

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036064

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.22

(21) Номер заявки
201500826

(22) Дата подачи заявки
2014.03.06

(51) Int. Cl. A61K 38/50 (2006.01)

(54) ГИБРИДНЫЙ БЕЛОК АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ МОЛЕКУЛЫ И
АРГИНИНДЕЗИМИНАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА И АРГИНИН-ЗАВИСИМЫХ
БОЛЕЗНЕЙ

(31) 61/773,214; 14/197,236

(32) 2013.03.06; 2014.03.05

(33) US

(43) 2015.12.30

(86) PCT/US2014/020943

(87) WO 2014/138319 2014.09.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВИЖН ГЛОБАЛ ХОЛДИНГС ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Вон Бин Ло (US), Вай Норман Фунг
Мань (CA), Гок Суй Цзи, Люн Юнь
Чжун (CN)

(74) Представитель:
Песиков Э.П. (RU)

(56) US-A1-20100303893
US-A1-20090305982
US-A1-20040039179
US-A1-20030157091
US-A1-20040001827
US-B2-7569384

VAN DEN BERG, M.A. et al. Genome
Sequencing And Analysis Of The Filamentous Fungus
Penicillium Chrysogenum. Nature Biotechnology.
October 2008, Vol. 26, No. 10; pages 1161-1168. DOI
10.1038/nbt.1498

(57) Изобретение относится к гибриднему белку альбумин-связывающей молекулы и аргининдезимиказы, к способам его получения, к фармацевтической композиции и применению для лечения рака (поджелудочной железы, головы и шеи, легкого, молочной железы, печени, носоглотки, пищевода, предстательной железы, желудка, мозга, колоректального рака или лейкоза) и аргинин-зависимых болезней.

036064 B1

036064 B1

036064

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Приоритет заявки на данное изобретение испрашивается на основании предварительной патентной заявки US 61/773214, поданной 6 марта 2013 г., и обыкновенной патентной заявки US 14/197236, поданной 5 марта 2014 г., содержание которых во всей полноте в порядке ссылки включено в настоящее описание.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к гибриднему белку, образованному альбумин-связывающей молекулой и аргининдезиминой (AAD), подвергнутому генетической модификации с целью создания вещества, обладающего высокой активностью и длительным периодом полувыведения *in vivo*. Настоящее изобретение дополнительно относится к конструкциям ДНК и белковой инженерии с целью создания различных гибридных белков AAD. Гибридные белки AAD могут быть выделены в очищенном виде из растворимой фракции и нерастворимой фракции (вирусных включений) общих белков. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения гибридного белка, содержащего альбумин-связывающую молекулу и аргининдезиминоазу, фармацевтической композиции и применению для лечения рака и аргинин-зависимых болезней.

Предпосылки создания изобретения

В мире происходит рост заболеваемости раком поджелудочной железы, толстой кишки, печени, меланомой и цервикальным раком. Срочно необходимо эффективное лечение этих болезней. В случае рака многих типов, включая лейкоз, меланому, рак поджелудочной железы, толстой кишки, почки, легкого, предстательной железы, молочной железы, мозга, цервикальный рак и рак печени, раковые клетки являются аутокотрофными к аргинину, поскольку они не синтезируют аргининосукцинатсинтазу (ASS), что делает рак этих типов отличными мишенями для терапии методом истощения аргинина.

Аргинин является частично заменимой аминокислотой в организме человека и других млекопитающих. Он может быть синтезирован из цитруллина посредством двухстадийного процесса, катализатором которого являются ферменты орнитинового цикла аргининосукцинатсинтаза (ASS) и аргининосукцинатлиаза (ASL). В процессе обмена веществ аргиназа может превращать аргинин в орнитин, а в митохондриях орнитинкарбамоилтрансфераза (ОТС) может превращать орнитин в цитруллин. Цитруллин может использоваться снова для синтеза аргинина. Нормальным клеткам для роста обычно не требуется экзогенный источник аргинина в силу избыточной каталитической активности ASS и ASL. В отличие от этого, раковые клетки многих типов не синтезируют ASS и, соответственно, являются аутокотрофными к аргинину. Их рост зависит исключительно от аргинина, получаемого из системы кровообращения. Соответственно, использование циркулирующего аргинина в качестве мишени для разрушающих его ферментов является одной из возможных стратегий ингибирования роста ASS-негативных опухолей [Feun et al., *Curr. Pharm. Des.* 14:1049-1057 (2008); Kuo et al., *Oncotarget*. 1:246-251 (2010)].

Аргинин может разрушать аргиназу, аргининдекарбоксилазу и аргининдезиминоазу (ADI). Из их числа наивысшим средством к аргинину (низким показателем K_m), вероятно, обладает аргининдезиминоаза (ADI). ADI преобразует аргинин в цитруллин и аммиак, которые являются метаболитами орнитинового цикла. К сожалению, ADI содержится только в прокариотах, например, *Mycoplasma* sp. Существует ряд сложностей, связанных с выделением ADI в очищенном виде из прокариот. ADI, выделенная из *Pseudomonas putida*, не обладает эффективностью *in vivo* в силу своей низкой ферментативной активности при нейтральном pH. ADI, выделенная из *Escherichia coli*, не обладает ферментативной активностью и впоследствии должна подвергаться многократной денатурации и ренатурации, что повышает последующую стоимость производства.

Поскольку нативная ADI содержится в микроорганизмах, она является антигенной и быстро выводится из кровообращения пациента. ADI в нативной форме является иммуногенной после введения в кровообращение человека, имеет малый период полувыведения (~4 ч) и активирует нейтрализующие антитела [Ensor et al., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002); Izzo et al., *J. Clin. Oncol.* 22:1815-1822 (2004)]. Эти недостатки могут быть преодолены путем пэгирования. Было обнаружено, что из различных форм пэгированной ADI эффективной является ADI, связанная с ПЭГ (с молекулярной массой 20000) посредством сукцинимидилсукцината (ADI-ПЭГ 20). Тем не менее, активность ADI после пэгирования значительно снижается приблизительно на 50% [Ensor et al., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002)]. В результате предыдущих попыток создания пэгированной ADI получали материалы, которые не являются гомогенными (из-за случайного присоединения ПЭГ к лизиновым остаткам на поверхности белка) и которые сложно характеризовать и контролировать их качество в ходе производственного процесса. Кроме того, ПЭГ является очень дорогостоящим, что значительно повышает стоимость изготовления. После внутривенного введения пэгированной ADI *in vivo* наблюдается просачивание или отделение свободного ПЭГ, а ADI (без ПЭГ) может вызывать проблемы иммуногенности. Соответственно, существует потребность в усовершенствованных композициях для лечения рака, в частности усовершенствованных композициях для лечения рака, которые обладают повышенной активностью и увеличенным периодом полувыведения *in vivo*.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен гибридный белок, образованный альбумин-связывающей молекулой и аргининдезиминой, связывающий сывороточный альбумин и содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 или 41, причем гибридный белок катализирует гидролиз аргинина в цитруллин.

Гибридный белок альбумин-связывающей молекулы и аргининдезимины (AAD) с повышенной активностью и увеличенным периодом полувыведения из плазмы эффективно истощает аргинин в раковых клетках. Нативная ADI содержится в микроорганизмах, является антигенной и быстро выводится из кровообращения пациента. В настоящем изобретении предложена конструкция гибридного белка AAD альбумин-связывающей молекулы и аргининдезимины с целью обеспечения высокой активности и более длительного периода полувыведения *in vivo* (истощение аргинина в течение по меньшей мере 5 суток после одной инъекции). Альбумин-связывающая молекула в гибридном белке AAD согласно настоящему изобретению не оказывает влияния на его специфическую ферментативную активность и продлевает период его полувыведения из кровообращения.

Специфическая активность ADI дикого типа и гибридного белка AAD согласно настоящему изобретению составляет 8,4 и 9,2 единиц/мг (при физиологическом pH 7,4) соответственно. В настоящем изобретении в целом предложен гибридный белок альбумин-связывающей молекулы и аргининдезимины, который сохраняет активность аргининдезимины, а также способен связывать сывороточный альбумин.

В соответствии с одним из вариантов изобретения гибридный белок дополнительно содержит Poly-N или гистидиновую метку.

В другом варианте изобретения в гибридном белке аргининдезиминоза получена из микроорганизмов, выбранных из *Mycoplasma*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Mycobacterium* и *Bacillus*.

В еще одном варианте изобретения аргининдезиминоза получена из *Mycoplasma arginini*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida* или *Pseudomonas aeruginosa*.

В настоящем изобретении предложено применение гибридного белка для получения лекарственного средства для лечения рака.

В соответствии с одним из вариантов выполнения изобретения предложено применение гибридного белка для лечения рака, в котором рак представлен раком поджелудочной железы, головы и шеи, легкого, молочной железы, печени, носоглотки, пищевода, предстательной железы, желудка, мозга, колоректальным раком или лейкозом.

В другом варианте выполнения изобретения предлагается применение гибридного белка для получения лекарственного средства для лечения аргинин-зависимых болезней.

В еще одном варианте выполнения изобретения предлагается способ получения гибридного белка, включающий конструирование гибридного гена, кодирующего указанный гибридный белок, встраивание гибридного гена в вектор, встраивание вектора в организм-хозяин и обеспечение синтеза указанного гибридного белка.

Предлагаемый способ может дополнительно включать очистку гибридного белка.

В одном из вариантов изобретения очистку осуществляют путем хроматографии.

В еще одном варианте выполнения изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок в фармацевтически приемлемом носителе для лечения рака.

В одном из вариантов изобретения предлагаемая фармацевтическая композиция имеет pH от 5,5 до 9,5.

В еще одном из вариантов изобретения предлагаемая фармацевтическая композиция имеет pH 7,4.

В другом варианте изобретения предлагаемая фармацевтическая композиция имеет pH 6,5.

Фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок AAD, может применяться для внутривенной (в.м.) инъекции (быстродействующей дозы лекарства) и внутримышечной (в.м.) инъекции (достаточно быстро и длительно действующей дозы лекарства).

Согласно первой особенности настоящего изобретения предложена конструкция модифицированного гибридного белка AAD с высокой активностью в отношении раковых клеток. Согласно второй особенности настоящего изобретения предложено получение очищенного гибридного белка AAD с высокой степенью чистоты как из растворимой, так и нерастворимой фракций общих белков. Согласно третьей особенности настоящего изобретения продлен период полувыведения гибридного белка AAD, поскольку он способен эффективно связывать альбумин в системе кровообращения. Согласно четвертой особенности настоящего изобретения предложен способ применения содержащей AAD фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения рака различных типов или болезней, сопутствующих опухолям или раку, или других аргинин-зависимых болезней.

Гибридный белок AAD согласно настоящему изобретению также модифицирован во избежание диссоциации на альбумин-связывающую молекулу и ADI, в результате чего он становится более устой-

чивым и имеет более длительный период полувыведения из кровообращения. ADI гибридизирована с альбумин-связывающей молекулой в гибридном белке AAD с целью продления периода полувыведения из плазмы и снижения иммуногенности гибридного продукта. Альбумин-связывающей молекулой (ABD) является пептид, который связывает альбумин в крови. Существуют различные варианты ABD с различным или улучшенным сродством к сывороточному альбумину человека (HSA). Могут быть сконструированы различные варианты ABD, которые могут быть гибридизированы с ADI. В отличие от встречающейся в природе ADI, этот более длительный период полувыведения эффективно способствует истощению аргинина в раковых клетках, раковых стволовых клетках и/или клетках-предшественниках рака.

В настоящем изобретении предложены гибридные белки AAD, способы лечения рака, способы лечения и/или ингибирования метастазов раковой ткани и способы лечения аргинин-зависимых болезней.

Применение различных химиотерапевтических средств и/или радиотерапии в сочетании с гибридным белком AAD согласно настоящему изобретению обеспечивает синергетический эффект лечения рака.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано проектирование различных гибридных белков AAD, образованных альбумин-связывающей молекулой и аргининдезиминой, в виде трехмерной конструкции. Альбумин-связывающая молекула могут быть гибридизирована с ADI с целью формирования гибридного белка AAD. Альбумин-связывающая молекула находится в положении вдали от активного участка ADI. Альбумин-связывающая молекула может быть гибридизирована с N-концом и/или C-концом ADI. Показанная структура основана на структуре ADI *Mycoplasma arginini* (банк данных белков: 1LXY), в которой (A) означает нативную ADI; (B) означает гибридный белок AAD с ABD; (C) означает гибридный белок AAD с ABD на N-конце; (D) означает гибридный белок AAD с ABD на C-конце.

На фиг. 2 показана расстановка последовательностей ADI в некоторых видах бактерий, включая *Mycoplasma arginini* (SEQ ID NO: 23), *Lactococcus lactis* (SEQ ID NO: 24), *Bacillus cereus* (SEQ ID NO: 25) и *Bacillus licheniformis* (SEQ ID NO: 26).

На фиг. 3 показаны конструкции и аминокислотные последовательности различных гибридных белков AAD, полученных из *Mycoplasma arginini* (A-E) и гибридного белка AAD, полученного из *Bacillus cereus* (F).

На фиг. 4 показано создание гибридного белка AAD согласно двум вариантам осуществления (A) и (B) путем использования интеиновых гибридных белков и лигирования синтезированных белков (CBD, связывающей хитин области) согласно следующим схемам; (C) C-концевой гибрид; (D) N-концевой гибрид; (E) опосредованное интеином лигирование белков.

На фиг. 5 показана карта плазмид вектора экспрессии, сконструированного с целью получения гибридного белка AAD.

На фиг. 6 показана (A) генетическая карта, (B) нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 44) и (C) аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 40) His-ABD-PolyN-ADI. (ADI: *Mycoplasma arginini* ADI).

На фиг. 7 показана (A) генетическая карта, (B) нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 45) и (C) аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 41) His-ABD-PolyN-bcADI. (bcADI, *Bacillus cereus* ADI).

На фиг. 8 показан синтез и очистка гибридного белка AAD: (A) AAD растворима на ~90% в случае синтеза при 20°C (дорожки 2 и 3) и нерастворима на ~90% (вирусные включения) в случае синтеза при 37°C (дорожки 4 и 5); (B) очищенный гибридный белок AAD в полиакриламидном геле для электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE): дорожка 1, очищенный гибридный белок AAD (52,8 кДа); дорожка 2, маркер молекулярной массы.

На фиг. 9 показано, что гибридный белок AAD эффективно истощает аргинин и ингибирует рост линий клеток рака различных типов у человека при исследовании *in vitro* культуры тканей, включая меланому человека (A375), карциному толстой кишки человека (HCT116) и рак поджелудочной железы человека (Pancl).

На фиг. 10 показаны результаты связывания альбумина гибридным белком AAD: (A) не денатурирующий нативный полиакриламидный гель (12%), иллюстрирующий увеличение количества комплекса HSA+AAD при увеличении количества добавленного гибридного белка AAD (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 36; фиг. 3A). Молярные соотношения сывороточного альбумина (HSA) и AAD на дорожках 3-6 составляют 1:1, 1:2, 1:5 и 1:15 соответственно. Дорожки 1 и 2 означают HSA и AAD в концентрации 6 и 30 пмоль соответственно; (B) - в другом эксперименте с использованием гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 40; фиг. 3E) соотношения альбумина и AAD, составляющего 1:8, достаточно для связывания всего присутствующего альбумина (дорожка 5).

На фиг. 11 показан график, иллюстрирующий содержание аргинина в плазме у мышей в зависимости от дозы гибридного белка AAD. 100 мкг AAD достаточно для истощения аргинина в плазме в течение по меньшей мере 5 суток.

Определения.

Термином "раковая стволовая клетка" обозначается биологически различимая клетка в опухолевом клоне, которая способна инициировать и поддерживать рост опухоли *in vivo* (т.е. инициирующая рак клетка).

Подробное описание изобретения

Аргинин является частично заменимой аминокислотой в организме человека и других млекопитающих. Он может быть синтезирован из цитруллина посредством двухстадийного процесса, катализатором которого являются ферменты орнитинового цикла аргининосукцинатсинтаза (ASS) и аргининосукцинатлиаза (ASL). В процессе обмена веществ аргиназа может превращать аргинин в орнитин, а в митохондриях орнитинкарбамоилтрансфераза (ОТС) может превращать орнитин в цитруллин (ОТС). Цитруллин может использоваться снова для синтеза аргинина. Нормальным клеткам для роста обычно не требуется экзогенный источник аргинина в силу избыточной каталитической активности ASS и ASL. В отличие от этого, раковые клетки многих типов не синтезируют ASS и, соответственно, являются ауксотрофными к аргинину. Их рост зависит исключительно от аргинина, получаемого из системы кровообращения. Соответственно, использование циркулирующего аргинина в качестве мишени для разрушающих его ферментов является одной из возможных стратегий ингибирования роста ASS-негативных опухолей.

Аргинин может разрушать аргининдезиминаяза (ADI). ADI преобразует аргинин в цитруллин и аммиак, которые являются метаболитами орнитинового цикла. К сожалению, ADI содержится только в прокариотах, например, *Mycoplasma* sp. Существует ряд сложностей, связанных с выделением ADI в очищенном виде из прокариот. ADI, выделенная из *Pseudomonas putida*, не обладает эффективностью *in vivo* в силу своей низкой ферментативной активности при нейтральном pH. ADI, выделенная из *Escherichia coli*, не обладает ферментативной активностью и впоследствии должна подвергаться многократной денатурации и ренатурации, что повышает последующую стоимость производства. ADI в нативной форме имеет малый период полувыведения из плазмы (~4 ч) после введения в кровообращение человека [Ensor et al., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002); Izzo et al., *J. Clin. Oncol.* 22:1815-1822 (2004)]. Эти недостатки могут быть частично преодолены путем пэггирования. Было обнаружено, что из различных форм пэггированной ADI эффективной является ADI, связанная с ПЭГ (с молекулярной массой 20000) посредством сукцинимидилсукцината (ADI-ПЭГ 20). Тем не менее, активность ADI после пэггирования значительно снижается (на ~50% [Ensor et al., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002)]; Wang et al., *Bioconjug. Chem.* 17:1447-1459 (2006)]. Кроме того, линкер сукцинимидилсукцината и ПЭГ является легко гидролизуемым и может отсоединяться от белка, создавая проблемы иммуногенности через короткое время нахождения в организме. Соответственно, существует потребность в усовершенствованных композициях для лечения рака, в частности, усовершенствованных композициях для лечения рака, которые обладают повышенной активностью.

ADI, выделенная из *Pseudomonas putida*, не обладает эффективностью *in vivo* в силу своей низкой ферментативной активности при нейтральном pH и быстрого выведения из кровообращения подопытных животных. ADI, выделенная из *Mycoplasma arginini*, описана, например, у Takaku et al., *Int. J. Cancer*, 51:244-249 (1992) и в патенте US 5474928. Тем не менее, одной из проблем, связанных с применением такого чужеродного белка в целях терапии, является его антигенность. У Takaku et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 84:1195-1200 (1993) описана химическая модификация выделенной из *Mycoplasma arginini* ADI полиэтиленгликолем (ПЭГ) посредством цианурхлоридной линкерной группы. Тем не менее, в результате высвобождения цианида из цианурхлоридной линкерной группы модифицированный белок становился токсичным в процессе метаболизма. В отличие от этого, даже в случае ADI-PEG20, ПЭГ линкер является легко гидролизуемым и может отсоединяться от белка, создавая проблемы иммуногенности через короткое время нахождения в организме. Соответственно, существует потребность в композициях, которые разрушают заменимые аминокислоты и в которых преодолены недостатки известного уровня техники.

Клетки рака многих типов, включая меланому, рак поджелудочной железы, толстой кишки, лейкоз, рак молочной железы, предстательной железы, почки и печени, являются ауксотрофными к аргинину, поскольку они не синтезируют аргининосукцинатсинтазу (ASS), что делает их отличными мишенями для терапии методом истощения аргинина. В настоящем изобретении предложены гибридные белки альбумин-связывающей молекулы и аргининдезиминаязы (AAD) с высокой активностью и длительным периодом полувыведения для эффективного истощения аргинина в раковых клетках.

Масса мономерной ADI составляет порядка 45 кДа, при этом она существует в форме димера (массой порядка 90 кДа) [Das et al., *Structure*. 12:657-667 (2004)]. На фиг. 1 показано проектирование гибридного белка AAD. Альбумин-связывающая молекула с линкером или без линкера (SEQ ID NO: 46-49) гибридизирована с ADI и образуют гибридный белок AAD. Следует отметить, что выбор конкретной альбумин-связывающей молекулы может зависеть от типа раковой ткани-мишени, желаемого размера и периода полувыведения получаемого гибридного белка и от того, выбрана ли определенная область или весь белок. Кроме того, выбранное альбумин-связывающее вещество может являться одинаковым или различаться. Иными словами, могут быть гибридизированы белок и пептид при условии, что получаемая молекула сохраняет активность ADI и также способна связывать сывороточный альбумин, при этом ни одной из функций одной части гибридного белка не препятствует другая часть гибридного белка. Аль-

бумин-связывающая молекула находится в положении вдали от активного участка. Альбумин-связывающая молекула может быть гибридизирована с N-концом и/или C-концом ADI. Существуют различные варианты ABD с различным или улучшенным сродством к сывороточному альбумину человека (HSA). Могут быть сконструированы различные варианты ABD, которые могут быть гибридизированы с ADI. Некоторые микроорганизмы, содержащие ADI (например, *Pseudomonas* sp), не могут использоваться из-за их потенциальной патогенности и пирогенности. Источником ADI могут являться без ограничения различные микроорганизмы, например *Mycoplasma* (например, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*), *Lactococcus* (например, *Lactococcus lactis*), *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*), *Streptococcus* (например, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*), *Escherichia*, *Mycobacterium* (например, *Mycobacterium tuberculosis*) и *Bacillus* (например, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*). ADI предпочтительно клонируют из *Mycoplasma arginini*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* или любого их сочетания. Их аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 23-35) и расстановка некоторых из аминокислотных последовательностей, показанная на фиг. 2, описаны в настоящем изобретении, а также известны из литературы [Das et al., Structure. 12:657-667 (2004); Wang et al., Bioconjug. Chem. 17:1447-1459 (2006); Ni et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:193-201 (2011)].

На фиг. 3 показано конструирование и аминокислотная последовательность (A) нативного белка ADI *Mycoplasma arginini* (SEQ ID NO: 23), (B) различных гибридных белков AAD, выделенных из ADI *Mycoplasma arginini* (SEQ ID NO: 36-40) и (C) гибридного белка AAD, выделенного из ADI *Bacillus cereus* (SEQ ID NO: 41). Успешно сконструированы различные гибридные белки AAD. В этих вариантах осуществления между альбумин-связывающей молекулой и ADI в гибридном белке AAD помещен линкер.

С другой стороны, также создан новый гибридный белок AAD путем использования интеиновых гибридных белков и лигирования синтезированных белков (фиг. 4). Новый гибридный белок AAD может быть сформирован (1) путем введения в реакцию ADI, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце ABD или (2) путем введения в реакцию ABD, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце ADI, в результате чего ADI и ABD связываются ковалентной связью. На фиг. 4Д показано, что ADI, имеющая N-концевой цистеиновый остаток, вступает в реакцию с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце ABD. Сложный тиоэфир на C-конце ABD и α -цистеин на N-конце ADI необходимы для облегчения лигирования белков. Эти фрагменты получают с использованием вектора pTWIN1 (New England Biolabs) согласно инструкции изготовителя. В частности, синтезируют ген, кодирующий гибридный белок ABD-интеин-CBD, и клонируют в вектор под контролем промотора T7 с целью экспрессии в *E. coli* (фиг. 4В).

Полученный гибридный белок ABD-интеин-CBD связывает хитин в колонке. На фиг. 4А показана аминокислотная последовательность ABD-интеин-CBD (SEQ ID NO: 42). После индуцируемого тиолом расщепления и элюирования из колонки получают ABD с химически активным сложным тиоэфиром на ее C-конце (фиг. 4В). С другой стороны, синтезируют ген, кодирующий гибридный белок CBD-интеин-ADI и клонируют в вектор под контролем промотора T7 с целью экспрессии в *E. coli* (фиг. 4С). Полученный гибридный белок CBD-интеин-ADI связывает хитин в колонке. На фиг. 4В показана аминокислотная последовательность CBD-интеин-ADI (SEQ ID NO: 43). После расщепления при pH 7 и 25°C и элюирования из колонки получают ADI с α -цистеином на ее N-конце (фиг. 4Д). Наконец, путем реакции лигирования белков получают гибридный белок AAD, как показано на фиг. 4Е.

Важно, что гибридные белки AAD могут быть получены и очищены традиционным способом. Например, как показано на фиг. 8, гибридный белок AAD успешно синтезируют из *E. coli* и выделяют в очищенном виде в форме как растворимой фракции, так нерастворимой фракции. Кроме того, на фиг. 8 показан очищенный гибридный белок AAD, подвергнутый анализу путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Масса очищенного гибридного белка AAD составляет 52,8 кДа.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит гибридный белок AAD с высокой активностью для истощения аргинина в опухолевых клетках с целью лечения рака. Было обнаружено, что специфическая активность очищенного гибридного белка AAD аналогична специфической активности ADI дикого типа. IC_{50} является полумаксимальной ингибирующей концентрацией, то есть отображает концентрацию гибридного белка AAD, которая требуется для 50% ингибирования линии раковых клеток. IC_{50} является показателем эффективности лекарства. В табл. 1 приведена IC_{50} гибридного белка AAD (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 40, фиг. 3Е) для различных линий раковых клеток (меланомы человека, A375 & SK-mel-28; карциномы толстой кишки человека, HCT116; рака поджелудочной железы человека, Panc1; рака печени человека, Sk-hep1; цервикального рака человека, C-33A). На фиг. 9 представлена эффективность *in vitro* гибридного белка AAD в отношении различных линий раковых клеток. Показано, что гибридный белок AAD способен уничтожать линии клеток рака множества типов, включая меланому человека, карциному толстой кишки человека и рак поджелу-

дочной железы.

Таблица 1

Линия раковых клеток	IC ₅₀ AAD (мкг/мл)
A375 (меланома человека)	0,104
SK-mel-28 (меланома человека)	1,92
PancI (рак поджелудочной железы человека)	1
Sk-hep1 (рак печени человека)	10
C-33A (цервикальный рак человека)	0,063
HCT116 (карцинома толстой кишки человека)	1,30

Что касается связывания альбумина, авторами успешно продемонстрировано, что сконструированный гибридный белок AAD способен связывать сывороточный альбумин человека (HSA). На фиг. 10 показано, что гибридный белок AAD (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 40, фиг. 3E) легко связывает HSA. При молярном соотношении 1:5 или 1:15 образуется комплекс HSA-AAD согласно конструкции, показанной на фиг. 1, с использованием линкерной молекулы. Предполагается, что период полувыведения циркулирующего гибридного белка AAD из кровообращения увеличивается за счет образования нековалентного комплекса HSA-AAD. Соответственно, успешно создана длительно действующая версия гибридного белка AAD.

Ни один из предлагаемых на рынке продуктов не обладает такой же высокой эффективностью, как содержащая гибридный белок AAD фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению. В случае применения при лечении рака содержащая гибридный белок AAD фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению служит противораковым средством для истощения аргинина в опухолевых тканях. Гибридный белок AAD является соответствующим кандидатом для применения в сочетании с другими молекулярными или цитотоксическими средствами нацеленного действия.

Примеры

Следующие далее примеры приведены в качестве описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не имеют целью ограничить каким-либо образом его объем.

Несколько из приведенных далее примеров относятся к способу получения гибридных белков, образованных альбумин-связывающей молекулой и аргининдезиминой. Могут применяться различные методы, включая клонирование и опосредованное интеином лигирование белков. Термин "клонирование" используется в широком смысле и обозначает конструирование гибридного гена, кодирующего гибридный белок альбумин-связывающей молекулы и аргининдезимины, встраивание гибридного гена в вектор, встраивание вектора в организм-хозяин и обеспечение синтеза указанного гибридного белка. Могут применяться многочисленные варианты этого способа, при этом подпадающие под определение клонирования, предусмотренное в настоящем изобретении.

Пример 1.

Конструирование гена, кодирующего альбумин-связывающую молекулу (ABD).

Конструирование гена, кодирующего ABD, происходит посредством двух раундов ПЦР. В первом раунде реакционная смесь ПЦР (общий объем 25 мкл) содержала следующие вещества:

1× буфер ПЦР iProof (Bio-Rad);

50 мкМ смеси dNTP;

0,5 единицы ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad);

10 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

прямой праймер ABD-F1 (SEQ ID NO: 01):

5'-CATGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACT-3'

обратный праймер ABD-R2 (SEQ ID NO: 02):

5'-TAGTCACTTACTCCATATTTGTCAAGTCTCTGTTAGCTAAGACTTTAGC-3'

прямой праймер ABD-F3 (SEQ ID NO: 03):

5'-GAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGAATTACAAGAACCTAATCAACAA-3'

обратный праймер ABD-R4 (SEQ ID NO: 04):

5'-TACACSTTCAACAGTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGTAATAGTCAC-3'

прямой праймер ABD-F5 (SEQ ID NO: 05):

5'-GCCAAAAGTGTGAAGGTGTAAGCACTGATAGATGAAATTTAGCTGC-3'

обратный праймер ABD-R6 (SEQ ID NO: 06):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 30 с; 20 циклов {98°C 10 с, 50°C 20 с, 72°C 20 с}.

Во втором раунде ПЦР смесь (общий объем 50 мкл) содержала следующие вещества:

1× буфер ПЦР iProof (Bio-Rad);

50 мкМ смеси dNTP;

1 мкл реагента ПЦР в качестве матричной ДНК из первого раунда;

1 единица ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad);

200 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

прямой праймер ABD-F7 (SEQ ID NO: 07):

5'-CATGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACT-3'

обратный праймер ABD-R8 (SEQ ID NO: 08):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 30 с; 35 циклов {98°C 10 с, 60°C 20 с, 72°C 20 с}; 72°C 5 мин.

Получили продукт ПЦР, содержащий последовательность ДНК ABD (из 169 пар оснований), и очистили его с помощью набора реагентов Qiagen для выделения ДНК из гелей в целях клонирования.

Пример 2А.

Конструирование гибридного гена, кодирующего гибридный белок AAD.

В первой ПЦР смесь (общий объем 50 мкл) содержала следующие вещества:

1× буфер ПЦР iProof (Bio-Rad);

50 мкМ смеси dNTP;

25 нг геномной ДНК *Mycoplasma arginini*;

1 единица ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad);

200 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

ADINde-F прямой праймер (SEQ ID NO: 09):

5'-ATCGATCGATGTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

ADIhis-R обратный праймер (SEQ ID NO: 10):

5'-AGCTAAGGAATTCGCATCATGATGGTGTGGTGGCTACCCCACTTAAC-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 1 мин; 35 циклов {98°C 10 с, 50°C 20 с, 72°C 40 с}; 72°C 5 мин.

Получили продукт ПЦР размером 1280 пар оснований и очистили его с помощью набора реагентов Qiagen для выделения ДНК из гелей. После этого осуществили вторую ПЦР. Смесь для ПЦР (общий объем 50 мкл) содержала следующие вещества:

1× буфер ПЦР iProof (Bio-Rad);

50 мкМ смеси dNTP;

10 нг продукта ПЦР размером 1280 пар оснований;

10 нг продукта ПЦР размером 169 пар оснований;

1 единица ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad);

200 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

прямой праймер ADINde-F (SEQ ID NO: 11):

5'-ATCGATCGATGTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

обратный праймер ABD-R10 (SEQ ID NO: 12):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 1 мин; 35 циклов {98°C 10 с, 50°C 20 с, 72°C 45 с}; 72°C 5 мин.

Получили продукт ПЦР размером 1428 пар оснований и очистили его с помощью набора реагентов Qiagen для выделения ДНК из гелей. Затем ферментировали его с помощью рестриктаз NdeI и HindIII и лигировали с плазмидой pREST A (Invitrogen), предварительно ферментированной с помощью тех же ферментов. Затем преобразовали продукт лигирования в клетки BL21 (DE3) *E. coli*. Подтвердили последовательность сконструированного гибридного гена путем секвенирования ДНК.

Пример 2В.

Клонирование His-ABD-PolyN-ADI.

Сконструировали His-ABD-PolyN-ADI (SEQ ID NO: 40, фиг. 3Е) на двух перекрывающихся друг друга стадиях ПЦР и вставили фрагмент, полученный на последней стадии ПЦР, в вектор pET3a между сайтами NdeI и BamHI. На фиг. 6 показаны генетическая карта, нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность His-ABD-PolyN-ADL.

Праймеры, использованные при конструировании His-ABD-PolyN-ADI:
прямой праймер hisABDNde-F (SEQ ID NO: 13):

5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATG-3'

обратный праймер ABDnn-R1 (SEQ ID NO: 14):

5'-TTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATC-3'

обратный праймер ABDn-R2 (SEQ ID NO: 15):

5'-AGAACCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGA-3'

прямой праймер ADIn-F (SEQ ID NO: 16):

5'-AATAATAACAATGGTAGCGGCGTTCTGTATTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

обратный праймер ADIBam-R (SEQ ID NO: 17):

5'-TAGATCAATGGATCCTTACCACTTAACATCTTTACGTGATAAAG-3'

В первом раунде ПЦР использовали две реакционные пробирки с 50 мкл реакционной смеси, содержащей компоненты в известной концентрации. В каждой из пробирок содержалась смесь dNTP, буфера iProof (BIO-RAD), ДНК-полимеразы iProof (BIO-RAD), праймеров и матричной ДНК с добавлением ddH₂O до объема 50 мкл. В качестве матричной ДНК использовали в реакции вектор pET3a, содержащий ген выделенной из *Mycoplasma arginini* ADI с удаленной сайтовой мутацией внутренней NdeI без изменения белковой последовательности гена ADI.

В двух реакционных пробирках содержалась смесь праймеров (А) из 10 пмоль hisABDNde-F (SEQ ID NO: 13), 0,5 пмоль ABDIn-R1 (SEQ ID NO: 14) и 10 пмоль ABDn-R2 (SEQ ID NO: 15) и (В) из 10 пмоль ADIn-F (SEQ ID NO: 16) и 10 пмоль ADIBam-R (SEQ ID NO: 17) соответственно.

Задали программу ПЦР согласно стадиям, рекомендованным в руководстве, с температурой (временем) гибридизации и усиления 50°C (20 с) и 72°C (40 с) соответственно. Получили два продукта ПЦР размером 237 и 1278 пар оснований. Экстрагировали продукты и использовали в качестве матрицы в следующем раунде ПЦР.

На второй перекрывающей стадии использовали такую же реакционную смесь, как в первом раунде, за исключением того, что в качестве матрицы использовали смесь из 1 пмоль продукта ПЦР размером 237 пар оснований и 1 пмоль продукта ПЦР размером 1278 пар оснований, полученных в результате первого раунда ПЦР. В качестве праймеров использовали 10 пмоль hisABDNde-F (SEQ ID NO: 13) и 10 пмоль ADIBam-R (SEQ ID NO: 17).

Температура (время) гибридизации и усиления составляли 50°C (20 с) и 72°C (60 с) соответственно. В результате реакции получили продукт ПЦР размером 1484 пары оснований. Очистили продукт ПЦР, ферментировали его с помощью NdeI и BamHI, а затем лигировали с предварительно ферментированной плазмидой pET3a. Затем преобразовали лигированный продукт в *E. coli* BL21 (DE3) с целью получения рекомбинантного белка.

Пример 2В.

Клонирование His-ABD-PolyN-bcADI.

Сконструировали His-ABD-PolyN-bcADI (SEQ ID NO: 41, фиг. 3Е) на двух перекрывающих друг друга стадиях ПЦР и вставили фрагмент, полученный на последней стадии ПЦР, в вектор pET3a между сайтами NdeI и BamHI. На фиг. 7 показаны генетическая карта, нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность His-ABD-PolyN-bcADI.

Праймеры, использованные при конструировании His-ABD-PolyN-bcADI:

прямой праймер hisABDNde-F2 (SEQ ID NO: 18):

5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATG-3'

обратный праймер bcABDnn-R1 (SEQ ID NO: 19):

5'-TTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATC-3'

обратный праймер bcABDn-R2 (SEQ ID NO: 20):

5'-TTTACCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGA-3'

прямой праймер bcADIn-F (SEQ ID NO: 21):

5'-AATAATAACAATGGTAGCGGCGGTAAACATCCGATACATGTTACTTCAGA-3'

обратный праймер bcADIBam-R (SEQ ID NO: 22):

5'-TAGATCAATGGATCCTTAAATATCTTTACGAACAATTGGCATAC-3'

В первом раунде ПЦР использовали две реакционные пробирки с 50 мкл реакционной смеси, содержащей компоненты в известной концентрации. В каждой из пробирок содержалась смесь dNTP, буфера iProof (BIO-RAD), ДНК-полимеразы iProof (BIO-RAD), праймеров и матричной ДНК с добавлением ddH₂O до объема 50 мкл. В качестве матричной ДНК использовали в реакции вектор pET3a, содержащий ген выделенной из *Bacillus cereus* ADI с удаленной сайтовой мутацией внутренней NdeI без изменения

белковой последовательности гена ADI.

В двух реакционных пробирках содержалась смесь праймеров (А) из 10 пмоль hisABDNde-F2 (SEQ ID NO: 18), 0,5 пмоль bcABDnn-R1 (SEQ ID NO: 19) и 10 пмоль bcABDn-R2 (SEQ ID NO: 20) и (В) из 10 пмоль bcADIn-F (SEQ ID NO: 21) и 10 пмоль bcADIBam-R (SEQ ID NO: 22) соответственно.

Задали программу ПЦР согласно стадиям, рекомендованным в руководстве, с температурой (временем) гибридизации и усиления 50°C (20 с) и 72°C (40 с) соответственно. Получили два продукта ПЦР размером 237 и 1250 пар оснований. Экстрагировали продукты и использовали в качестве матрицы в следующем раунде ПЦР.

На второй перекрывающей стадии использовали такую же реакционную смесь, как в первом раунде, за исключением того, что в качестве матрицы использовали смесь из 1 пмоль продукта ПЦР размером 237 пар оснований и 1 пмоль продукта ПЦР размером 1250 пар оснований, полученных в результате первого раунда ПЦР.

В качестве праймеров использовали 10 пмоль hisABDNde-F2 (SEQ ID NO: 18) и 10 пмоль bcADIBam-R (SEQ ID NO: 22).

Температура (время) гибридизации и усиления составляли 50°C (20 с) и 72°C (60 с) соответственно. В результате реакции получили продукт ПЦР размером 1512 пар оснований. Очистили продукт ПЦР, ферментировали его с помощью NdeI и BamHI, а затем лигировали с предварительно ферментированной плазмидой pET3a. Затем преобразовали лигированный продукт в *E. coli* BL21 (DE3) с целью получения рекомбинантного белка.

Пример 3.

Синтез и очистка гибридного белка AAD.

С целью получения посевной культуры в течение ночи культивировали штамм BL21(DE3) *E. Coli*, содержащий плазмиду, кодирующую гибридный белок AAD (фиг. 5), в 5 мл среды 2xTY при 30°C, 250 об/мин. Добавили культивированную в течение ночи посевную культуру (2,5 мл) в 250 мл среды 2xTY при 37°C, 250 об/мин в течение 2,5 ч (до OD₆₀₀ ≈ 0,6-0,7). После достижения OD₆₀₀ добавили в культуру IPTG (до конечной концентрации 0,2 мМ). Продолжили выращивание еще в течение 22 ч при 20°C, а затем собрали клетки путем центрифугирования. Повторно суспендировали сгусток клеток в 25 мл 10 мМ буфера на основе фосфата натрия с pH 7,4. Подвергли клетки лизису путем разрушения ультразвуком. Собрали растворимую часть после центрифугирования. Затем очистили гибридный белок (содержащий гистидиновую метку) методом никель-аффинной хроматографии. В табл. 2 показано, что температура культивации является важным фактором, влияющим на растворимость гибридного белка AAD (с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40, фиг. 3Е), полученного из экспрессирующего хозяина.

С целью выделения растворимой фракции гибридного белка AAD повторно суспендировали сгусток клеток в 25 мл 10 мМ буфера на основе фосфата натрия с pH 7,4. Подвергли клетки лизису путем разрушения ультразвуком. Собрали растворимую часть после центрифугирования. Затем очистили гибридный белок AAD (содержащий гистидиновую метку) методом никель-аффинной хроматографии.

С целью выделения нерастворимой фракции гибридного белка AAD повторно суспендировали сгусток клеток в 25 мл 20 мМ буфера Triton X-100 на основе фосфата натрия с pH 7,4. Подвергли клетки лизису путем разрушения ультразвуком. Собрали нерастворимую часть (вирусные включения) путем центрифугирования. Развернули молекулы белка путем повторного суспендирования в 10 мл 20 мМ Tris-HCl с pH 7,4, 6 М гуанидингидрохлорида со встряхиванием до достижения растворимости. Повторно свернули молекулы белка путем добавления по каплям раствора развернутого белка в быстро перемешиваемый раствор 100 мл 20 мМ буфера на основе фосфата натрия с pH 7,4. Удалили нерастворимые вещества путем центрифугирования. Осуществили высаливание белка путем добавления твердого порошкового сульфата аммония в надосадочную жидкость до достижения 70% насыщения. Собрали нерастворимую часть путем центрифугирования и повторно суспендировали в 10 мл 20 мМ буфера на основе фосфата натрия. Затем очистили гибридный белок AAD (содержащий гистидиновую метку) методом никель-аффинной хроматографии.

Таблица 2

AAD	1	2	3
Температура культивации (°C)	30	20	37
Выход (мг)/ 250 мл культуры	~0,66	~12,0	~7,0
Растворимость	50%	90%	90% вирусных включений
IC ₅₀ (мкг/мл) для клеток A375	0,10	0,68	0,23

Пример 4.

Анализ ферментативной активности и ферментативной кинетики гибридного белка AAD.

С целью определения ферментативной активности ADI дикого типа и гибридного белка AAD согласно настоящему изобретению использовали реакцию диацетилмоноксима-тиосемикарбазида (DAM)-(TSC) для обнаружения цитруллина. Эта реакция представлена далее.

L-Аргинин аргининдезиминаза (ADI) или гибридный белок AAD > **L-цитруллин + аммиак**

С этой целью добавили образец в окрашивающийся реагент, который получили путем смешивания кислого раствора хлорида железа с раствором DAM-TSC. Вкратце, в течение 5 мин инкубировали фермент с 20 мМ аргинина, 10 мМ фосфата натрия с pH 7,4 при 37°C. Нагрели реакцию смесь до 100°C в течение 5 мин, чтобы проявить цвет и осуществить считывание на волне 540 нм (световой путь = 1 см). Построили стандартную кривую с использованием различных концентраций цитруллина. Одна единица нативного фермента ADI соответствует ферментативной активности, при которой 1 мкмоль аргинина преобразуется в 1 мкмоль цитруллина в минуту при 37°C в условиях анализа. Специфическая активность ADI дикого типа и гибридного белка AAD согласно настоящему изобретению составляла 8,4 и 9,2 единиц/мг (при физиологическом pH 7,4) соответственно. Также определили специфическую активность ADI дикого типа и гибридного белка AAD при различных pH (от 5,5 до 9,5), из которых оптимальным является pH 6,5. Соответственно, полученные результаты показывают, что гибридный белок AAD эффективно истощает аргинин, поскольку гибридизация с альбумин-связывающей молекулой не сказывается на ферментативной активности ADI.

Константа Михаэлиса K_m равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, и является обратным показателем сродства субстрата к ферменту. Малая величина K_m говорит о высоком сродстве к субстрату, и это означает, что скорость реакции быстрее приближается к максимальной скорости. С целью определения ферментативной кинетики или величины K_m измеряли активность ADI дикого типа и гибридного белка AAD при различных концентрациях являющегося субстратом аргинина (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 мкМ) и при pH 7,4. Измеренная величина K_m для гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 40, белка ADI, полученного из *Mycoplasma arginini*), показанная на фиг. 3E, и для гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 41, белка ADI, полученного из *Bacillus cereus*), показанная на фиг. 3F, составляют 0,0041 и 0,132 мМ соответственно. Эти результаты говорят о том, что гибридизация с ABD не сказывается на способности различных гибридных белков AAD связывать аргинин.

Пример 5.

Анализ пролиферации клеток и эффективности *in vitro* гибридного белка AAD в отношении линий раковых клеток.

Использовали культуральную среду DMEM для выращивания линий клеток A375 и SK-mel-28 меланомы человека, Panc1 рака поджелудочной железы человека и C-33A цервикального рака человека. Использовали среду EMEM для культивирования линий клеток SK-hep 1 рака печени и C-33A цервикального рака. Высеяли раковые клетки ($2-5 \times 10^3$) в 100 мкл культуральной среды на лунки 96-луночных планшетов и инкубировали в течение 24 ч. Заменили культуральную среду средой, содержащей различные концентрации гибридного белка AAD. Инкубировали планшеты еще в течение 3 суток при 37°C в среде из 95% воздуха/5% CO₂. Осуществили анализ, чтобы оценить число жизнеспособных клеток в культуре согласно инструкциям изготовителя. Приняли количество фермента, которое потребовалось для ингибирования роста клеток на 50%, за IC₅₀.

Как показано в табл. 1 и на фиг. 9, эти результаты говорят о том, что гибридный белок AAD эффективно истощает аргинин и ингибирует рост раковых клеток человека различных линий при исследовании культур тканей *in vitro*. Например, IC₅₀ для меланомы человека, карциномы толстой кишки человека, рака поджелудочной железы человека, рака печени человека и цервикального рака человека имела малую величину (см. табл. 1), поскольку гибридный белок AAD легко ингибировал рост клеток рака всех этих типов. Как и предполагалось, гибридный белок AAD ингибирует рост клеток рака всех аргинин-зависимых типов (например, рака ASS-негативного типа).

Пример 6.

Определение периода полувыведения *in vivo* гибридного белка AAD.

В этом исследовании использовали мышей линии Balb/c (в возрасте 5-7 недель), которых акклиматизировали в течение недели до начала эксперимента. Разделили мышей (n=3) на четыре группы и внутривенно ввели соответственно 0, 100, 500 или 1000 мкг гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 40, фиг. 3E) в 100 мкл PBS. Взяли образцы крови каждой мыши в момент 0 ч и в дни с 1 по 7. Получили сыворотку после центрифугирования. Затем освободили сыворотку от белков и подвергли анализу на аргинин с помощью анализатора аминокислот.

Как показано на фиг. 11, даже в наименьшей дозировке 100 мкг гибридный белок AAD (SEQ ID NO: 40, фиг. 3E) эффективно истощает аргинин в плазме в дни 1, 3 и 5, т.е. AAD способна эффективно истощать аргинин *in vivo* в течение по меньшей мере 5 дней. Содержание аргинина постепенно вернулось к нормальному уровню в день 6 и день 7 во всех лечебных группах.

Пример 7.

Эффективность *in vivo* гибридного белка AAD в отношении ксенотрансплантатов раковых клеток.

В этом исследовании использовали бестимусных мышей линии balb/c (в возрасте 5-7 недель), которых акклиматизировали в течение недели до начала эксперимента. Подкожно ввели мышам 2×10^6 раковых клеток в 100 мкл свежей культуральной среды. Через 10 дней произвольно разделили мышей на контрольную и лечебную группы. Мышам из контрольной группы раз в неделю внутривенно вводили 100 мкл PBS, а мышам из лечебной группы - 100 мкл гибридного белка AAD. Измерили размер опухолей с помощью калибра и вычислили объем опухолей согласно формуле (длина $\times$ ширина²)/2. На 5 день после каждого курса брали образцы крови с целью измерения содержания аргинина в плазме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный белок, образованный альбумин-связывающей молекулой и аргининдезиминой, связывающий сывороточный альбумин и содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 или 41, причем гибридный белок катализирует гидролиз аргинина в цитруллин.

2. Гибридный белок по п.1, дополнительно содержащий Poly-N или гистидиновую метку.

3. Гибридный белок по п.1, в котором аргининдезиминая получена из микроорганизмов, выбранных из *Mycoplasma*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Mycobacterium* и *Bacillus*.

4. Гибридный белок по п.3, в котором аргининдезиминая получена из *Mycoplasma arginini*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida* или *Pseudomonas aeruginosa*.

5. Применение гибридного белка по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для лечения рака.

6. Применение по п.5, в котором рак представлен раком поджелудочной железы, головы и шеи, легкого, молочной железы, печени, носоглотки, пищевода, предстательной железы, желудка, мозга, колоректальным раком или лейкозом.

7. Применение гибридного белка по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для лечения аргинин-зависимых болезней.

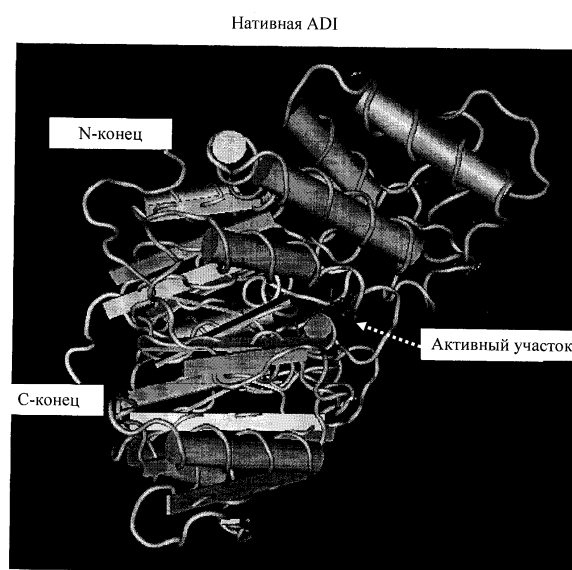
8. Способ получения гибридного белка по п.1, включающий конструирование гибридного гена, кодирующего указанный гибридный белок, встраивание гибридного гена в вектор, встраивание вектора в организм-хозяин и обеспечение синтеза указанного гибридного белка.

9. Способ по п.8, дополнительно включающий очистку гибридного белка.

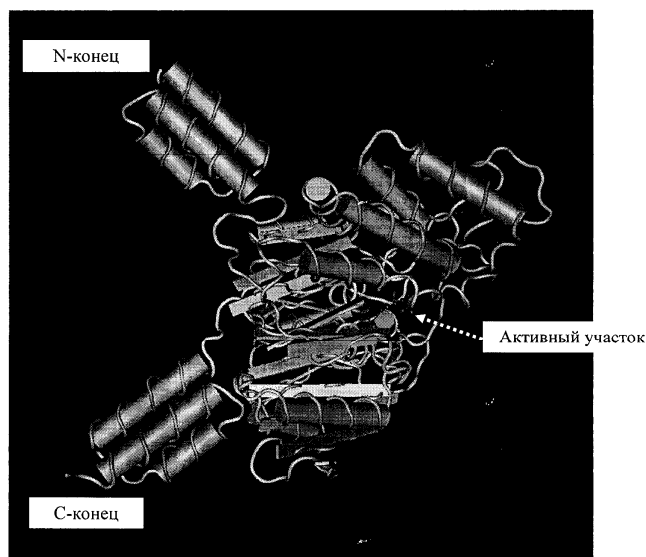
10. Способ по п.9, в котором очистку осуществляют путем хроматографии.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок по п.1 в фармацевтически приемлемом носителе для лечения рака.

(A)



(B) Гибридный белок AAD с двумя ABD/ABD1



SEQ ID NO: 46

ABD без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 47

ABD с линкером:

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 48

ABD1 без линкера:

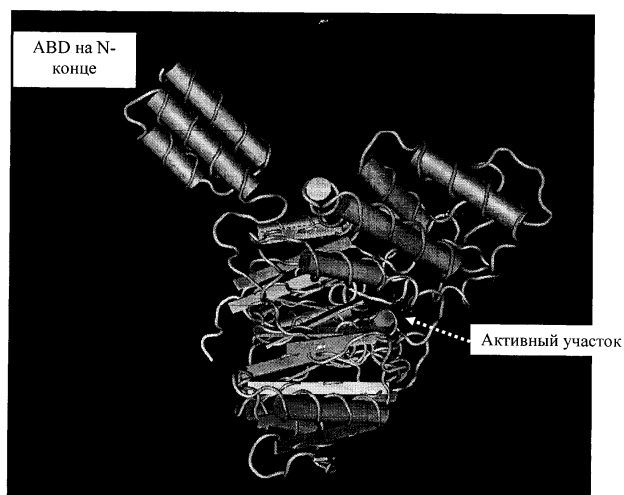
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

SEQ ID NO: 49

ABD1 с линкером:

GSHHHHHHANS�AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

(C) Гибридный белок AAD с одной ABD/ABD1 на N-конце



SEQ ID NO: 46

ABD без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 47

ABD с линкером :

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 48

ABD1 без линкера:

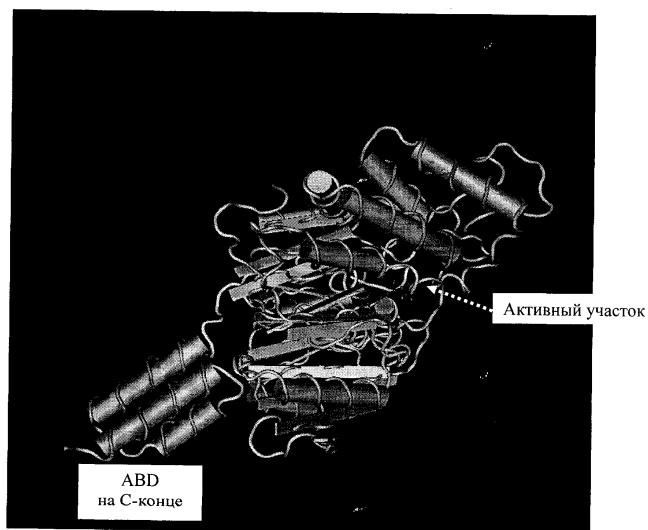
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

SEQ ID NO: 49

ABD1 с линкером:

GSHHHHHHANS�AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

(D)

Гибридный белок AAD с одной ABD/ABD1
на C-конце

SEQ ID NO: 46

ABD без линкера:

AEAKVLANRELDKYGVSDDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 47

ABD с линкером:

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 48

ABD1 без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

SEQ ID NO: 49

ABD1 с линкером:

GSHHHHHHANS�AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

Фиг. 1

- 14 -

(A) SEQ ID NO: 36

ADI - linker - ABD

MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDARKEHKQ
 FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAQDKLIEEFLEDSEPVLSSEHKVVVRNFLKA
 KKTRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRKVR
 QRETLFSRFVFSNHPKLINTFWYDPSLKLSEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
 LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANVFKFWDYDLV
 NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
 VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSPLSRKDVKWSHHHHHHAN
 SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLAALP

(ABD 1: высокоаффинная альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут)

Линкер 1 (SEQ ID NO: 50): GSHHHHHHANS

(B) SEQ ID NO: 37

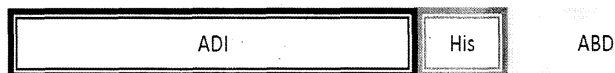
ADI - linker - ABD

MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDARKEHKQ
 FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAQDKLIEEFLEDSEPVLSSEHKVVVRNFLKA
 KKTRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRKVR
 QRETLFSRFVFSNHPKLINTFWYDPSLKLSEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
 LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANVFKFWDYDLV
 NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
 VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSPLSRKDVKWAQHDEAVDAN
 SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут)

Линкер 2 (SEQ ID NO: 51): AQHDEAVDANS

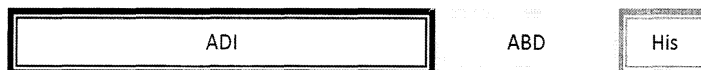
(C) SEQ ID NO: 38



MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDARKEHKQ
 FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAQDKLIEEFLEDSEPVLSSEHKVVVRNFLKA
 KKTRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRKVR
 QRETLFSRFVFSNHPKLINTFWYDPSLKLSEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
 LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANVFKFWDYDLV
 NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
 VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSPLSRKDVKWHHHHHHAQHD
 EAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут)

(D) SEQ ID NO: 39



MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDARKEHKQ
 FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAQDKLIEEFLEDSEPVLSSEHKVVVRNFLKA
 KKTRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRKVR
 QRETLFSRFVFSNHPKLINTFWYDPSLKLSEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
 LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANVFKFWDYDLV
 NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
 VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSPLSRKDVKWAQHDEAVDAN
 SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPHHHHHH

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут)

(E) SEQ ID NO: 40



MHHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAAL
 PSGSNNNNNGSGGSVFDKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSA
 ILESHDARKEHKQFVAVELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAQKLIIEEFLEDSEPVLS
 EEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPLNYFTRDPFASVG
 NGVTIHYMRYKVRQRETLSRFVFSNHPKLINTPWYDPSLKLSEGGDVFIYNNDTLVV
 GVSERTDLQTVTLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPI
 ANDVFKFDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLQSIINKKPVLIPIAGEGASQMEIERETH
 FDGTNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSPFLSRKD
 VKW

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер между His и ABD подчеркнут сплошной линией, а линкер между Poly-N и ADI подчеркнут пунктирной линией)

Линкер 3 (SEQ ID NO: 52): DEAVDANS; Линкер4: SGS; Линкер 5 (SEQ ID NO: 53): GSGG

(F) SEQ ID NO: 41



MGHHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAALP
 SGSSNNNNNGSGGKHPIHVTSEIGELQTVLLKRPKEVENLTPDYQLQLLFDDIPYLPPIQK
 EHHYFAQTLRNRGVEVLYLEKLAAEALVDKKLREEFVDRIKKEGQADVNVAHQTLKEYLLSF
 SNEELIQKIMETGGVRKNEIETSKKTHLYELMETEDHYPFYLDPMETPNLYFTRDPAASVGD
 GLTINKMETREPARRESLFMETEYIIKYHPRFEKHNVPWIWLD RDYKFPIEGGDELILNEET
 IAIGVSARTSAKAIERLAKNLSRQNKIKKVLAIETPKCRAFMEHLDTVFTMETVDYDKFT
 IHPAIQGPKNMETNIYILEKGSDEETLKITHRTSLMETEALKEVLGLSELVLI PCGGGDVI
 ASAREQWNDGSNTLAIAPGVVVTYDRNYVSNTLLREHGIEVIEVLSSEL SRGGGPRCMETS
 METPIVRKDI

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер между His и ABD подчеркнут сплошной линией, а линкер между Poly-N и bcADI подчеркнут пунктирной линией)

Линкер 3 (SEQ ID NO: 52): DEAVDANS; Линкер 4: SGS; Линкер 5 (SEQ ID NO: 53): GSGG

Фиг. 3

(A) SEQ ID NO: 42



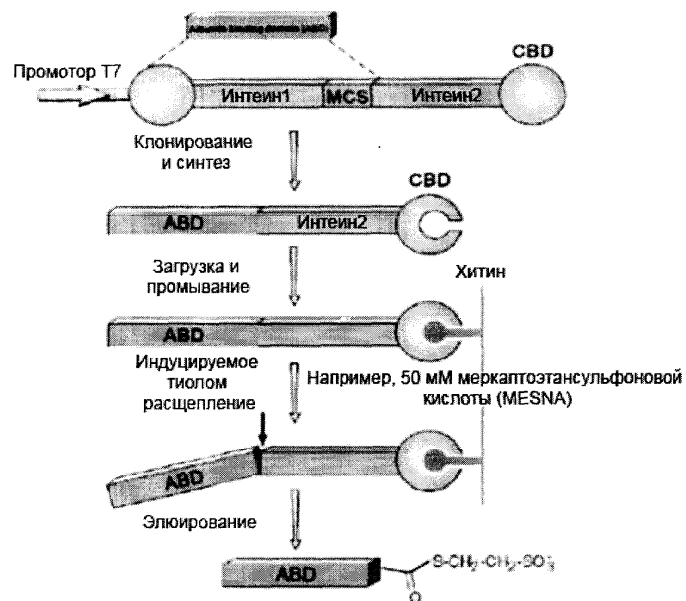
MAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAALPEF
 LEGSSCITGDALVALPEGESVRIADIVPGARPNSDNAIDLKVLDRHGNEPVLADRLFHSGE
 HPVYTVRTVEGLRVTGTANHPLLCLVDVAGVPTLLWKLIDEIKPGDYAVIQRSAFSVDCA
 GFARGKPEFAPTTYTVGVPGLVRFLEAHHRDPDAQIADELTDGRFYAKVASVTDAGVQ
 PVYSLRVDTADHAFITNGFVSHATGLTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKT
 YKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQGDPTITITK

(B) SEQ ID NO: 43

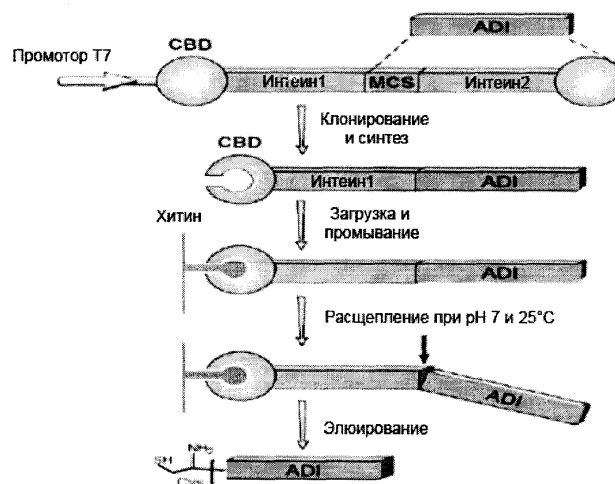


MKIEEGKLTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQN
 NGNNGLELRESGAISGDSLISLASTGKRVSIDLLDEKDFEIWAINETMKLESAKVSRV
 FCTGKKLVYILKTRLGRTIKATANHRFLTIDGWRKLDLSLKEHIALPRKLESSSLQLSP
 EIEKLSQSDIYWDSIVSITETGVVEVFDLTVPGPHNFVANDIIVHNCSVFDSEKFGIHVY
 SEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELCSAILESHDARKEHKQFVAELKANDINVVE
 LIDLVAETYDLASQEAQDKLIEEFLEDSEFVLSEEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAG
 ITKYDLGIEADHELIVDPMPLNYFTRDPFASVGNVGTIHYMRYKVRQRETLFSRVFSNH
 PKLINTPWYDPSLKLSIAGGDVFTYNNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKSEFEK
 RIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMDDKFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLP
 LEGLLQSIINKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAAAL
 EAAGIKVLPFHGNQLSLGGMGNARCMPLSRKDVKW

(C)

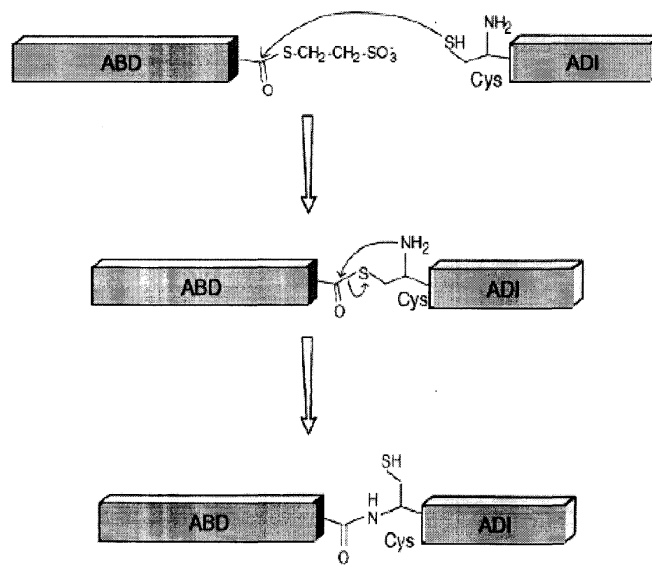
С-концевая
гибридизация

(D)

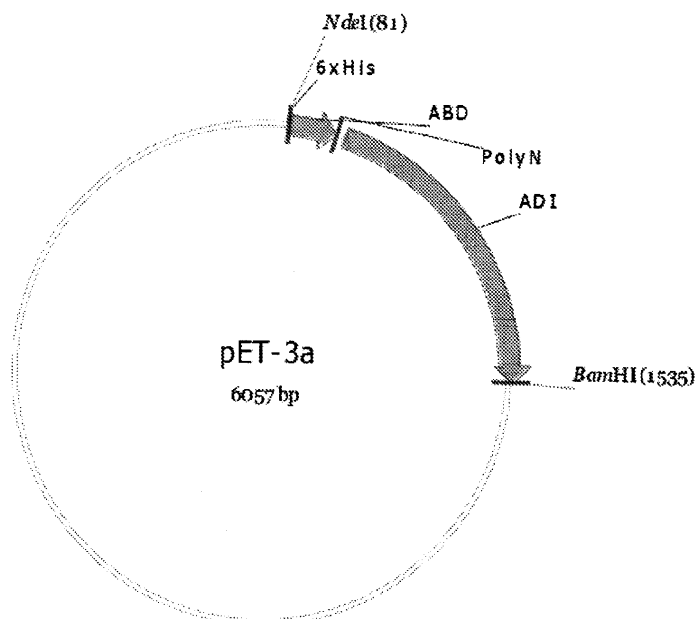
N-концевая
гибридизация

(E)

Опосредованное интеином лигирование белков

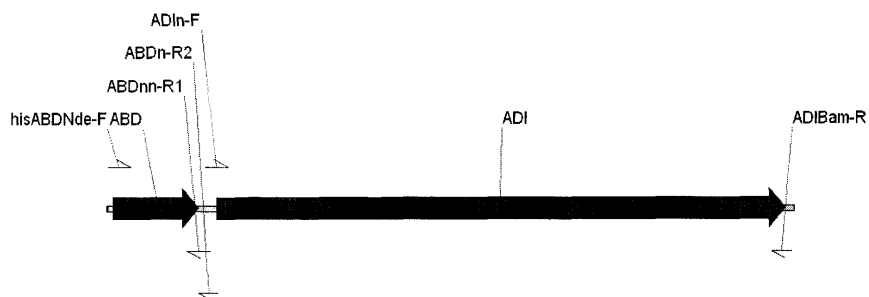


Фиг. 4



Фиг. 5

(A) Генетическая карта



(B) Нуклеотидная последовательность His-ABD-PolyN-ADI (1484 пары оснований)

(SEQ ID NO: 44)

5' -
 ATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCT
 TAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAATGC
 CAAACTGTTGAAGGTGTAAGCACTGATAGATGAAATTTAGCTGCATTACCTTCGGGTAGT
 AACACAATAATAACAATGGTAGCGCGGTTCTGTATTGACAGTAAATTTAAAGGAATTCACG
 TTTATTCAGAAATTGGTGAATTAGAATCAGTTCTAGTTCACGAACCAGGACGCGAAATTGACTA
 TATTACACCAGCTAGACTAGATGAATTATGCTTCTCAGCTATCTTAGAAAGCCACGATGCTAGA
 AAAGAACACAAACAATTTCGTAGCAGAATTTAAAGCAAAACGACATCAATGTTGTTGAATTAATTG
 ATTTAGTTGCTGAAACATATGATTTAGCATCACAAGAAGCTAAAGACAAATTAATCGAAGAATT
 TTTAGAAGACTCAGAACCAGTTCTATCAGAAGAACACAAAGTAGTTGTAAGAACTTCTTAAAA
 GCTAAAAAACATCAAGAGAATTAGTAGAAATCATGATGGCAGGGATCACAATAACGATTTAG
 GTATCGAAGCAGATCAGAAATTAATCGTTGACCCAATGCCAAACCTATACTTCACACGTGACCC
 ATTTGCATCAGTAGGTAATGGTGTAAACAATCCACTACATGCGTTACAAAGTTAGACAACGTGAA
 ACATTATTCTCAAGATTGTATTCTCAAATCACCTAAACTAATTAACACTCCATGGTACTACG
 ACCCTTCACTAAATTTATCAATCGCAGGTGGGGACGTATTTATCTACAACAATGACACATAGT
 AGTTGGTGTCTGAAAGAACTGACTTACAACAGTTACTTTATTAGCTAAAAACATTTGTTGCT
 AATAAAGAATCTGAATTCAAACGTATTGTTGCAATTAACGTTCCAAATGGACAAACTTAATGC
 ACTTAGACACATGGCTAACAATGTTAGACAAGGACAAATTCCTATACTACCAATCGCTAATGA
 CGTATTTAAATTCTGGGATTATGACTTAGTAAACGGTGGAGCAGAACCAACCAAGTTGAAAAC
 GGATTACCTTAGAAGGATTATTACAATCAATCATTAACAAAAACCAAGTTTAAATTCCTATCG
 CAGGTGAAGGTGCTTCACAAATGGAAATCGAAAGAGAAACACACTTCGATGGTACAACTACTT
 AGCAATTAGACCAGGTGTTGTAATTGGTTACTCAGTAACGAAAAACAAACGCTGCTCTAGAA
 GCTGCAGGCATTAAAGTCTTCCATTCCACGGTAACCAATTATCATTAGGTATGGGTAAACGCTC
 GTTGTATGTCAATGCCTTTATCACGTAAAGATGTTAAGTGGTAA-3'

(C) Аминокислотная последовательность His-ABD-PolyN-ADI:

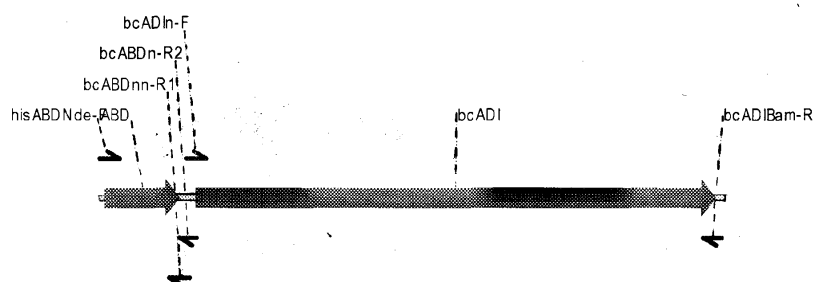
(SEQ ID NO: 40)

MHHHHHHDEAVDANSLAEAKVLNRELDKYGVSDYYKNL INNAKTVEGVKALIDEILAALPSGSNNNNNNGSGGSVF
 DSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDARKEHKQFVAELKANDINVVELIDLVAET
 YDLASQEAQDKLIEEFLEDSEPVLSSEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTR
 DPFASVGNVGTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLISIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTV
 TLLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSP IANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLE
 GLLQSTINKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDGNTYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQSLGMG
 NARCMSMPLSRKDKW

((PolyN с линкером: SGSNNNNNNGSGG)

Фиг. 6

(A) Генетическая карта



(B) Нуклеотидная последовательность His-ABD-PolyN-bcADI (1512 пар оснований):

(SEQ ID NO: 45)

5' -
 ATGGGTCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAACAGCTTAGCTGAAGCTAAAG
 TCTTAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAA
 TGCCAAAACCTGTTGAAGGTGTAAGCACTGATAGATGAAATTTAGCTGCATTACCTTCGGGT
 AGTAACAACAATAATAACAATGGTAGCGGCGGTAAACATCCGATACATGTTACTTCAGAAATTG
 GGGAATTACAAACGGTTTTATTAAAACGACCGGGTAAAGAAGTGGAAGAACTTGACGCCAGATTA
 TTTGCAGCAATTATTTATTTGACGATATCCATACCTACCAATTATTCAAAAAGAGCATGATTAT
 TTTGCACAAACGTTACGCAATCGGGGTGTGAAGTTCTTTATTAGAAAACTAGCCGCTGAGG
 CGTTAGTAGATAAAAACTTCGAGAAGAAATTTGTTGATCGTATTTTAAAGAAGGACAGGCCGA
 CGTAAATGTTGCACATCAAACTTTAAAGAATATTTACTTTCTTTTCAAATGAAGAATTAATT
 CAAAAAATTATGGGCGGTGTACGGAACGAAATGAAACAAGTAAGAAGACACATTTATATG
 AATTAATGGAAGATCATTATCCGTTTACTTAGATCCAATGCCTAATTTATATTTTACTCGTGA
 TCCAGCAGCTAGCGTGGGCGATGGCTTAACGATAAATAAGATGAGAGAACCAGCGCTAGACGT
 GAATCATTATTCATGGAGTACATCATTAATATCATCCAAGATTTGAAAAACATAATGTACCAA
 TCTGTTAGATCGTGATTATAAATTTCCAATTGAAGGTGGCGACGAGCTAATTTAAATGAAGA
 AACAAATGCGATTGGAGTATCTGCTCGTACTTCAGCTAAAGCAATTGAACGTTAGCAAAAAAT
 CTCTTTAGCCGACAAAATAAAATTAAGAAAGTGTAGCAATAGAAATTCCAAATGCCGAGCAT
 TTATGCATTTAGATACAGTATTTACAATGGTTGATTATGATAAGTTTACAATTCACCCAGCTAT
 TCAAGGGCCAAAAGGGAATATGAATATTTATATTTTAAAGAAAGGATCAGATGAGGAACTCTT
 AAAATTACACATCGTACTTCTTTAATGGAAGCATTAAGAGAGGTATTAGGCTTAAGTGAATTAG
 TTCTATTCCATGTGGAGGAGGAGATGTAATTGCTTCTGCTCGTGAACAATGGAATGATGGCTC
 GAACACATTAGCAATCGCGCCAGGTGTAGTTGTACATATGATCGCAACTATGTATCCAATACG
 TTATTACGGGAACACGGGTATAGAAGTGATTGAGGTGCTAAGTTCAGAAATTATCTCGTGGTCTGT
 GGGGTCCACGTTGCATGAGTATGCCAATGTTCGTAAAGATATTTAA - 3'

(C) Аминокислотная последовательность His-ABD-PolyN-bcADI:

(SEQ ID NO: 41)

MGHHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILA
 ALPSGSNNNNNNGSGGKHPIHVTSEIGELQTVLLKRPGKEVENLTPDYLQQLFDDIPY
 LP¹IIQKEHDYFAQTLRN²RGVEVLYLEKLA³AEALVDKKLREEFVD⁴RILKEGQADV⁵NVAHQ
 TLKEYLLSFSNEELIQIMETGGVRKNEIETSKKTHLYELMETEDHYPFYLDPMETPNLY
 FTRDPAASVGDLTINKMETREPARRRESLFMETEYIIKYHPRFEKHN⁶VPIWLDRDYKF
 PIEGGDELILNEETIAIGVSARTSAKAIERLAKNLF⁷RQNKIKKVL⁸AIEIPKCR⁹AFMETHLD
 TVFTMETVDYDKFTIH¹⁰PAIQGPKGNMETNIYILEKGSDEETLKITHRTSLMETEALKEVL
 GLSELVLIPCGGGDV¹¹IASAREQWNDGSNTLAIAPGVVV¹²TYDRNYVSNTLLREHGIEVIE
 VLSSELSRGRGGPRCMETSMETPIVRKDI

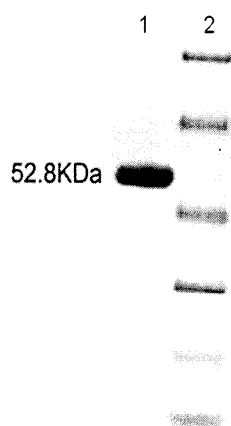
(PolyN с линкером: SGSNNNNNNGSGG)

Фиг. 7

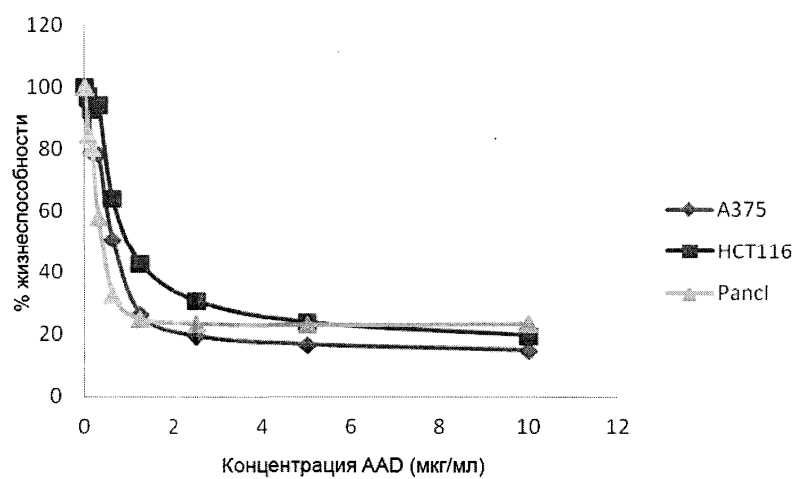
(A)



(B)

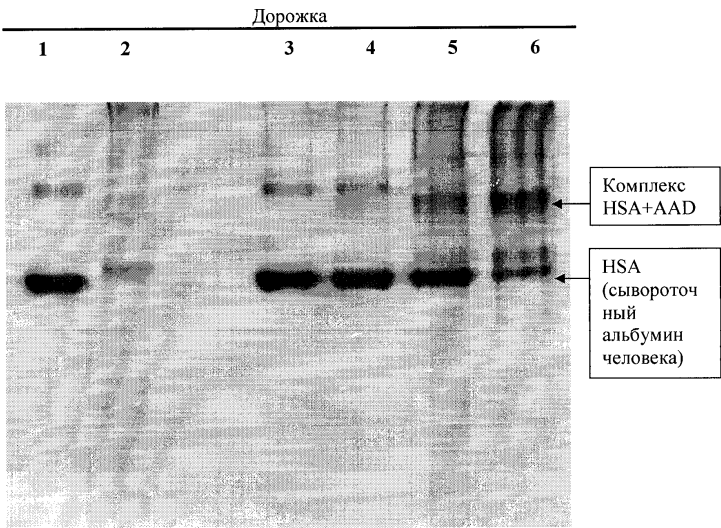


Фиг. 8

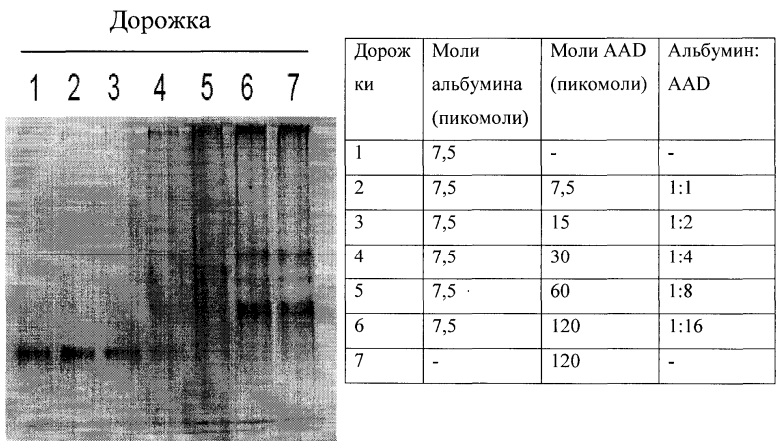


Фиг. 9

(A)

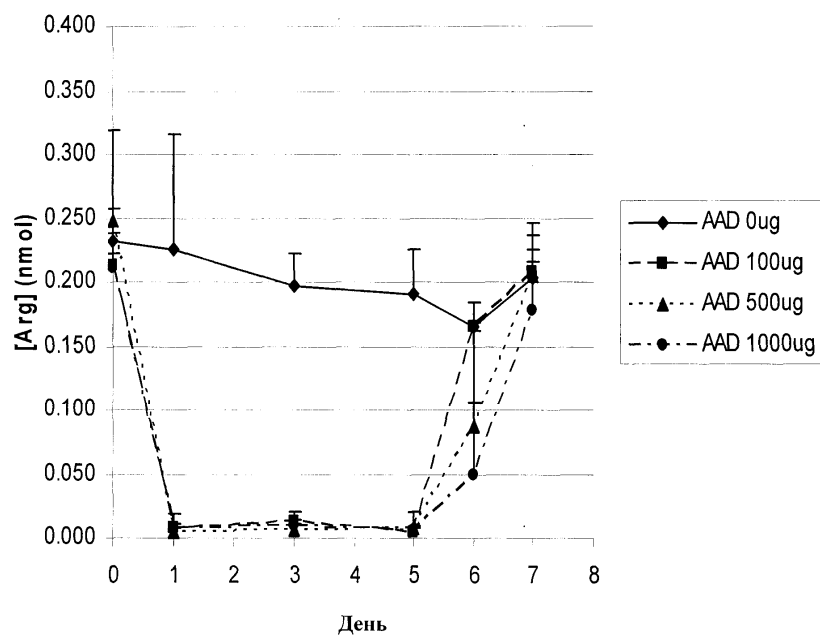


(B)



Фиг. 10

Влияние AAD на содержание аргинина в плазме мышей (n=3)



Фиг. 11

