

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035463**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.19

(21) Номер заявки
201690159

(22) Дата подачи заявки
2014.05.07

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 13382167.8

(32) 2013.05.07

(33) EP

(43) 2016.05.31

(86) PCT/EP2014/059315

(87) WO 2014/180889 2014.11.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФУНДАСИО ПРИВАДА ИНСТИТУТ
Д'ИНВЕСТИГАСИО ОНКОЛОХИКА
ДЕ ВАЛЬ ХЕБРОН (ES)**

(72) Изобретатель:
Суусек Лаура, Болье Мари-Эв (ES)

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

(56) WO-A2-2013063560

SOUCEK LAURA ET AL.: "Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis", CANCER RESEARCH, vol. 62, no. 12, 15 June 2002 (2002-06-15), pages 3507-3510, XP002705287, ISSN: 0008-5472, the whole document

SOUCEK LAURA ET AL.: "Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes", ONCOGENE, vol. 17, no. 19, 12 November 1998 (1998-11-12), pages 2463-2472, XP002705286, ISSN: 0950-9232, the whole document

BIDWELL G.L. ET AL.: "Targeting a c-Myc inhibitory polypeptide to specific intracellular compartments using cell penetrating peptides", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 135, no. 1, 2 April 2009 (2009-04-02), pages 2-10, XP025969917, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2008.11.015 [retrieved on 2008-11-28], the whole document

PONZIELLI R. ET AL.: "Cancer therapeutics: Targeting the dark side of Myc", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 41, no. 16, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 2485-2501, XP027785617, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB ISSN: 0959-8049 [retrieved on 2005-11-01], paragraph [04.2]; figure 2

MONTAGNE MARTIN ET AL.: "The Max b-HLH-LZ can transduce into cells and inhibit c-Myc transcriptional activities", PLOS ONE 2012, vol. 7, no. 2, E32172, 2012, pages 1-9, XP002705285, ISSN: 1932-6203, page 5, column 1

(57) Изобретение относится к доминантно-негативному мутанту Мус, называемому Омомус, для применения в медицине и для применения в профилактике и/или лечении рака. Изобретение также относится к слитому белку, содержащему Омомус, к его фармацевтической композиции и к применению в медицине, в частности, для лечения рака.

B1

035463

035463 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области онкологии и, более конкретно, к способам и композициям для лечения рака с использованием полипептида Ототус и к композициям, содержащим Ототус и один или несколько противоопухолевых лекарственных средств, и к их применению для лечения рака.

Уровень техники

Идеальное противораковое лекарственное средство должен воздействовать на незаменимую функцию, постоянно необходимую для поддержания опухоли, но необязательную для поддержания и функционирования любых нормальных тканей. Следовательно, наиболее общая логика заключается в воздействии на продукты генов, которые специфически изменяются при раке, на том основании, что указанные мутантные молекулы являются вероятными "драйверами" рака и, возможно, менее важны для нормальных тканей. По указанным причинам значительное внимание было направлено на каталогизацию рекуррентных повреждений при конкретных типах рака. К сожалению, этот подход связан с несколькими проблемами. Во-первых, большинство солидных опухолей человека проходит через эпизоды генетической нестабильности и проявляет мутационный шум, который может скрыть "драйверные" мутации и их соответствующие эффекторные пути. Во-вторых, онкологические заболевания представляют собой конечный результат процесса, который включает в себя переходы через несколько эволюционных этапов действия эффекта "бутылочного горлышка". Каждое "бутылочное горлышко" может предусматривать мутацию определенного типа, действие которой в дальнейшем не является существенным для сохранения опухоли и соответственно не является хорошей терапевтической мишенью после указанного момента в эволюции опухоли.

Мус представляет собой белок, содержащий основной участок, участок спираль-петля-спираль, лезитиновую молнию (b-HLN-LZ), участвующий в контроле роста и развитии рака, который действует в комплексе со структурно родственными белками Max, Mad и Mnt.

Димеры Мус/Max активируют транскрипцию генов и индуцируют пролиферацию клеток или апоптоз. Комплексы Mad/Max и Mnt/Max действуют как репрессоры и вызывают арест клеточного роста и дифференцировки. Все димеры распознают один и тот же консенсусный сайт ДНК, E-боксы CACGTG.

Мус жестко регулируется в нормальных клетках, в которых его уровни выше в пролиферирующих и ниже в непролиферирующих клетках. Аберрантно высокая и/или нерегулируемая активность Мус вовлечена в качестве причины в большинство видов рака и часто связана с агрессивными, слабо дифференцированными и ангиогенными опухолями. Нарушение регуляции экспрессии Мус является результатом гиперэкспрессии гена посредством амплификации, потери контроля транскрипции, сниженной дегградации или повышенной стабильности. Указанное нарушение приводит к аберрантной пролиферации, увеличению продолжительности существования, изменениям метаболизма, ангиогенезу и воспалению, все из которых представляют собой основные признаки рака. Многочисленные исследования доказали важную роль Мус в регулировании внутриклеточных и внеклеточных аспектов онкогенеза, что позволяет предположить, что воздействие на его функцию может иметь терапевтическое значение.

Известно, что супрессия мус с помощью ингибитора бромодомена BET приводит к регрессии различных типов опухолей (Delmore, J.E., et al., 2011, Cell, 146: 904-917). Несмотря на то что данный подход обладает значительным потенциалом, он имеет некоторые ограничения, такие как токсичность и многочисленные побочные эффекты.

Многие малые молекулы, нарушающие взаимодействие Мус/Max, проявляют низкую специфичность *in cellulo* (Prochownik, E.V. and Vogt, P.K., 2010, Genes Cancer, 650-659).

Ингибитор Мус, однако, еще предстоит сделать клинически доступным, и его создание связано с различными особенностями: во-первых, Мус является ядерным фактором транскрипции, который, следовательно, менее доступен, чем мембранные или цитоплазматические молекулы; во-вторых, Мус не имеет ферментативного "активного центра", на который можно было бы воздействовать; в-третьих, семейство Мус содержит 3 различных белка, с-, N и L- Мус, которые в определенных условиях являются функционально дублирующими, поэтому необходимо одновременное ингибирование их всех. Кроме того, существуют опасения, что ингибирование Мус может вызвать серьезные побочные эффекты за счет ингибирования пролиферации нормальных тканей. По всем этим причинам создание препарата ингибитора Мус является сложной задачей.

Ототус представляет собой доминантно-негативный мутант MYC, содержащий b-HLN-LZ домен Мус и содержащий четыре аминокислотных замены в лейциновой "молнии" Мус (Soucek, L. et al., 1998, Oncogene 17, 2463-2472; Soucek, L. et al. (2002), Cancer Res 62: 3507-3510). Аминокислотные замены E61T, E68I, R74Q и R75N придают измененную специфичность димеризации белку, который сохраняет способность связываться с природным партнером Max и образовывать гомодимеры и гетеродимеры с с-, N- и L-Мус дикого типа. Благодаря указанным свойствам, Ототус способен предотвратить функцию трансактивации Мус-зависимых генов как *in vitro*, так и *in vivo* путем устранения способности Мус связываться с его участком узнавания и связывания на ДНК, E-боксом (Savino, M. et al., 2011, PLoS One 6, e22284; Soucek, L. et al. (2004), Cell Death Differ 11, 1038 1045). В то же время Ототус существенно усиливает Мус-индуцированный апоптоз зависимым от уровня экспрессии Мус образом и тем самым увеличивает трансрепрессивную активность Мус. Таким образом, Ототус предотвращает связывание Мус с

Е-боксами промоторов и трансактивацию целевых генов, в то же время сохраняя Miz-1-зависимое связывание с промоторами и трансрепрессию. В присутствии Омотус, интерактом Мус направлен на репрессию, и его активность переключается с проонкогенной на подавляющую опухольный рост.

Мыши TRE-Омотус;CMVrtTA, у которых экспрессия Омотус контролируется тетрациклин-зависимым промоторным элементом, и широко экспрессируемый трансактиватор rtTA запускается промотором CMV, проявляют высокую экспрессию Омотус в большинстве тканей после введения доксициклина (Soucek et al., 2008, Nature, 455: 679-683). Указанных мышей скрещивали с мышами LSL-Kras^{G12D} хорошо известной модели легочного онкогенеза. Достаточно всего 3 дней экспрессии Омотус, чтобы вызвать радикальное уменьшение опухолей, и в течение одной недели опухоли у животных полностью исчезали. Важно отметить, что хотя в других делящихся тканях, таких как ткани кожи, семенников и кишечника, наблюдали существенное снижение скорости пролиферации во время лечения и обнаруживали определенную степень атрофии, у мышей не наблюдали очевидных признаков дистресса или заболевания. Кроме того, побочные эффекты ингибирования Мус, вызванные экспрессией Омотус, полностью обратимы и исчезают после прекращения лечения.

В настоящее время, несмотря на то, что экспрессия Омотус оказалась эффективной стратегией ингибирования Мус *in vivo*, она применялась исключительно при использовании генно-терапевтического подхода. Действительно, Омотус представляет собой пептид, считающийся слишком большим и неподходящим для доставки в желаемый клеточный компартмент (Montagne M. et al., PLoS One. 2012;7:e32172. doi: 10.1371/journal.pone.0032172), Savino M. et al., PLoS One. 2011; 6:e22284. doi: 10.1371/journal.pone.0022284) and Genes Dev., 2011, 25: 895-7. doi: 10.1101/gad.2053311.)

Кроме того, предполагается, что Омотус обладает слабой способностью проходить через физиологические барьеры ввиду присущих ему физико-химических свойств (например, гидрофобности, рассчитанной с помощью профиля гидрофобности по методу Кайта-Дулиттла, Kyte J., Doolittle R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132). Кроме того, несмотря на наличие нескольких остатков аргинина в основном участке Омотус, согласно новейшим алгоритмам, позволяющим прогнозировать спонтанную способность пептидов проникать в клетки, Омотус не обладает таким свойством (Gautam et al. Journal of Translational Medicine 2013, 11:74).

Таким образом, создание терапевтических подходов для лечения рака на основе доменов b-HLN-LZ, способных к трансдукции через клеточную мембрану эукариотических клеток и к ингибированию трансактивации Мус-зависимых генов, было бы полезным.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентному варианту для применения в медицине, а также для применения в профилактике и/или лечении рака.

В другом аспекте изобретение относится к слитому белку, содержащему:

- (i) полипептид SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант и
- (ii) последовательность клеточно-проникающего пептида и/или сигнал ядерной локализации.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей слитый белок по изобретению, а также к применению слитого белка в медицине, в частности, для лечения рака.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей совместно или по отдельности:

- (i) полипептид SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентный вариант или слитый белок согласно изобретению и
- (ii) противоопухолевое средство.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию по изобретению, а также к применению композиции по изобретению в медицине, в частности, для лечения рака.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1(A) - флуоресцентное изображение клеток A549, инкубированных в течение 2 ч с Омотус-FITC при 37°C, показывает, что Омотус-FITC локализован в ядре и цитоплазме; (B) окрашивание ядер красителем Хехст; (C) фазово-контрастная микроскопия.

Фиг. 2 - клетки, инкубированные с 10 мкМ Омотус или Мах*, подсчитывали и окрашивали аннексином V и PI. (A) Общее число клеток A549, обработанных PBS, Омотус или Мах. (B) Процент погибших клеток, окрашенных PI. (C) Процент живых (неокрашенных) клеток. (D) Процент клеток с положительным окрашиванием аннексином V.

Фиг. 3(A) - спектры кругового дихроизма (CD), записанные при 20°C для очищенных белков с-Мус*, Мах* и Омотус (32 мкМ), показывающие, что Омотус имеет складчатую структуру, более сходную со структурой Мах*, чем со структурой Мус* (мрад, миллиградусы). (B) Термическая денатурация, исследованная с помощью кругового дихроизма при 1°C/мин для очищенных белков с-Мус*, Мах* и Омотус, показывающая, что Омотус имеет складчатую структуру более термически стабильную, чем структура Мах* (°m, миллиградусы при установленной длине волны 222 нм).

Фиг. 4 - количественное определение флуоресценции на основе изображений, полученных с помо-

шью конфокальной микроскопии клеток A549, фиксированных 4% PFA после 2 ч инкубации при 37°C с Ототус или Мах* при различных концентрациях пептидов (5, 10 и 25 мкМ) (30-80 клеток, подсчитанных на изображении). УЕ, условные единицы.

Фиг. 5 - количественное определение флуоресценции на основе изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии живых клеток A549 после 20 мин инкубации при 37°C с Ототус или Мах* (20 мкМ). УЕ, условные единицы.

Фиг. 6 - окрашивание кристаллическим фиолетовым клеток аденокарциномы легких A549 и H1650, обработанных 25 мкМ пептида Ототус или Мах* в течение указанного времени.

Фиг. 7 - количественное определение ингибирования пролиферации с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым клеток аденокарциномы легких A549 и H1650, обработанных 25 мкМ пептида Ототус или Мах* в течение указанного времени.

Фиг. 8 - дозозависимый ответ клеток A549 на Ототус и Мах* в соответствии с количественным определением с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым.

Фиг. 9 - количественное определение пролиферации клеток глиомы U87, обработанных пептидами Ототус или Мах* в дозе 25 мкМ.

Фиг. 10(A) - легкие не леченых (слева) и леченых (справа) животных через 10 мин после интраназального введения флуоресцентного пептида Ототус (однократная доза 37,5 мг/кг). (B) Мозг не леченых (слева) и леченых (справа) животных через 10 мин после интраназального введения флуоресцентного пептида Ототус (однократная доза 37,5 мг/кг).

Фиг. 11 - лечение аденокарциномы легких с помощью PBS или Ототус с помощью интраназального введения. (A) Скорость пролиферации опухолей. (B) Клеточная плотность.

Фиг. 12 - измерение % площади опухоли после лечения аденокарциномы легких PBS или Ототус при интраназальном введении.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что Ототус способен к эффективной трансдукции через клеточную мембрану и к транслокации в ядро, где он оказывает супрессирующее опухоль действие. Таким образом, Ототус представляет собой настоящий домен белковой трансдукции (PTD). Следовательно, впервые можно использовать Ототус как таковой, в качестве анти-Мус лекарственного средства без необходимости использования каких-либо носителей для доставки полипептида в цитоплазму клетки или без использования генно-терапевтических подходов для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей Ототус, в клетку. Данный факт позволяет использовать полипептид Ототус для лечения заболеваний, связанных с нерегулируемой клеточной пролиферацией, таких как рак. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что Ототус имеет несколько преимуществ по сравнению с доменом bHLHZ в Мах (Мах*):

Ототус обладает большей способностью проникать в клетку по сравнению с Мах* в различных типах клеток и в разных концентрациях (пример 6);

Ототус более термически устойчив, чем Мах*, и данный факт является явным преимуществом при создании лекарств (пример 5);

Ототус более эффективен, чем Мах* как в отношении предотвращения роста клеток (пример 8), так и в увеличении гибели раковых клеток (пример 4).

Кроме того, Ототус способен проходить через гематоэнцефалический барьер (пример 9 и фиг. 10 B) и оказывать терапевтический эффект *in vivo* (пример 10).

Терапевтические методы с использованием Ототус.

Настоящее изобретение относится к способам лечения рака, основанным на использовании полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 1, которая соответствует Ототус, или его функционально эквивалентному варианту.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентному варианту, предназначенному для использования в медицине.

В другом аспекте изобретение относится к полипептиду SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентному варианту, предназначенному для использования в профилактике и/или лечении рака.

В другом аспекте изобретение также относится к способу профилактики и/или лечения рака, который включает введение индивиду, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества полипептида SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта.

В другом аспекте изобретение относится также к полипептиду SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентному варианту, предназначенному для получения лекарственного средства, для профилактики и/или лечения рака.

Полипептид последовательности SEQ ID NO: 1 соответствует последовательности белка Ототус. Термин "Ототус" в данном контексте относится к полипептиду, который состоит из мутированного варианта домена bHLHZip Мус, несущего мутации E61T, E68I, R74Q и R75N (где нумерация положений, содержащих мутации, дана для последовательности участка Мус, соответствующего аминокислотам 365-454 полипептида, который указан под номером доступа NP 002458 в базе данных NCBI, выпущенной 27

июня 2012 г.). Последовательность с-Мус, представленная в базе данных NCBI под номером доступа NP 002458, показана ниже, участок, из которого получен Омомус, выделен подчеркиванием.

```

1 mdfrrvvenq qppatmplnv sftnrnydld ydsvqpyfyc deeenfyqqq qqselsppap
61 sediwkkfel lptpplspsr rsglcspsyv avtpfslrgd ndggggsfst adqlemvtel
121 lggdmvnqsf icdpddetfi kniiiqdcmw sgfsaaaklv seklasyqaa rkdsqspnpa
181 rghsvctstss lylqdlstaa secidpsvfvf pyplndsssp kscasqdsaa fspssdslls
241 stesspqgsp eplvlheetp pttssdseee qedeeeidvv svekrqapgk rsesgspasg
301 ghskpphspl vlkrchvsth qhnyappst rkdypaakrv kldsvrvlrq isnnrkctsp
361 rssdteenvk rrthnvlerg rrnelkrsff alrdqipele nnekapkvvi lkkatayils
421 vqaeekklis eedllrkre qlkhkleqlr nsca (SEQ ID NO:2)

```

¹ACC GAG GAG AAT GTC AAG AGG CGA ACA CAC AAC GTC TTG GAG CGC CAG
¹Thr Glu Glu Asn Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln

⁴⁹AGG AGG AAC GAG CTA AAA CGG AGC TTT TTT GCC CTG CGT GAC CAG ATC
¹⁷Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile

⁹⁷CCG GAG TTG GAA AAC AAT GAA AAG GCC CCC AAG GTA GTT ATC CTT AAA
³³Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys

¹⁴⁵AAA GCC ACA GCA TAC ATC CTG TCC GTC CAA GCA GAG ACG CAA AAG CTC
⁴⁹Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Thr Gln Lys Leu

¹³³ATT TCT GAA ATC GAC TTG TTG CGG AAA CAA AAC GAA CAG TTG AAA CAC

Полинуклеотид, кодирующий Омомус (SEQ ID NO: 3), и соответствующая полипептидная последовательность (SEQ ID NO: 1) представлены ниже, выделенные подчеркиванием и жирным шрифтом триплеты соответствуют положениям, содержащим изменения относительно Мус.

⁶⁵ Ile Ser Glu Ile Asp Leu Leu Arg Lys Gln Asn Glu Gln Leu Lys His

²⁴¹AAA CTT GAA CAG CTA CGG AAC TCT TGT GCG TAA

⁸¹Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Cys Ala End

Омомус также содержит домен M2 с-Мус, имеющий последовательность RQRNELKSF (SEQ ID NO: 49) (см. Dang and Lee, Mol. Cell. Biol, 1988, 8:4048-4054) (выделенный двойным подчеркиванием выше) и соответствующий сигналу ядерной локализации.

Омомус отличается тем, что он проявляет повышенную способность к димеризации со всеми тремя онкогенными белками Мус (с-Мус, N-Мус и L-Мус). Омомус можно получить из домена bHLHZip любого белка Мус, известного в данной области, при условии, что мутации, которые вызывают эффект подавления опухоли, сохраняются. Таким образом, Омомус который можно использовать в настоящем изобретении, может быть получен из любых видов млекопитающих, в том числе, но не ограничиваясь ими, от домашних и сельскохозяйственных животных (коров, лошадей, свиней, овец, коз, собак, кошек и грызунов), приматов и человека. Предпочтительно белок Омомус получают из белка Мус человека (номер доступа NP 002458, выпуск от 27 июня 2012 г.).

Термин "Мус" в данном контексте относится к семейству факторов транскрипции, которое включает с-Мус, N-Мус и L-Мус. Белок Мус активирует экспрессию многих генов путем связывания с консенсусной последовательностью CACGTG (последовательностями энхансерных боксов или E-боксов и вовлечения гистоновых ацетилтрансфераз или НАТ). Вместе с тем, Мус также может действовать как транскрипционный репрессор. Путем связывания фактора транскрипции Miz-1 и вытеснения коактиватора p300 он ингибирует экспрессию генов-мишеней Miz-1. Мус также играет непосредственную роль в контроле репликации ДНК.

Термин b-HLN-LZ Мус или домен Мус, включающий основной участок, спираль-петлю-спираль, лецитиновую молнию, относится к участку, который определяет димеризацию Мус с белком Мах и связывание с генами-мишенями Мус. Указанный участок соответствует аминокислотам 365-454 Мус человека и характеризуется двумя альфа-спиралями, соединенными петлей (Nair, S.K., & Burley, S.K., 2003, Cell, 112: 193-205).

Термин "функционально эквивалентный вариант", когда речь идет о Омотус, относится к любому полипептиду, который получен в результате делеции, вставки или добавления одной или нескольких аминокислот в полипептид SEQ ID NO: 1 или который получен в результате химической модификации полипептида SEQ ID NO: 1 и который, по существу, сохраняет опухолесупрессирующую активность полипептида Омотус. Специалисту в данной области понятно, что для сохранения опухолесупрессирующей активности Омотус необходимо, чтобы вариант мог димеризоваться с Мус и ингибировать его активность сразу после обнаружения в ядре, чтобы он был способен перемещаться через клеточную мембрану и ядерную оболочку.

Подходящие функционально эквивалентные варианты Омотус включают полипептиды, состоящие по существу из полипептида SEQ ID NO: 1. В данном контексте "состоящий по существу из" означает, что указанная молекула не содержит никаких дополнительных последовательностей, которые могли бы изменить активность Омотус.

Подходящие функциональные варианты специфически взаимодействующего пептида представляют собой варианты, имеющие степень идентичности по отношению к пептиду SEQ ID NO: 1, приблизительно больше чем 25% идентичности аминокислотной последовательности, например, 25, 40, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. Степень идентичности между двумя полипептидами определяют с использованием компьютерных алгоритмов и способов, которые широко известны специалистам в данной области. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями предпочтительно определяют с помощью алгоритма BLASTP, который описан ранее [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403-410]. В предпочтительном варианте осуществления идентичность последовательности определяют по всей длине полипептида SEQ ID NO: 1 или всей длине варианта или их обоих.

Функционально эквивалентные варианты полипептида Омотус также могут включать посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, ацетилирование, изопренилирование, миристилирование, протеолитический процессинг и т.д.

Альтернативно, подходящие функциональные варианты специфически взаимодействующего пептида представляют собой варианты, в которых одно или несколько положений в полипептиде Омотус содержит аминокислоту, которая представляет собой консервативную замену аминокислоты, представленной в белке Омотус, упомянутом выше. "Консервативные аминокислотные замены" происходят в результате замены одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные структурные и/или химические свойства. Например, следующие шесть групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), серин (S), треонин (T); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V) и 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W). Выбор таких консервативных аминокислотных замен находится в пределах квалификации обычного специалиста в данной области и описан, например, Dordo et al. et al. (*J. Mol. Biol.*, 1999, 217:721-739) и Taylor et al., (*J. Theor. Biol.*, 1986, 119:205-218).

Следует понимать, что функционально эквивалентные варианты Омотус содержат мутации в положениях, соответствующих мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, обнаруженным в Омотус, полученном из с-Мус человека. Положение, в котором должны произойти указанные мутации в функционально эквивалентном варианте, можно определить путем множественного выравнивания различных последовательностей Мус и идентификации с помощью выравнивания положений, соответствующих положениям 61, 68, 74 и 75 в последовательности Омотус, полученной из с-Мус человека.

Множественное выравнивание последовательностей представляет собой удлинение попарного выравнивания, которое включает больше чем две последовательности одновременно. Способы множественного выравнивания позволяют выравнивать все последовательности в наборе данного запроса. Предпочтительной программой множественного выравнивания последовательностей (и ее алгоритмом) является ClustalW, Clusall2W или ClustalW XXL (см. Thompson et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680). После того как сравнивают (выравнивают) последовательности с-Мус, полученные из различных организмов, и последовательность варианта, который описан в настоящем документе, специалист в данной области может легко определить положения в пределах каждой из последовательностей, соответствующие положениям, и ввести в вариант Омотус мутации, соответствующие мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, обнаруженным в Омотус, полученном из с-Мус человека.

Подходящие тесты для определения можно ли рассматривать полипептид как функционально эквивалентный вариант Омотус включают, без ограничения, тесты, которые позволяют измерить способность полипептида образовывать димерные комплексы с Мах и Мус, такие как тесты, основанные на экспрессии репортерного гена, которые описаны в Soucek et al. (*Oncogene*, 1998, 17: 2463-2472), а также PLA (метод белкового лигирования) или на коиммунопреципитации.

Тесты, которые позволяют измерить способность полипептида связываться с участком распознавания Мус/Мах в ДНК (участок CACGTG), такие как анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA), описанный Soucek et al (выше).

Тесты, которые позволяют измерить способность подавлять Мус-индуцированную трансактивацию,

такие как тест, основанный на экспрессии репортерного гена под контролем связывающих участков ДНК, специфичных к Мус/Мах, которые описаны Soucek et al (выше). Тесты на основе способности полипептида ингибировать рост клеток, экспрессирующих онкоген мус, которые описаны Soucek et al. (выше).

Тесты, которые позволяют измерить способность полипептида увеличивать мус-индуцированный апоптоз, такие как тесты, описанные Soucek et al. (Oncogene, 1998: 17, 2463-2472). Кроме того, может быть использован любой общеизвестный в данной области тест оценки апоптоза, такой как окрашивание Хехстом, пропидиум иодидом (PI) или окрашивание аннексином V, трипановым синим, обнаружение эффекта "лестницы"/расщепления ДНК и TUNEL.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считается функционально эквивалентным вариантом Омотус, если он проявляет в одном или нескольких указанных выше тестах активность, которая составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% активности нативного Омотус.

Кроме того, функционально эквивалентные варианты Омотус способны трансдуцировать клетки после контактирования варианта с указанной клеткой. Следует понимать, что функционально эквивалентные варианты Омотус содержат трансдуцирующий домен белка, обнаруженный в нативном Омотус, или другой функциональный трансдуцирующий домен белка.

Термин "последовательность пептида, пенетрирующего клетку" используется в настоящем описании взаимозаменяемо с "CPP", "трансдуцирующий домен пептида" или "PTD". Он относится к пептидной цепи переменной длины, которая направляет транспорт белка внутрь клетки. Процесс доставки в клетку обычно происходит путем эндоцитоза, но пептид также может быть интернализован в клетку путем прямой мембранной транслокации. CPP обычно имеют аминокислотный состав, который либо включает высокое относительное количество положительно заряженных аминокислот, таких как лизин или аргинин, либо имеют последовательности, которые содержат в чередующемся порядке полярную/заряженную аминокислоту и неполярные, гидрофобные аминокислоты. Примеры CPP, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, без ограничения, CPP, обнаруженный в белке *Drosophila antennapedia* (RQIKIWFQNRMKWK; SEQ ID NO:4), CPP, обнаруженный в ДНК-связывающем белке VP22 herpesvirus simplex 1 (HSV-1) (DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRVE, SEQ ID NO:5), CPP Vac-7 (RRIRPRPPRLPRPRPLPFPRPG; SEQ ID NO: 6), CPP белка TAT HIV-1, состоящие из аминокислот 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 7), аминокислот 48-60 (GRKKRRQRRRTPQ, SEQ ID NO: 8), аминокислот 47-57 (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 9); CPP пептида S413-PV (ALWKTLLKVLKAPKKKRKV; SEQ ID NO: 10), CPP пенетратина (RQIKWFQNRMMKWK; SEQ ID NO: 11), CPP SynBI (RGGRLSYSRRRFSTSTGR; SEQ ID NO: 12), CPP SynB3 (RRLSYSRRRF; SEQ ID NO: 13), CPP PTD-4 (PIRRRKKLRRLK; SEQ ID NO: 14), CPP PTD-5 (RRQRRTSKLMKR; SEQ ID NO: 15), CPP FHV Coat-(35-49) (RRRRNRTRNRNRVR; SEQ ID NO: 16), CPP BMV Gag-(7-25) (KMTRAQRRAAARRNRWTAR; SEQ ID NO: 17), CPP HTLV-II Rex-(4-16) (TRRQRTRRARRNR; SEQ ID NO: 18), CPP D-Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 19), CPP R9-Tat (GRRRRRRRRRPPQ; SEQ ID NO: 20), CPP MAP (KLALKLALKLALALKLA; SEQ ID NO: 21), CPP SBP (MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 22), CPP FBP (GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 23), CPP MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 24), CPP MPG(ENLS) (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-суа; SEQ ID NO: 25), CPP Pep-1 (ac-KETWWETWTEWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 26), CPP Pep-2 (ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 27), полиаргининовая последовательность, имеющая структуру R_N (где N составляет от 4 до 17), последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 28), последовательность RRRRRRLR (SEQ ID NO: 29), последовательность RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 30); транспортан GWTLNSAGYLLGKINL-KALAAALAKKIL (SEQ ID NO: 31); KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO: 32); RQIKIWFQNRMMKWK (SEQ ID NO: 33), последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 34); последовательность RKKRRQRR (SEQ ID NO: 35); последовательность YARAAARQARA (SEQ ID NO: 36); последовательность THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 37); последовательность GGRRARRRRRRR (SEQ ID NO: 38).

Подходящие анализы, позволяющие определить, сохраняет ли полипептид способность к транслокации через клеточную мембрану Омотус, включают, без ограничения, тесты, которые позволяют измерить способность полипептида трансдуцировать клетки в культуре, такие как тест, показанный в примере 3 настоящего изобретения. Указанный тест основан на контактировании полипептида с культурой клеток и детектировании присутствия полипептида во внутриклеточной области. В предпочтительном варианте осуществления обнаружение полипептида по изобретению осуществляют с помощью флуоресцентной микроскопии.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом Омотус, если он способен трансдуцировать клетку-мишень по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% также эффективно, как нативный Омотус.

Кроме того, функционально эквивалентные варианты Омотус также способны достичь ядер трансдуцированных клеток, после того как вариант контактирует с указанной клеткой. Следует понимать, что

функционально эквивалентные варианты Омотус содержат NLS, обнаруженный в нативном Омотус или другой функциональный NLS.

Термин "сигнал ядерной локализации" в данном контексте относится к аминокислотной последовательности длиной приблизительно 4-20 аминокислотных остатков, которая служит для направления белка в ядро. Как правило, последовательность ядерной локализации богата основными аминокислотами и типичные последовательности хорошо известны в данной области (Gorlich D. (1998) EMBO 5.17:2721-7). В некоторых вариантах осуществления NLS выбирают из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 (PKKKKV, SEQ ID NO: 39); NLS нуклеоплазмина (KPAATKKAGQAKK, SEQ ID NO: 40); NLS CBP8 0 (RRRHSDENDGGQPHKRR, SEQ ID NO: 41); NLS белка Rev HIV-I (RQARRNRRRWE, SEQ ID NO: 42); Rex HTLV-I (MPKTRRRPRRSQRKRPP, SEQ ID NO: 43); NLS hnRNP A (NQSS-NFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFKPRNQGGY, SEQ ID NO: 44); NLS рL23а (VHSHKKK-KIRTSPTFTTPKTLRLRRQPKYPRKSAPRRNKLHDY, SEQ ID NO: 45). В одном варианте осуществления изобретения сигнал ядерной локализации содержит мотив K (K/R) X (K/R) (SEQ ID NO: 46).

Подходящие тесты, позволяющие определить, является ли полипептид функционально эквивалентным вариантом Омотус в терминах его способности к транслокации через клеточную мембрану, включают двойное мечение клетки реагентом, специфичным к полипептиду, и красителем, который специфически окрашивает ядро клетки (таким как DAPI или краситель Хехст). Такие тесты представлены в примере 6 настоящего изобретения. В предпочтительном варианте осуществления обнаружение полипептида по изобретению осуществляется с помощью конфокальной микроскопии или с помощью флуоресцентной микроскопии. В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом Омотус, если он способен транслоцироваться в ядро опухолевых клеток-мишеней с эффективностью, составляющей по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% эффективности нативного Омотус.

Подходящие функционально эквивалентные варианты включают полипептиды Омотус*ТАТ и Омотус*LZArg, которые представлены ниже.

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
Омотус*ТАТ	47	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKQVI LKKATAYILSVQAEQTQKLISETDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCAGRK KRRQRRR
Омотус*LZArg	48	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKQVI LKKATAYILSVQAEQTQKLISETDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCARRR RRRLR

Согласно изобретению полипептид Омотус или его функционально эквивалентный вариант используют в способе профилактики или лечения рака у индивида. Следует понимать, что профилактический или терапевтический способ согласно изобретению включает непосредственное использование полипептида Омотус или его функционально эквивалентного варианта. Таким образом, профилактические или терапевтические способы согласно изобретению не включают введение нуклеиновой кислоты, кодирующей Омотус или его функционально эквивалентный вариант.

Под "профилактикой" понимают введение полипептида SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта согласно первому аспекту изобретения, или лекарственного средства, содержащего его, на начальной или ранней стадии заболевания, или также для предотвращения его наступления.

Термин "лечение" используется для обозначения введения полипептида SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта согласно первому аспекту изобретения, или лекарственного средства, содержащего его, для контроля прогрессирования заболевания, до или после того, как появились клинические признаки. Под "контролем прогрессирования заболевания" понимают благоприятные или желаемые клинические результаты, которые включают, но без ограничения, уменьшение симптомов, уменьшение продолжительности заболевания, стабилизацию патологических состояний (в частности, предотвращение дополнительного ухудшения), замедление прогрессирования заболевания, улучшение патологического состояния и ремиссию (как частичную, так и полную). Контроль прогрессирования заболевания также включает продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без применения лечения.

Термин "рак" относится к заболеванию, характеризующемуся неконтролируемым делением клеток (или увеличением выживаемости или устойчивостью к апоптозу), способностью указанных клеток проникать в другие соседние ткани (инвазия) или распространением в другие области организма, где клетки обычно не находятся (метастазирование), через лимфатические и кровеносные сосуды. В зависимости от того, могут ли опухоли распространяться путем инвазии и метастазирования, их классифицируют как доброкачественные или злокачественные: доброкачественные опухоли представляют собой опухоли, которые не могут распространяться путем инвазии или метастазирования, то есть они растут только локально; в то время как злокачественные опухоли представляют собой опухоли, которые способны распространяться путем инвазии и метастазирования. Способы по настоящему изобретению эффективны для лечения местных и злокачественных опухолей. В данном контексте термин "рак" включает, но не ограничивается следующими типами рака: рак молочной железы; рак желчевыводящих путей; рак моче-

вого пузыря; рак мозга, включая глиобластомы и медуллобластомы; рак шейки матки; хориокарцинома; рак толстой кишки; рак эндометрия; рак пищевода; рак желудка; гематологические новообразования, включая острую лимфоцитарную и миелогенную лейкемию; Т-клеточную острую лимфобластную лейкемию/лимфому; волосатоклеточный лейкоз; хронический миелолейкоз, множественную миелому; AIDS-ассоциированные лейкозы и Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых; интраэпителиальные неоплазии, включая болезнь Боуэна и болезнь Паджета; рак печени; рак легких; лимфомы, включая болезнь Ходжкина и лимфоцитарные лимфомы; нейробластомы; рак ротовой полости, включая плоскоклеточный рак; рак яичников, включая опухоли, возникающие из эпителиальных клеток, стромальных клеток, зародышевых клеток и мезенхимальных клеток; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; рак прямой кишки; саркомы, включая лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, фибросаркому и остеосаркому; рак кожи, включая меланому, карциному из клеток Меркеля, саркому Капоши, базальноклеточную карциному и плоскоклеточный рак; рак яичка, включая эмбрионально-клеточные опухоли, такие как семинома, несеминома (тератомы, хориокарциномы), стромальные опухоли и герминогенные опухоли; рак щитовидной железы, включая аденокарциному щитовидной железы и медуллярную саркому; и рак почки, включая аденокарциному и опухоль Вильмса. Другие виды рака известны специалисту в данной области. В предпочтительном варианте осуществления рак, который лечат, представляет собой рак легких, предпочтительно аденокарциному легких, более предпочтительно KRAS-зависимую аденокарциному легких. Авторы настоящего изобретения также установили, что Ототус или его функционально эквивалентный вариант способен снижать пролиферацию клеток независимо от того проявляет ли рак повышенную экспрессию или активность белка Мус.

"Индивид" в данном контексте включает любое животное, которое имеет рак, или у которого проявляется симптом рака или рак, или который подвержен риску развития рака или проявлению симптома рака. Подходящие индивиды (пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственные животные, и домашние животные или комнатные животные (такие как кошка или собака). Включены низшие приматы и предпочтительно пациенты-люди.

Подходящая доза Ототус или его функционально эквивалентного варианта, которую используют в способах согласно изобретению, будет зависеть от различных факторов, таких как тип рака, подлежащего лечению, тяжесть и течение заболевания, вводят ли композицию в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на пептид или полипептид, и решение лечащего врача.

Количество полипептида SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентного варианта соответствующим образом вводят пациенту однократно или в течение нескольких курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания соответствующая доза в целом будет составлять приблизительно от 0,01 до 500 мг на 1 кг веса тела пациента в день, которые вводят в виде одной или нескольких доз. Предпочтительно доза будет составлять от приблизительно 0,1 до приблизительно 250 мг/кг в день; более предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг/кг в день. Подходящая доза может составлять приблизительно от 0,01 до 250 мг/кг в день, приблизительно от 0,05 до 100 мг/кг в день, или приблизительно от 0,1 до 50 мг/кг в день. В указанном диапазоне доза может составлять от 0,05 до 0,5, от 0,5 до 5 или от 5 до 50 мг/кг в день. Для перорального введения композиции предпочтительно представлены в форме таблеток, содержащих от 1,0 до 1000 мг активного ингредиента, в частности 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0, и 1000,0 мг активного ингредиента при симптоматическом подборе дозы для пациента, получающего лечение. Соединения можно вводить по схеме от 1 до 4 раз в день, предпочтительно один или два раза в день.

Полипептид SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант можно вводить любым подходящим способом введения, таким как пероральный способ, топический способ, ингаляция или парентеральный способ, при условии, что включены фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для изготовления желаемой лекарственной формы. Предпочтительным способом введения указанных фармацевтических композиций является внутривенный способ. В другом варианте осуществления способ введения является интраназальным способом.

В одном варианте осуществления Ототус или его функционально эквивалентный вариант получают с носителями, которые будут защищать указанный полипептид от быстрого удаления из организма, как например, препарат с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты и микроинкапсулированные системы для введения. Могут быть использованы биodeградируемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения указанных препаратов очевидны для специалистов в данной области. Материалы также могут быть коммерчески приобретены в Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc.

Несмотря на то что Ототус и его функционально эквивалентные варианты способны к транслокации через биологические мембраны, возможно включение Ототус или любого из его функционально эквивалентных вариантов в наночастицы. Наночастицы могут способствовать сохранению целостности полипептида в биологических жидкостях, пока он не достигнет органа-мишени. Кроме того, наночастицы также могут быть модифицированы таким образом, что они содержат функциональные группы, кото-

рые позволяют направить наночастицу на орган, представляющий интерес. Таким путем Ототус или его функционально эквивалентный вариант будет доставляться на близкое расстояние к органу-мишени, что облегчает поступление Ототус во внутреннюю часть клеток, где требуется его биологическая активность.

Таким образом, в другом варианте осуществления Ототус или любой из его функционально эквивалентных вариантов образует часть наночастицы.

В данном контексте термин "наночастица" относится к любому веществу, имеющему размеры в диапазоне 1-1000 нм. В некоторых вариантах осуществления наночастицы имеют размеры в диапазоне 2-200 нм, предпочтительно в диапазоне 2-150 нм и еще более предпочтительно в диапазоне 2-100 нм. Наночастицы, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают такие наноматериалы, как липидная наночастица, суперпарамагнитная наночастица, нанооболочка, полупроводниковый нанокристалл, квантовая точка, полимерная наночастица, силиконовая наночастица, наночастица на основе оксида кремния, металлическая наночастица, фуллерен и нанотрубка. Направленная доставка может быть достигнута путем добавления лигандов без нарушения способности наночастиц доставлять их полипептидную нагрузку. Предполагается, что это позволит обеспечить доставку к конкретным клеткам, тканям и органам. Направленная специфичность систем доставки на основе лигандов основана на распространении рецепторов лигандов на различных типах клеток. Направляющий лиганд может быть либо ковалентно, либо нековалентно связан с наночастицей, и может быть конъюгирован с наночастицами различными способами, которые указаны в настоящем документе.

Примеры белков или пептидов, которые могут быть использованы для нацеливания наночастиц, включают трансферин, лактоферрин, TGF- β , фактор роста нервов, альбумин, пептид Tat HIV, пептид RGD и инсулин, а также другие белки.

Следует понимать, что включение Ототус или его функционально эквивалентного варианта в наночастицу не подразумевает или подразумевает не только облегчение поступления Ототус во внутреннее пространство клетки, но защиту Ототус от разрушения и/или обеспечение нацеливания наночастицы на орган, представляющий интерес.

Конъюгаты Ототус и слитые белки, содержащие Ототус.

Настоящее изобретение также относится к конъюгатам, которые содержат первый участок, содержащий полипептид SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант, и второй участок, содержащий химическую группу, которая способствует клеточному захвату полипептида. Примеры групп, усиливающих клеточный захват, включают, но не ограничиваются ими: гидрофобную группу (например, липид или жирная кислота), трансдуцирующий домен белка и некоторые хелаты металлов.

Наличие дополнительных химических групп в молекуле Ототус дает в результате конъюгаты, проявляющие повышенную способность к транслокации через биологические мембраны относительно немодифицированного Ототус, что приводит к увеличению опухольсупрессирующей активности.

Таким образом, в другом аспекте изобретение относится к конъюгату, содержащему:

- (i) полипептид SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант и
- (ii) химическую группу, которая способствует клеточному захвату полипептида. Термин "конъюгат" в данном контексте относится к двум или более соединениям, которые ковалентно связаны друг с другом таким образом, что функция каждого соединения сохраняется в конъюгате.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты согласно изобретению содержат по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или больше химических групп, которые способствуют клеточному захвату полипептида или его функционально эквивалентного варианта.

В одном варианте осуществления химическая группа, которая способствует клеточному захвату полипептида, представляет собой липид или жирную кислоту.

Жирная кислота, как правило, представляет собой молекулу, содержащую углеродную цепь с кислотным остатком (например, карбоновой кислоты) при конце цепи. Углеродная цепь жирной кислоты может быть любой длины, однако предпочтительно длина углеродной цепи соответствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше атомам углерода, и любому диапазону, получаемому из указанных значений. В определенных вариантах осуществления длина углеродной цепи составляет от 4 до 18 атомов углерода в цепочечной части жирной кислоты. В определенных вариантах осуществления углеродная цепь жирной кислоты может содержать нечетное число атомов углерода, однако, четное число атомов углерода в цепи может быть предпочтительным в определенных вариантах осуществления. Жирная кислота, содержащая только простые связи в своей углеродной цепи, называется насыщенной, тогда как жирная кислота, содержащая по меньшей мере одну двойную связь в своей цепи, называется ненасыщенной. Жирная кислота может быть разветвленной, хотя в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения она является неразветвленной. Конкретные жирные кислоты включают, но не ограничиваются ими, линолевую кислоту, олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, линоленовую кислоту, стеариновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, арахидоновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту.

В предпочтительном варианте осуществления химическая группа, которая способствует клеточно-му захвату полипептида, представляет собой последовательность проникающего пептида, в таком случае конъюгат представляет слитый белок, содержащий Отомус или его функционально эквивалентный вариант и последовательность проникающего пептида.

Термин "слитый белок" относится к белкам, созданным с помощью генной технологии, который состоит из двух или более функциональных доменов, полученных из различных белков. Слитый белок можно получить общепринятым способом, например, с помощью генной экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный слитый белок в подходящей клетке. Следует понимать, что проникающий пептид обозначает проникающий пептид, который отличается от проникающего пептида, который образует часть полипептида SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта.

Термины "полипептид SEQ ID NO: 1", "функционально эквивалентный вариант полипептида SEQ ID NO: 1" и "проникающий пептид" подробно описаны в контексте медицинского применения изобретения и равно применимы в контексте слитого белка.

В предпочтительном варианте осуществления указанный проникающий пептид не является эндогенным проникающим пептидом Отомус.

В одном варианте осуществления последовательность проникающего пептида соединяют с N-концом полипептида SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта. В другом варианте осуществления проникающий пептид соединяют с C-концом полипептида SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта.

В предпочтительных вариантах осуществления слитые белки согласно изобретению содержат наряду с собственным проникающим пептидом, обнаруживаемым в полипептиде SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентном варианте, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или больше дополнительных проникающих пептидов.

В другом предпочтительном варианте осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению содержат полипептид SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант и дополнительно содержат N-концевой или C-концевой сигнал ядерной локализации. Термин "сигнал ядерной локализации (NLS)" описан в контексте использования в терапевтических целях по изобретению и равно применим к слитым белкам изобретения. Следует понимать, что дополнительный NLS относится к NLS, который отличается от эндогенного NLS, обнаруживаемого в Отомус или в его функционально эквивалентном варианте. Дополнительный NLS может быть таким же или может отличаться от эндогенного NLS, обнаруживаемого в Отомус или в его функционально эквивалентном варианте.

В одном варианте осуществления NLS представляет собой один из NLS, который эндогенно присутствует в последовательности Мус, такой как пептид M1 (PAAK VKLD, SEQ ID NO: 50) или пептид M2 (RQRRNELKRSF, SEQ ID NO: 49) (см. Dang and Lee, выше).

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты или слитые белки согласно изобретению содержат, наряду с эндогенным NLS, обнаруживаемым в полипептиде SEQ ID NO: 1 или в его функционально эквивалентном варианте, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или больше NLS.

Специалисту в данной области понятно, что может быть желательным, чтобы слитый белок дополнительно содержал один или несколько гибких пептидов, которые соединяют полипептид SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант, последовательность проникающего пептида и/или NLS. Таким образом, в конкретном варианте осуществления указанный полипептид по изобретению непосредственно соединен с последовательностью проникающего пептида. В другом конкретном варианте осуществления полипептид по изобретению соединяют с последовательностью проникающего пептида с помощью гибкого пептида. В конкретном варианте осуществления полипептид по изобретению непосредственно связывают с последовательностью проникающего пептида и с NLS. В другом конкретном варианте осуществления полипептид по изобретению соединяют с последовательностью проникающего пептида через первый гибкий пептидный линкер и с NLS через второй гибкий пептидный линкер.

В данном контексте термин "гибкий пептид", "спейсерный пептид" или "линкерный пептид" относится к пептиду, который ковалентно связывает два белка или фрагмента, но который не является частью одного из двух пептидов, обеспечивая движение одного белка относительно другого белка, не оказывая существенного негативного воздействия на функцию одного из двух белков или фрагментов. Таким образом, гибкий линкер не влияет на опухольсупрессирующую активность последовательности Отомус, проникающую активность проникающего пептида или способность к ядерной локализации NLS.

Гибкий пептид содержит по меньшей мере одну аминокислоту, по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 12 аминокислот, по меньшей мере 14 аминокислот, по меньшей мере 16 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по

меньшей мере 30 аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере 45 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 60 аминокислот, по меньшей мере 70 аминокислот, по меньшей мере 80 аминокислот, по меньшей мере 90 аминокислот или приблизительно 100 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления гибкий пептид будет обеспечивать движение одного белка относительно другого белка с целью повышения растворимости белка и/или увеличения его активности. Подходящие линкерные участки включают полиглициновый участок, последовательность GPRRRR (SEQ ID NO: 51) комбинаций остатков глицина, пролина и аланина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по изобретению может содержать дополнительную химическую группу, включая, среди прочего, флуоресцентные группы, биотин, полиэтиленгликоль (ПЭГ), аналоги аминокислотных аналогов, неприродные аминокислоты, фосфатные группы, гликозильные группы, радиоизотопные метки и фармацевтические молекулы. В других вариантах осуществления гетерологичный полипептид может содержать одну или несколько химически активных групп, включая, среди прочего, кетон, альдегид, остатки Cys и остатки Lys.

В конкретном варианте осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению содержат метку, связанную с конъюгатом или с С-концевым или N-концевым доменом указанного слитого белка или его варианта. Указанная метка обычно представляет собой пептид или аминокислотную последовательность, которые можно использовать для выделения или очистки указанного слитого белка. Таким образом, указанная метка, способна связываться с одним или несколькими лигандами, например с одним или несколькими лигандами аффинной матрицы, такой как хроматографический носитель или гранула, с высокой аффинностью. Примером указанной метки является гистидиновая метка (His-tag или HT), такая как метка, содержащая 6 остатков гистидина (His₆ или H₆), которая может связываться на колонке с никелем (Ni²⁺) или кобальтом (Co²⁺) с высокой аффинностью. His-метка обладает тем необходимым свойством, что она может связываться со своими лигандами в условиях, которые являются денатурирующими для большинства белков и разрушающими большинство белок-белковых взаимодействий. Таким образом, данный факт можно использовать для удаления белка-приманки, меченной H₆, после разрыва межбелковых взаимодействий в которых участвовал белок-приманка.

Дополнительные иллюстративные, неограничивающие примеры меток, используемых для выделения или очистки слитого белка, включают Arg-метку, FLAG-метку (DYKDDDDK; SEQ ID NO:52), Strep-метку (WSHPQFEK, SEQ ID NO:53), эпитоп, распознаваемый антителом, такой как с-мус-tag (распознаваемый антителом анти-с-мус), HA-метку (YPYDVPDYA, SEQ ID NO:54), V5-метку (GKPIPNPLLGLDST, SEQ ID NO:55), SBP-метку, S-метку, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлозосвязывающий домен, хитин-связывающий домен, глутатион-s-трансферазную метку, мальтозасвязывающий белок, NusA, TrxA, DsbA, Avi-метку и т.д. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 60:523-525), аминокислотную последовательность, такую как ANGHRP (SEQ ID NO:56) или PINDHDNPHLVHSGMTCXXC (SEQ ID NO:57), β-галактозидазу и т.п.

Метку можно использовать, при необходимости, для выделения или очистки указанного слитого белка. В другом аспекте изобретение относится к конъюгату или слитому белку согласно изобретению, предназначенному для использования в медицине.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату или слитому белку согласно изобретению, предназначенному для использования в профилактике и/или лечении рака.

В другом аспекте изобретение относится к использованию конъюгата или слитого белка согласно изобретению для создания лекарственного средства для профилактики и/или лечения рака.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения и/или профилактики рака у индивида, который включает введение указанному индивиду конъюгата или слитого белка согласно изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления рак, профилактику которого проводят, или который лечат, представляет собой Мус-индуцированный рак. В другом предпочтительном варианте осуществления рак, профилактику которого проводят, или который лечат, представляет собой рак, связанный с мутацией в гене KRAS. В одном варианте осуществления мутация гена KRAS представляет собой мутацию глицина в положении 12, глицина в положении 13 или глутамина в положении 61. В более предпочтительном варианте осуществления мутацию выбирают из группы, состоящей из мутации G12S, мутации G12V, мутации G13D, мутации G12C, мутации G12R, мутации G12F, мутации G12I, мутации G13C, мутации G13R, или мутации Q61L.

Термины "лекарственное средство", "профилактика", "лечение", "рак" и "Мус-индуцированный рак" определены ранее, и в равной степени применимы к этому аспекту изобретения.

Противоопухолевые композиции.

Тот неожиданный факт, что полипептид Омомус способен к транслокации через биологические мембраны и проявлению опухолесупрессирующей активности, когда он предоставлен в виде полипептида, открывает возможность включения в состав Омомус вместе с другими противоопухолевыми препаратами. Таким образом, в другом аспекте изобретение также относится к композициям, содержащим вместе или по отдельности первый компонент, выбранный из группы, состоящей из:

- (i) Омомус;
- (ii) его функционально эквивалентного варианта;

(iii) конъюгата или слитого белка согласно изобретению, и, в качестве второго компонента, противоопухолевое соединение.

Первый компонент композиций согласно изобретению включает полипептид согласно SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентный вариант или слитый белок согласно изобретению. Подходящие полипептиды, функционально эквивалентные варианты полипептида SEQ ID NO: 1 и слитые белки описаны выше в контексте терапевтических способов согласно изобретению и равно применимы к композициям согласно изобретению.

В данном контексте под "противоопухолевым средством" понимают указанное биологическое или химическое соединение, которое позволяет лечить опухоли или предотвращать их образование. В предпочтительном варианте осуществления указанное противоопухолевое средство выбирают из группы, состоящей из цитотоксического средства, антиангиогенного средства, антиметастатического средства и антипролиферативного средства.

Используемый в настоящем изобретении термин "цитотоксическое средство" относится к средству, которое способно активировать клеточную гибель и которое обладает способностью снижать рост, прекращать рост или уничтожать клетки и, конкретно, быстро пролиферирующие клетки, еще более конкретно, опухолевые клетки. Гибель клеток может быть вызвана любым механизмом, таким как, например, апоптоз, хотя не ограничивается указанной причиной, ингибированием метаболизма, вмешательством в организацию цитоскелета или химической модификацией ДНК. Термин "цитотоксическое средство" включает любое химиотерапевтическое средство, в том числе малые органические молекулы, пептиды, олигонуклеотиды и тому подобное; токсины; ферменты; цитокины; радиоизотопы или радиотерапевтические средства.

"Химиотерапевтические средства" обозначают химические соединения, такие как, без ограничения, антрациклины, такие как доксорубин и даунорубин, таксаны, такие как Тахо1™ и доцетаксел, алкалоиды барвинка, такие как винкристин и винбластин, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, иринотекан, идарубин, митомицин С, оксалиплатин, ралтитрексед, тамоксифен, цисплатин, карбоплатин, метотрексат, актиномицин D, митоксантрон, бленноксан или митрамицин.

"Токсин" обозначает токсическое средство, которое конъюгируют с полипептидом согласно первому аспекту изобретения или со слитым белком согласно второму аспекту изобретения с образованием иммунотоксина. Конъюгирование определенных токсинов с указанным полипептидом или указанным слитым белком снижает токсичность первых, обеспечивая их использование в качестве терапевтических средств, поскольку в иной форме они были бы слишком токсичны. Связывание токсина и полипептида согласно первому аспекту изобретения или слитого белка согласно второму аспекту изобретения осуществляют химически, сохраняя его биологическую активность. Их разделение обычно происходит в лизосомах клеток-мишеней, так что упомянутое химическое связывание расщепляется только в ограниченной кислой клеточной среде, обеспечиваемой лизосомами. Токсины, используемые в контексте настоящего изобретения, представляют собой растительные токсины, бактериальные токсины, токсины грибкового или животного происхождения, а также их фрагменты, такие как, без ограничения, А-цепь рицина, сапонин, А-цепь дифтерийного токсина, активные несвязывающиеся фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*, А-цепь абрина, А-цепь модецина, α-сарцин, А-белки *Leurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогелин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

"Ферменты" следует понимать в контексте настоящего изобретения как токсин или ферменты, активизирующие лекарственное средство, такие как, без ограничения, щелочная фосфатаза, которая активирует эпопозид и доксорубин; карбоксипептидаза G2, которая активирует нитроиприты; бета-лактамаза, которая активирует доксорубин, паклитаксел и митомицин.

"Цитокины" обозначают пептиды различного размера и молекулярной массы, которые синтезируются клетками иммунной системы с целью регуляции иммунного ответа, и они могут представлять собой гормоны, факторы роста, факторы некроза и т.д. Они могут быть природного происхождения или могут быть получены из рекомбинантных клеточных культур и представлять собой биологически активные эквиваленты цитокинов с природной последовательностью. Их конъюгация с антителами дает в результате иммуноцитокينات. Цитокины, используемые в настоящем изобретении, представляют собой, но без ограничения, TNF-альфа, INF-гамма, фактор GM-GSF или IL-2.

"Радиоактивные изотопы" обозначают радиоактивные изотопы, такие как, без ограничения, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁸Re, ⁶⁷Cu, ²¹¹At, ²¹³Bi, ¹²⁵I, ¹¹¹In.

"Антиангиогенное средство" обозначает химическое или биологическое вещество, которое ингибирует или уменьшает образование новых кровеносных сосудов, то есть ангиогенез.

Антиангиогенные средства, которые могут быть конъюгированы с полипептидом согласно первому аспекту изобретения или со слитым белком согласно второму аспекту изобретения, включают, без ограничения, антиангиогенное средство, выбранное из группы, состоящей из паклитаксела, 2-метоксиэстрадиола, приномастата, батимастата, BAY 12-9566, карбоксиамидотриазола, CC-1088, декст-

рометорфана уксусной кислоты, диметилксантона уксусной кислоты, эндостатина, IM-862, маримастата, пеницилламина, РТК787/Z 222584, RPI.4610, скваламина лактата, SU5416, талидомида, комбретастатина, тамоксифена, COL-3, неовастата, BMS-275291, SU6668, антитела анти-VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, интерлейкина 12, IM862, амилорида, ангиостатина, ангиостатина K1-3, ангиостатина K1-5, Каптоприла, DL-альфа-дифторметилорнитина, DL-альфа-дифторметилорнитина HCl, эндостатина, фумагиллина, гербицидина А, 4-гидроксибензилретинамида, юглона, ламинина, гексапептида ламинина, пентапептида ламинина, лавендустина А, медроксипрогестерона, миноциклина, ингибитора рибонуклеазы плаценты, сурамина, тромбоспондина, антител против проангиогенных факторов (например, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназы проангиогенных факторов роста (например, Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); ингибиторов mTOR (например, Torisel); интерферона альфа, бета и гамма, IL-12, ингибиторов матриксной металлопротеиназы (например, COL3, маримастат, батимастат); ZD6474, SU11248, витаксина; ингибиторов PDGFR (например, Гливек); NM3 и 2-ME2; циклопептидов, таких как циленгитид.

"Антиметастатическое средство" обозначает химическое или биологическое вещество, которое ингибирует или уменьшает метастазирование, т.е. дальнейшее распространение, в основном с помощью лимфотока и кровотока, клеток, вызывающих рак, и рост новых опухолей в конечных участках указанного метастазирования.

"Антипролиферативное средство" обозначает химическое или биологическое вещество, которое способно предотвращать или ингибировать образование или рост опухолей. Антипролиферативные средства включают, но без ограничения, (i) антиметаболиты, такие как антиметаболиты фолиевой кислоты (аминоптерин, деноптерин, метотрексат, эдотрексат, триметрексат, нолатрексед, лометрексол, пеметрекседом, ралтитрексед, пиритрексим, птероптерин, лейковорин, 10-пропаргил-5,8-дидеазафолат (PDDF, CB3717)), аналоги пурина (кладрибин, клофарабин, флударабин, меркаптопурин, пентостатин, тиогуанин) и аналоги пиримидина (капецитабин, цитарабин или ага-С, децитабин, фторурацил, 5-фторурацил, доксифлуридин, флоксурин и гемцитабин); (ii) природные продукты, такие как противоопухолевые антибиотики и ингибиторы митоза, такие алкалоиды барвинка, такие как винкристин, виндезин, винбластин, винорелбин; таксаны, такие как паклитаксел (Taxol™), доцетаксел (Taxotere™); колхицин (NSC 757), тиоколхицин (NSC 361792), производные колхицина (например, NSC 33410) и аллоколхицин (NSC 406042); галихондрин В (NSC 609395); доластатин 10 (NSC 376128); майтансин (NSC 153858); ризоксин (NSC 332598); эпотилон А, эпотилон В; дискодермолит; эстрамустин; нокодазол; (iii) гормоны и их антагонисты, такие тамоксифен, торемифен, анастрозол, арзоксифен, лазофоксифен, ралоксифен, нафоксидин, фулвестрант, аминоклутетимид, тестолактон, атаместан, эксеместан, фадрозол, форместан, летрозол, госсерелин, лейпрорелин или леупролид, бузерелин, гистрелин, мегестрол и флюооксиместерон; (iv) биологические агенты, такие как вирусные векторы, интерферон альфа и интерлейкины; (v) соединения на основе платины, такие как карбоплатин, цисплатин [цис-диамминдихлорплатина, (CDDP)], оксалиплатин, ипроплатин, надаплатин, триплатинтетранитрат, тетраплатин, сатраплатин (JM216), JM118 [цисаммиакатдихлор(II)], JM149 [цисаммиакатдихлор(циклогексилламин)трансдигидроксоплатина(IV)], JM335 [трансаммиакатдихлордигидроплатина(IV)], трансплатин, ZD0473, цис, транс, цис-Рt(NH3)(С6Н11NH2)(00СС3Н7)2С1, маланат-1,2-диаминоциклогексанолатин(II), 5-сульфосалицилат-транс-(1,2-диаминоциклодекстран)платин(II) (SSP), поли-[(транс-1,2-диаминоциклогексан)платин]карбоксиамилоза (POLY-PLAT) и 4-гидроксисульфонилфенилацетат (транс-1,2-диаминоциклогексан)платина(II) (SAP) и т.п., и (vi) ДНК-алкилирующие препараты, такие как азотистые иприты, нитрозомочевины, производные этиленмина, алкилсульфонаты и триазены, включая, но без ограничения, циклофосфамид (Cytoxan™), бусульфан, импросульфан, пипосульфан, пипоброман, мелфалан (L-сарколизин), хлорамбуцил, мехлоретамин или мустин, урамустин или урацил иприт, новембихин, фенестерин, трофосфамид, ифосфамид, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), хлорзотоцин, фотемустин, нимустин, ранимустин, семустин (метил-CCNU), стрептозоцин, тиотепа, триэтиленмеламин, триэтилендиотфосфорамин, прокарбазин, алтретамин, дакарбазин, митозоломид и темозоломид.

Фармацевтические композиции.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим конъюгаты и слитые белки согласно изобретению или композиции согласно изобретению. Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически активное количество конъюгата или слитого белка согласно изобретению и фармацевтически активный носитель (первая фармацевтическая композиция по изобретению). В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически активное количество композиции согласно изобретению и фармацевтически активный носитель (вторая фармацевтическая композиция по изобретению).

В контексте настоящего изобретения выражение "фармацевтическая композиция" относится к составу, который был адаптирован для введения заранее установленной дозы одного или нескольких терапевтически используемых средств в клетку, группу клеток, орган, ткань или животному, имеющему неконтролируемое деление клеток, например рак.

Первая фармацевтическая композиция по изобретению содержит фармацевтически эффективное количество конъюгата или слитого белка согласно изобретению. Подходящие конъюгаты и слитые белки для использования в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению включают любой из слитых белков, упомянутых выше в разделе "Конъюгаты Ототус и слитые белки по изобретению".

Вторая фармацевтическая композиция по изобретению содержит фармацевтически эффективное количество композиции согласно изобретению и фармацевтически активный носитель. Вторая фармацевтическая композиция по изобретению содержит полипептид SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентный вариант или слитый белок согласно изобретению. Подходящие функционально эквивалентные варианты полипептида SEQ ID NO: 1 или подходящие слитые белки для использования в фармацевтических композициях второго типа согласно изобретению представляют собой функционально эквивалентные варианты или слитые белки, которые описаны выше в разделах, посвященных терапевтическому применению изобретения или слитым белкам по изобретению соответственно.

Выражение "фармацевтически эффективное количество" в данном контексте обозначает количество, которое способно обеспечить терапевтический эффект, и которое может быть определено специалистом в данной области общепринятым способом. Количество полипептида, его функционально эквивалентного варианта или слитого белка или противоопухолевого соединения, которое может быть объединено в фармацевтических композициях согласно изобретению, будет изменяться в зависимости от индивидуума и конкретного способа введения. Специалистам в данной области понятно, что дозы также можно определить с помощью руководства Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition (1996), Appendix II, p. 1707-1711 и Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Tenth Edition (2001), Appendix II, p. 475-493.

Подходящая доза активного компонента или компонентов в фармацевтической композиции будет зависеть от типа рака, который лечат, тяжести и течения заболевания, вводят ли композицию в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на пептид или полипептид, и решения лечащего врача. Количество полипептида SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентного варианта, слитого белка вводят пациенту соответствующим образом однократно или в течение серии процедур. В зависимости от типа и тяжести заболевания, подходящая доза, как правило, будет составлять приблизительно от 0,01 до 500 мг на 1 кг веса тела пациента в день, которые вводят в виде одной или нескольких доз. Предпочтительно доза будет составлять от приблизительно 0,1 до приблизительно 250 мг/кг в день; более предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг/кг в день. Подходящая доза может составлять приблизительно от 0,01 до 250 мг/кг в день, приблизительно от 0,05 до 100 мг/кг в день, или приблизительно от 0,1 до 50 мг/кг в день. В указанном диапазоне доза может составлять от 0,05 до 0,5, от 0,5 до 5 или от 5 до 50 мг/кг в день. Для перорального введения композиции предпочтительно предоставляются в форме таблеток, содержащих от 1,0 до 1000 миллиграмм активного ингредиента, в частности 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 и 1000,0 мг активного ингредиента для симптоматической корректировки дозы у пациента, которого лечат. Соединения можно вводить по схеме от 1 до 4 раз в день, предпочтительно один раз или два раза в день.

В случае фармацевтических композиций второго типа согласно изобретению, которые содержат первый компонент, выбранный из полипептида SEQ ID NO: 1, его функционально эквивалентного варианта и слитого белка согласно изобретению, и второй компонент, который представляет собой противоопухолевое средство, композиция может быть представлена в виде одного препарата (например, в виде таблетки или капсулы, содержащей заданное количество каждого из компонентов) или, с другой стороны, может быть представлена в виде отдельных препаратов, которые затем объединяют для совместного, последовательного или раздельного введения. Композиции по изобретению также включают препарат в виде набора частей, в который компоненты включены по отдельности, но которые упакованы в одном контейнере. Специалистам в данной области понятно, что препарат из различных компонентов в случае второй фармацевтической композиции согласно изобретению может быть аналогичным, другими словами, аналогично составленным (в таблетках или пилюлях), что обеспечивает их введение тем же путем. В случае, когда различные компоненты по изобретению включены по отдельности, указанные два компонента могут быть представлены в блистере. Каждый блистер содержит препараты, которые должны приниматься в течение дня. Если препараты должны приниматься несколько раз в день, препараты, соответствующие каждому введению, могут быть помещены в различные секции блистера, предпочтительно с пометкой в каждой секции блистера о времени дня, когда их следует принимать. Альтернативно, компоненты композиции по изобретению могут быть изготовлены по-разному, так что различные компоненты вводятся по-разному. Таким образом, возможно, что первый компонент создан в виде таблетки или капсулы для перорального введения, и второй компонент создан для перорального введения или наоборот. Соотношение компонентов, которые входят в состав композиций, используемых во второй фармацевтической композиции согласно изобретению, могут быть скорректированы специалистом в зависимости от противоопухолевого средства, используемого в каждом конкретном случае, а также от целевого показателя. Таким образом, изобретение предусматривает композиции, в которых соотношение между количе-

ствами двух компонентов может изменяться от 50:1 до 1:50, в частности от 20:1 до 1:20, от 1:10 до 10:1, или от 5:1 до 1:5.

Первая и вторая фармацевтические композиции по изобретению также могут содержать одно или несколько дополнительных соединений для профилактики и/или лечения патологий, при которых происходит неконтролируемое деление клеток, таких как рак. Указанные дополнительные соединения, такие как противоопухолевые средства, могут образовывать часть фармацевтической композиции в виде независимых соединений.

Первая и вторая фармацевтические композиции по изобретению также содержат один или несколько дополнительных фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. "Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" обозначает терапевтически неактивное вещество, которое используют для включения активного ингредиента и которое является приемлемым для пациента с фармакологической/токсикологической точки зрения и для химика-фармацевта, который производит его, с физической/химической точки зрения с учетом композиции, лекарственной формы, стабильности, приемлемости для пациента и биологической доступности.

Число и природа фармацевтически приемлемых наполнителей зависит от желаемой лекарственной формы. Фармацевтически приемлемые наполнители известны специалистам в данной области (Fauli y Trillo C. (1993) "Tratado de Farmacia Galenica", Luzan 5, S.A. Ediciones, Madrid). Указанные композиции могут быть получены с помощью обычных способов, известных в существующем уровне техники ("Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, US).

Первую и вторую фармацевтические композиции по изобретению можно вводить любым подходящим путем, таким как пероральный путь, топический путь, ингаляция или парентеральный путь, при условии, что будут включены фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для создания желаемой лекарственной формы. Предпочтительным путем введения указанных фармацевтических композиций является внутривенный путь.

"Пероральный путь" означает, что фармацевтическая композиция задействована в организме после проглатывания. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может быть в лекарственной форме, подходящей для его введения пероральным путем, вне зависимости от того является ли она твердой или жидкой. Лекарственные формы, подходящие для введения пероральным путем, могут представлять собой таблетки, капсулы, сиропы или растворы, и могут содержать любое общепринятое вспомогательное вещество, известное в данной области, такое как связующие вещества, например сироп, камедь, желатин, сорбит или поливинилпирролидон; наполнители, например лактоза, сахар, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицин; лубриканты для таблетирования, например стеарат магния; дезинтегрирующие агенты, например крахмал, поливинилпирролидон, гликолят натрия крахмала или микрокристаллическая целлюлоза; или фармацевтически приемлемые смачивающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия. Твердые пероральные композиции могут быть получены с помощью обычных процессов смешивания, наполнения или сжатия. Повторяющиеся операции смешивания можно использовать для полного распределения активного вещества в композициях, в которых используют большие количества наполнителей. Указанные операции являются обычными в данной области. Таблетки могут быть получены, например, путем влажного или сухого гранулирования, и в некоторых случаях нанесения на них покрытия согласно способам, известным в общей фармацевтической практике, в частности энтеросолюбильного покрытия.

С другой стороны, "топический путь" обозначает введение несистемным путем и включает применение указанной фармацевтической композиции по изобретению наружно на эпидермис, в ротовой полости и закапывание указанной композиции в уши, глаза и нос, и при котором указанная композиция, по существу, не попадает в кровоток. "Системный путь" обозначает введение пероральным путем, внутривенным путем, внутрибрюшинным и внутримышечным путем. Количество антитела, необходимое для терапевтического или профилактического эффекта, разумеется, будет меняться в зависимости от избранного антитела, природы и тяжести заболевания, которое собираются лечить, и пациента.

"Ингаляция" обозначает введение интраназальным путем или пероральную ингаляцию. Лекарственные формы, подходящие для указанного введения, такие как аэрозольный препарат или ингалятор с дозатором, могут быть получены обычными способами. В одном варианте осуществления путь введения представляет собой интраназальный путь.

В данном контексте термин "парентеральный" включает введение внутривенным путем, внутрибрюшинным путем, внутримышечным путем или подкожным путем. Лекарственные формы для подкожного, внутривенного и внутримышечного парентерального введения, в целом, являются предпочтительными.

В одном варианте осуществления первая и вторая фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть адаптированы для парентерального введения, например стерильные растворы, суспензии или лиофилизированные продукты в подходящей дозированной лекарственной форме. Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы (когда они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления

стерильных инъекционных растворов или дисперсий. При введении внутривенным путем некоторые подходящие носители включают физиологический раствор, забуференный фосфатом (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой настолько, чтобы ее можно было легко ввести в виде инъекции. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна быть защищена от воздействия загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, фармацевтически приемлемый полиол, такой как глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и их подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания размера частиц, требуемого в случае дисперсии, и путем использования сурфактантов. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, таких как парабены, хлорбутанол, фенол, аскорбиновая кислота, тиомерсал и т.п. В большинстве случаев предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит; или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута включением агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Инъекционные стерильные растворы можно получить путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним из вышеуказанных ингредиентов или с их комбинацией, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием через стерильные мембраны. В целом, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и остальные необходимые ингредиенты из числа ранее указанных ингредиентов. В случае стерильных порошков для приготовления инъекционных стерильных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые приводят к образованию порошка, состоящего из активного ингредиента плюс любой желаемый дополнительный ингредиент, из его ранее отфильтрованного стерильного раствора.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить соответствующим образом с помощью импульсной инфузии, например, с уменьшением дозы композиции. Предпочтительно дозу вводят с помощью инъекций, более предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, отчасти в зависимости от того, осуществляется ли введение в остром или хроническом состоянии.

В одном варианте осуществления первую или вторую фармацевтические композиции по изобретению создают с носителями, которые будут защищать указанный полипептид от быстрого выведения из организма, например препараты с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты и микроинкапсулированные системы введения. Можно использовать биodeградируемые биосовместимые полимеры, такие как этилен, винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения указанных препаратов будут ясны специалистам в данной области. Вещества также можно коммерчески приобрести в Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc.

Композиции с замедленным высвобождением также включают препараты кристаллов антител, суспендированных в подходящих составах, которые могут поддерживать кристаллы в суспензии. Указанные препараты, когда их вводят подкожным или внутрибрюшинным путем, могут производить эффект замедленного высвобождения. Другие композиции также включают антитела, заключенные в липосомы. Липосомы, содержащие такие антитела, могут быть получены с помощью известных способов, таких как способы, описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949.

Несмотря на то что Омотус и конъюгаты и слитые белки, содержащие Омотус, способны к транслокации через биологические мембраны, специалисту понятно, что также может быть удобно включать конъюгаты или слитые белки, содержащие Омотус, в наночастицы. Наночастицы могут способствовать сохранению целостности полипептида в биологических жидкостях, пока он не достигнет органа-мишени. Кроме того, в случае композиций, содержащих противоопухолевое средство, инкапсулирование композиций может снизить побочные эффекты, вызванные противоопухолевым средством. Наконец, наночастицы также можно модифицировать так, чтобы они содержали группы, которые обеспечивают направленную доставку наночастицы к органу, представляющему интерес.

Таким образом, в другом варианте осуществления фармацевтические композиции по изобретению содержат конъюгаты, слитые белки и композиции согласно изобретению, образующие часть наночастицы.

Подходящие наночастицы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают такие наноматериалы, как наночастица на основе липида, суперпарамагнитная наночастица, наноболочка, полупроводниковый нанокристалл, квантовая точка, полимерная наночастица, силиконовая наночастица, кремниевая наночастица, металлическая наночастица, фуллерен и нанотрубка.

Направленная доставка может быть достигнута путем добавления лигандов без нарушения способности наночастиц доставлять полипептидную нагрузку. Предполагается, что добавление лигандов обеспечит доставку к конкретным клеткам, тканям и органам. Направленная специфичность лигандных сис-

тем доставки основана на распределении рецепторов лигандов на различных типах клеток. Направляющий лиганд может быть ковалентно или нековалентно связан с наночастицей и может быть конъюгирован с наночастицами различными способами, которые описаны в настоящем документе.

Примеры белков или пептидов, которые можно использовать для направленной доставки наночастиц, включают трансферин, лактоферрин TGF- β , фактор роста нервов, альбумин, пептид Tat HIV, пептид RGD, и инсулин, а также другие белки.

Первая и вторая фармацевтические композиции по изобретению могут быть изготовлены с фармацевтически приемлемым носителем. В предпочтительном варианте осуществления носитель не обеспечивает прямой доставки слитого белка или композиции в цитоплазму клеток, т.е. носитель не способен к слиянию с плазматической мембраной клеток-мишеней. В данном контексте "носитель" обозначает любое вещество, которое служит для улучшения доставки и эффективности активного ингредиента в фармацевтической композиции. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают одно или более из перечисленного: вода, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности или эффективность гибридного белка или композиций, входящих в состав фармацевтических композиций. Примеры соответствующих носителей хорошо известны в литературе (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). Примеры носителей, без ограничения, представляют собой группу сахаридов, таких как лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, и мальтит; группу крахмалов, таких как кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал и картофельный крахмал; группу целлюлоз, таких как целлюлоза, метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза, и гидроксилпропилметилцеллюлоза; и группу наполнителей, таких как желатин и поливинилпирролидон. В некоторых случаях могут быть добавлены разрыхлители, такие как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или альгинат натрия.

Первая и вторая фармацевтические композиции по изобретению подходят для введения любому типу млекопитающих, предпочтительно человеку.

Далее изобретение подробно описывается с помощью следующих примеров, которые являются только иллюстративными и никоим образом не ограничивают объем изобретения.

Примеры

Материалы и методы.

Пример 1. Экспрессия конструкта Omomus в обогащенной среде или в минимальной среде M9.

В случае продукции Omomus в обогащенной среде 1 л среды 2YT, содержащей ампициллин, инокулировали химически компетентными клетками BL21-AI™ One Shot® Escherichia coli (Life technologies) трансформированными конструктом Omomus-pET-3a, выращивали при 37°C при перемешивании 250 об/мин до достижения OD₆₀₀ значения 0,8. Экспрессию белка индуцировали 10 мл раствора арабинозы, инкубацией при 37°C в течение 12 ч. Альтернативно, в случае продукции Omomus в минимальной среде M9 клетки E. Coli, трансформированные конструктом Omomus-pET3a, высевали в 1 л минимальной среды M9, содержащей chloramphenicol and ampicillin with BL21-CodonPlus (Stratagene), и выращивали при 37°C с перемешиванием 250 об/мин до достижения OD₆₀₀ значения 0,8. Экспрессию белка индуцировали с помощью 1 мл раствора IPTG 1000X. Культуру клеток инкубировали при перемешивании 250 об/мин при 37°C в течение 12 ч.

Бактериальную культуру центрифугировали при 10000 об/мин, 4°C, 5 мин в роторе SLA-1500 с использованием 250 мл бутылей. Культуру центрифугировали последовательно для объединения эквивалента 1 л культуры на бутыль.

В целях проверки успешной экспрессии белка из культуры брали аликвоту объемом 1 мл и измеряли значения OD₆₀₀. Центрифугировали 800 мкл указанной аликвоты при 16,060×g в течение 1 мин и удаляли супернатант. Осадок суспендировали в объеме буфера IB Laemmli, эквивалентном (0,1 × значение OD₆₀₀) мкл, чтобы обеспечить равные количества лизированного клеточного экстракта в каждом образце и упростить сравнение клеток до и после экспрессии белка. Затем образцы перемешивали с помощью вихревой мешалки, обрабатывали ультразвуком в течение 5 с при максимальной мощности, замораживали в жидком азоте и в заключение кипятили в течение 2 мин (повторяли 3 раза) перед проведением денатурирующего ДСН-ПААГ-электрофореза в 16,5% акриламидном геле. После электрофореза осуществляли окрашивание кумасси бриллиантовым голубым или проводили вестерн-блоттинг. Буфер IB Laemmli оптимизировали, чтобы обеспечить растворение телец включения, надлежащую миграцию и разделение белков для визуализации экспрессии Omomus.

Пример 2. Очистка Omomus b-HLH-LZ.

Осадки клеток суспендировали в 3 мл лизирующего буфера на 1 г осадка с помощью вортекса. Добавляли 150 мкл раствора Triton на 1 г культурального осадка. Вязкость суспензии снижали обработкой

ультразвуком на льду, при мощности 15 в течение 6×15 с с помощью ультразвукового гомогенизатора.

Затем добавляли эквивалент 100 мкл/г культурального осадка бычьей панкреатической ДНКазы I с последующей инкубацией в течение 60 мин при 37°C с перемешиванием 50 об/мин. Образцы центрифугировали 20 мин при 12000×g (13000 об/мин в роторе SS34 в Sorvall RC 5B Plus с использованием 35 мл колб для центрифугирования), 4°C для осаждения телец включения, а также высокомолекулярные комплексы, такие как клеточные стенки, рибосомы и нерасщепленная геномная ДНК. Липиды, растворимые белки, аминокислоты, сахара и нуклеиновые кислоты составляли супернатант, который удаляли после центрифугирования.

Осажденные тельца включения солиubilizировали 15 мл части А буфера Bull cracker при перемешивании на вортексе. Указанный кислый, денатурирующий, обладающий высокой ионной силой буфер позволяет осуществить полную солиubilизацию конструкта Омотус из телец включения и элиминацию высокомолекулярных комплексов и остаточной ДНК с помощью центрифугирования.

Раствор телец включения разводили 1:1 частью В буфера Bull cracker. После этого пробы центрифугировали 30 мин при 30000×g (19000 об/мин в роторе SS34 в центрифуге Sorvall RC 5B Plus) при 4°C.

Супернатант очищали с помощью катионообменной хроматографии на катионообменных колонках 5 мл (HiTrap™ SP Sepharose HP колонки от GE Healthcare или эквивалентные колонки), последовательно собранных в системе FPLC. Вначале колонку промывали 2 объемами колонки (CV) буфера В для FPLC со скоростью потока 5 мл/мин. Затем колонку уравнивали 5 CV (125 мл) буфера А для FPLC со скоростью потока 2,5 мл/мин. Супернатант (в количестве, эквивалентном максимальному значению 9 г культурального осадка на нагрузку) вводили со скоростью 2,5 мл/мин. Сразу же после загрузки супернатанта колонку промывали 75 мл (3 CV) буфера U8 со скоростью потока 2,5 мл/мин. Промывали 1 CV буфера А. Затем 3 CV 10% буфера В добавляли к колонке. Элюирование Омотус осуществляли 10-35% градиентом буфера В в 50 мл (0,5%/мл) со скоростью 2,5 мл/мин во фракции объемом 2,5 мл. В указанных условиях Омотус элюировали при ~1,5 М NaCl (т.е. ~30% об./об. градиента) с чистотой 90%>.

Фракции, содержащие чистый конструкт, объединяли и обессоливали с помощью 5 последовательно установленных обессоливающих колонок HiTrap™ Desalting от GE Healthcare (или эквивалентных колонок), уравниваемых обессоливающим буфером TFA, со скоростью потока 3,0 мл/мин. Объединенные фракции вводили (максимальный объем 7,5 мл на введение) и проводили элюирование с последующей детекцией OD₂₈₀. Белок элюировался в первых 15 мл после введения. Следующие фракции, показывающие низкие значения OD₂₈₀ и высокую проводимость, удаляли. Указанный способ обеспечивал ~95%> выделение 98-99%> обессоленного белка.

Очищенный белок можно концентрировать либо с помощью центрифугирования в центрифужных фильтрах Amicon®Ultra Ultracel®-3K (Millipore™) или эквивалентных фильтрах, либо с помощью лиофилизации. Концентрирование с использованием Amicon®Ultra выполняли согласно инструкциям производителя. Альтернативно, в случае лиофилизации добавляли 50% об./об. ацетонитрила к обессоленным фракциям, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Полученный пенистый лиофилизированный белок взвешивали и солиubilizировали до 100 мкл/мг в 50% об./об. ацетонитрила, содержащего 0,05% об./об. TFA, отбирали аликвоты от 1 до 10 мг на эппендорф и лиофилизировали еще раз.

Показатели выхода составляли приблизительно 25 мг/л культуры в обогащенной среде и 15 мг/л культуры в минимальной среде M9.

Пример 3. Омотус трансдуцируется в клетки A549.

Авторы изобретения хотели показать, что в клетках, обработанных Омотус, можно наблюдать, как спустя даже короткое время Омотус достигает ядра.

Экспрессию и очистку Омотус осуществляли, как показано в примерах 1 и 2.

Клетки A549 (ATCC) поддерживали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для проведения анализа с помощью флуоресцентной микроскопии 20000 клеток A549 высевали на 0,5-дюймовые стеклянные покровные стекла и выращивали в течение 16 ч. Добавляли свежую среду, дополненную пептидом Омотус (35 мкМ), и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Клетки отмывали 3 раза PBS и фиксировали в 3% параформальдегиде и исследовали под микроскопом.

На фиг. 1 показано, что Омотус может работать в качестве домена белковой трансдукции, трансфицирующегося через клеточную мембрану и перемещающегося в ядро.

Пример 4. Омотус уменьшает количество жизнеспособных клеток A549 и индуцирует апоптоз.

Клетки A549 инкубировали в 24-луночных планшетах в течение 72 ч с 10 мкМ Max* или Омотус. Max* получали, как описано в Montagne M. et al. (Montagne M. et al. 2012. PLoS One, 7(2) :e32172). Клетки собирали и окрашивали Аннексином V и PI в соответствии с протоколом производителя (Tali® Apoptosis Kit A10788, Life technologies) и проводили количественный флуоресцентный анализ с использованием цитометра с визуализацией Tali®.

В этом исследовании авторы настоящего изобретения показали, что Омотус более эффективно уменьшает число жизнеспособных клеток A549, чем домен bHLHZ Max (фиг. 2A и 2C). Соответственно процент погибших/апоптотических клеток выше после обработки пептидом Омотус, чем пептидом

Мах* (фиг. 2В и 2D).

Пример 5. Ототус имеет более складчатую структуру, чем с-Мус*, и является более термически устойчивым, чем Мах* и с-Мус* в растворе.

Термически стабильные полипептиды являются предпочтительными в тех случаях, когда полипептид необходимо включить в фармацевтическую композицию. Поэтому определяли сравнительную термическую стабильность Ототус и Мах*.

Ген Ототус экспрессировался, как описано в примере 1, и белок очищали, как описано в примере 2 выше. Очистку Мах* проводили, как подробно описано в Beaulieu M.E. et al., 2013 (Methods Mol Biol, 1012:7-20). Вкратце, бактерии BL21-DE3-pLys трансформировали вектором экспрессии рЕТ-3а, содержащим вставку Мах*, и культивировали, как описано выше. Индукция осуществляли с помощью IPTG (0,6 мМ) в течение 4 ч, после чего собирали клетки. После лизирования с помощью лизирующего буфера и центрифугирования при 30000×g солубилизованный экстракт белка очищали с помощью катионообменной хроматографии и обессоливали, как описано выше. Очищенные и лиофилизированные белки ресуспендировали в 50 мМ KH_2PO_4 , 50 мМ KCl , 5 мМ DTT (рН доводили с помощью 1н. КОН или 1н. HCl).

Измерения кругового дихроизма выполняли, как описано Beaulieu M.E. et al., 2012 (J Mol Recognit, 25 (7): 414-26), с использованием концентрации белка 32 мкМ. Спектры CD регистрировали при 20°C и тепловую денатурацию осуществляли при 1°C/мин (фиг. 3А и 3В) с наблюдением при длине волны 222 нм для измерения содержания спиральных структур (отражающего складчатое, структурированное состояние) в белке.

Пример 6. Ототус проникает в ядра клеток более эффективно, чем Мах*.

Вкратце, очищенные пептиды Ототус и Мах* метили флуоресцеин-малеимидом (FITC) с помощью сконструированного С-концевого остатка цистеина. После очистки и оценки наличия одной флуоресцентной метки на молекулу белка методом масс-спектрометрии, различные концентрации белка (5, 10 или 25 мкМ) добавляли к клеткам A549 (K-Ras мутант аденокарциномы легких), культивировали в среде RPMI, содержащей 0,5% сыворотки, и инкубировали в течение 2 ч при 37°C перед тем, как отмывали три раза PBS и фиксировали в 4% PFA в течение 10 мин, окрашивали 1,5 мкг/мл красителя Хехст в течение 10 мин и помещали предметные стекла для микроскопирования. Изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии, показали, что Ототус проникает в ядра клеток A549 более эффективно, чем Мах* при использовании в концентрациях 5, 10 и 25 мкМ (данные не представлены).

Интенсивность флуоресценции ядер оценивали количественно с использованием ImageJ с подсчетом от 30 до 80 клеток на изображение. Количественная оценка проникающей способности, наблюдаемая для Ототус и Мах* в фиксированных клетках A549, показана на фиг. 4.

Повышенную проникающую способность Ототус по сравнению с Мах* подтверждали с использованием концентрации 20 мкМ на живых клетках (чтобы избежать возможных артефактов фиксации) после 20-минутной инкубации. Вкратце, FITC-меченные Ототус и Мах* добавляли в культуру клеток A549 в среде RPMI, содержащей 0,5% сыворотки, инкубировали в течение 20 мин при 37°C с последующей трехкратной промывкой клеток в PBS и помещали клетки в заливочную среду, содержащую краситель Хехст. Изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии, показали, что Ототус проникает в ядра живых клеток A549 более эффективно, чем Мах* при использовании в концентрации 20 мкМ (данные не представлены). Интенсивность флуоресценции ядер оценивали количественно с использованием ImageJ с подсчетом от 30 до 80 клеток на изображение. Количественная оценка проникающей способности, полученная для Ототус и Мах* в живых клетках A549, представлена на фиг. 5.

Пример 7. Поступление Ототус осуществляется с помощью АТФ-зависимого процесса.

Показано, что Мах* проникает в клетки с помощью АТФ-зависимого процесса, который может быть заблокирован путем снижения температуры до 4°C. Аналогичный механизм обеспечивает способность Ототус проникать в клетки. Клетки A549 инкубировали в течение 2 ч с 20 мкМ FITC-меченного пептида при 4°C и фиксировали 4% PFA с предварительной трехкратной отмывкой PBS, помещали клетки на стекла для проведения микроскопии с использованием заливочной среды, содержащей краситель Хехст. Изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии, показали, что поступление Ототус может быть заблокировано понижением температуры до 4°C.

Пример 8. Ототус уменьшает общее количество клеток более эффективно, чем Мах*.

Вкратце, клетки аденокарциномы легкого A549 и H1650 инкубировали с 25 мкМ пептидов Ототус или Мах* в среде RPMI, содержащей 5% сыворотки, и фиксировали в указанное время (2 или 4 дня) 4% PFA с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым (0,5% кристаллический фиолетовый в 25% метаноле в течение 10 мин) и отмывали водой по меньшей мере три раза. Как Ототус, так и Мах* предотвращали рост клеток, но Ототус являлся более эффективным (фиг. 6). Клетки, окрашенные кристаллическим фиолетовым, растворяли в 10% уксусной кислоте, полученный раствор разводили 1:4 в H_2O и проводили количественный анализ путем измерения абсорбции при OD_{595} . Количественное определение ингибирования пролиферации с помощью кристаллического фиолетового показало, что Ототус более эффективно, чем Мах* снижает пролиферацию клеток H1650 (EGFR-мутантные клетки аде-

нокарциномы легких) при использовании в концентрации 25 мкМ в течение 6 дней (фиг. 7).

Для расчета значения IC_{50} для Омотус и Мах клетки A549 обрабатывали указанной концентрацией пептида в культуральной среде, содержащей 5% сыворотки, и окрашивали кристаллическим фиолетовым, как описано выше. Количественную оценку проводили, как описано выше. На фиг. 8 показана кривая дозозависимого ответа клеток A549 на Омотус в сравнении с Мах*, из которой видно, что Омотус имеет более низкое значение IC_{50} , чем Мах* (т.е. необходима более низкая доза Омотус по сравнению с Мах*, чтобы уменьшить число клеток в два раза). В частности, значение IC_{50} для Омотус составляет 1,2 мкМ и значение IC_{50} для Мах* составляет 2,6 мкМ.

Эффект Омотус на пролиферацию клеток оценивали на клетках глиомы U87. Клетки глиомы U87 инкубировали с пептидами Омотус или Мах* (конечная концентрация 25 мкМ) в среде DMEM, содержащей 5% сыворотки, в течение 48 ч. Клетки обрабатывали трипсином и подсчитывали с использованием клеточного счетчика Tali (Life technologies Inc.). На фиг. 9 показано, что Омотус уменьшает пролиферацию клеток глиомы U87 более эффективно, чем Мах*.

Пример 9. Омотус эффективно достигает ткани легких и мозга после интраназального введения.

Животные получали или однократную дозу 37,5 мг/кг Омотус или не получали (получали PBS) с помощью интраназального введения. Через 10 мин после интраназального введения выявляли флуоресцентный пептид. Легкие экспериментальных животных являются флуоресцирующими в результате локализации в них Омотус (фиг. 10A). Результаты показывают, что пептид Омотус можно вводить животным с помощью интраназального закапывания, и пептид эффективно достигает легких. В мозге некоторых животных, результаты исследования которых описаны на предыдущем чертеже, также определяли интенсивность флуоресценции (фиг. 10B). Очевидно, что флуоресцентный пептид Омотус может проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и достигать мозга.

Пример 10. Пептид Омотус оказывает терапевтический эффект *in vivo*.

Введенный в виде пептида интраназально Омотус уменьшает пролиферацию в мышинной модели KRas-зависимой аденокарциномы легких. Авторы изобретения использовали мышиную модель KRas-зависимого онкогенеза (модель LSLKRasG12D). Вкратце, 8-недельным мышам закапывали препарат вируса AdenoCre для индукции экспрессии мутантного белка KRas-G12D исключительно в легких. Когда у мышей развивалась аденокарцинома легких (через 18 недель после заражения), животным вводили интраназально пептид Омотус (15 мг/кг в объеме 35 мкл) ежедневно в течение 3 дней. Омотус уменьшал скорость пролиферации опухолей (окрашивание Ki-67; фиг. 11A) и уменьшал плотность клеточной популяции (фиг. 11B).

Пептид Омотус также снижал опухолевую массу *in vivo* после 1 недели лечения. Используя ту же самую мышиную модель и условия эксперимента, как описано выше, животным вводили ежедневно в течение 1 недели 15 мг/кг пептида. Определяли изменения площади опухоли в % с использованием программного обеспечения ImageJ. На фиг. 12 показано, что Омотус уменьшает опухолевую массу в мышинной модели KRas-зависимой аденокарциномы легких.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение в профилактике и/или лечении рака полипептида Омотус с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта, обладающего степенью идентичности с SEQ ID NO: 1 свыше 60%, где функционально эквивалентный вариант представляет собой полипептид, который получен в результате вставки или добавления одной или более аминокислот и/или в результате делеции одной или более аминокислот и/или в результате консервативной замены одной или более аминокислот SEQ ID NO: 1.

2. Конъюгат для лечения рака, включающий:

(i) полипептид Омотус, охарактеризованный в п.1, или его функционально эквивалентный вариант; и

(ii) химическую группу, которая способствует клеточному захвату указанного полипептида или его функционально эквивалентного варианта.

3. Конъюгат по п.2, где химическая группа, которая способствует клеточному захвату полипептида Омотус или его функционально эквивалентного варианта, представляет собой проникающий пептид, где указанный проникающий пептид и полипептид Омотус или его функционально эквивалентный вариант образуют слитый белок.

4. Конъюгат по п.3, где последовательность проникающего пептида выбрана из GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 28) и RRRRRRLR (SEQ ID NO: 29).

5. Конъюгат по любому из пп.2-4, дополнительно содержащий сигнал ядерной локализации.

6. Конъюгат по п.5, где сигнал ядерной локализации выбран из группы, состоящей из PKKKRKV (SEQ ID NO: 39), PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 50) и KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 40).

7. Конъюгат по любому из пп.2-5, где функционально эквивалентный вариант полипептида Омотус имеет SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

8. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая фармацевтически эффективное ко-

личество конъюгата по любому из пп.2-7 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

9. Применение конъюгата по любому из пп.2-7 в профилактике и/или лечении рака.

10. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

(i) фармацевтически эффективное количество полипептида Ототус, его функционально эквивалентного варианта, охарактеризованного в п.1, или конъюгата по любому из пп.2-7;

(ii) фармацевтически эффективное количество противоопухолевого средства и

(iii) фармацевтически приемлемый эксципиент.

11. Комбинация для лечения рака, включающая:

(i) фармацевтически эффективное количество полипептида Ототус, его функционально эквивалентного варианта, охарактеризованного в п.1, или конъюгата по любому из пп.2-7;

(ii) фармацевтически эффективное количество противоопухолевого средства и

(iii) фармацевтически приемлемый эксципиент.

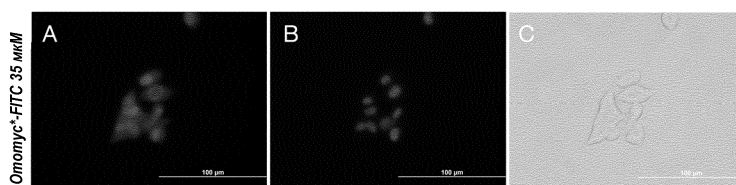
12. Композиция или комбинация по любому из пп.10 или 11, где противоопухолевое средство выбрано из группы, состоящей из цитотоксического средства, антиангиогенного средства и антиметастатического средства.

13. Композиция или комбинация по любому из пп.10-12, где функционально эквивалентный вариант полипептида Ототус имеет SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

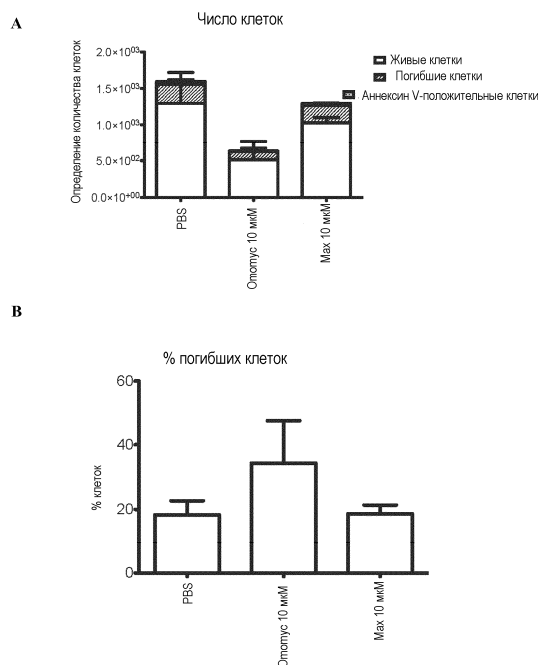
14. Применение композиции по любому из пп.10, 12 или 13 в профилактике и/или лечении рака.

15. Применение комбинации по любому из пп.11-13 в профилактике и/или лечении рака.

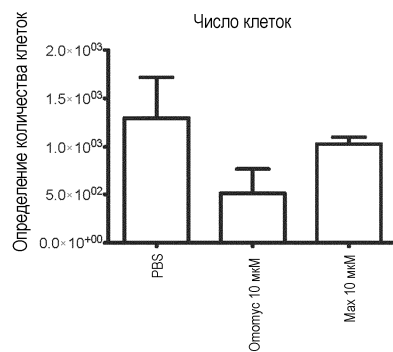
16. Способ профилактики и/или лечения рака, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества полипептида Ототус или его функционально эквивалентного варианта, охарактеризованного в п.1.



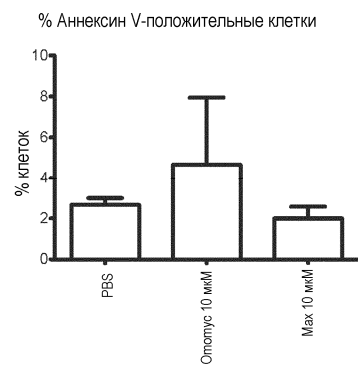
Фиг. 1



С

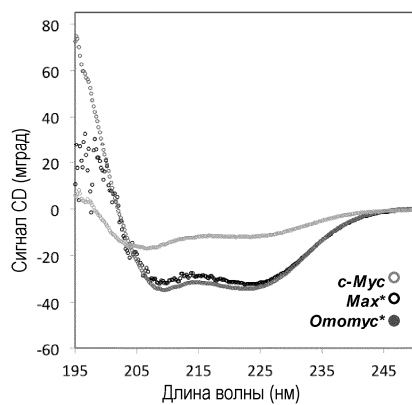


D

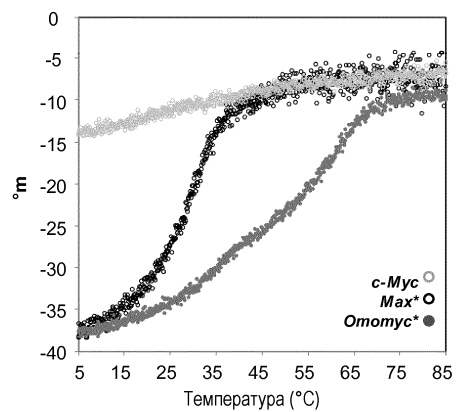


Фиг. 2

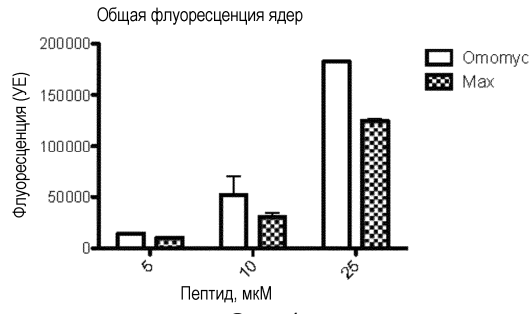
A



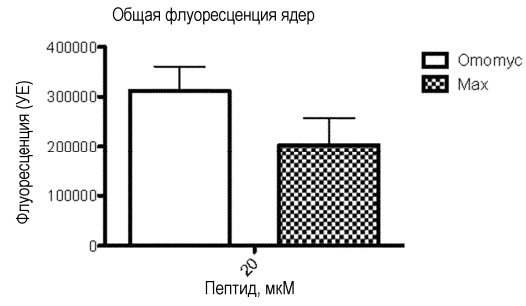
B



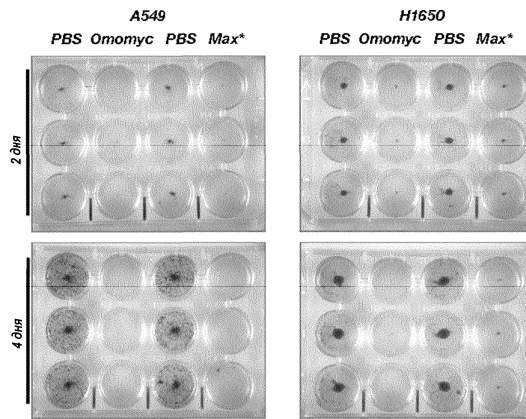
Фиг. 3



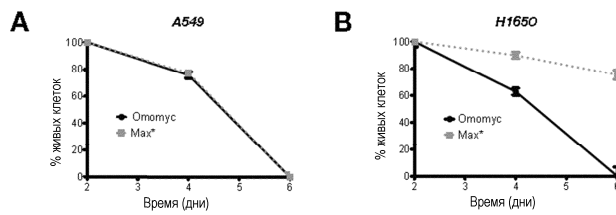
Фиг. 4



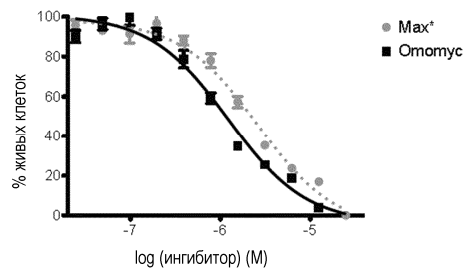
Фиг. 5



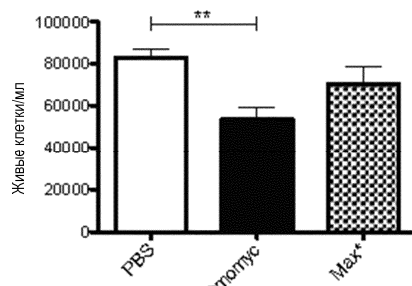
Фиг. 6



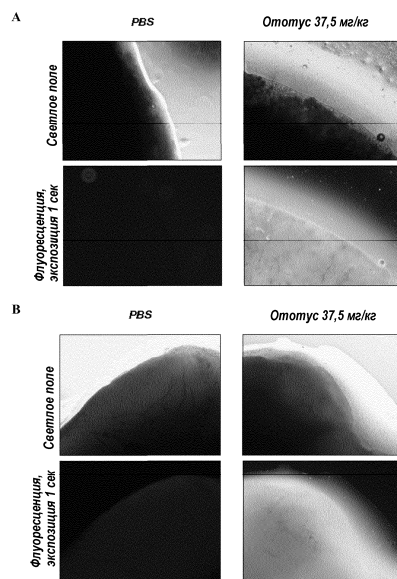
Фиг. 7



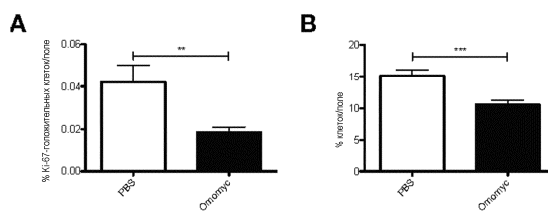
Фиг. 8



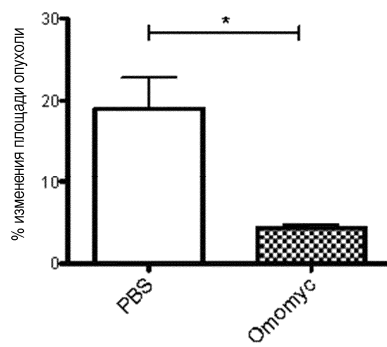
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12