

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090897 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.28

(51) Int. Cl. C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.05

(54) НОВЫЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ФЕРРИТИНА ЧЕЛОВЕКА И РАСЩЕПЛЯЕМЫХ ПРОТЕАЗОЙ ПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

(31) 102017000116184

(72) Изобретатель:
Брака Альдо (IT)

(32) 2017.11.06

(33) IT

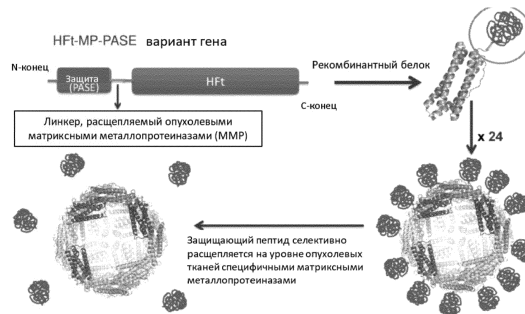
(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Глухарёва А.О.,
Угрюмов В.М. (RU)

(86) PCT/IB2018/058655

(87) WO 2019/087155 2019.05.09

(71) Заявитель:
ТЕНА БАЙОТЕК С.Р.Л. (IT)

(57) Слитый белок, наночастица, состоящая из множества мономеров указанного слитого белка, и их применения. Описан слитый белок на основе тяжелой цепи ферритина человека, который включает на N-конце белка по меньшей мере одну последовательность расщепления металлопротеиназы и модифицированный полипептид PAS, который действует в качестве маскирующего полимера, что увеличивает стабильность белкового лекарственного средства, а также наночастица, состоящая из нескольких мономеров указанного слитого белка, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный слитый белок, и их диагностические и терапевтические применения.



202090897

A1

A1

202090897

НОВЫЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ФЕРРИТИНА ЧЕЛОВЕКА И РАСЩЕПЛЯЕМЫХ ПРОТЕАЗОЙ ПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ХИМОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

ОПИСАНИЕ

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к слитому белку, к наночастицам, состоящим из множества мономеров указанного слитого белка, к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный слитый белок, и к их диагностическим и терапевтическим применениям. Настоящее изобретение относится к слитому белку, к наночастице, состоящей из множества мономеров указанного слитого белка, и к их применению. Описан слитый белок на основе тяжелой цепи ферритина человека, который содержит на N-конце белка по меньшей мере одну последовательность расщепления металлопротеиназы и модифицированный полипептид PAS, действующий в качестве маскирующего полимера, который повышает стабильность комплекса белок-лекарственное средство, а также наночастица, состоящая из нескольких мономеров указанного слитого белка, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный слитый белок, и их диагностические и терапевтические применения.

Уровень техники

Селективное высвобождение терапевтических средств в пораженных областях является одной из самых важных задач по улучшению современных способов лечения, особенно, в противоопухолевой терапии. В данном контексте применение наночастиц в качестве носителей (нановекторов) терапевтических средств потенциально обеспечивает возможность как обойти биологические барьеры, которые могут присутствовать на пути от места введения до конечной цели, так и, в частности, обеспечить накопление лекарственного средства селективным образом в пораженной области, а не в нормальных тканях. основополагающим предварительным условием служит способность нановектора связывать большие количества лекарственного средства эффективным образом.

Среди известных носителей для целевого высвобождения лекарственного средства наночастицы на основе ферритинов (ferritins (Fts)) привлекают все большее внимание благодаря их исключительным характеристикам биосовместимости, способности проникать сквозь биологические барьеры, универсальности функционализируемости и

возможности связывать определенные виды лекарственных средств. Fts представляют собой высоко симметричные мультимерные белковые структуры, состоящие из 24 субъединиц, которые собираются в молекулярную структуру по существу со сферической оболочкой, окружающей полость, которая физиологически используется для хранения железа. Наружный диаметр и внутренний диаметр составляют 12 и 8 нм, соответственно. Такая молекулярная структура по типу оболочки обозначается далее как «наночастица» или «HFt-наночастица». Наночастицы на основе тяжелой цепи ферритина человека (heavy chain of human ferritin, HFt) демонстрируют ряд преимуществ по сравнению с другими системами высвобождения лекарственных средств, особенно в связи с применениями *in vivo* у человека. Фактически, молекулы HFt предназначены для прохождения сквозь биологические барьеры (с диаметром отсечения (minor diameter) 20 нм), и в физиологических условиях они присутствуют как в клетках, так и в крови, хотя и в низких концентрациях (приблизительно 20 мкг/л).

Являясь природными элементами, они с меньшей вероятностью могут вызывать сильный неаутоиммунный (в ответ на внешние факторы) гуморальный и/или Т-клеточный иммунный ответ. Кроме того, HFt является одной из нескольких природных наночастиц, которая сама по себе способна связываться с опухолевыми клетками эффективным и селективным путем. Действительно, с использованием одной из самых привлекательных молекул для таргетной терапии злокачественных новообразований, рецептора трансферрина 1 (transferrin receptor 1 (TfR1)), было показано, что HFt интернализуется. TfR1 действительно представлен, из-за повышающей регуляции, в больших количествах на поверхности многих видов злокачественных опухолей (с превышением до 100 раз по сравнению с нормальными клетками) и эффективно интернализуется. Для более чем 474 образцов клинических тканей, была доказана интернализация HFt, но не легкой цепи ферритина человека (light chain of human ferritin (LFt)), посредством TfR1 и специфическое распознавание многих типов опухолей (т.е. злокачественных новообразований печени, легких, поджелудочной железы, толстой кишки, шейки матки, яичников, простаты, молочной железы, саркомы и тимуса) по сравнению с неопухолевыми тканями, с 98% чувствительностью и 95% специфичностью (Fan K, Cao C, Pan Y, Lu D, Yang D, Feng J, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotechnol.* 2012;7:459-64). Однако, нативная HFt имеет несколько недостатков. Во-первых, выходы, с которыми она способна связываться с определенными типами лекарственных средств, такими как, например, доксорубин (один из противоопухолевых препаратов с широким спектром противоопухолевой

активности), являются низкими, и это может ограничить их возможное применение и клинические разработки. Во-вторых, нативная HFt при системном пути введения имеет очень короткий период полужизни в плазме, приблизительно от 2 до 3 часов. И, наконец, ее природная ферроксидазная активность может ингибировать развитие и созревание остеобластов человека и приводить к снижению минерализации, к остеопении и остеопорозу (Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, Balla J. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 2010,25:164-72). По данной причине целесообразно использовать вариант HFt, лишенный ферроксидазной активности благодаря сайт-специфической мутации (в настоящем документе обозначена как vHFt), который не вызывает ингибирования.

Недавно, для того чтобы увеличить как период полужизни *in vivo* нативного HFt, так и стабильность комплексов HFt-лекарственное средство, в WO2016051340 A1 была раскрыта новая конструкция на основе HFt, названная HFt-MP-PAS, подходящая для доставки лекарственного средства. В данной конструкции N-конец каждой субъединицы HFt генетически слит с: i) полипептидной последовательностью PAS, то есть последовательностью, богатой остатками пролина (P), аланина (A) и серина (S); и ii) селективной к опухоли последовательностью (MP), реагирующей на протеолитическое расщепление опухолевыми протеазами (MMP), вставленной между каждой субъединицей HFt и расположенным снаружи полипептидом PAS. Целью защиты с помощью PAS было повышение стабильности белка во время процесса инкапсулирования лекарственного средства, предпочтительно для лекарственного средства доксорубин, и повышение стабильности комплекса белок-лекарственное средство. Присутствие PAS также способно маскировать поверхность белка и, таким образом, удлинять период его полужизни в плазме. Последовательность MP позволяет избирательно удалять защиту PAS с помощью сигналов, присутствующих в микроокружении опухоли (т.е. MMP, специфичные для данной последовательности), так что полученная в результате демаскированная HFt может свободно взаимодействовать и интернализироваться посредством TfR1, сверхэкспрессируемого в злокачественных клетках. Конструкция HFt-MP-PAS доказала, что i) инкапсулирует во внутренней полости в три раза больше доксорубина (DOX), чем HFt дикого типа, ii) образует более стабильные комплексы (т.е. утечка лекарственного средства была незначительной) и iii) обладает более высоким *in vivo* временем циркуляции. Важно, что DOX-нагруженная конструкция HFt-MP-PAS (HFt-MP-PAS-DOX) продемонстрировала превосходную терапевтическую эффективность в *in vivo* модели рака поджелудочной железы человека,

значительно увеличивая общую выживаемость животных. Увеличение инкапсулирования DOX, стабильности комплекса белок-лекарственное средство и времени циркуляции в плазме по отношению к HFt было приписано наличию PAS. Однако, все еще существует потребность в создании улучшенных наночастиц в качестве носителей (нановекторов) терапевтических средств.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что введение по меньшей мере одного отрицательно заряженного остатка, выбранного из глутамата или аспартата в домен PAS резко улучшает свойства слитого белка HFt-MP-PAS, как ясно видно из экспериментальных данных, представленные в примерах и чертежах настоящего раскрытия. В частности, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что новая конструкция со вставкой отрицательно заряженного остатка, такого как глутамат, в домен PAS (HF-MP-PASE) превосходит как нативный белок HFt, так и белок HFt-MP-PAS с точки зрения количества белка, полученного в конце реакций для капсулирования лекарственного препарата. Кроме того, новая конструкция HF-MP-PASE показывает более высокую степень накопления лекарственного препарата в ядрах клеток, более высокую стабильность в сыворотке крови и более высокую степень накопления в опухоли по сравнению с нативным HFt и HFt-MP-PAS.

Соответственно, первый объект настоящего изобретения представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере три домена, где:

- (a) первый домен содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи нативного ферритина человека или его варианта, имеющего по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи нативного ферритина человека;
- (b) второй домен содержит аминокислотную последовательность сайта расщепления матричной металлопротеиназы (ММР); и
- (c) третий N-концевой домен состоит из аминокислотной последовательности полипептида из по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, и который по существу состоит или состоит из пролина, серина, аланина и по меньшей мере одного отрицательно заряженного остатка, выбранного из глутамата или аспартата.

Настоящее изобретение обеспечивает также композиции, содержащие соединения по настоящему изобретению, а также для конкретных применений в терапевтических применениях. Эта и другие цели достигаются благодаря слитому белку, как

охарактеризовано в прилагаемой формуле изобретения в пункте 1. Другие независимые пункты и зависимые пункты формулы изобретения относятся к дополнительным аспектам и конкретным вариантам осуществления изобретения, которые являются неотъемлемой частью настоящего описания.

Для того, чтобы улучшить и облегчить связывание лекарственного средства внутри полости ферритина, авторы настоящего изобретения решили удалить остатки цистеина с поверхности белка и ввести дополнительные остатки цистеина в полость белка. Таким образом, стало возможным очень эффективно связывать с внутренней полостью каждую молекулу, содержащую тиолреактивный мотив, например, лекарства, линкеры, флуорофоры и тому подобное (см. примеры и фигуры).

Соответственно, еще один объект настоящего изобретения представляет собой мутеин тяжелой цепи нативного ферритина человека, где указанный мутеин не имеет каких-либо остатков цистеина на поверхности белка и имеет по меньшей мере один цистеин во внутренней полости белка.

Кроме того, для того, чтобы улучшить и облегчить связывание лекарственных средств, содержащих положительно заряженный мотив, авторы настоящего изобретения решили удалить остатки цистеина с поверхности белка и ввести дополнительный отрицательно заряженный остаток, выбранный из глутамата или аспартата, в полость белка. Таким образом, стало возможным очень эффективно связывать с внутренней полостью молекулы, содержащие положительно заряженный мотив, например, лекарства, линкеры, флуорофоры и тому подобное (см. примеры и фигуры).

Соответственно, еще один объект настоящего изобретения представляет собой мутеин тяжелой цепи нативного ферритина человека, где указанный мутеин не имеет каких-либо остатков цистеина на поверхности белка и имеет по меньшей мере один дополнительный остаток глутамата или аспартата во внутренней полости белка .

Еще один объект настоящего изобретения представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок или наночастицу в соответствии с любым из раскрытых в данном документе вариантов осуществления.

Еще один объект настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий указанные нуклеиновые кислоты, и клетку-хозяин, содержащую указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор.

Дополнительные признаки и преимущества изобретения станут очевидными из следующего подробного описания, которое предоставлено только в иллюстративных целях, но не в качестве ограничения, со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 схематически представлено получение наночастиц HFt, в которых N-конец каждого из 24 мономеров генетически связан с расщепляемыми пептидными последовательностями и с последовательностями, по существу состоящими из пролина, аланина, серина и глутамата (PASE).

На Фигуре 2 показаны профили перемещения полос электрофореза в нативном агарозном геле. Дорожка HFt-MP-PAS (15 мкг); Дорожка 2, HFt-MP-PASE (15 мкг).

На Фигуре 3 схематически представлен синтез HFt-MP-PASE, содержащего лекарственное средство митоксантрон (MIT) или пиксантрон (PIX). Для ясности показаны только 4 из 24 модифицированных N-концов HFt.

На Фигуре 4 показана способность инкапсулировать митоксантрон или пиксантрон у предыдущей конструкции HFt (HFt-MP-PAS) по сравнению с новым белком HFt-MP-PASE и другими данными из литературы. Величины относительного выхода указаны в виде % выхода белка и количества связанных молекул лекарственного средства. Можно видеть, что данная конструкция, являющаяся объектом данного патента, неожиданно и непредвиденно имеет превосходные выходы с точки зрения получения белка по сравнению как с нативным HFt, так и с модифицированным HFt (HFt-MP-PAS).

На Фигуре 5 показаны профили элюции эксклюзионной хроматографии (SEC) и распределение частиц по размерам (DLS) конструкций на основе HFt. (A) SEC-анализ конструкций HFt-MP-PAS (черный) и HFt-MP-PASE (красный), загруженных MIT. Профили элюции, полученные при одновременном отслеживании вкладов белка и MIT при 280 нм (сплошная линия) и 610 нм (пунктирная линия), соответственно. (B) DLS-профили тех же конструкций

На Фигуре 6 показано высвобождение лекарственного средства из комплексов HFt-MP-PASE-MIT. Наночастицы, нагруженные MIT, хранили при 4 °C и 37 °C в PBS и анализировали на содержание митоксантрона с помощью SEC в определенные моменты времени. Процент утечки митоксантрона оценивали путем сравнения собранных одновременно профилей элюции при 280 нм и 610 нм.

На Фигуре 7 показана локализация HFt-MP-PASE-MIT (концентрация MIT 20 мкМ) в клеточных линиях рака толстой кишки SW480 (верхняя панель) и SW620 (нижняя панель) после 3-часовой инкубации. Левые панели: окрашивание ламином (Lamin) A/C (маркер ядерной мембраны, зеленый); центральные панели: MIT (синий); правые панели: наложение. Белая черта обозначает длину в 10 мкм.

На Фигуре 8 показана локализация MIT (панели A, B), HFt-MP-PAS-MIT (панели C, D) и HFt-MP-PASE-MIT (панели E, F) в клеточных линиях рака толстой кишки SW480 (панели A, C и E) и SW620 (панели B, D и F) после 3 ч инкубации. Концентрация MIT составляет 20 мкМ во всех экспериментах. Белая черта обозначает длину 20 мкм.

На Фигуре 9 показана эффективность MIT и HFt-MP-PASE-MIT в уничтожении линий клеток человека PaCa-44, Саран-1 и MiaPaCa2 (рак поджелудочной железы), HT1080 (фибросаркома), MDA-MB-231 (рак молочной железы) и SW480 и SW620 (колоректальный рак). Среднее \pm SEM (n = 3)

На Фигуре 10 показаны результаты экспериментов по биораспределению доксорубицин-содержащих соединений. Концентрации доксорубицина в плазме рассчитывали через 24 часа после внутривенных инъекций мышам, несущим опухоль поджелудочной железы человека (ксенотрансплантаты), некапсулированного лекарственного средства доксорубицина или доксорубицина, инкапсулированного в соединениях на основе ферритина: нативный HFt, HFt-MP-PAS и HFt-MP-PASE.

На Фигуре 11 схематически представлено изготовление наночастиц на основе HFt, где помимо модификаций N-конца, показанных ранее (HFt-MP-PAS), остатки нативного цистеина замещены остатками серина и ненативные остатки цистеина или глутамата (в красных сферах) включены во внутреннюю полость (HFt-Cys-MP-PASE или HFt-Glu-MP-PASE).

На Фигуре 12 схематически представлен синтез HFt-Cys-MP-PASE или HFt-Glu-MP-PASE, содержащего лекарственное средство, реакционноспособное по отношению к тиоловой группе цистеинов (например, малеимид), или лекарственное средство, содержащее положительный мотив. Для ясности показаны только 4 из 24 модифицированных N-концов HFt. Ненативные остатки цистеина во внутренней полости белка показаны красным цветом.

На Фигуре 13 показана способность инкапсулировать производное доксорубицина 6-малеимидокапроилгидразон (DOX-EMCH) или комбинацию малеимидопропионовой кислоты и Genz-644282 новым белком HFt-Cys2-MP-PASE (содержащим 4 ненативных цистеина на мономер, 96 на 24 мера) или способность инкапсулировать нативный митоксантрон или Genz-644282 с помощью HFt-Glu-MP-PASE (содержащего 4 ненативных глутамата на мономер, 96 на 24 мера). Относительные выходы указаны в виде % выхода белка и числа конъюгированных молекул лекарственного средства.

Подробное описание изобретения

Слитый белок, который является объектом настоящего изобретения, содержит по меньшей мере три домена.

Первый домен содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи ферритина человека. Такая аминокислотная последовательность представляет собой нативную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности. Так как длина тяжелой цепи ферритина человека составляет 183 аминокислоты (SEQ ID NO:1), то вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности, содержит до 19 аминокислотных замен по сравнению с нативной последовательностью.

В одном варианте осуществления тяжелая цепь ферритина человека представляет собой мутеин, в котором остатки цистеина с поверхности белка удалены и по меньшей мере один цистеин или отрицательно заряженный (аспартат или глутамат) остаток вставлен во внутреннюю полость белка, предпочтительно, два, три или четыре цистеина или аспартата или глутамата вставляются во внутреннюю полость белка. Нативные цистеиновые остатки с поверхности белка заменены остатком без тиолреактивной группы, с предпочтительной заменой цистеина на серин. Белковая поверхность ферритина человека в данном описании определяется как любые остатки, доступные для растворителя. Внутренняя полость ферритина человека определяется в данном описании как любые остатки, не доступные для растворителя.

Например, в одном варианте осуществления цистеин вставлен вместо лизина 71, лизина 143 и/или глицина 182.

В одном предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь ферритина человека представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 варианта HFT (HFT-Cys1), лишенного нативных остатков цистеина и содержащего три ненативных остатка цистеина во внутренней полости, которые представляют альтернативный вариант. Аминокислотная последовательность HFt-Cys1 характеризуется шестью аминокислотными заменами: серин вместо цистеина 90, серин вместо цистеина 102, серин вместо цистеина 130, цистеин вместо лизина 71, цистеин вместо лизина 143 и цистеин вместо глицина 182.

В одном предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь ферритина человека лишена нативных остатков цистеина и содержит четыре ненативных остатка цистеина во внутренней полости, которые представляют альтернативный вариант (HFt-Cys2). Аминокислотная последовательность данного дополнительного варианта характеризуется семью аминокислотными заменами: серин вместо цистеина 90, серин

вместо цистеина 102, серин вместо цистеина 130, цистеин вместо лизина 53, цистеин вместо лизина 71, цистеин вместо треонина 135 и цистеин вместо лизина 143.

В одном предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь ферритина человека лишена нативных остатков цистеина и содержит четыре ненативных остатка глутамата во внутренней полости, которые представляют альтернативный вариант (HFt-Glu). Аминокислотная последовательность данного дополнительного варианта характеризуется семью аминокислотными заменами: серин вместо цистеина 90, серин вместо цистеина 102, серин вместо цистеина 130, глутамат вместо лизина 53, глутамат вместо лизина 71, глутамат вместо треонина 135 и глутамат вместо лизина 143.

Все мутеины/варианты ферритина человека, раскрытые в данном документе, представляют собой объекты настоящего изобретения. Все раскрытые в данном документе варианты осуществления тяжелой цепи ферритина человека могут быть использованы в качестве первого домена в слитом белке по изобретению.

Аминокислотная последовательность нативного HFt представляет собой (учитывая, что первый метионин является началом кодирующей области и может быть удален при дальнейшей обработке белка):

(SEQ ID NO 1)

MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYF
LHQSHEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVN
QSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEY
LFDKHTLGDSDNES

В некоторых вариантах осуществления слитый белок HFt по изобретению содержит вариант HFt (HFt Cys1), лишенный нативных остатков цистеина и содержащий три ненативных остатка цистеина во внутренней полости. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность варианта HFt Cys1 представляет собой:

(SEQ ID NO 2)

MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYF
LHQSHEEREHAEKLMCLQNQRGGRIFLQDIKKPDSDDWESGLNAMESALHLEKNVN
QSLLELHKLATDKNDPHLSDFIETHYLNEQVCAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEY
LFDKHTLGDSNEC

Аминокислотная последовательность варианта HFt Cys2 представляет собой:

(SEQ ID NO 15)

MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFACYF
LHQSHEEREHAEKLMCLQNQRGGRIFLQDIKKPDSDDWESGLNAMESALHLEKNVN

QSLLELHKLATDKNDPHLSDFIECHYLNEQVCAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEY
LFDKHTLGSDNES

В некоторых вариантах осуществления слитый белок HFt по изобретению содержит вариант HFt (HFt Glu), лишенный нативных остатков цистеина и содержащий четыре ненативных остатка глутамата во внутренней полости. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность вариант HFt Glu представляет собой:

(SEQ ID NO: 18)

MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAEYF
LHQSHEEREHAEKLMELQNQRGGRIFLQDIKKPDSDDWESGLNAMESALHLEKNVN
QSLLELHKLATDKNDPHLSDFIEEHYLNEQVEAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEY
LFDKHTLGSDNES

Второй домен слитого белка по изобретению содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере одного сайта расщепления матриксной металлопротеиназы (ММР), в частности, ММР 2, ММР 3, ММР 7 или ММР 9. В качестве неограничивающего примера, далее перечислены несколько пептидов, которые имитируют последовательность расщепления цепи коллагена и особенно эффективно расщепляются с помощью ММР 2 и ММР 9:

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln (SEQ ID NO: 3)

Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln (SEQ ID NO: 4)

Pro Leu Gly Leu Ala Gly (SEQ ID NO: 5)

Pro Val Gly Leu Ile Gly (SEQ ID NO: 6)

Cys Gly Leu Asp Asp (SEQ ID NO: 7)

Аминокислотные последовательности, которые содержат сайт расщепления для предполагаемого фермента, также могут быть сконструированы таким образом, что сайт расщепления повторяется несколько раз, как, например, в последовательности, как показано ниже:

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln (SEQ ID NO: 8).

Все ранее указанные аминокислотные последовательности являются характерными, но не ограничивающими примерами получения слитых белков и наночастиц согласно настоящему изобретению.

Третий домен слитого белка по изобретению, связанный с N-концом, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности полипептида, которая богата пролином, серином, аланином и по меньшей мере одной отрицательно заряженной аминокислотой, такой как глутамат или аспарат (для краткости называемый

«PASE»), для повышения стабильности белка в процессе инкапсулирования лекарственного средства, особенно с лекарственными средствами, которые могут стимулировать белковую агрегацию, и повышения стабильности комплекса белок-лекарственное средство по сравнению с полипептидом, в котором отсутствуют отрицательно заряженные аминокислоты (PAS).

Полипептид PASE по существу состоит из аминокислотных последовательностей, богатых Pro, Ala и Ser, и по меньшей мере одного или нескольких Glu и/или Asp, которые образуют отрицательно заряженный неструктурированный полимер, длина которого предпочтительно составляет менее 80 аминокислотных остатков, более предпочтительно содержит от 20 до 80 аминокислотных остатков, еще более предпочтительно содержит от 30 до 70 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления пролиновые остатки вышеуказанного полипептида PASE составляют от 10 до 40% от общего количества аминокислотных остатков полипептида PASE.

Согласно одному варианту осуществления домен PASE будет содержать один, два, три или четыре глутамата и/или аспартата. В одном предпочтительном варианте осуществления домен PASE содержит не более одного глутамата или аспартата в пределах 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков домена PAS.

Примеры полипептидов PASE, особенно подходящие для применения в рамках настоящего изобретения и поэтому являющиеся предпочтительными, представляют собой следующие:

ASPAAPAPASPAAPAPSAPAEASPAAPAPASPAAPAPSAPAE (SEQ ID NO: 9);

ASPAAPAPASPAEPAPSAPAAASPAAPAPASPAEPAPSAPA (SEQ ID NO: 10);

ASPAAPAPASPAAPAPSAPAEASPAAPAPASPAAPAPSAPAEASPAAPAPASPAAPAPSAPAEASPAAPAPAS (SEQ ID NO: 11);

ASPAAPAPASPAAPAPSAPADASPAAPAPASPAAPAPSAPAD (SEQ ID NO: 12);

ASPAAPAPASPADPAPSAPAAASPAAPAPASPADPAPSAPA (SEQ ID NO: 13);

ASPAAPAPASPAAPAPSAPADASPAAPAPASPAAPAPSAPADASPAAPAPASPAAPAPSAPADASPAAPAPAS (SEQ ID NO: 14);

Все раскрытые здесь домены PASE являются объектами настоящего изобретения.

Термином *«полипептид по существу состоит из аминокислотных последовательностей, богатых Pro, Ala и Ser»* в настоящем описании определяется полипептид, который образует стабильную конформацию случайного клубка и который состоит из Pro, Ala и Ser, где от 1 до 5% остатков Pro, Ala и Ser заменены другими аминокислотами, такими как, например, глицин, которые не изменяют стабильную

конформацию случайного клубка полипептида. Как упомянуто выше, биосинтетические полипептиды в конформации случайного клубка (или полипептидные сегменты в конформации случайного клубка) по настоящему изобретению, состоящие исключительно из остатков пролина и аланина и по меньшей мере одного остатка глутамата или аспартата, образуют стабильную конформацию случайного клубка. Используемый в данном документе термин «случайный клубок» в целом относится к любой конформации полимерной молекулы, включая аминокислотные полимеры/аминокислотные последовательности/полипептиды, в которых отдельные мономерные элементы, образующие указанную полимерную структуру являются по существу случайным образом ориентированными по отношению к смежным мономерным элементам, в то же время все еще являясь химически связанными с указанными смежными мономерными элементами. Конкретно, полипептид, аминокислотная последовательность или аминокислотный полимер, принимающий/имеющий/образующий «конформацию случайного клубка», по существу, не имеют определенной вторичной и третичной структуры. Природа полипептидных случайных клубков и способы их экспериментальной идентификации известны специалисту в данной области и описаны в научной литературе (Cantor (1980) *Biophysical Chemistry*, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York; Creighton (1993) *Proteins—Structures and Molecular Properties*, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York; Smith (1996) *Fold Des* 1:R95 R106).

Стабилизирующий и маскирующий полипептид PASE добавляется к поверхности HFt посредством короткой пептидной последовательности, которая, как ранее указывалось, содержит один или более сайтов расщепления металлопротеиназы, получая таким образом слитый белок по изобретению с замещаемой маскировкой. Действительно, полипептид PASE может быть селективно удален в тканях-мишенях посредством внеклеточных матричных металлопротеиназ (ММР). Было показано, что ММР 2 и ММР 9 являются ключевыми металлопротеиназами, которые сверхэкспрессированы в опухолевом микроокружении и участвуют в ангиогенезе, инвазии и опухолевых метастазах.

Еще один объект настоящего изобретения представляет собой слитый белок, в котором домен PASE или PAS и ММР-расщепляемые домены связаны с С-концом белка HFt вместо N-конца. Согласно одному варианту осуществления слитый белок имеет SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

PAS MP HFt (SEQ ID NO:16)

MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYF
 LHQSHEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPCDDWESGLNAMECALHLEKNVN
 QSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEY
 LFDKHTLGSDNESPLGLAGASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSA
 PA

PASE MP HFt (SEQ ID NO:17)

MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYF
 LHQSHEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPCDDWESGLNAMECALHLEKNVN
 QSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEY
 LFDKHTLGSDNESPLGLAGASPAAPAPASPAEPAPSAPAASPAAPAPASPAEPAPSAP
 A

Применение полипептидов PASE на мультимерной поверхности ферритина в рамках настоящего изобретения дает несколько преимуществ по сравнению с известными из уровня техники. Для того, чтобы получить с более высоким выходом монодисперсные материалы во время образования комплекса белок-лекарственное средство, авторы изобретения генетически преобразовали HFt MP PAS, о котором сообщалось ранее, путем добавления остатков глутамата (E) или аспартата (D) в последовательности PAS и получили новую конструкцию, названную HFt MP PASE. Благодаря данной модификации, белки на основе ферритина могут образовывать комплексы с лекарственными средствами, которые могут стимулировать агрегацию белка (например, митоксантрон и пиксантрон) более растворимым и монодисперсным образом, чем нативная HFt или модифицированный аналог HFt MP PAS.

Данное улучшение стабильности инкапсулирования комплекса белок-лекарственное средство, которое отличается от доксорубина (например, митоксантрон и пиксантрон), было удивительно и неожиданно получены авторами настоящего изобретения, которые сконструировали наночастицы на основе тяжелой цепи ферритина человека (HFt), используя как технологию слитых генов, так и технологию получения рекомбинантных белков. В частности, как будет подробно описано в разделе, относящемся к примерам, были сделаны генетические конструкции, которые, в одной последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК), кодируют три последовательности, приведенные на Фигуре 1: i) HFt; ii) короткие пептидные последовательности (MP), расщепляемые MMP-2/9; iii) неструктурированные полипептидные последовательности, богатые Pro, Ser, Ala и Glu (PASE),

предпочтительно, с длиной, составляющей от 20 до 80 остатков. Последовательности ii) и iii) связаны с N-концом HFt для обратимой маскировки.

Как уже говорилось выше, слитые белки HFt, полученные авторами настоящего изобретения, спонтанно образуют наночастицы HFt, способные нести терапевтические молекулы (химические соединения, моноклональные антитела, пептиды и тому подобное) (Фигура 2).

В одном варианте осуществления одна или несколько, предпочтительно 5, терапевтических и/или диагностических молекул инкапсулированы во внутренней полости наночастицы HFt, или ковалентно связаны с поверхностью наночастицы HFt, или ковалентно связаны во внутренней полости HFt. Количество связанного лекарственного средства и гомогенность комплекса белок-лекарственное средство значительно увеличивались по сравнению с немодифицированным белком (HFt) или модифицированным PAS (HFt MP PAS) благодаря наличию полипептидов PASE. Гомогенность полученного материала является весьма желательным свойством в области фармацевтики, поскольку оно указывает на отсутствие негативных эффектов, таких как осаждение, кластеризация и потеря конечного продукта, несущего терапевтическую молекулу.

Терапевтическая молекула представляет собой, например, фармацевтически активный ингредиент. Как используется в настоящем описании, термин «фармацевтический активный ингредиент» или, проще, «активный ингредиент» относится к любой фармацевтически активной молекуле (химическое соединение, моноклональное антитело, пептид и тому подобное), например, к молекуле, которая может быть использована для лечения злокачественного новообразования. Предпочтительные активные ингредиенты для использования в настоящем изобретении представляют собой, например, но ими не ограничиваются, доксорубин, митоксантрон, пиксантрон, Genz 644282, паклитаксел, ауристатины, камптотецины, гемцитабин и активные ингредиенты на основе платины. Также может быть использован предшественник активных ингредиентов, перечисленных выше.

При терапевтических применениях наночастицы HFt по настоящему изобретению, которые действуют как нацеленные системы носителей, могут быть введены индивиду или пациенту посредством любого подходящего пути введения, например перорально, парентерально, внутривенно, внутривенно, внутривенно, внутривенно, внутримышечно, в виде суппозиториев, внутриочагово, интраназально или подкожно, интратекально, интралимфатически, путем ингаляции микрокапель или путем имплантации устройства замедленного

высвобождения, например осмотического насоса. Как используется в настоящем описании, термин «индивид» относится к животным, таким как млекопитающие, включая человека, коров, овец, коз, лошадей, собак, кошек, кроликов, крыс, мышей и тому подобное.

Как используется в настоящем описании, термин «лечение» относится к свидетельству успешного или улучшенного лечения определенного заболевания, поражения, состояния или симптома, или, при определенных обстоятельствах, к профилактике возникновения симптома или состояния.

При терапевтических применениях наночастицы HFt по изобретению используются для введения терапевтически эффективной дозы фармацевтически активного ингредиента. «Терапевтически эффективная доза» означает дозу, которая дает терапевтический эффект, для достижения которого ее вводят. Точная доза будет зависеть от ряда факторов, в том числе цели лечения, индивида, заболевания, на которое направлено лечение, и тому подобное, и может быть легко определена специалистом в данной области техники, используя известные *per se* методики (см, например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Наночастицы HFt по изобретению могут быть использованы для лечения любого заболевания, которое требует введения фармацевтического ингредиента, например, путем изолирования активного ингредиента в полости наночастицы или путем его ковалентного связывания с поверхностью наночастиц. Наночастицы могут быть также использованы для диагностики, более конкретно, для визуализации заболеваний, путем изолирования активного ингредиента в полости наночастицы или путем его ковалентного связывания с поверхностью наночастиц.

Наночастицы HFt по изобретению могут быть введены индивиду для лечения любого заболевания, предпочтительно, гиперпролиферативного заболевания, включая злокачественное новообразование, например: карциномы, глиомы, мезотелиомы, меланомы, саркомы, лимфомы, лейкоз, аденокарциномы, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, глиобластома, лейкоз, лимфома, рак предстательной железы, лимфома Беркитта, рак головы и шеи, рак толстой кишки, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы, гепатобилиарный рак, рак мочевого пузыря,

мелкоклеточный рак кишечника, рак прямой кишки, рак почки, рак желчного пузыря, рак полового члена, рак уретры, рак яичка, рак шейки матки, рак влагалища, рак матки, рак щитовидной железы, паратиреоидный рак, рак надпочечников, эндокринный рак поджелудочной железы, карциноидная опухоль, рак кости, рак кожи, ретинобластомы, множественные меланомы, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома (см. CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE (DeVita, V. T. et al. 2008 Edition) для других видов злокачественного новообразования).

Согласно одному варианту осуществления наночастицы HFТ являются связанными с каждой молекулой, содержащей тиолреактивный мотив, например, лекарственные средства, линкеры, флуорофоры и тому подобное с использованием, например, одного или нескольких цистеинов, вставленных во внутреннюю полость. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления наночастицы HFТ инкапсулируют производное доксорубина 6-малеимидокапроилгидразон (DOX EMCH) или линкер малеимидопропионовую кислоту и лекарственный препарат GENZ 644282, используя один или несколько цистеинов, вставленных во внутренней полости.

Следующие примеры приведены в иллюстративных целях, но не в качестве ограничения объема настоящего изобретения, определенного в прилагаемой формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Конструирование экспрессионных векторов для слитых белков HFt-MP-PASE

В качестве попытки уменьшить агрегацию белка и повысить стабильность было решено ввести отрицательно заряженные остатки в образующую внешнюю поверхность последовательность PAS, слитую с каждой субъединицей HFt. Действительно, анализ полученной ранее конструкции HFt-MP-PAS дал основание предположить, что введение двух глутаматных остатков в последовательность PAS из 40 остатков может вызвать достаточное электростатическое отталкивание для предотвращения агрегации между сборками различных 24-меров, не влияя на субъединичную сборку внутри 24-мера. Чтобы максимально распределить отрицательные заряды на поверхности конструкции, остатки глутаминовой кислоты были размещены на расстоянии 20 остатков друг от друга.

Ген HFt-MP-PASE получали путем объединения трех различных последовательностей в одну последовательность: HFt (SEQ ID NO: 1), MP (SEQ ID NO: 5) и PASE (SEQ ID NO: 10). Данная конструкция отличается от ранее раскрытой конструкции HFt-MP-PAS

(названной ранее HFt MMP PAS40; WO2016051340) только двумя аминокислотными заменами в последовательности PAS: глутамат вместо аланина 13 и глутамат вместо аланина 33. Каждый из сравнительных экспериментов, описанных в данном новом патенте, был выполнен с использованием данных двух конструкций.

Вектор экспрессии, pET-11a, содержащий ген HFt-MP-PASE, синтезировали, используя GENEART AG (Germany). Синтез гена проводили с учетом оптимизации кодонов для высоких уровней экспрессии в *Escherichia coli*.

Слитый белок HFt MP PASE получали с помощью рекомбинантной технологии белков и очищали из растворимой клеточной фракции, с высоким выходом, подобно HFt-MP-PAS (около 150 мг на литр из культуры клеток *E. coli*). Влияние на подвижность белка отрицательно заряженных остатков глутамата (48 на белок), вставленных на поверхности белка, оценивали путем проведения электрофореза в агарозном геле в нативных условиях (Фигура 1). В отличие от денатурирующего SDS PAGE, в нативном электрофорезе подвижность белка зависит как от заряда белка, так и от молекулярной массы. Предполагая, что последняя сопоставима для HFt MP PAS и HFt MP PASE, наблюдаемая разница в подвижности белка должна быть приписана дополнительным отрицательным зарядам в конструкции HFt-MP-PASE (Фигура 2).

Пример 2

Получение HFt-MP-PAS и HFt-MP-PASE, несущих химиотерапевтические средства

В качестве химиотерапевтических средств авторы настоящего изобретения привели пример, в котором использовали лекарственные средства митоксантрон (MIT) или пиксантрон (PIX). Данные препараты были инкапсулированы внутрь белковой полости слитых белков, используя процесс рассоединения-соединения белка как функцию pH в соответствии с протоколом, раскрытым в Falvo et al., 2016, *Biomacromolecules*. 17(2):514-22. Процедура разборки/сборки показана на Фигуре 3.

Пример 3

Тестирование инкапсулирующих выходов лекарственного средства митоксантрон и пиксантрон

Эффективность инкапсулировать MIT или PIX в HFt-MP-PASE сравнивали с таковой у нативного белка HFt и HFt MP PAS (Фигура 4). Во всех проведенных экспериментах HFt-MP-PASE превосходит как нативный белок HFt, так и белок HFt-MP-PAS по количеству белка, полученного в конце реакций. Это указывает на то, что HFt-MP-PASE является более стабильным и не агрегирует/не выпадает в осадок из раствора во время образования комплекса белок-лекарственное средство.

Пример 4

Тестирование гомогенности и стабильности комплекса белок-митоксантрон

Комплексы HFt-MP-PASE, нагруженные MIT, были более растворимыми и монодисперсными, чем HFt-MP-PAS-аналоги, так что высокомолекулярные частицы в растворе не обнаруживались (Фигура 5). Эксперименты по динамическому рассеянию света (DLS) показали, что образцы HFt-MP-PASE-MIT имеют приблизительно такой же размер, как ранее раскрытый авторами изобретения HFt-MP-PAS-DOX (содержащий доксорубин как лекарственное средство), со средним диаметром $17,0 \pm 1,1$ нм (Фигура 5B). Полученные результаты указывают на то, что вставка остатков глутамата в HFt-MP-PASE-MIT неожиданно приводит к более высокой растворимости и гомогенности белка по сравнению с HFt-MP-PAS-аналогом, вероятно, предотвращая MIT-опосредованные белок-белковые взаимодействия в растворе. В дополнение, несколько большее число молекул MIT на 24-мер, наблюдаемое для HFt-MP-PAS по сравнению с HFt-MP-PASE (55,0 против 49,0) может быть, вероятно, приписано присутствию молекул MIT на поверхностях первой конструкции, что может способствовать белок-белковой агрегации.

Стабильность комплексов HFt-MP-PASE-MIT тестировали путем хранения растворов в течение 2 месяцев в PBS при 4 °C или 37 °C и оценивая содержание MIT с помощью анализа эксклюзионной хроматографии (SEC) каждые 7 дней. HFt-MP-PASE-MIT продемонстрировал превосходную стабильность, менее 10% MIT высвобождалось после 2 месяцев хранения при 4 °C (Фигура 6), и не имелось признаков помутнения или выпадения в осадок.

Пример 5

Тестирование клеточной интернализации и локализации наноносителей на основе HFt

Для того чтобы определить, подвергаются ли MIT-содержащие конструкции на основе HFt связыванию с клеточной поверхностью и/или интернализации, их инкубировали с опухолевыми клетками толстой кишки, SW480 и SW620, при 37 °C в течение 1 или 3 ч и флуоресценцию, связанную с MIT, визуализировали с помощью конфокальной микроскопии.

На Фигуре 7 показана локализация HFt MP PASE MIT в клеточных линиях SW480 (верхняя панель) и SW620 (нижняя панель). После 3 часов инкубирования HFt MP PASE MIT в больших количествах накапливается в ядрах обеих клеточных линий, как показано окрашиванием маркером ядерной мембраны ламином A/C (в зеленом цвете). В

частности, MIT локализуется во внутриядерных структурах, предположительно являющихся ядрышками, на основе размера, положения и формы, как ранее предполагалось для клеток карциномы толстой кишки и злокачественных клеток молочной железы.

Сравнение между клетками, обработанными свободным MIT, HFt-MP-PAS-MIT или HFt-MP-PASE показано на Фигуре 8. Во всех случаях MIT локализуется внутри клеточных ядер, но в случае свободного MIT и HFt-MP-PAS-MIT препарат частично присутствует также в цитоплазме. В целом, клетки, обработанные HFt-MP-PASE-MIT, показали высокую степень накопления MIT в ядрах.

Пример 6

Анти-пролиферативные эффекты HFt MP PASE MIT *in vitro*

Для оценки способности HFt-MP-PASE, нагруженного MIT, уничтожать злокачественные клетки *in vitro* авторы изобретения провели анализы жизнеспособности ХТТ на широком спектре злокачественных клеток человека различного происхождения: фибросаркома HT1080; тройной негативный MDA молочной железы MB 231; панкреатические PaCa 44, Saran 1 и MiaPaCa2; колоректальные злокачественные клетки SW480 и SW620.

Не только MIT сохранил фармакологическую активность после инкапсулирования в конструкциях HFt MP PASE, но и MIT-нагруженные наноносители показали значения IC₅₀, сходные со значениями для неинкапсулированного MIT во всех протестированных клеточных линиях, и даже меньше в некоторых случаях (см. Фигуру 9). Данный факт замечателен тем, что неинкапсулированные лекарственные средства могут свободно диффундировать в клетки, в то время как конструкции HFt MP PASE могут только доставлять MIT путем скорость-лимитирующего опосредованного рецептором поглощения. Более того, новая наносистема HFt-MP-PASE-MIT показала, что на клеточных линиях поджелудочной железы эффективность уничтожения приблизительно в десять раз выше, чем у применяемого в настоящее время препарата гемцитабина (то есть 0,43 против 6,75 мкМ, 0,10 против 2,8 мкМ и 0,07 против 1,15 мкМ для клеток PaCa44, Saran 1 и MiaPaCa2, соответственно).

Пример 7

Эксперименты по биораспределению доксорубицин-содержащих соединений на мышях

Для сравнения, как HFt-MP-PASE сравнивается с HFt-MP-PAS с точки зрения накопления лекарственного средства в опухолях и органах, оба слитых белка

инкапсулировали с лекарственным средством. В качестве лекарственного средства был выбран доксорубин (DOX), поскольку оба слитых белка обладают схожей способностью инкапсулировать его, в отличие от лекарственного средства митоксантрона. Концентрации доксорубина в плазме рассчитывали через 24 часа после внутривенных инъекций у мышей, несущих человеческие опухоли поджелудочной железы (ксенотрансплантаты), неинкапсулированного лекарственного средства доксорубин или доксорубина, инкапсулированного в соединениях на основе ферритина: нативный HFt, HFt-MP-PAS и HFt-MP-PASE. На Фигуре 10 показано, что HFt-MP-PASE обладает более высокой стабильностью в сыворотке крови и также больше накапливается в опухоли.

Пример 8

Конструирование экспрессионных векторов для слитых белков HFt-MP-PASE-Cys или Glu

В качестве попытки улучшить и облегчить связывание лекарственного средства внутри полости в ферритине, было решено удалить остатки цистеина с поверхности белка и ввести дополнительные цистеиновые или глутаматные остатки в белковую полость. Таким образом, было бы возможно связать с внутренней полостью каждую молекулу, содержащую тиолреактивный или положительно заряженный мотив, например, лекарства, линкеры, флуорофоры и тому подобное. На Фигурах 11 и 12 схематично показано изготовление и синтез HFt на основе наночастиц, где в дополнение к N-концевым модификациям, показанным ранее (HFt-MP-PAS), нативные остатки цистеина замещены остатками серина, и ненативные остатки цистеина или глутамата (в красных сферах) включены во внутреннюю полость (HFt-Cys-MP-PASE или HFt Glu MP PASE). Фигура 13 показывает способность инкапсулировать производное доксорубина б-малеимидапроилгидразон с помощью нового белка HFt-Cys2-MP-PASE (содержащего 4 ненативных цистеина на мономер, 96 на 24-мер). На этой же фигуре показана способность HFt-Cys-MP-PASE инкапсулировать линкер малеимидопропионовую кислоту и лекарственное средство Genz 644282. На этой же фигуре показана способность HFt-Glu-MP-PASE инкапсулировать свободные лекарственные средства митоксантрон или Genz 644282. Все данные лекарственные средства были инкапсулированы в белковой полости слитых белков, используя процесс рассоединения-соединения белка как функцию pH в соответствии с протоколом, раскрытым в Falvo et al., 2016, *Biomacromolecules*. 17(2):514 22, с одной модификацией. В реакциях с использованием молекул, содержащих малеимид, их добавляли при pH от 6,5 до 7,5 после стадии кислого

pH, чтобы избежать возможного повреждения молекулы из-за низких значений pH. Кроме того, в реакции с использованием линкера малеимидопропионовой кислоты и лекарственного средства Genz 644282, первый добавляли перед лекарственным средством при соотношении линкер/тиол 1,2:1.

Относительные выходы указаны в виде % выхода белка и числа конъюгированных молекул лекарственного средства.

Пример 9

Анти-пролиферативные эффекты HFt-Glu-MP-PASE Genz 644282 *in vitro*

Для тестирования пролиферации клетки саркомы человека (HT 1080 и A204), рака молочной железы человека (MDA MB 231), меланомы человека (Colo38) и рака поджелудочной железы человека (PaCa44 и MiaPaCa2) высевали на 15 96-луночных планшетов в количестве, составляющем приблизительно 5×10^3 /лунка, в 200 мкл полной среды при 37 °C. На следующий день в лунки добавляли Genz 644282 или HFt Glu MP PASE Genz 644282, трехкратно, при различных концентрациях Genz 644282, и клетки культивировали в течение 72 часов. В течение последних 4 часов в культуре жизнеспособность клеток оценивали по восстановлению 3(4,5-диметилтиазол-2-ил)2,5-дифенилтетразолийбромида (МТТ). Всего в каждую лунку добавляли 1 мг/мл МТТ и образцы инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. После промывания кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида. Поглощение измеряли при 550 нм.

Анти-пролиферативные эффекты HFt Glu MP PASE Genz 644282 на культивируемые злокачественные клетки показаны на Фигуре 14. Полученные результаты свидетельствуют о том, что HFt Glu MP PASE Genz 644282 эффективно ингибирует злокачественные клетки, выращенные *in vitro* зависимым от концентрации образом, со значениями IC₅₀, одинаковыми или ниже по сравнению с неинкапсулированным лекарственным средством. Данные результаты имеют большое значение в свете потенциальных терапевтических применений. Те же результаты были также получены, используя конструкцию HFt-Cys-MP-PASE Genz 644282.

Анти-пролиферативные эффекты HFt-Glu-MP-PASE Genz 644282 *in vivo*

Пятинедельным самкам голых (nude) мышей CD1 (Charles River Laboratories, Лекко, Италия) инъецировали подкожно (то есть в правый бок) 4×10^6 клеток PaCa-44, ресуспендированных в 200 мкл среды RPMI 1640 плюс 1% BSA. После того как размеры опухоли достигали объем около 100 мм³, мышей рандомизировали в группы из шести животных и внутривенно вводили 200 мкл физиологического раствора, Genz-644282 (1,9

мг/кг) или HFt-Glu-MP-PASE-Genz (0,95 или 1,9 мг/кг). Мышам делали внутривенные инъекции два раза в неделю в течение трех недель; объем опухоли измеряли два раза в неделю с помощью цифрового штангенциркуля, и массу мышей контролировали. После того как размер опухоли мышей достиг объема ≥ 1500 мм³, животных умерщвляли. На Фигуре 15 представлены кривые роста опухолей через приблизительно две недели после последнего лечения. На данной фигуре очевидна способность HFt-Glu-MP-PASE-Genz резко снижать прогрессирование злокачественного новообразования, при этом наблюдается 100% полного ответа опухоли. На Фигуре 16 показано общее выживание животного. Все животные, которых лечили HFt-Glu-MP-PASE-Genz, были свободны от заболевания и выживали через 100 дней после начала терапии, что указывает на высокую эффективность тестируемого соединения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий по меньшей мере три домена, где:
 - (a) первый домен содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи нативного ферритина человека или его варианта, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи нативного ферритина человека;
 - (b) второй домен содержит аминокислотную последовательность сайта расщепления матричной металлопротеиназы (ММР); и
 - (c) третий N-концевой домен состоит из аминокислотной последовательности полипептида из по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, и который по существу состоит или состоит из пролина, серина, аланина и по меньшей мере одного отрицательно заряженного остатка, выбранного из глутамата или аспартата. (PASE)
2. Слитый белок по п. 1, где указанный третий N-концевой домен (PASE) имеет длину, которая составляет менее 80 аминокислотных остатков, предпочтительно содержит от 20 до 80 аминокислотных остатков, еще более предпочтительно содержит от 40 до 75 аминокислотных остатков.
3. Слитый белок по п. 1 или 2, в котором первый домен содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи нативного ферритина человека SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность варианта тяжелой цепи ферритина человека SEQ ID NO: 2 или варианта тяжелой цепи ферритина человека без каких-либо остатков цистеина на поверхности белка и с по меньшей мере одним цистеином или аспаратом или глутаматом во внутренней полости белка, предпочтительно с двумя, тремя или четырьмя цистеинами или аспартатами или глутаматами во внутренней полости.
4. Слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором второй домен содержит аминокислотную последовательность сайта расщепления матричной металлопротеиназы (ММР), выбранной из группы, состоящей из ММР 2, ММР 3, ММР 7 и ММР 9, в частности, где аминокислотная последовательность сайта расщепления матричной металлопротеиназы (ММР) выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.
5. Слитый белок по п. 4, в котором указанный третий N-концевой домен (PASE) содержит не более одного глутамата или аспартата в пределах от 15 до 20 остатков домена

PASE, предпочтительно не более одного глутамата или аспартата в пределах 20 остатков домена PASE.

6. Слитый белок по любому из п.п. 1-5, в котором остатки пролина указанного третьего N-концевого домена (PASE) полипептида составляют от 10 до 40% от общего числа аминокислотных остатков.

7. Слитый белок по любому из п.п. 1-6, в котором указанный полипептид третьего N-концевого домена (PASE) выбран из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

8. Слитый белок по любому из п.п. 1-7, содержащий первую и/или вторую линкерную аминокислотную последовательность(и), соответственно связывающую первый домен со вторым доменом и/или второй домен с третьим доменом, где первая и вторая аминокислотные последовательности являются одинаковыми или отличными друг от друга.

9. Слитый белок по любому из п.п. 1-8, который связан с активным ингредиентом и/или визуализирующим средством.

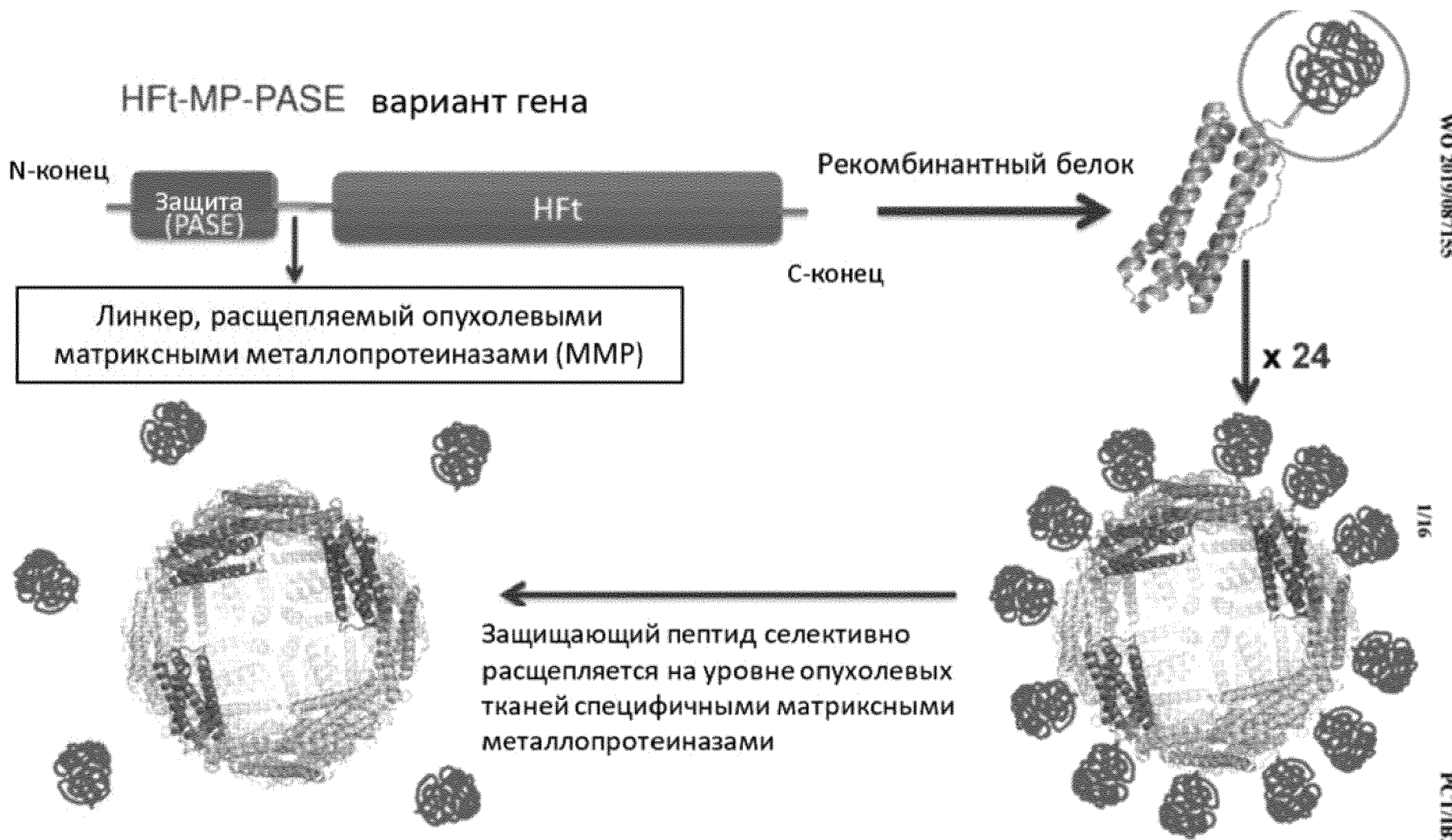
10. Слитый белок по любому из п.п. 1-9, в котором тяжелая цепь варианта ферритина человека имеет SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 18.

11. Наночастица, содержащая множество мономеров слитого белка по любому из п.п. 1-10, предпочтительно 24 мономера.

12. Наночастица по п. 11, где активный ингредиент, выбранный из доксорубина, митоксантрона, пиксантрона, GENZ 644282, паклитаксела, ауристатинов, камптотецинов, гемцитабина и активных ингредиентов на основе платины, связан с указанной наночастицей или инкапсулирован в указанной наночастице.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из п.п. 1-10, наночастица по п. 11 или 12, в сочетании с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым наполнителем, носителем или разбавителем.

14. Фармацевтическая композиция по п. 13 для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в терапевтическом лечении и/или диагностике опухоли.

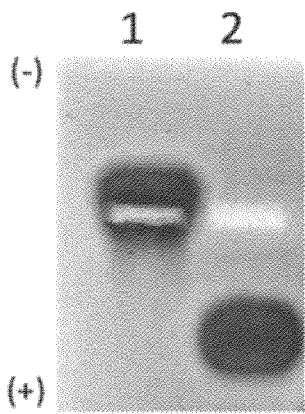


WO 2019/087155

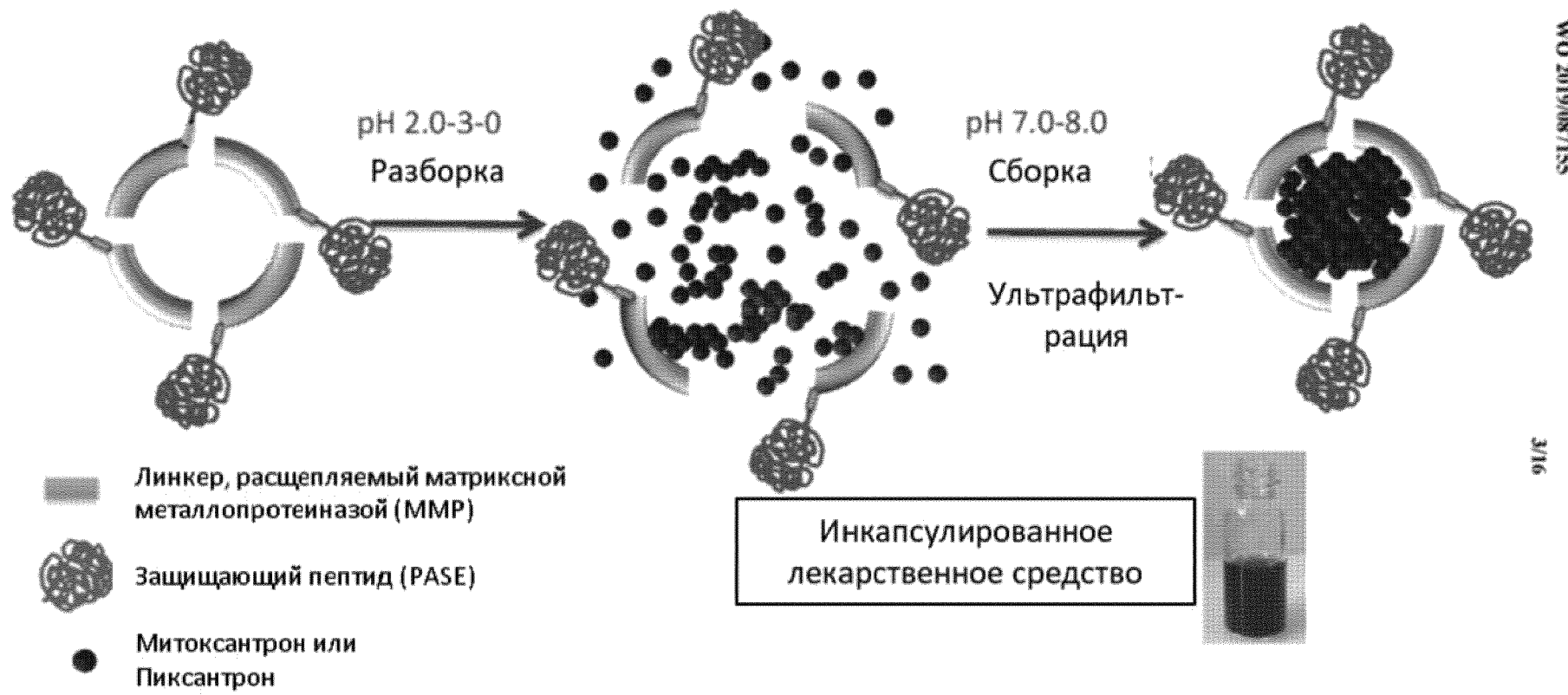
1/16

PT/EP2018/058655

ФИГ. 1



ФИГ. 2



MO 2019/087155

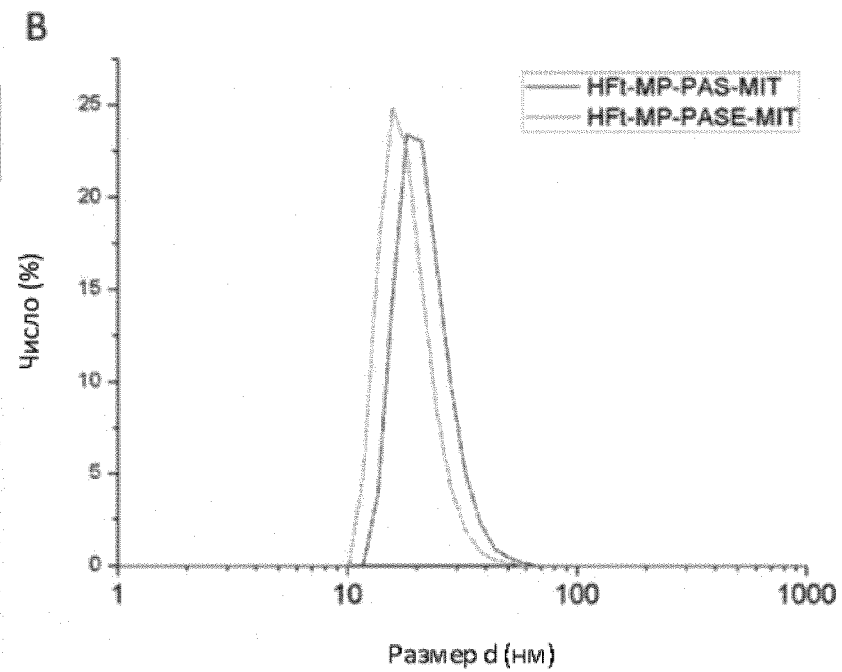
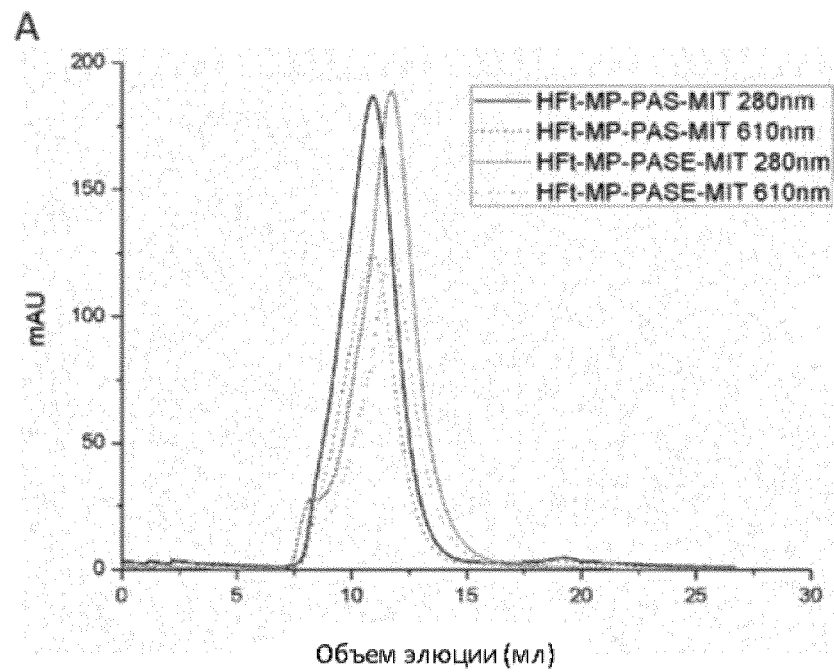
3/16

PC/T/IB2018/058655

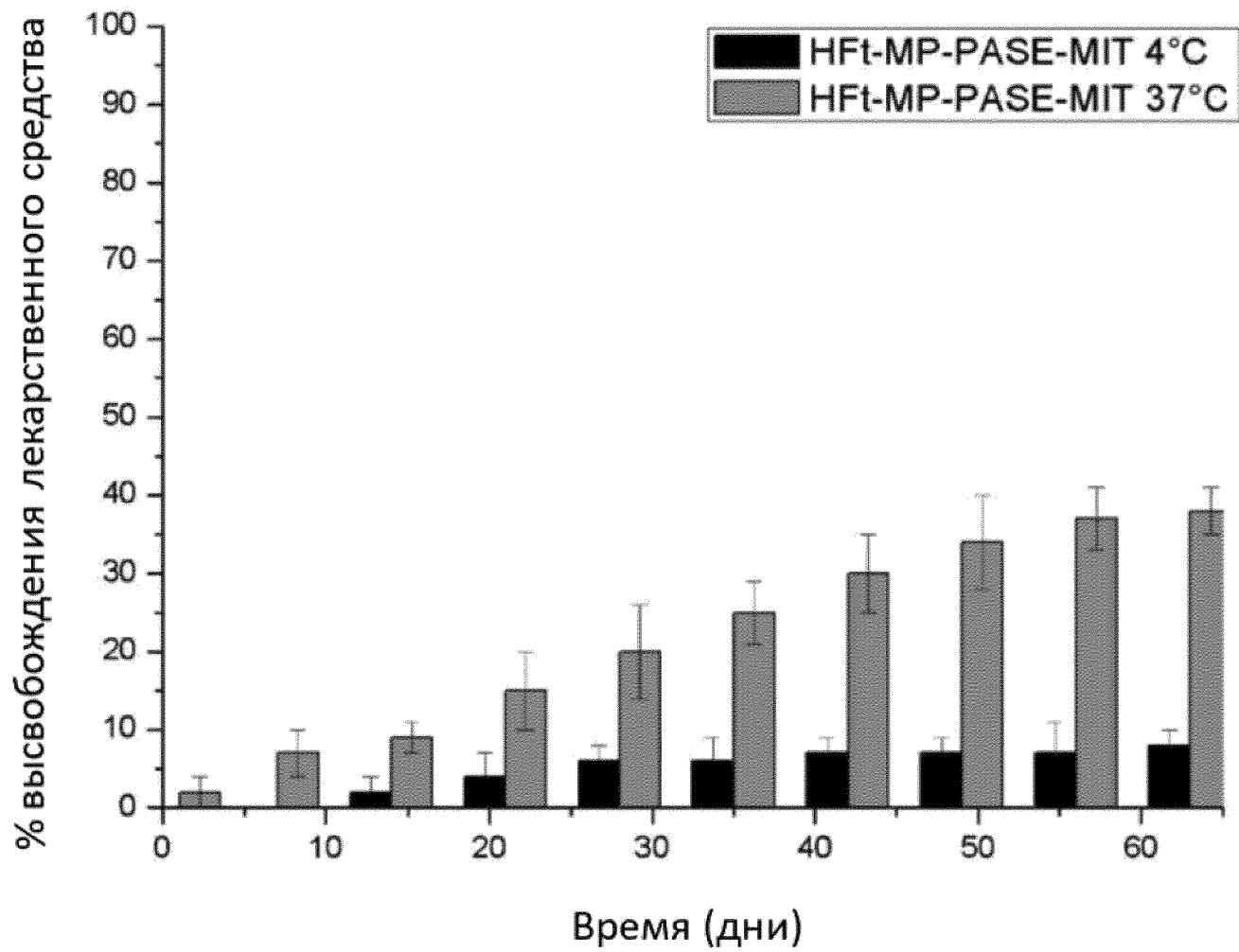
ФИГ. 3

Белок	МИТОКСАНТРОН (MIT)		ПИКСАНТРОН (PIX)	
	Выход белка (%)	Число MIT-молекул на 24-мер	Выход белка (%)	Число PIX-молекул на 24-мер
HFI-MP-PAS	60±4	55±4	54±5	25±4
HFI-MP-PASE	90±3	49±5	91±4	28±3
HFI	19±3	48±4	20±4	21±4

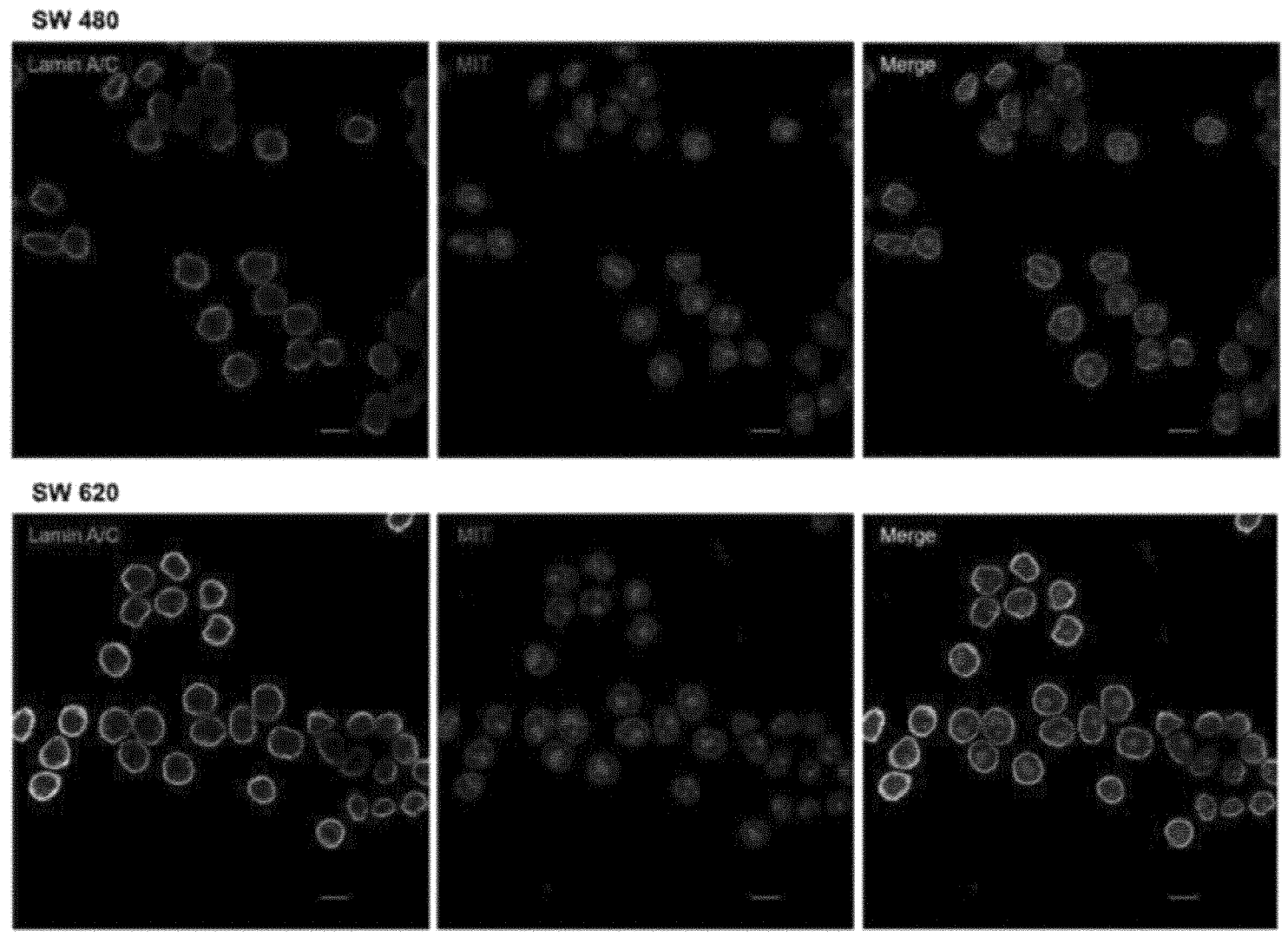
ФИГ. 4



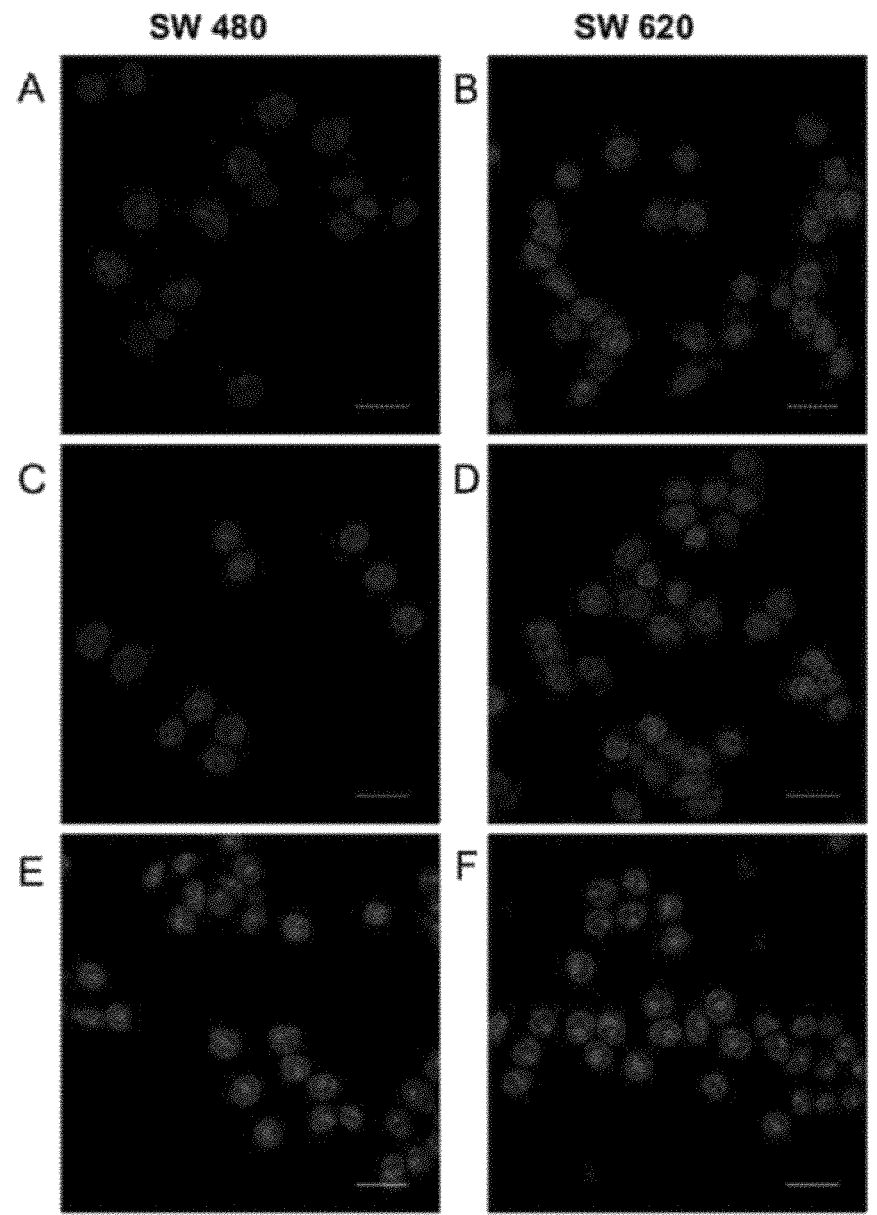
ФИГ. 5



ФИГ. 6



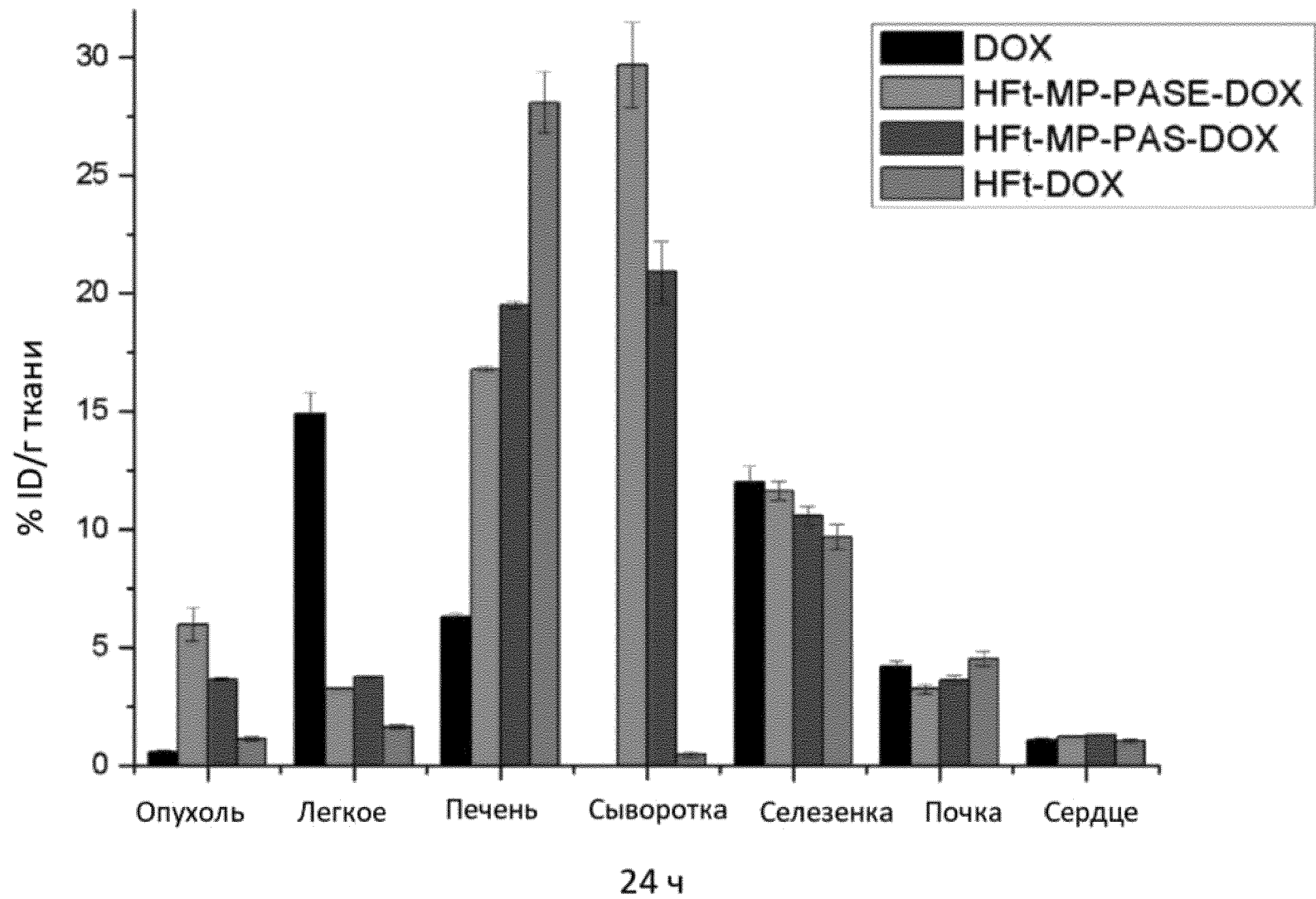
ФИГ. 7



ФИГ. 8

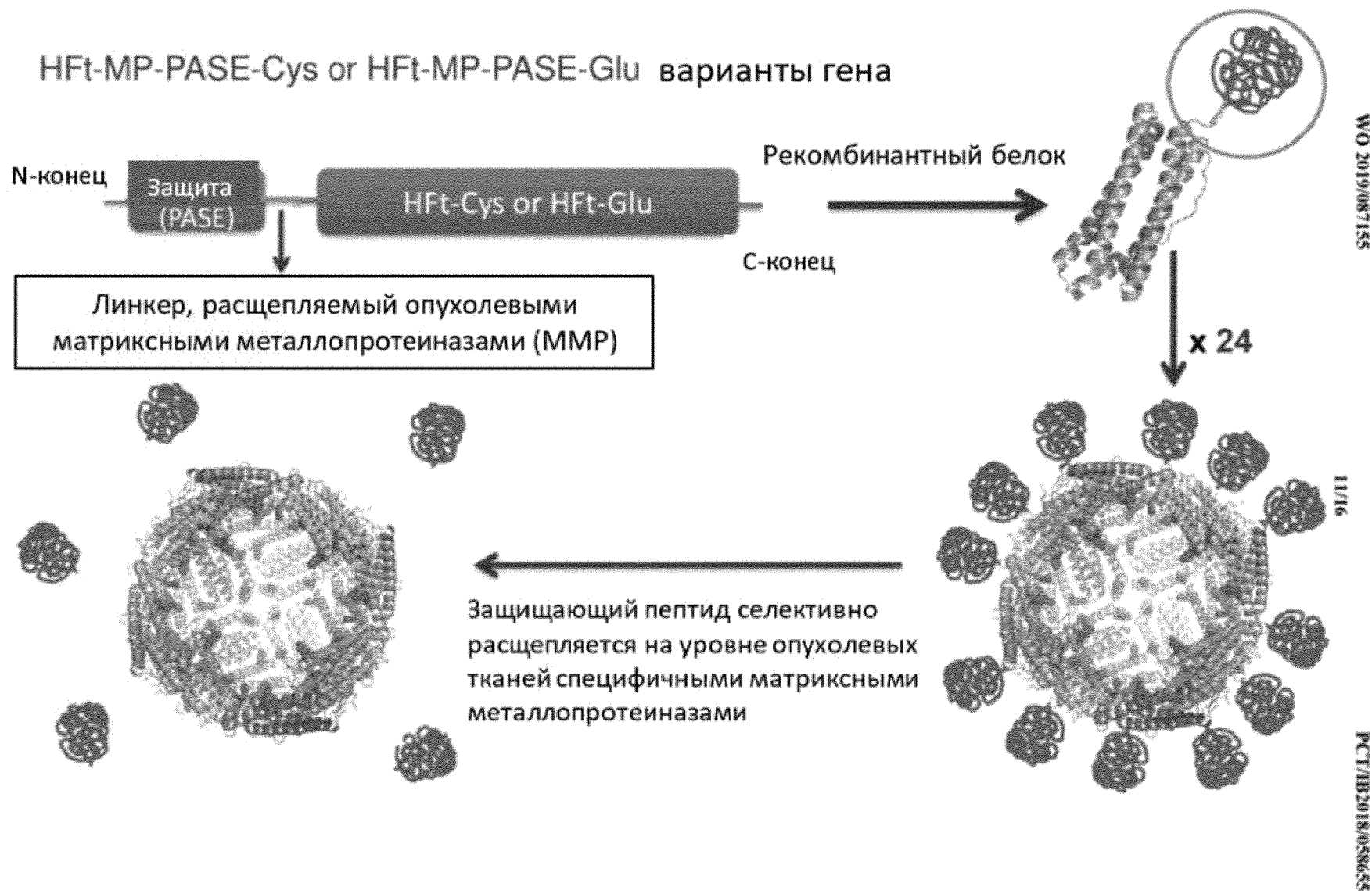
Злокачественные клетки	IC ₅₀ (μM) <i>Свободный MIT</i>	IC ₅₀ (μM) <i>HFI-MP-PASE-MIT</i>
SW480	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001
SW620	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001
MDA-MB-231	0.03 ± 0.009	0.02 ± 0.007
HT1080	0.01 ± 0.008	0.009 ± 0.005
PaCa44	0.43 ± 0.12	0.43 ± 0.34
Capan-1	0.72 ± 0.23	0.10 ± 0.04
MiaPaCa2	0.11 ± 0.06	0.07 ± 0.02

ФИГ. 9



ФИГ. 10

Hft-MP-PASE-Cys or Hft-MP-PASE-Glu варианты гена



ФИГ. 11



WO 2019/087155

12/16

PCT/IB2018/058655

ФИГ. 12

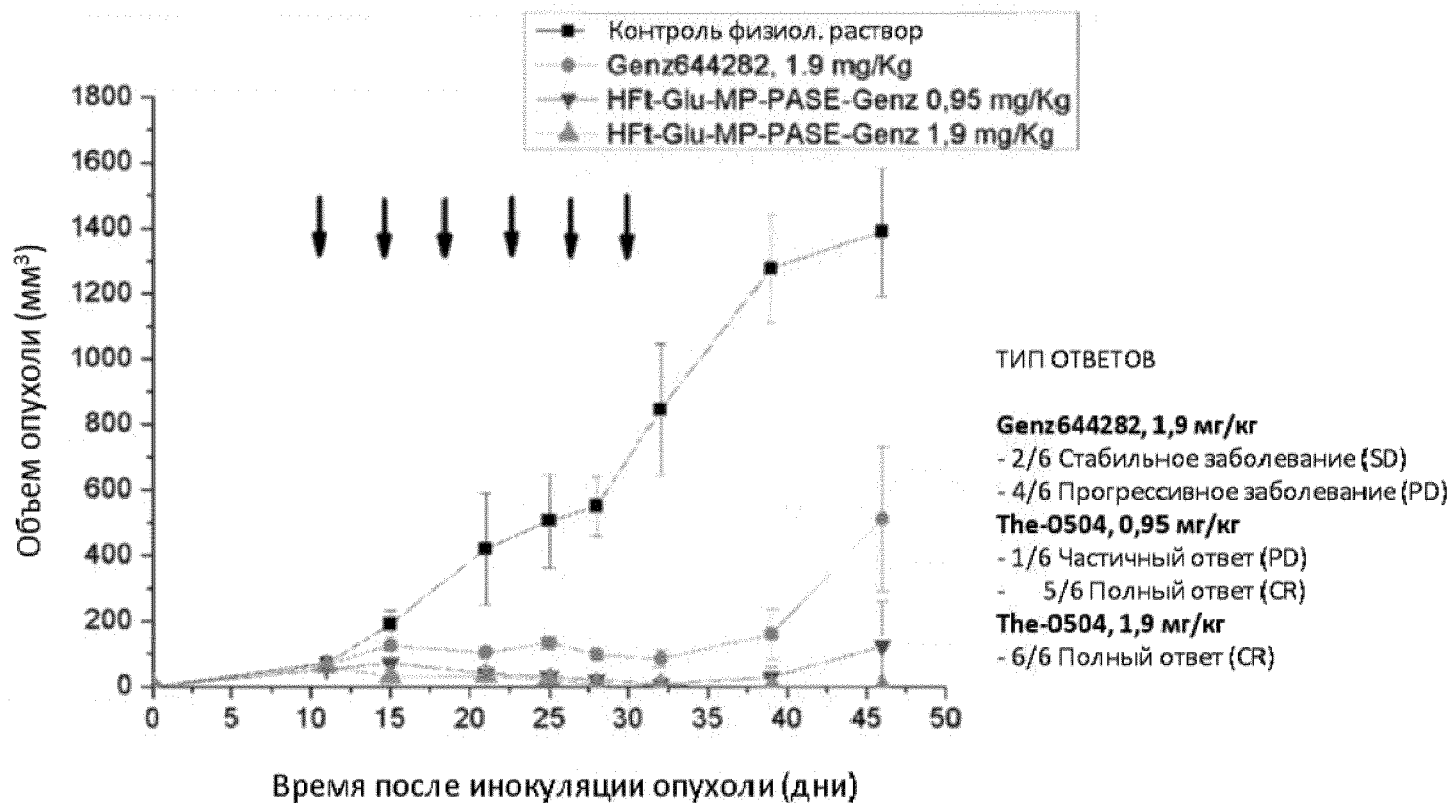
Белок	Выход белка (%)	Число конъюгированных молекул лекарства на 24-мер
Hft-Cys2-MP-PASE	92±3	69±4 (DOX-EMCH)
Hft-Cys1-MP-PASE	91±3	74±5 (малеимидопропионовая кислота + Genz 644282)
Hft-MP-PASE	90±3	49±5 (Митоксантрон)
Hft-Glu-MP-PASE	91±3	70 (Митоксантрон)
Hft-MP-PASE	75±4	24±3 (Genz 644282)
Hft-Glu-MP-PASE	90±4	80±4 (Genz 644282)

ФИГ. 13

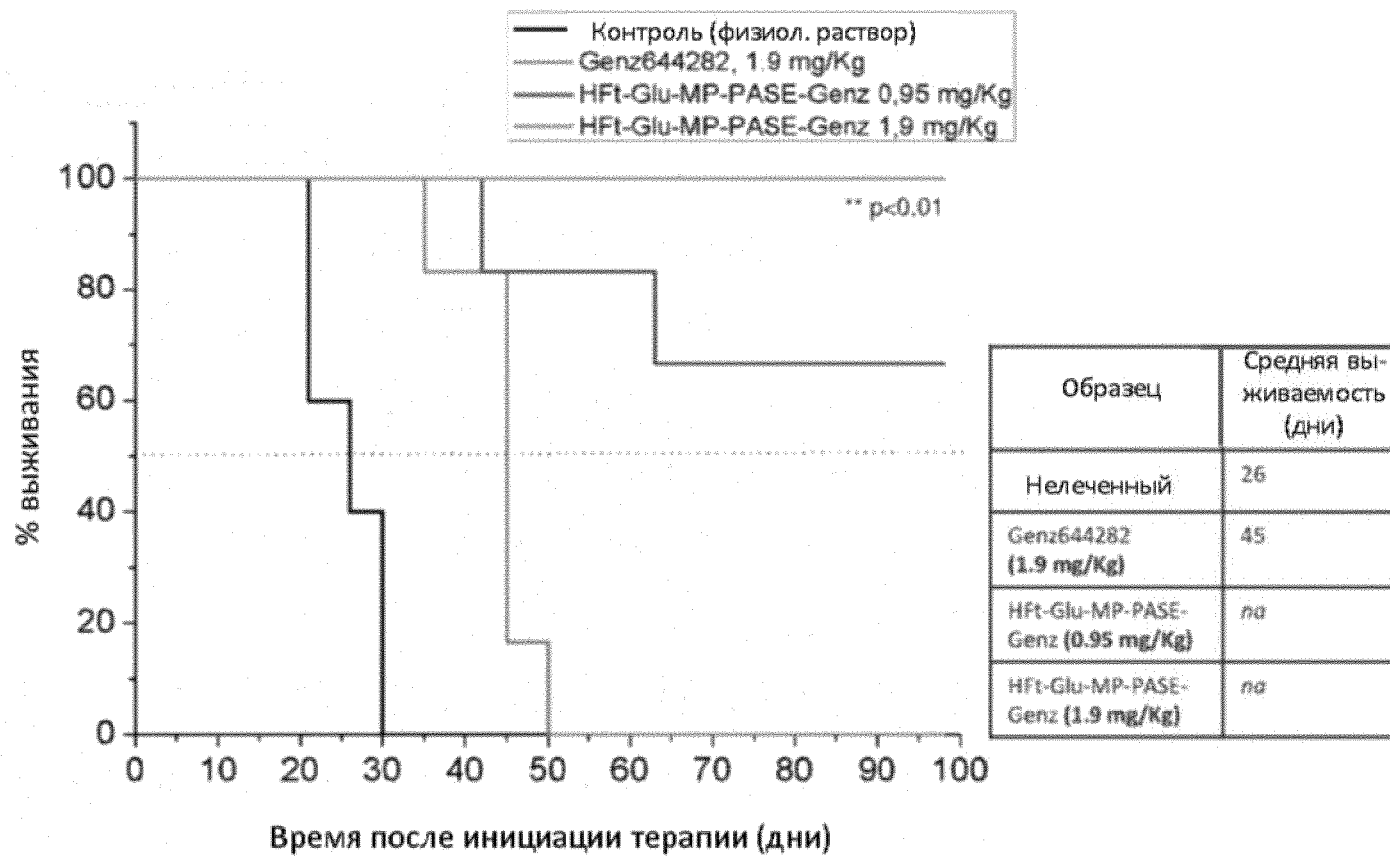
Злокачественные клетки	IC ₅₀ (nM) <i>Free Genz-644282</i>	IC ₅₀ (nM) <i>HFl-Glu-MP-PASE-Genz</i>
A204	5.8 ± 0.41	4.44 ± 0.33
Colo38	6.99 ± 0.01	5.85 ± 0.03
MDA-MB-231	19.03 ± 2.6	20.1 ± 1.7
HT1080	5.41 ± 0.8	4.09 ± 0.5
PaCa44	150.4 ± 30.6	100.4 ± 19.3
MiaPaCa2	26.1 ± 2.6	14.5 ± 1.6

ФИГ. 14

Модель опухоли поджелудочной железы (PaCa44),
мышинный ксенотрансплантат



ФИГ. 15



ФИГ. 16