использовался в качестве положительного контроля клеточной стимуляции, тогда как только RPMI 1640 использовали как контроль роста базальных клеток.

Клетки культивировали в течение 24 часов, затем из каждой лунки отобрали супернатант, разбавили в 1/2 раз, после чего при помощи специальных наборов (Quantikine®, R&D Системы), согласно рекомендациям производителей, была определена концентрация цитокина.

Уровни TNF $\alpha$ , модулированные пептидами E18-3 и E18-12 в мононуклеарных клетках пациентов с РА, представлены на фиг.9. У пациентов, представленных как P4, P5 и P16, экспрессируются молекулы DR 0306, у пациентов, обозначенных P7, P8 и P12, экспрессируются молекулы DR 0303, тогда как пациент P9 демонстрирует генотип DR0506, а пациент P10 имеет генотип DR 0204. На данной фигуре буква А обозначает клетки, *in vitro* культивируемые без пептидов; тогда как В соответствует клеткам, *in vitro* стимулируемым пептидом E18-3, и С обозначает клетки, *in vitro* стимулируемые пептидом E18-12.

На фигуре, когда существует статистически существенное различие между уровнями цитокинов, секретируемых клетками, которые стимулируются пептидами, и уровнями цитокинов в нестимулируемых клетках, то в столбцах для уровней соответствующего цитокина подписывают другую букву.

Как это видно на фиг.9, индукция синтеза TNF $\alpha$  в мононуклеарных клетках пациентов, стимулируемых пептидами E18-12 и E18-3, зависит от молекул HLA типа II, которые экспрессируются у данных пациентов. У пациентов P4, P5 и P6, которые демонстрируют генотип DR 0306, наблюдался статистически существенный рост концентрации TNF $\alpha$ , по сравнению с клетками, не стимулируемыми пептидами.

Тот же эффект имеет место у пациента P9 с генотипом DR0506 и у пациента P10 DR 0204.

У пациентов P7, P8 и P12, представляющих генотип DR 0303, не наблюдали никакого различия в уровнях TNF $\alpha$ , когда мононуклеарные клетки стимулируются пептидами по изобретению.

Модуляция уровней IL-10 для пептидов E18-3 и E18-12 представлена на фиг.9, на которой буква А обозначает клетки, культивируемые *in vitro* без пептидов; тогда как В соответствует клеткам, стимулируемым *in vitro* пептидом E18-3, и С представляет

клетки, стимулируемые *in vitro* пептидом E18-12.

У пациентов P9, и P10 в случае IL-10, как показано на фиг.10, наблюдается существенное снижение уровня этого цитокина, но у остальной части пациентов не было существенных изменений.

5 Из этих наблюдений можно сделать вывод, что пептиды E18-12 и E18-3 индуцируют TH1 фенотип в периферических мононуклеарных клетках.

Терапевтическим вариантом исходных пептидов E18-12 или E18-3 может быть их введение оральным путем, и таким образом они будут индуцировать механизмы толерантности, которые вносят значительный вклад в уменьшение воспаления.

10 Пример 17

Измерение цитокина, индуцированного пептидными производными APL типа у пациентов с RA

Опираясь на предыдущие результаты, авторы решили модифицировать указанные исходные пептиды, соответствующие эпитопам Т-клеток, на участках контакта с молекулой HLA, используя методы биоинформатики, таким образом, чтобы модифицированные пептиды APL типа могли изменить профиль цитокинов к регулирующему фенотипу. Кроме того, модификации, сделанные в каждом из этих пептидов, соответствуют участкам связывания пептида, которые подтверждены для большинства молекул HLA, экспрессируемых у пациентов, и которые теоретически являются благоприятными для взаимодействия с различными молекулами HLA.

Анализ на измерение цитокинов TNF $\alpha$  и IL-10 был выполнен с использованием крови пациентов с RA. В данном анализе была оценена способность пептидов APL типа, производных *hHsp60*, повышать или снижать уровни различных цитокинов, вовлеченных в патогенез заболевания. Кроме того, в этот анализ в качестве контроля эксперимента были включены исходные пептиды (E18-3, E18-12).

APL пептиды, оцененные в этих тестах были следующим:

MGPKGRTVIIIQSWGSPKGTK (SEQ. ID. NO:5)

MGPKGRTVIIMQSWGSPKGTK (SEQ. ID. NO:6)

MGPKGRTVIIAQSWGSPKGTK (SEQ. ID. NO:7)

30 MGPKGRTVIIIEQSLGSPKGTK (SEQ. ID. NO:8)

MGPKGRTVIIIEQSMGSPKGTK (SEQ. ID. NO:9)

MGPKGRTVIIIQSLGSPKGTK (SEQ. ID. NO:10)

MGPKGRTVIIIQSMGSPKGTK (SEQ. ID. NO:11)

MGPKLRTVIIIEQSWGSPKGTK (SEQ. ID. NO:12)

35 MGPKLRTVIIIQSMGSPKGTK (SEQ. ID. NO:13)

SIDLKDKLKNIGAKLVQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO:14)

SIDLKDKYKNIGAKLSQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO:15)

SIDLKDKLKNIGAKLSQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO:16)

SIDLKDKYKNAGAKLVQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO:17)

40 SIDLKDKYKNIGAKLVQLVANNTNEEA (SEQ. ID. NO:18)

SIDLKDKYKNIGAKLVQAVANNTNEEA (SEQ. ID. NO:19)

SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNANEEA (SEQ. ID. NO:20)

SIDLKDKYKNIGAKLVQLVANNANEEA (SEQ. ID. NO:21)

У каждого пациента было отобрано 10 мл крови, которая была разбавлена 1 к 2 в PBS 1X. К 5 мл указанного раствора в 15 мл центрифужных пробирках добавили 3 мл Ficoll-Paque (Amershan) и центрифугировали в течение 30 мин при 1200 об/мин.

Было выделено кольцо, соответствующее мононуклеарным клеткам. Затем клетки были дважды промыты 15 мл PBS 1X и после каждой промывки отцентрифугированы при 900 об/мин. Наконец, осадок был ресуспендирован в среде RPMI 1640, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, с добавлением пенициллина (100 Ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), HEPES 25 мМ/л и L-глутамин 2 мМ (все получено от Gibco BRL).

Полученные мононуклеарные клетки культивировали в количестве 10<sup>6</sup> клеток на

лунку в 24-луночных планшетах (Costar) в объеме 800 мкл. Клетки стимулировали пептидами [E18-3, E18-12, E18-3APL1 (SEQ. ID. NO:18), E18-3APL2 (SEQ. ID. NO:21), E18-12APL1 (SEQ. ID. NO:5), E18-12APL3 (SEQ. ID. NO:12)] при концентрации 40 мкг/мл, повторяя эксперимент трижды. RPMI 1640 использовался в качестве контроля роста базальных клеток.

Клетки культивировали в течение 24 часов, затем из каждой лунки отобрали супернатант, разбавили в 1/2 раз, после чего при помощи специальных наборов (Quantikine®, R&D Системы), согласно рекомендациям производителей была определена концентрация цитокина.

На фиг.11 показаны уровни IL-10, индуцированного пептидами (E18-12 и E18-3) и набором APL пептидов: E18-3APL1 (SEQ. ID. NO:18); E18-3APL2 (SEQ. ID. NO:21); E18-12APL1 (SEQ. ID. NO:5); E18-12APL3 (SEQ. ID. NO:12). На этой фигуре буквами обозначены статистически существенные различия (авторы изобретения только сравнивают статистические значения между различными пептидами и контрольными клетками у каждого пациента индивидуально). Кроме того, клетки пациентов P4 и P6 не стимулировались ни пептидом E18-3APL2, ни пептидом E18-12APL3. Очевидно, что у всех пациентов пептид E18-3APL1 очень значительно повышает уровни IL-10 по сравнению с не стимулируемыми клетками. Увеличение, вызванное этим пептидом у некоторых пациентов, таких как P2 и P4, было приблизительно в 9 раз выше, чем количество, выработанное клетками без стимуляции, а у пациентов P1, P3 и P5 приблизительно в 5 раз выше. Кроме того, из-за существенного увеличения уровней IL-10 у пациентов P1, P4 и P6 подобные результаты были получены и с E18-12APL1. С другой стороны, ни исходные пептиды, ни пептиды E18-3APL2 и E18-12APL3 не вызвали увеличение уровней IL-10 по сравнению с клетками, которые являлись отрицательным контролем.

На фиг.12 показаны уровни TNF $\alpha$ , индуцированного различными пептидами в той же самой группе пациентов. На этой фигуре буквы показывают статистически существенные различия (авторы только сравнивают статистическое значение между различными пептидами и контрольными клетками у каждого пациента индивидуально). Кроме того, клетки пациентов P4 и P6 не стимулировались ни пептидом E18-3APL2, ни пептидом E18-12APL3. Так как можно оценить это, все пациенты не отвечают с той же самой интенсивностью на стимуляцию различными пептидами, хотя известно, что ответ был совершенно гомогенным. С другой стороны, пептид E18-12APL1 больше всего увеличил продукцию TNF $\alpha$ , особенно у пациентов P4 и P5, тогда как пациенты P1, P2 и P3 показали небольшое увеличение относительно отрицательного контроля. Кроме того, пептид E18-3APL1 оказывал на большинство пациентов аналогичное действие. В случае с пептидом E18-3APL1 клетки пациентов P2, P4 и P5 показали значительное повышение уровней TNF $\alpha$ , хотя и менее выраженное. В этом тесте авторы получили результаты, подобные предыдущим анализам с исходными пептидами. Предыдущие результаты показывают, что ни пептид, ни его APL не вызывают уменьшение TNF $\alpha$ , экспрессируемого в мононуклеарных клетках пациентов.

Указанные результаты могли быть противоречивыми, так как те APL, которые увеличивает продукцию IL-10, способствуют повышению уровней TNF $\alpha$ . На фиг.13 показывается отношение уровней IL-10 и TNF $\alpha$ , индуцированных исходными пептидами и их APL-производными. На этой фигуре буквы указывают статистически существенные различия (авторы только сравнивают статистическое значение между различными пептидами и контрольными клетками у каждого пациента индивидуально).

Кроме того, клетки пациентов P4 и P6 не стимулировали ни пептидами E18-3APL2, ни пептидами E18-12APL3. Очевидно, что повышение уровней IL-10 по сравнению с уровнями TNF $\alpha$ , было значительно более сильным, потому что клетки, стимулируемые E18-3APL1 показали индекс выше, чем 1 у четырех из шести

пациентов, что указывает на то, что уровни IL-10 превысили уровни TNF $\alpha$ . Кроме того, у всех пациентов уровни IL-10 были значительно выше в клетках, стимулируемых пептидом E18-3APL1 по сравнению с клетками, которые являлись отрицательным контролем, обнаруживая при этом статистически значимые различия. В случае с E18-12APL1 различия по сравнению с отрицательным контролем не были настолько заметны. Так что, хотя E18-3APL1 и увеличивает уровни TNF $\alpha$ , чистый преобладающий эффект состоит в увеличении уровней IL-10, что объясняется как поляризация ответа в пользу иммуносупрессивных цитокинов.

Результаты настоящего исследования являются чрезвычайно перспективными, поскольку данные результаты предполагают, что эти два APL-производных могут быть введены пациентам и могут индуцировать субпопуляцию регуляторных Т-клеток, секретирующих IL-10, который вызывает активную супрессию на общем уровне. Другой частный вывод, который авторы изобретения могут сделать посредством анализа этих результатов, состоит в том, что эти APL фактически демонстрируют гомогенное действие на всех изученных пациентов, независимо от генотипа, который они имеют. Эти результаты чрезвычайно обнадеживающие, поскольку они предполагают, что введение данных APL-производных оказывало бы тот же самый эффект на всех пациентов, несмотря на существующие различия относительно молекул HLA типа II, которые они имеют.

Полученные экспериментальные данные подтверждают, что основное преимущество настоящего изобретения состоит в использовании фармацевтических композиций, включающих иммуномодулирующие пептиды белка стресса человека, Hsp60, которые соответствуют эпитопам Т-клеток, или варианты этих пептидов APL-типа, которые могут эффективно использоваться в терапии пациентов с РА, вызывая специфический иммунный ответ, направленный на выключение клонов аутореактивных Т-клеток, включенных в иммунопатогенные механизмы этого заболевания. Метод лечения, который предложен авторами в настоящем изобретении, является приемлемым и может быть распространен на большое количество пациентов, а также может использоваться в комбинации с современными методами терапии этого заболевания.

#### Пример 18

#### Оценка терапевтического эффекта пептидных производных APL-типа в животной модели, в которой артрит вызван Mт

Животные были разделены на двенадцать групп по восемь крыс в каждой. Болезнь была вызвана в одиннадцати группах животных (группы I-XI), из которых десять групп обработали пептидами, а одну оставили в качестве контроля индукции заболевания. Группы животных, которые обработали пептидами, получили 50 мкг пептида в объеме 100 мкл PBS на крысу, в дни 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 после индукции болезни при помощи Mт. Животные, разделенные на двенадцать групп, обрабатывали следующим способом:

Группа I: получала пептид E18-12 (SEQ. ID. NO:1)

Группа II: получала пептид соответствующий SEQ. ID. NO:5

Группа III: получала пептид, соответствующий SEQ. ID. NO:8

Группа IV: получала пептид, соответствующий SEQ. ID. NO:12

Группа V: получала пептид, соответствующий SEQ. ID. NO:13

Группа VI: получала пептид E18-3 (SEQ. ID. NO:2)

Группа VII: получала пептид, соответствующий SEQ. ID. NO:14

Группа VIII: получала пептид, соответствующий SEQ. ID. NO:15

Группа IX: получала пептид, соответствующий SEQ. ID. NO:16

Группа X: получала пептид, соответствующий SEQ. ID. NO:17

Группа XI: не получала пептид (контроль индукции заболевания)

Группа XII: заболевание не индуцировали и не вводили пептид (отрицательный контроль).

В дни 21 и 35 после индукции несколько животных из каждой группы умерщвили, была извлечена селезенка, и был взят образец суставов для гистопатологического анализа.

В группах животных, прошедших терапию пептидами APL-типа, по сравнению с не обработанной группой животных и с группами, обработанными пептидами E18-12 и E18-3, клиническое улучшение было значительным. Эти результаты, демонстрирующие во всех случаях превосходство пептидных производных APL-типа над исходными пептидами, были подтверждены гистопатологическим анализом и измерением уровня цитокинов.

На фиг.14 показан график развития болезни в четырех группах животных, относящихся к данной животной модели. В этом случае группы представляют собой: группа I (животным вводили E18-12), группа II (животным вводили E18-12APL1 SEQ. ID. NO: 5), группа XI (контроль индукции болезни) и группа XII (здоровые животные). На этом графике различные буквы обозначают существенные различия ( $p < 0,001$ ) (его сравнивают со статистически существенным различием между всеми группами в определенные дни измерений).

На данном графике можно увидеть, что с 12 дня после индукции болезни животные групп I, II и XI начали показывать характерные клинические признаки РА. Многие животные также демонстрировали внесуставные проявления, такие как узелки на ушах, хвосте и на конечностях. Самые серьезные проявления РА наблюдали приблизительно на 20-й день в трех группах больных животных. В случае животных, которым ввели E18-12, на 21-й день не могли выявить существенные различия по сравнению с контрольной группой индукции болезни. Однако примерно на 35-й день после индукции болезни клинические признаки у животных этой группы были значительно более легкими по сравнению с клиническими признаками в группе XI ( $p < 0,001$ ). Эти результаты подтверждают, что защитный эффект пептида E18-12 проявляется, приблизительно, на 35-й день. В этом смысле можно рекомендовать вводить этот пептид в более ранних фазах болезни, чтобы получить лучшие результаты на 21-й день. Однако в случае животных группы II клинические признаки воспаления были очевидно более слабыми по сравнению с группами I и XI ( $p < 0,001$ ), что указывает на то, что этот пептид проявляет мощный защитный эффект у животных, у которых была вызвана болезнь.

#### Формула изобретения

1. Пептиды белка теплового шока человека 60 кДа, представляющие собой эпитопы для Т-клеток, предназначенные для индукции механизмов периферической толерантности, в частности индукторы механизмов анергии, или механизмов, опосредованных клонами регуляторных Т-клеток у пациентов с ревматоидным артритом, характеризующиеся последовательностями:

E18-12 MGPKGRTVIEQSWGSPKVTK (SEQ. ID. NO:1)  
 E18-3 SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG (SEQ. ID. NO:2)  
 F19-6 IIDPTKVVRTALLDAA (SEQ. ID. NO:3).

2. Пептиды APL-типа, представляющие собой производные пептида E18-12 (SEQ. ID. NO:1), модифицированные по участкам контакта с молекулами МНС человека, с аминокислотной последовательностью:

MGPKGRTVIEQSWGSPKVTK

1 2 34 56 7

где замену аминокислоты выбирают из:  
 в положении 1 аминокислота замещена на L;  
 в положении 4 на A, L, M;  
 в положении 6 на L, M.

3. Пептидные производные APL-типа по п.2, имеющие аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ. ID. NO:5, SEQ. ID. NO:6, SEQ. ID. NO:7, SEQ. ID. NO:8, SEQ. ID. NO:9, SEQ. ID. NO:10, SEQ. ID. NO:11, SEQ. ID. NO:12 и SEQ. ID. NO:13.

5 4. Пептиды APL-типа, представляющие собой производные пептида E18-3 (SEQ. ID. NO:2), модифицированные по участкам контакта с молекулами МНС человека, с аминокислотной последовательностью:  
S I D L K D K K Y K N I G A K L V Q D V A N N T N E E A

1 2 3 4 5 6 7 8

10 где замену аминокислоты выбирают из:  
в положении 1 аминокислота замещена на L,  
в положении 2 на A;  
в положении 5 на S;  
в положении 6 на A, L;  
15 в положении 8 на A.

5. Пептидные производные APL-типа по п.4, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ. ID. NO:14, SEQ. ID. NO:15, SEQ. ID. NO:16, SEQ. ID. NO:17, SEQ. ID. NO:18, SEQ. ID. NO:19, SEQ. ID. NO:20 и SEQ. ID. NO:21.

20 6. Пептид, представляющий собой производное APL-типа пептида F19-6 (SEQ. ID. NO:3), модифицированный по участкам контакта с молекулами МНС крысы, с аминокислотной последовательностью:  
I I D P T K V V R T A L L D A A (F19-6)

25 1 2

где аминокислота в положении 1 замещена на H,  
в положении 2 замещена на E,  
и соответствует пептиду F19-7: (SEQ. ID. NO:4).

30 7. Фармацевтическая композиция, обладающая иммуномодулирующей активностью, включающая один или несколько пептидов по пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Фармацевтическая композиция по п.7 для лечения ревматоидного артрита.

35 9. Способ лечения пациентов, страдающих ревматоидным артритом, включающий введение эффективных доз пептидов по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.7.

40

45

50

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología  
 <120> Пептиды HSP60 и их APL-производные и фармацевтические композиции  
  
 <130> pерМС  
 <140>  
 <141>  
 <160> 21  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 1  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Trp Gly Ser  
   1                  5                  10                  15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
                   20

<210> 2  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 2  
 Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val  
   1                  5                  10                  15  
 Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala Gly  
                   20                  25

<210> 3  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 3  
 Ile Ile Asp Pro Thr Lys Val Val Arg Thr Ala Leu Leu Asp Ala Ala  
   1                  5                  10                  15

<210> 4  
 <211> 16

<212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 4  
 Ile Ile Asp Pro Thr His Val Val Arg Thr Glu Leu Leu Asp Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 5  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Trp Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 6  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Met Gln Ser Trp Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 7  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Ala Gln Ser Trp Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 8

<211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 8  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Leu Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 9  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Met Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 10  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Leu Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 11  
 Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Met Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 12  
 Met Gly Pro Lys Leu Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Trp Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 13  
 Met Gly Pro Lys Leu Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Met Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Val Thr Lys  
 20

<210> 14  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 14  
 Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Leu Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala  
 20 25

<210> 15  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 15  
 Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Ser  
 1 5 10 15

Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala  
 20 25

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: пептид

<400> 16

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Leu Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Ser  
 1 5 10 15

Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala  
 20 25

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: пептид

<400> 17

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Gly Ala Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala  
 20 25

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: пептид

<400> 18

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Gln Leu Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala  
 20 25

<210> 19

<211> 27

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: пептид

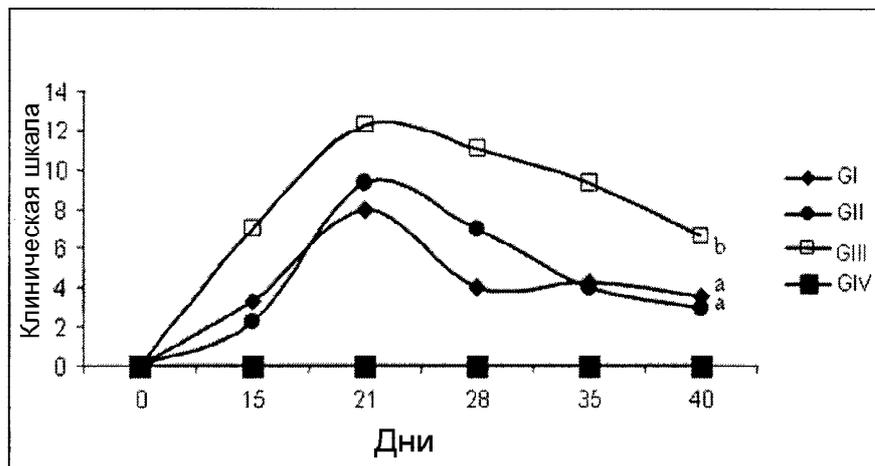
<400> 19  
 Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala  
 20 25

<210> 20  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 20

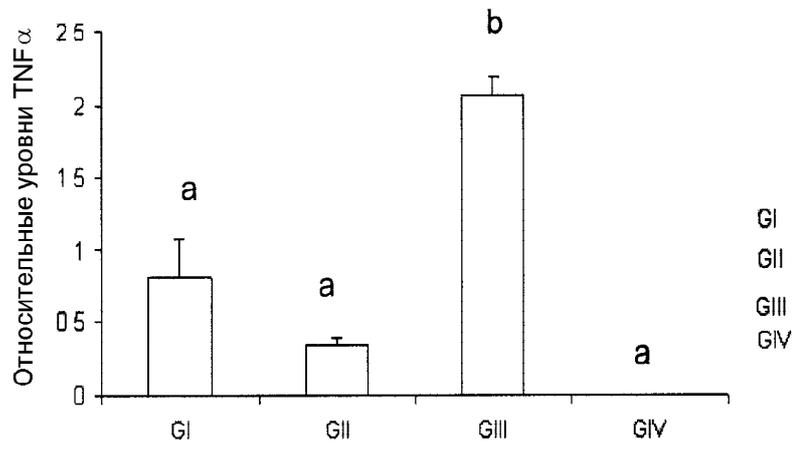
Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gln Asp Val Ala Asn Asn Ala Asn Glu Glu Ala  
 20 25

<210> 21  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: пептид  
 <400> 21

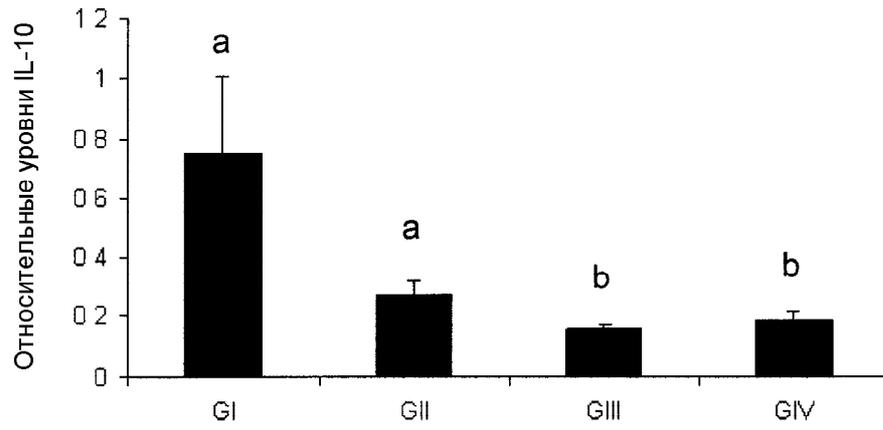
Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Val Ala Asn Asn Ala Asn Glu Glu Ala  
 20 25



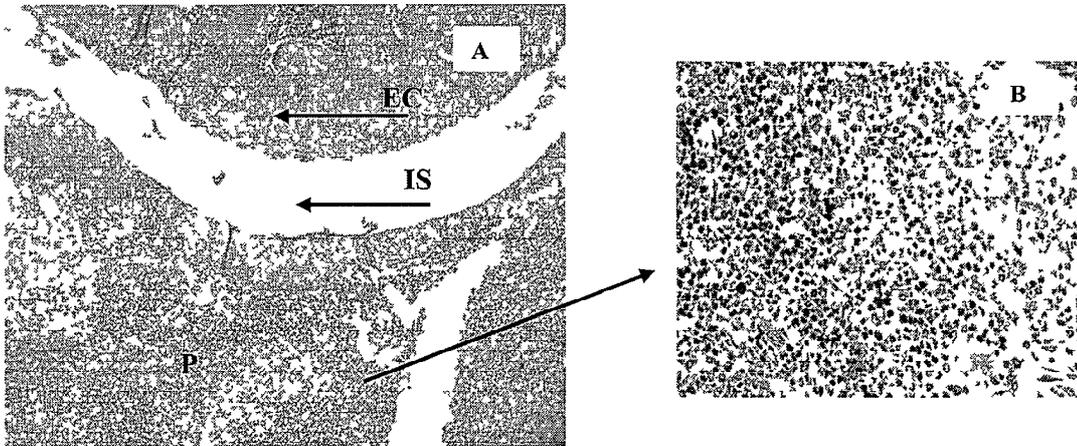
ФИГ. 1



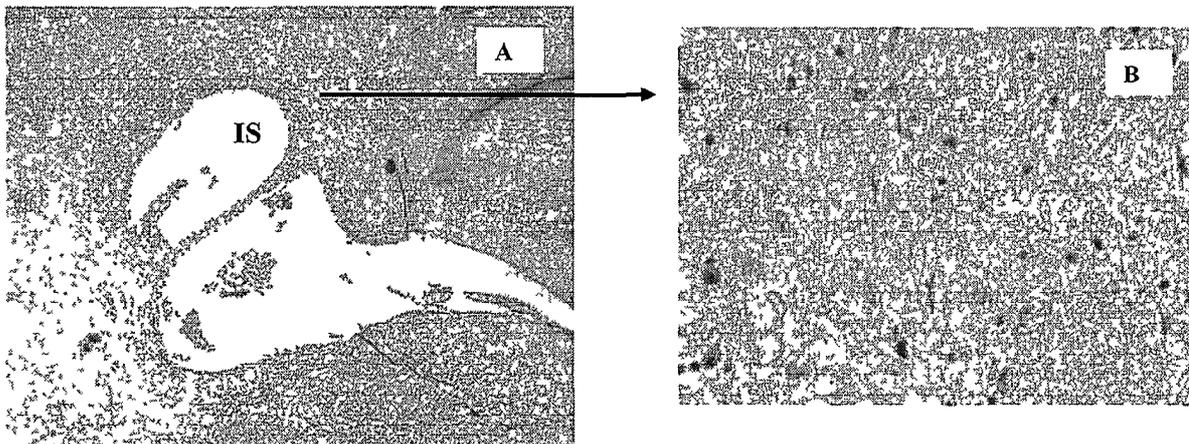
ФИГ. 2



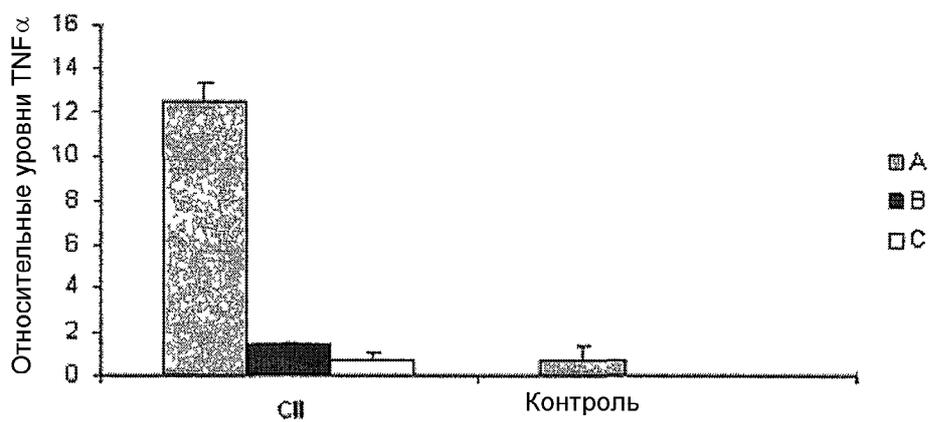
ФИГ. 3



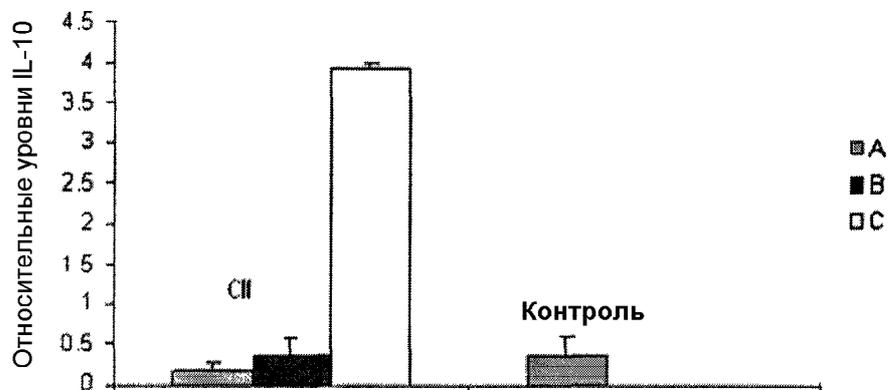
ФИГ. 4



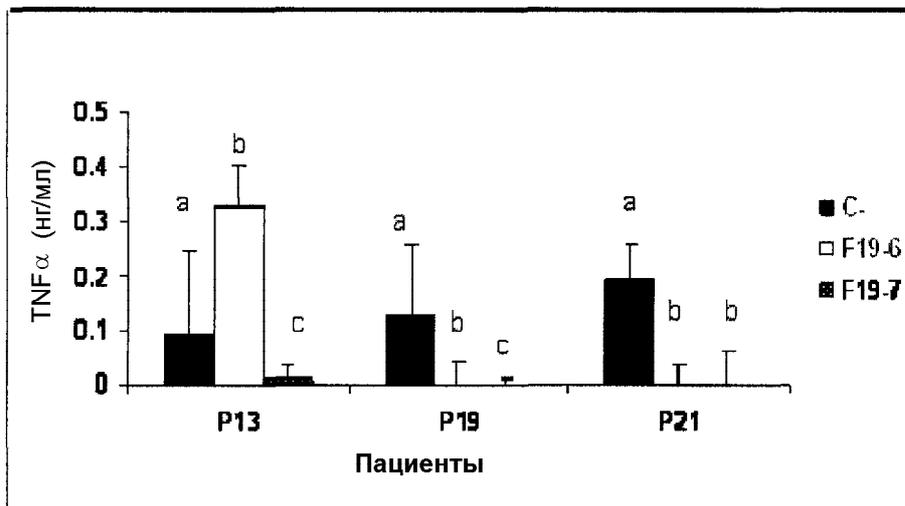
ФИГ. 5



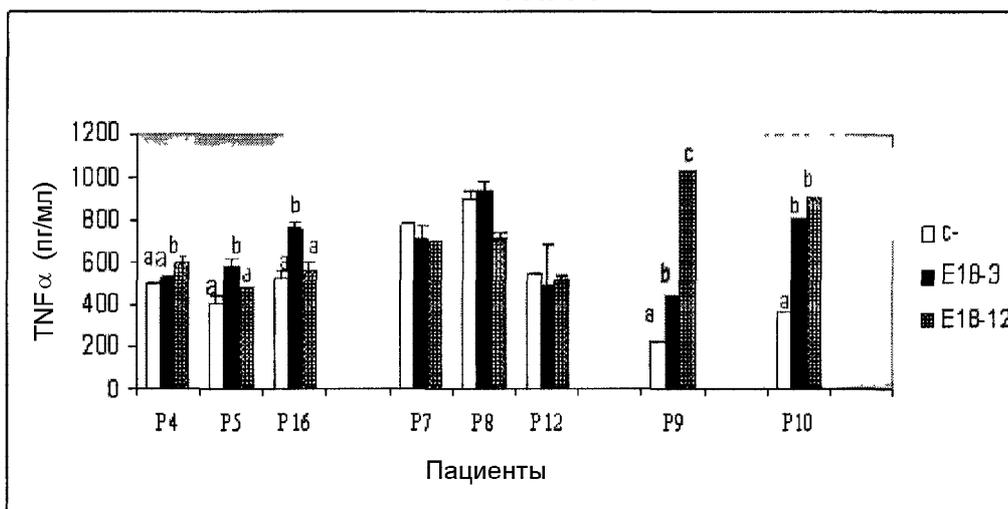
ФИГ. 6



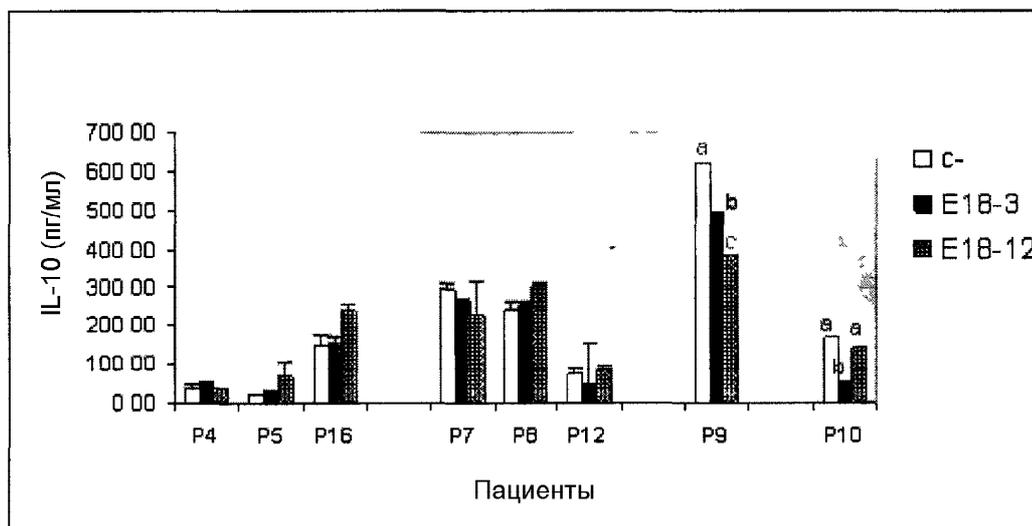
ФИГ. 7



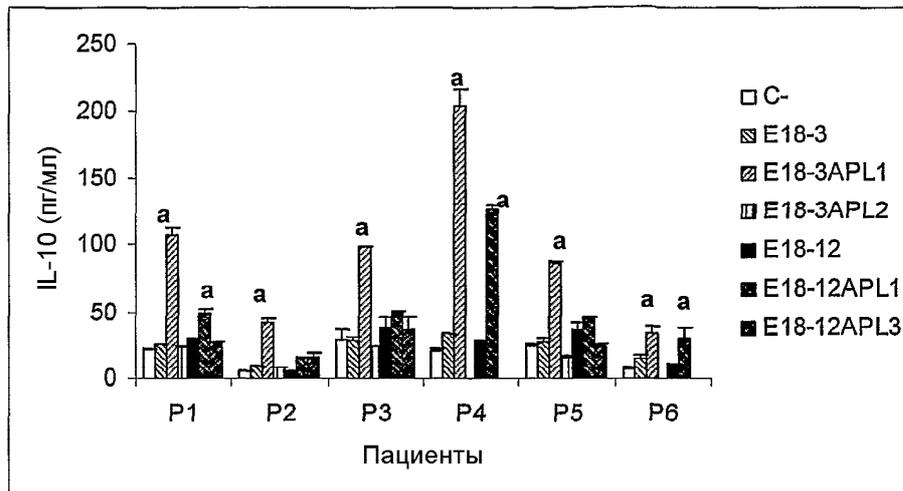
ФИГ. 8



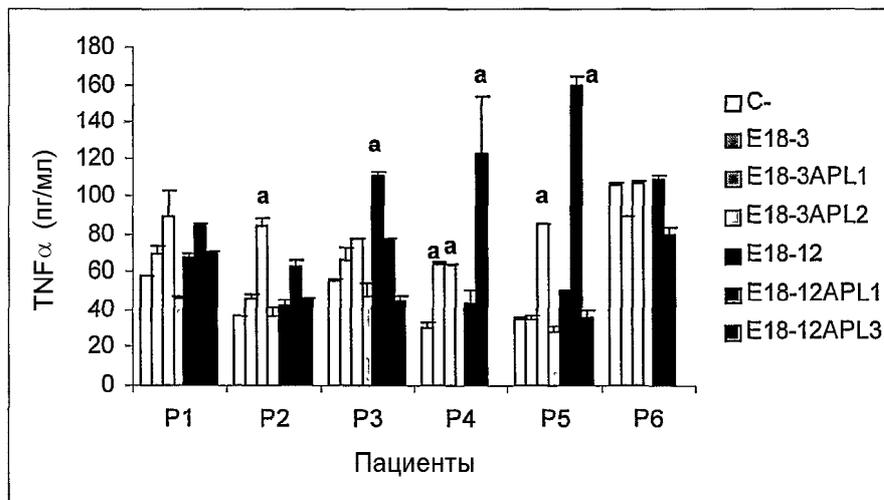
ФИГ. 9



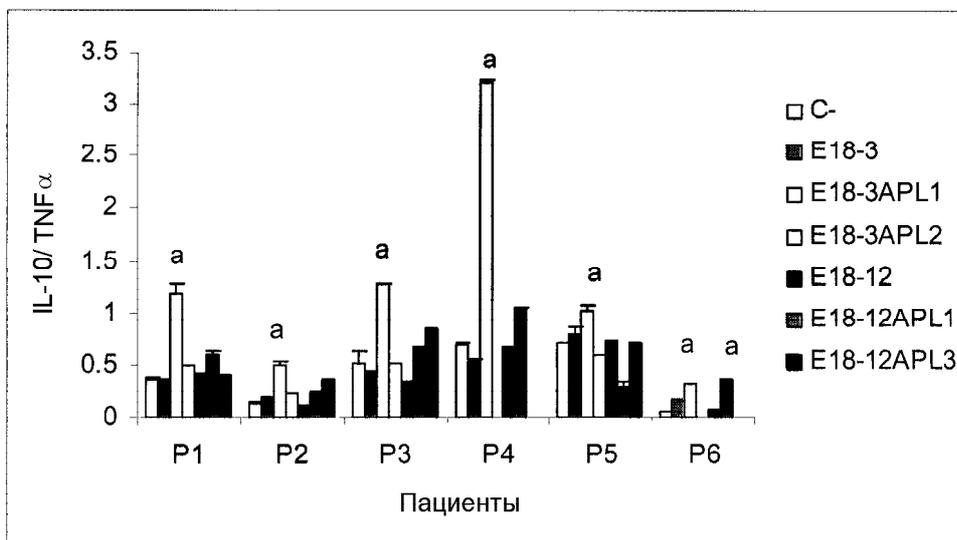
ФИГ. 10



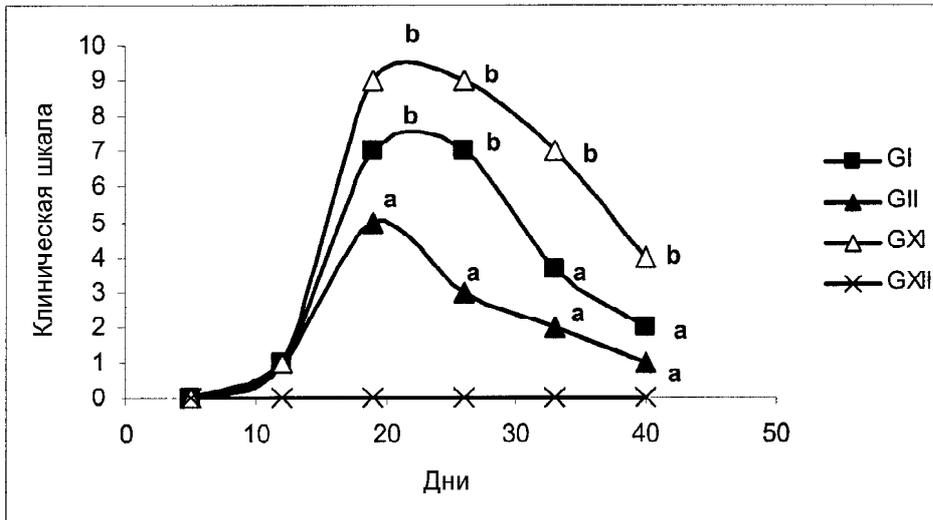
ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14