

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036210**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.10.14**

(21) Номер заявки  
**201890607**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.10.21**

(51) Int. Cl. **A61K 33/24** (2006.01)  
**A61K 47/46** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

---

(54) **СПОСОБ ПОЛИСИГНАЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТОК  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

---

(31) **2015140255**

(32) **2015.09.22**

(33) **RU**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/RU2016/000722**

(87) **WO 2017/052419 2017.03.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"БИОТЕХНОЛОГИЯ" (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Большакова Татьяна Николаевна,  
Колесанова Екатерина Фёдоровна,  
Рыбалкина Екатерина Юрьевна,  
Сивов Игорь Геннадьевич (RU)**

(74) Представитель:  
**Черняев М.А. (RU)**

(56) CHIA CF. et al. Thallium acetate induces C6 glioma cell apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.*, 2005 May; 1042:523-530, (the abstract), found on PubMed, PMID: 15965099

US-A1-20130017210

ASHLEY CE. et al. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano.* 2011 Jul 26; 5 (7): 5729-45. doi: 10.1021/nn201397z., (the abstract), found on PubMed, PMID: 21615170

EDREI Y. et al. Improved efficacy of a novel anti-angiogenic drug combination (TL-118) against colorectal-cancer liver metastases; MRI monitoring in mice. *Br J Cancer.*, 2012 Aug 7; 107(4): 658-66. doi: 10.1038/bjc.2012.322, (the abstract), found on PubMed, PMID: 22805330

(57) В одном из аспектов изобретения предложен способ адресной (таргетной) доставки солей одновалентного таллия, включающий приготовление вирионов фага MS2 или его вирусоподобной частицы с последующей модификацией поверхности циклическим лигандом, наполненных одновалентными солями таллия так, что способ приготовления не допускает "вытекания" иона металла из вирионов до их физического или биохимического разрушения. В родственных аспектах в изобретении предложен способ адресной (таргетной) доставки солей одновалентного изотопа таллия <sup>201</sup>Tl. В предпочтительном варианте лигандом является циклический полипептид, способный взаимодействовать с рецепторами клеток ЗСО и в наиболее предпочтительном варианте лигандом служит iRGD. Лиганд может быть химически конъюгирован для образования ковалентного присоединения или присоединен методом слияния с последовательностью гена А-белка. В предпочтительных вариантах соль одновалентного таллия выбирают из группы галоидных солей, ацетата, нитрата, сульфата, карбоната. В настоящем изобретении предложена субстанция, где вирионы фага MS2 или его вирусоподобные частицы с поверхностью, модифицированной циклическим лигандом, потенциально способны проникать сквозь неповрежденные кожные покровы. Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидны со ссылкой на следующее подробное описание и прилагаемые чертежи. Кроме того, представлены далее различные ссылки, в которых более подробно описаны некоторые процедуры, включены сюда полностью для ссылки. Эти и другие аспекты и варианты осуществления изобретения описаны более подробно ниже и со ссылкой на прилагаемые примеры и фигуры.

**B1****036210****036210 B1**

### Область техники

Изобретение относится к адресной (таргетной) химиотерапии, пригодной для доставки соли таллия в очаговые и метастатические скопления клеток злокачественных солидных опухолей (ЗСО). И более конкретно к получению и использованию бактериофага модифицированного лигандом для доставки солей одновалентного таллия, который вызывает индуцированный апоптоз клеток и который не выводится из клеток белковыми помпами лекарственной устойчивости, с последующими терапевтическими целями. Вещества, субстанции и способы, описанные здесь, найдут применение при терапии и/или профилактики ЗСО.

### Предшествующий уровень техники

В настоящее время для адресной (таргетной) химиотерапии опухолей в РФ используют препараты гуманизированных антител (Гарин А.М., Базин И.С. Таргетная терапия солидных опухолей. Пособие для клиницистов-онкологов. Москва, 2009).

Однако разработка других систем адресной доставки разнообразных химиопрепаратов, как правило имеющих высокую токсичность, в клетки опухолей ведётся интенсивно (US Patent Application 20090047318, 20130287853). Химиопрепараты инкапсулируют, например, в вирус-подобные частицы (US Patent 8324149, US Patent Application 20080274905) или в вирионы РНК-содержащих бактериофагов (US Patent 5677124, 6159728, US Patent Application 20100167981; Carlee E. Ashley et al. Cell-Specific Delivery of Diverse Cargos by Bacteriophage MS2 Virus-Like Particles//ACS Nano. 2011 July 26; 5(7): 5729-5745 и Jeff E. Glasgow et al. Osmolyte-Mediated Encapsulation of Proteins inside MS2 Viral Capsids//ACS Nano. 2012 October 23; 6(10): 8658-8664; аббревиатура ACS означает American Chemical Society). Благодаря такому подходу, реализуется идея гарантированного уничтожения клеток ЗСО с одновременным снижением действия токсичных препаратов на весь организм.

Внимание к РНК-содержащим бактериофагам, в частности к MS2, как средства адресной (таргетной) доставки, объясняется простотой организации вириона и отсутствием специфичных для него рецепторов на поверхности клеток человека и млекопитающих, исключающих его проникновение в клетку этих организмов. Преодолеть "ошибку" природы исследователи пытаются двумя последовательными модификациями. Во-первых, пытаются разработать условия инкапсулирования химиопрепаратов (Pavel Plevka et al. Structure and stability of icosahedral particles of a covalent coat protein dimer of bacteriophage MS2//Protein science 2009, v. 18 (5), pp.1653-1661 и Jeff E. Glasgow et al. Osmolyte-Mediated Encapsulation of Proteins inside MS2 Viral Capsids//ACS Nano. 2012 October 23; 6(10): 8658-8664). А во-вторых, проводят модификацию поверхности вириона, придавая частицам бактериофага MS2 способность сорбироваться на поверхности (за счёт лиганд-рецепторных взаимодействий), а затем и проникать в цитоплазму злокачественной клетки (US Patent 5534257; US Patent Application 20130017210; Stacy L. Capehart et al. Controlled Integration of Gold Nanoparticles and Organic Fluorophores Using Synthetically Modified MS2 Viral Capsids//J Am. Chem. Soc. 2013, February 27; 135(8): 3011-3016).

Однако описанные выше усилия исследователей в создании систем адресной доставки на основе модифицированных вирусов снижается из-за генетически детерминированной способности клеток ЗСО выводить из клеток молекулы различных токсичных химиопрепаратов (Stavrovskaya A.A., T.P. Stromskaya. Transport Proteins of the ABC Family and Multi-drug Resistance of Tumor Cells//Biochemistry (Moscow), 2008, v. 73(5), pp. 592-604). Способность выводить химиопрепараты из клеток реализуется белками лекарственной устойчивости или MDR-белками (Multidrug Resistance) (Stephan Wilkens. Structure and mechanism of ABC transporters// F1000Prime Reports 2015, 7:14-23).

Вместе с тем, следует обратить внимание, что радиоактивный одновалентный изотоп  $^{201}\text{Tl}$ , проникая в цитоплазму клетки ЗСО, по каналам специфичным для ионов калия, не подвергается выведению из цитоплазмы (Jean C. Maublant et al. In Vitro Uptake of Technetium-99m-Tcortoxime in Carcinoma Cell Lines and Normal Cells: Comparison with Technetium-99m-Sestamibi and Thallium-201//The Journal of Nuclear Medicine November 1993, v.34(11), pp. 1949-1952; Brismar T. et al. Increased cation transport in mdrl-gene-expressing K562 cells//Cancer Chemother Pharmacol. 1995; v. 36(1): pp.87-90; M. Fukumoto et al. Scintigraphic Prediction of Resistance to Radiation and Chemotherapy in Patients with Lung Carcinoma// Cancer 1999, October 15, v. 86(8), pp. 1470 - 1479).

Прямые эксперименты (Spenser PS. et al., EFFECTS OF THALLIUM SALTS ON NEURONAL MITOCHONDRIA IN ORGANOTYPIC CORD-GANGLIA-MUSCLE COMBINATION CULTURES//The journal of cell biology, 1973, v. 58(1), pp. 79-95) показывают, что уровень токсичности солей одновалентного таллия на клетку в культуре находятся в пределах 1 пкг (для нормальной линии клеток HEK293) и 40 пкг (для клеток глиобластомы U251). По данным рентгено-структурного анализа (Ailong Ke et al. Structural Roles of Monovalent Cations in the HDV Ribozyme//Structure March 2007, v.15(1), 281-287) ионы одновалентного таллия, взаимодействуя с геномной РНК внутри частицы фага MS2 (внутренний радиус 10 нм), достигнут летальной для клетки концентрации при поглощении 20 нагруженных вирионов. Эти расчёты послужили основанием для создания системы адресной доставки солей таллия к клеткам ЗСО, одновалентные катионы которых устойчивы к действию MDR-белков. Настоящее изобретение предлагает решение терапевтических и диагностических потребностей при адресной (таргетной) химиотерапии ЗСО.

### Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание адресной доставки соли одновалентного таллия к клеткам ЗСО и эндотелия сосудов их питающих, с помощью поверхностно модифицированных вирионов фага MS2, наполненных солями одновалентного таллия. Наиболее близкими аналогами существующего изобретения являются заявка на изобретение (US Patent Application 2013/0251630, а так же PCT/DK2011/050479, EP 2651447A1 и CA 2821024 A1) и WO 2015061592A1 (заявка PCT/US2014/062007). Обе заявки раскрывают способы адресной доставки радионуклидов металлов или фармацевтических композиций введённых в липосомальные наночастицы к клеткам опухолей. Однако в отличие от указанных заявок, настоящее изобретение раскрывает способ доставки ионов одновалентного таллия (в том числе и радиоактивного) с помощью поверхностно модифицированных частиц бактериофага MS2.

Известны способы инкорпорации различных токсических химиопрепаратов в бактериофаг MS2. Например, в US Patent 6159728 или в US Patent Application 20100167981. Однако в указанных ссылках не раскрыты способы инкапсулирования одновалентного таллия в бактериофаг или его вирусоподобную частицу, а также адресная доставка одновалентного таллия к клеткам ЗСО.

Известны способы адресной доставки различных химических соединений к клеткам ЗСО и их кровеносных сосудов (US Patent Application 20090246133, 20140186265, 20150004688), однако не раскрыто использование поверхностно модифицированного вириона фага MS2 для этих целей.

В публикациях (Ruoslahti E. Specialization of tumor vasculature//Nat Rev Cancer 2002 Feb; v. 2 (2): pp. 83-90; K. N. Sugahara et al. Tissue-Penetrating Delivery of compounds and Nanoparticles into Tumors//Cancer Cell December 8 2009, v. 16 (3), pp. 510-520) можно найти описание метода получения поверхностно модифицированных вирус-подобных частиц фага MS2, так чтобы они взаимодействовали с рецепторами клеток ЗСО и сосудов их питающих по механизму лиганд-рецептор. Тем не менее, метод наполнения солями одновалентного таллия таких вирусных частиц в этих публикациях не описан.

Много патентов и патентных заявок раскрывают методы поверхностной модификации бактериофага MS2 или его вирусоподобных частиц (US Patent 5698424; US Patent 5534257; US Patent 5470573; US Patent 5698424; US Patent Application 20090054246; US Patent Application 20140106982; US Patent Application 20130149336; Патент РФ 2526570). Однако все они направлены исключительно на получение специфической иммунной реакции, в том числе и для иммунотерапии ЗСО. Такие исследования и патенты являются аналогами фаговых дисплеев (Mc Cafferty J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains// Nature 6 December 1990, v.348, pp. 552-554; US Patent 5821047; US Patent 5702892) и не имеют отношения к настоящей заявке.

Известны способы применения радиоактивных солей таллия (<sup>201</sup>Tl, Патент СССР 1088558), как способ диагностики или прогностический метод визуализации ЗСО субъекта. Известны аналогичные зарубежные патенты (US Patent Application 20140037541; US Patent Application 20130324847A1; US Patent 4764598; US Patent 4446123). Во всех этих примерах раскрыты методы приготовления экстракорпорально вводимых диагностических препаратов не токсичных для клинического применения. Количество однократно вводимого одновалентного таллия при этом 10 - 100 пг/кг или 10<sup>-6</sup> часть от hLD<sub>50</sub>=1,5 мг/кг (Toxicological review of thallium and compounds//U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. September 2009).

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение потребности в адресной (таргетной) доставке одновалентного таллия, исключающей токсическое воздействие токсического вещества на организм, но гарантированно уничтожающей клетку ЗСО. Данная методика для адресной (таргетной) доставки одновалентного таллия обладает следующими преимуществами, такими как легкость применения, лучшая фиксация в зоне размножения ЗСО, эффективная абсорбция, отсутствие токсичности, контролируемое высвобождение одновалентного таллия из вириона, снижение применяемой дозы таллия и простое создание субстанции. Кроме того, субстанция по настоящему изобретению не раздражает кожу и слизистые поверхности.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. А. Электрофоретическое разделение частиц фага MS2, пустых (крайняя левая дорожка) и наполненные таллием частично (средняя дорожка) или предельно (крайняя правая).

Б. Электронные микрофотографии частиц фага MS2, наполненных TlNO<sub>3</sub>.

В. Микрофотография частиц фага MS2 (контроль). Масштабная линия = 1 мкм.

Фиг. 2. График эффективности наполнения частиц фага MS2 солями одновалентного таллия (на примере TlNO<sub>3</sub>).

А. Наполнение частиц фага в зависимости от концентрации соли в штоке фага.

Б. Соотношение "введённая в частицы"/"добавленная в шток от количества соли".

Фиг. 3. График "вытекания" соли из наполненных частиц фага MS2 со временем.

Данные, представленные на графиках 2 и 3 анализировали с помощью программы Statistica 12 (p <0,01) или Стьюдент-теста. \* P <0,05, \*\*\* p <0,001.

Фиг. 4. Наиболее плотная фракция бактериофага MS2, содержащая таллий (наполнение методом сборки-разборки) является самой тяжёлой (нижняя фракция), фракция бактериофага MS2, содержащая таллий (наполнение методом высушивания) расположена выше и ещё выше находится фракция бакте-

риофага MS2 дикого типа не содержащая таллий.

Фиг. 5. Агглютинация клеток опухоли частицами фага MS2 с модифицированной лигандом поверхностью вириона. Слева - клетки, выросшие в среде без VEGF. Справа - клетки, выросшие в среде с VEGF.

Фиг. 6 Проникновение вирионов фага MS2, наполненных таллием, в клетки. Слева - клетки, выросшие без VEGF. Справа - клетки, выросшие с VEGF (овальные включения в ядрах - накопление таллия).

### Осуществление изобретения

Предлагаемый способ может быть реализован на базе существующего уровня техники следующей последовательностью действий.

Первоначально производят подготовительные процедуры, в том числе, они были описаны, например, в US Patent 8367621, 6399307, 6803379; US Patent Application 20130343989, 20100322862, 20150044665, в результате выполнения которых такие наночастицы могут найти применение в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, наночастицы на основе наноматериалов, описанные в US Patent 6180389; US Patent Application 20040028694, 20140045915, 20140314664, 20140341938 рассматриваются в качестве ядра модифицированного вириона фага, в соответствии с настоящим изобретением. Одновременно с получением высоких титров фага MS2, проводили химические реакции, которые касались разработки оригинального метода синтеза циклических пептидов, используемых для модификации поверхности вирионов фага MS2.

В некоторых вариантах изобретения модифицированные вирионы фага могут содержать радионуклид <sup>201</sup>Tl, который обычно используется в качестве соли одновалентного таллия, такого как хлорид, иодид или бромид. Использование радионуклидов в качестве индикаторов ярлыков и хорошо известны в данной области и могут быть легко адаптированы специалистом в данной области для использования в рамках настоящего изобретения. Радионуклиды могут быть использованы при процедуре разборки - сборки модифицированных вирионов фага для наполнения солями и в качестве меток с вводимыми солями. Методом обнаружения и исследования вирионов фага здесь стала просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Другим способом обнаружения частиц стал метод плазмонного резонанса (SPR), волна которого позволяет детектировать сорбированные частицы модифицированных вирионов, в том числе наполненных таллием, на стекле (V. N. Konopsky et al. Photonic Crystal Biosensor Based on Optical Surface Waves//Sensors 2013, 13(20), pp. 25662578). Флуоресцентная спектроскопия может быть использована для анализа проб, содержащих соли одновалентного таллия (DI ZHANG et al. A Thallium Transport FLIPR-Based Assay for the Identification of KCC2-Positive Modulators//Journal of Biomolecular Screening 2010, v. 15 (2); pp.177-184), для определения эффективности его упаковки и вымывания. Кроме того, изотопная метка может быть использована для облегчения обнаружения иона при упаковке и вымывании.

Все манипуляции с материалами, содержащими соли таллия, проводятся с учётом письма Главного государственного санитарного врача РФ от 2004.01.06 № 2510/92-04-32.

Изобретение поясняется следующими примерами.

Пример 1.

Получение высокого титра фага MS2 проводили по методу, описанному ранее (Княжев В.А., Сивов И.Г., Сергиенко В.И. РНК-транскрипция неинфекционными вирионами фага MS2// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2002, № 3, стр. 56-63). Контролями служили секвенирование ОТ-ПЦР фрагмента геномной РНК, а так же определение титра методом агаровых слоев (Gratia A. Numerical Relations between Lysogenic Bacteria and Particles of Bacteriophage// Ann. Inst. Pasteur 1936, v.57, p.652). Концентрирование вирионов фага, проводили после осветления клеточного лизата центрифугированием (15000 об/мин) с последующим осаждением ПЭГ-6000 в присутствии NaCl, как известно специалистам. Концентрирование препарата фага так же проводили обезвоживанием сухим сефадексом G-10.

Пример 2. Наполнение фага MS2 солями таллия и контроль процесса.

А. Методом вакуумной сушки, когда проводили сушку смеси препарата фага с растворами таллия.

Б. Методом разборки - сборки, когда его проводили по протоколу, известному специалистам (US Patent 8987173), выдерживая фаг 24 часа в буфере ST (50 mM трис, 100 mM NaCl) в присутствии 0.25M TMAO и 0,1M соли таллия. Затем раствор центрифугировали при 10,000g 10 мин. Супернатант смешивали с ПЭГ6000 и NaCl до конечной концентрации 12,5% и 0.5M, соответственно. Через 2 ч раствор осаждали центрифугированием (17,800g в течение 45 мин) при 4°C. Осадок растворяли в минимальном количестве ST буфера и вновь осаждали при 10,000g в течение 10 мин. Надосадок фракционировали и фракции, соответствующие интактным капсулам вируса MS2, собирали и после хранили в 4°C в ST буфере.

В. Контроль количества инкапсулированного таллия проводили методом флуоресценции с PTSA (четвертичной натриевой солью пирен-1,3,6,8-тетрасульфоновой кислоты) (DI Zhang et al. A Thallium Transport FLIPR-Based Assay for the Identification of KCC2-Positive Modulators// Journal of Biomolecular Screening 2010, v.1, pp. 177-184). Пробы получали после промывки инкапсулированных таллием частиц фага, а так же после тепловой денатурации осадка этих частиц и последующей обработкой прогретой пробы РНК-азой.

Пример 3. Сравнение фага MS2 и его модифицированных вариантов.

А. Методом электрофореза в ПААГ: проводили в соответствии с методичкой (МГУ, кафедра биоинженерии биофага, Москва 2007 г.) в 2% геле ПААГ с агарозой в условиях, известных специалистам.

Б. Методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы: Градиенты плотности сахарозы 5-50% (вес/объем) были сформированы в пробирках (Beckman Instruments, Inc., Фуллертон, Калифорния) по методу (Brakke M.K. Densitygradient centrifugation. Methods in Virology Volume 2. Edited by: K Maramorosch and H Koprowski. New York, Academic Press; 1967:93-118). Пробу фага суспендировали в 1 мл холодного фосфатного буфера pH 9.0 и наслаивали на градиент сахарозы и центрифугировали при 85000g в течение 6 ч.

В. Просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Контрастирование серебром (45 мин, Augion, Великобритания) использовали для визуализации фаговых частиц. После фиксации проводили с 1% (масса / объем) четырехоксида осмия в фосфатном буфере в течение 1 ч, а фильтры промывали в фосфатном буфере в течение 10 мин. Фильтры вынимали из вставки и случайным образом нарезают 2 сегментов 3-5 × 2 мм. Эти сегменты обезвоживали в 30-100% этанола и, наконец, помещали в смолу Ероп. Ультратонкие срезы делали алмазным ножом Diatome 70-80 нм толщиной, которые затем помещали на медные сетки, покрытых Pioloform. Сетки подвергали контрастному окрашиванию уранилацетата в течение 35 мин, промывали три раза, погружая сетки в цитрат свинца в течение 7 мин и промывали трижды. Сетки наблюдали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400, работающий при ускоряющем напряжении 80 кВ, используя увеличение × 8000.

Г. SPR-методом.

Исследования поверхностного резонансного плазмона (SPR) был выполнен с помощью прибора Eva 2.0 (<http://www.pcbiosensors.com>, Патенты РФ 2341785, 2442142). Раствор анти- MS2 IgG (10 мкг/мл) в смеси с красителем N-гидроксисукцинимидным эфиром 5-карбокситетраметиламинородамина (0,1 мкМ,  $\lambda_{exc}$ = 575 нм;  $\lambda_{em}$ =605 нм) хранили в 0.1 мМ уксуснокислом натрии (pH 5,5). Стандартная процедура связывания IgG со стеклом проведена с помощью 3,3-диэтоксипропил триэтоксисилана по ранее описанной процедуре (Патент РФ 681837). Непрореагировавшие группы на поверхности стекла были заблокированы с 1 М этаноламином pH 8.5 до полной дезактивации. Все исследования выполняли трижды с объемной скоростью 300 мкл/мин. Пробы, содержащие фаг разбавляли 1:100 и/или 1:50 в "фаговом" буфере. После каждого измерения поверхность восстанавливали раствором 100 тМ NaOH и последующей проточной промывкой "фаговым" буфером.

Молярное соотношение между IgG и красителем позволяет оценить максимальное количества белка, связанного с поверхностью чипа, по флуоресценции красителя (Patent US 5800996), связавшегося со стеклом, благодаря анти-MS2 IgG.

Пример 4. Модификация поверхности фаговых частиц пептидами.

А. Синтез пептидов со структурой (NH<sub>2</sub>)GGGCRGDK/RGPD/EC(COOH).

Пептид синтезировали методом твердофазного пептидного синтеза исходя из Fmoc-аминокислот на автоматическом пептидном синтезаторе 433A Applied Biosystems на смоле с присоединенным остатком Fmoc-Cys(Acm). Использовали следующие производные аминокислот: Fmoc-Cys(Acm), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Gly, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Pro. Снятие Fmoc-защитной группы с N-концевой альфа-аминогруппы растущей пептидной цепи проводили 22%-ным раствором 4-метилпиперидина в N-диметилформамиде (Алешина Е.Ю., Пындык Н.В., Мойса А.А., Санжаков М.А., Харьбин О.Н., Николаев Е.Н., Колесанова Е.Ф. Синтез фрагмента Р-амилоида 5RHDSGY10 и его изомеров. Биомед. химия, 2008, т.54, №2, 154-166). Присоединение аминокислот к растущей пептидной цепи (кроме Fmoc-Cys(Acm)) осуществляли с предварительной активацией Fmoc-аминокислот гексафторфосфатом 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния в присутствии 1-гидроксибензотриазола и 2,4,6-коллидина согласно процедуре FastMoc, описанной в инструкции к синтезатору. Fmoc-Cys(Acm) присоединяли с активацией *in situ*, используя в качестве активатора диизопропилкарбодиимид в присутствии 1-гидроксибензотриазола. По окончании синтеза пептид снимали со смолы обработкой смесью трифторуксусной кислоты, три-(изопропил)-силана, 3,6-диокса-1,8-октандитиола и воды (в объемном соотношении 94:1:2,5:2,5) и осаждали метил-трет-бутиловым эфиром. Осадок пептида растворяли в 10%-ном водном ацетонитриле с 0,1% трифторуксусной кислоты, и полученный раствор подвергали очистке методом ВЭЖХ на колонке Zorbax SB-C8, 21,2×250 мм, 7 мкм в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты. Фракцию, содержащую целевой пептид, собирали и упаривали под вакуумом и затем проводили удаление защитных Acm-групп с остатков цистеина с одновременным формированием дисульфидного мостика по известной методике (Fernando Albericio et al. Preparation and handling of peptides containing methionine and cysteine//In: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Eds. W.C. Chang and P.D. White. Oxford University Press, 2000). Пептид подвергали повторной очистке методом ВЭЖХ на той же колонке, фракцию целевого пептида упаривали под вакуумом.

Б. Чистоту препарата синтезированного пептида подтверждали масс-спектрометрическим анализом с ионизацией электрораспылением и детекцией методом ионной ловушки, а также аналитической ВЭЖХ

в соответствии с протоколами описанными ранее (M.H.V. Van Regenmortel, S. Mullen Synthetic peptides as antigens. Elsevier, 1999, pp. 88-90).

В. Конъюгацию пептида с фаговыми частицами проводили с использованием диметиладипимидата в соответствии со стандартной процедурой, известной специалистам (M.H.V. Van Regenmortel, S. Mullen Synthetic peptides as antigens. Elsevier, 1999, pp. 88-90).

Пример 5. Определение чувствительности эндотелиальных и других клеточных культур к модифицированным вирионам, наполненным таллием и агглютинация клеток модифицированными вирионами.

Клеточные культуры эндотелиальных клеток получали из коллекции НИИ канцерогенеза РОНЦ и размножали согласно патентау РФ 2359030, 2493251. Индукцию образования интегринов на поверхности эндотелиальных клеток и клеток ЗСО проводили эндотелиальным фактором роста (VEGF), согласно описанной процедуре (патент РФ 2377017). Агглютинацию клеток проводили согласно описанной процедуре (US Patent 5401636; US Patent 5541417). Проникновение вирионов фага MS2, наполненных таллием, фиксировали при помощи флуоресцентной микроскопии с красителем PTSA по процедуре, описанной ранее (Патент РФ 2305270).

Пример 6. Определение чувствительности животных к модифицированным вирионам, наполненным солями одновалентного таллия.

Эксперименты выполнены на 130 белых неинбредных крысах обоего пола массой 200-400 г и 263 белых неинбредных мышах обоего пола массой 17-36 г, содержащихся в условиях вивария с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92), согласно методическим руководствам и нормативным документам - ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96; правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997); правила лабораторной практики (GLP) в РФ, утвержденные приказом Минздрава РФ от 19 июня 2003 г. №267.

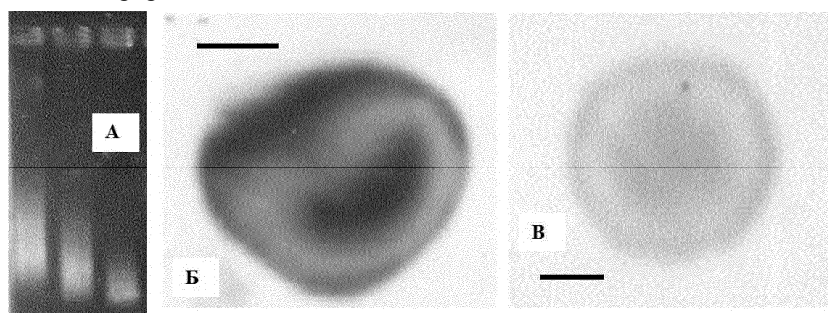
Расчет коэффициента кумуляции в первом и втором случаях проводится по формуле:  $K=LD50/LD50$ , где LD50 - суммарная среднесмертельная доза вещества при многократном введении; LD50 - смертельная доза вещества при однократном введении;  $K_{cum}$  - коэффициент кумуляции.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

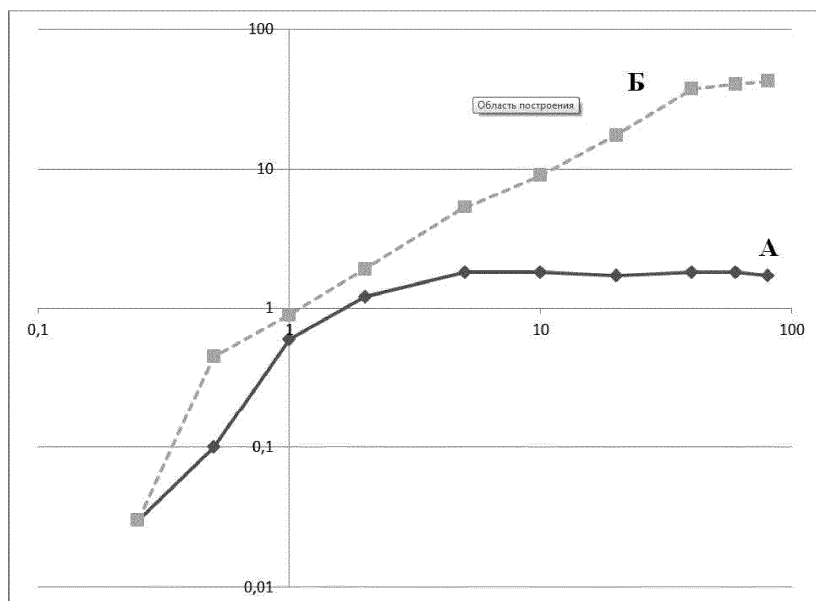
1. Способ активации апоптоза клеток злокачественных солидных опухолей (ЗСО), при котором активацию осуществляют посредством адресной доставки солей одновалентного таллия к клеткам ЗСО и их питающим сосудам, а для обеспечения адресной доставки формируют поверхностно модифицированный вирион фага MS2, состоящий из оболочки, содержащей циклический лиганд iRGD, ковалентно связанный с оболочкой, и сердцевины, содержащей геномную РНК и соль одновалентного таллия, при этом проникновение вириона в клетки обеспечивается за счёт лиганд-рецепторных взаимодействий с интегринами  $\alpha v\beta 3$  и  $\alpha v\beta 5$ .

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что сердцевина модифицированного вириона фага MS2 содержит геномную РНК и соль изотопа Tl.

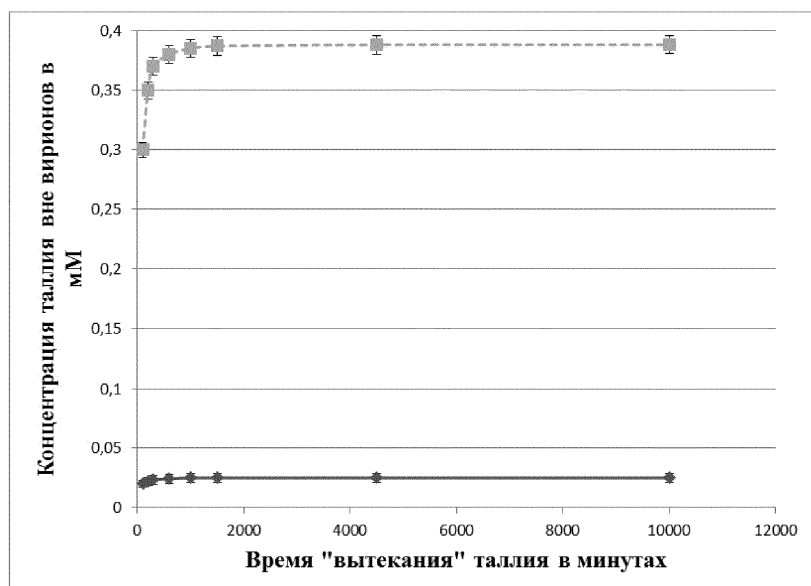
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что адресную доставку солей одновалентного таллия к клеткам ЗСО осуществляют пероральным или назальным способом.



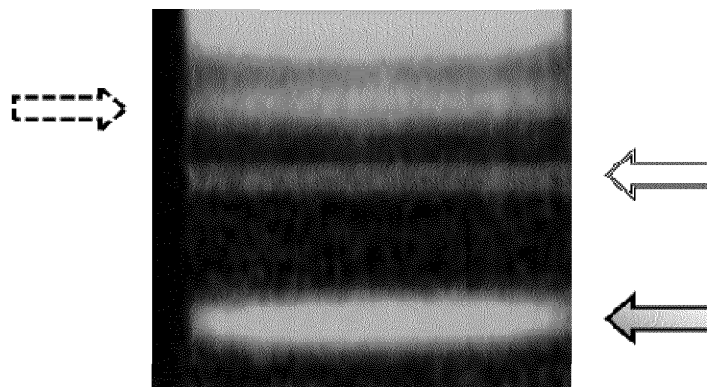
Фиг. 1



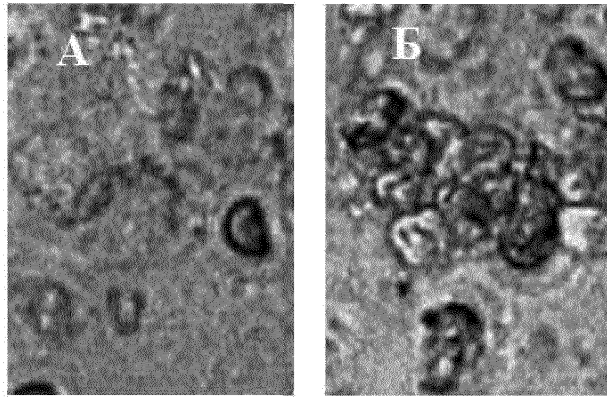
Фиг. 2



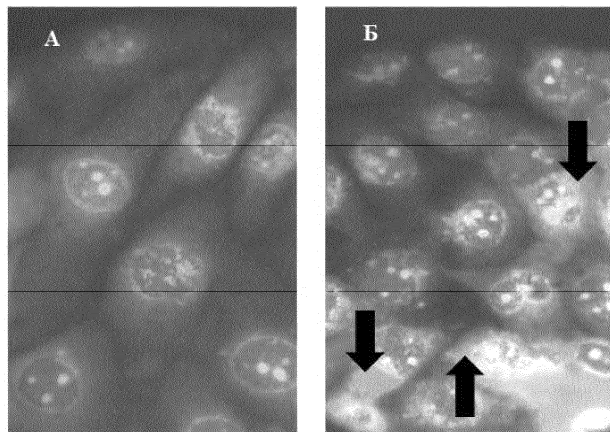
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6