



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 196 606** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 38/17**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99107658/14, 17.09.1997
(24) Дата начала действия патента: 17.09.1997
(30) Приоритет: 18.09.1996 IT M196A001919
18.09.1996 IT M196A001920
18.09.1996 IT M196A001921
18.09.1996 IT M196A001922
(43) Дата публикации заявки: 20.02.2001
(46) Дата публикации: 20.01.2003
(56) Ссылки: WO 9602567 A1, 01.02.1996. WO
9318146 A, 16.09.1993. RU 96115937 A,
20.10.1998.
(85) Дата перевода заявки PCT на национальную
фазу: 19.04.1999
(86) Заявка PCT:
EP 97/05079 (17.09.1997)
(87) Публикация PCT:
WO 98/11909 (26.03.1998)
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой

(71) Заявитель:
ЗЕТЕСИС С.П.А. (ИТ)
(72) Изобретатель: ПАНЕРАИ Альберто Э. (ИТ),
БАРТОРЕЛЛИ Альберто (ИТ)
(73) Патентообладатель:
ЗЕТЕСИС С.П.А. (ИТ)
(74) Патентный поверенный:
Егорова Галина Борисовна

(54) ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛКОВ В КАЧЕСТВЕ АГЕНТОВ ПРОТИВ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(57)
Изобретение относится к медицине, в частности к белкам и применению белков, выделенных с помощью хлорной кислоты из органов животного для приготовления лекарственных препаратов, эффективных против аутоиммунных заболеваний, в

частности, эффективных против артрита, атеросклероза, множественного склероза, диабета. Изобретение позволяет снижать развитие или предотвращать указанные патологические состояния. 2 с. и 7 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU
2
1
9
6
6
0
6
C
2

RU
2
1
9
6
6
0
6
C
2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 196 606** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 38/17**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99107658/14, 17.09.1997
(24) Effective date for property rights: 17.09.1997
(30) Priority: 18.09.1996 IT MI96A001919
18.09.1996 IT MI96A001920
18.09.1996 IT MI96A001921
18.09.1996 IT MI96A001922
(43) Application published: 20.02.2001
(46) Date of publication: 20.01.2003
(85) Commencement of national phase: 19.04.1999
(86) PCT application:
EP 97/05079 (17.09.1997)
(87) PCT publication:
WO 98/11909 (26.03.1998)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. N.G.Lebedevoj

(71) Applicant:
ZETESIS S.P.A. (IT)
(72) Inventor: PANERAI Al'berto Eh. (IT),
BARTORELLI Al'berto (IT)
(73) Proprietor:
ZETESIS S.P.A. (IT)
(74) Representative:
Egorova Galina Borisovna

(54) **APPLICATION OF PROTEINS AS AGENTS AGAINST AUTOIMMUNE DISEASES**

(57) Abstract:
FIELD: medicine, immunology. SUBSTANCE:
invention relates to proteins and
application of proteins isolated from animal
organs by means of perchloric acid for
preparing medicinal preparations that are
effective against autoimmune diseases, in

part, arthritis, atherosclerosis,
cerebrospinal sclerosis and diabetes
mellitus. Invention allows to reduce or
prevent indicated pathological states.
EFFECT: valuable medicinal properties of
proteins. 9 cl, 1 tbl

RU 2 196 606 C2

RU 2 196 606 C2

Изобретение относится к применению белков, выделенных из органов животного, в частности, из печени млекопитающего для приготовления лекарственных препаратов, эффективных против аутоиммунных заболеваний, в частности, эффективных против атеросклерозов, артрита, множественного склероза, диабета.

Введение полного адьюванта Фрейнда доказало возможность индуцирования экспериментального артрита, очень близкого к ревматоидному артриту у крыс. С другой стороны, введение адьюванта кроликам индуцирует не артритную патологию, а атеросклероз. Проведенные исследования показали, что при обоих заболеваниях иммунореактивностью к эндогенному фактору проявляется наличием белка теплового шока 60 (БТШ-НСП60). Последующие исследования подтверждают эти наблюдения, доказывающие, что введение полного адьюванта Фрейнда может быть заменено введением НСП60, вызывая те же самые патологии. Впоследствии было доказано, что предварительное введение крысам адьюванта, НСП60 или их фрагментов предотвращает атаку артрита по неизвестному механизму, тогда как дополнительное введение адьюванта ухудшает развитие заболевания.

Совсем недавно было обнаружено, что предварительное введение адьюванта предотвращает также другие исследуемые патологии; в основном речь идет об аутоиммунных заболеваниях, таких как диабет или экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЕАЕ). Наконец, стало понятно, что НСП60 имеют структурные аналоги с высокомолекулярными аутогенами, следовательно, они борются с большим количеством заболеваний, чем предполагалось ранее.

WO 92/10197 описывает белковые фракции, выделяемые с помощью хлорной кислоты из органов млекопитающих, и их применение в качестве противоопухолевых агентов. В этих фракциях при электрофорезе в геле можно различать три основных компонента, имеющих молекулярные массы 50, 14 и 10 кДа. Очищенный экстракт, содержащий эти три компонента, впоследствии обозначили как UK101. Последовательность белкового компонента с массой 14 кДа, которая является главной, если не единственной ответственной за описанные активности, приведена ниже в таблице и в WO 96/02567, и это совпадает с описаниями других авторов (Levy-Favatier, Eur. Biochem. 1903, 21(3) 665-73), которые предполагали, что новые выявленные последовательности относятся к семейству белков, известных как шаперонины, к которым относятся и НСП (белки теплового шока).

Белки, описанные в WO 92/10197, а также в WO 96/02567 (в последующем обозначенные как UK114), проявляют некоторые свойства, никогда не исследовавшиеся у шаперонинов или схожих белков. В большей степени это доказывается утверждением, что белки могут быть применены в профилактике и лечении аутоиммунных заболеваний, в особенности атеросклеротических расстройств, таких как атеросклероз, вызванный трансплантацией органа, артрит, множественный склероз и

диабет.

Изобретение предпочтительно относится к применению очищенных белков UK101 и UK114 для приготовления лекарственных препаратов для предотвращения и лечения аутоиммунных заболеваний, таких как атеросклероз, вызванный трансплантацией органа, множественный склероз, диабет.

Более того, изобретение относится к применению белков, имеющих высокую степень схожести с UK114, по крайней мере, на 80%, а предпочтительно на 90%.

АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Было установлено, что в настоящее время наиболее часто причиной неудачи трансплантации органов в большей степени является не отторжение, а образование атеросклеротических бляшек в месте контакта между сосудами трансплантируемого органа и сосудами хозяина. Эта патология усугубляется введением иммуносупрессоров, таких, как циклоспорин, в который входит AZT, являющийся очень токсичным при применении.

Эффективность белков UK101 и UK114 очевидна при их применении в двух обычно используемых атеросклеротических моделях, в одной из которых используется кролик с предварительным введенным полным адьювантом Фрейнда, и атеросклеротическая модель при трансплантации. В первом случае подкожно введенный адьювант индуцирует в течение 21 дня образование атеросклеротических бляшек в подвздошном ответвлении и дуге аорты. Предварительное введение (за 7 дней) UK101 и UK114 полностью предотвращает развитие патологии в большинстве случаев, в отличие от введения только адьюванта, который только снижает развитие заболевания у всех животных.

Вторая рассматриваемая модель атеросклероза при трансплантации заключается в шунтировании артериальных сосудов у крыс. Через короткое время образуются атеросклеротические бляшки в сосудах хозяина аналогично, как показывают исследования, как эта патология проявляется у человека. Предварительное введение (за 7 дней) UK101 и UK114 полностью предотвращает развитие патологии в большинстве случаев, по сравнению с обследованной группой животных, которым предварительно не вводились белки перед трансплантацией.

АНТИАРТРИТНАЯ АКТИВНОСТЬ

Эта активность очевидна и в обычной артритной модели, при которой артрит индуцируется адьювантом. В этой модели Lewis-крысам делают инъекцию в основание хвоста полного адьюванта Фрейнда, на 7-й день патология проявляется в виде опухания конечностей и артрозов. Пик развития патологии приходится на промежуток между 14 и 21 днями, затем конечности возвращаются в нормальное состояние. Предварительное введение (за 7 дней) UK101 или UK114 полностью предотвращает развитие патологии в большинстве случаев, в отличие от введения только адьюванта, которое приводит к развитию патологии у 100% животных. Введение UK101 или UK114 после введения адьюванта снижает развитие патологии.

Следовательно, это приводит к

пониманию того, что UK101 и UK114 обладают способностью снижать развитие или предотвращать патологические состояния, такие как артриты и ревматоидные артриты.

АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ МНОЖЕСТВЕННОГО СКЛЕРОЗА

Эта активность очевидна при обычной модели множественного склероза: экспериментального аллергического энцефаломиелита. Патология индуцируется подкожной инъекцией Lewis крысам гомогената спинного мозга морских свинок вместе с полным адьювантом Фрейнда. Патология проявляется в виде прогрессирующего паралича конечностей, которая проявляется на 12-й день, достигает пика на 21-й день и исчезает на 30-й день после введения иммуногена. Предварительное введение (за 7 дней) UK101 или UK114 полностью предотвращает развитие патологии в большинстве случаев и снижает опасность течения заболевания по сравнению с введением только смеси гомогената и адьюванта, которые приводят к развитию патологии у 100% животных.

Следовательно, UK101 и UK114 действительно обладают способностью снижать развитие или предотвращать патологию множественного склероза.

АНТИДИАБЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Она очевидна в обычной модели диабета, представленной ВВ крысой, у которой спонтанно развивается диабет приблизительно на 45-й день жизни. Животным вводят на 30-й день жизни UK101 или UK114 и наблюдают развитие патологии по сравнению с контрольной группой животных, которым не ввели белки. Предварительное введение приводит к снижению количества и тяжести патологии в исследуемой модели. Пациентам, имеющим различные виды опухолей, а также страдающим диабетом, вводили UK101 в щадящем режиме. У всех пациентов, которым ввели белки, независимо от вида опухолевой патологии, снижался диабет с выходом, в дальнейшем, из инсулиновой зависимости.

Следовательно, UK101 и UK114 обладают способностью изменять течение диабета или предотвращать его.

Антидиабетическая эффективность фактически подтверждается, несмотря на ограниченное число известных случаев, при которых ввели *in vivo* пациентам, страдающим от диабета.

Белки согласно изобретению могут быть многократно введены в виде инъекций с соответствующим наполнителем.

Схемы введения (дозы, частота введения и т.д.) может варьироваться в соответствии с обстоятельствами, зависящими от таких факторов, как: состояние пациента, стадии заболевания и т.д., но обычно ежедневная дозировка варьируется в пределах от 1 до 100 мг, в зависимости от необходимости.

Формула изобретения:

1. Белок, имеющий следующую последовательность (см. графическую часть).
2. Белок по п. 1, выделенный с помощью хлорной кислоты из печени млекопитающего.
3. Белок по п. 2, где выделенный белок по меньшей мере на 80% гомологичен белку по п. 1.
4. Белок по п. 1 для приготовления лекарственных средств, эффективных против аутоиммунных заболеваний.
5. Белок по п. 1 для приготовления лекарственных препаратов для предотвращения и лечения атеросклероза, связанного с трансплантацией.
6. Белок по п. 1 для приготовления лекарственных препаратов для предотвращения и лечения артритов.
7. Белок по п. 1 для приготовления лекарственных препаратов для предотвращения и лечения рассеянного склероза.
8. Белок по п. 1 для приготовления лекарственных препаратов для предотвращения и лечения диабета.
9. Фармацевтическая композиция, эффективная против аутоиммунных заболеваний, содержащая в качестве активного ингредиента белки по пп. 1-4 в смеси с подходящими наполнителями.

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15				20					25				
Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
	30					35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45					50					55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
85					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105						110	
Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile
		115					120					125	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Val			
			130					135					

RU 2196606 C2

RU ?196606 C2

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(1) ЗАЯВИТЕЛЬ:

- (A) НАЗВАНИЕ: zetesis s.p.a.
- (B) УЛИЦА: Galleria del Corso 2
- (C) ГОРОД: Milano
- (E) СТРАНА: Italy
- (F) ПОЧТОВЫЙ КОД (ZIP): 20122

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛКОВ В
КАЧЕСТВЕ АГЕНТОВ ПРОТИВ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(iii) ЧИСЛО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 1

(iv) ФОРМА СЧИТЫВАНИЯ КОМПЬЮТЕРОМ:

- (A) ТИП СРЕДЫ: ГИБКИЙ ДИСК
- (B) КОМПЬЮТЕР: IBM PC совместимый
- (C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: Patentin Release #
1.0, version #1/30 (EPO)

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 137 АМИНОКИСЛОТ
- (B) ТИП: АМИНОКИСЛОТА
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ:
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

RU 2196606 C2

RU 2196606 C2

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: БЕЛОК

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 1:

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala
1				5					10				
Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Val	Asp
15					20					25			
Arg	Thr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Ala
	30					35					40		
Ser	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Lys
		45					50					55	
Gln	Ala	Leu	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly
			60					65					70
Cys	Asp	Phe	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Ala
				75					80				
Asp	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Tyr	Lys	Gln
85					90					95			
Tyr	Phe	Gln	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val
	100					105					110		
Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile
		115					120					125	
Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Val			
			130					135					

RU 2196606 C2

RU 2196606 C2

К пункту 1 формулы

Met Ser Glu Asn Ser Glu Glu Pro Val Gly Glu Ala Lys Ala
 1 5 10
 Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Ser Gln Ala Val Leu Val Asp
 15 20 25
 Arg Thr Ile Tyr Ile Ser Gly Gln Leu Gly Met Asp Pro Ala
 30 35 40
 Ser Gly Gln Leu Val Pro Gly Gly Val Val Glu Glu Ala Lys
 45 50 55
 Gln Ala Leu Thr Asn Ile Gly Glu Ile Leu Lys Ala Ala Gly
 60 65 70
 Cys Asp Phe Thr Asn Val Val Lys Ala Thr Val Leu Leu Ala
 75 80
 Asp Ile Asn Asp Phe Ser Ala Val Asn Asp Val Tyr Lys Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Gln Ser Ser Phe Pro Ala Arg Ala Ala Tyr Gln Val
 100 105 110
 Ala Ala Leu Pro Lys Gly Gly Arg Val Glu Ile Glu Ala Ile
 115 120 125
 Ala Val Gln Gly Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val.
 130 135

RU 2196606 C2

RU 2196606 C2