

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190973** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.24

(22) Дата подачи заявки
2019.11.18

(51) Int. Cl. *A61K 31/337* (2006.01)
A61K 31/401 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 33/24 (2019.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/42 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ С РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ

(31) **201821043455; 201821022667**

(32) **2018.11.19; 2018.12.18**

(33) **IN**

(86) **PCT/IB2019/059873**

(87) **WO 2020/104911 2020.05.28**

(71) Заявитель:
**ЮНИКЕМ ЛАБОРАТОРИС
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:

**Сате Дхананджай, Кумар Судип,
Бачате Сачин Прабхакар, Канконкар
Моханиш Прадип (IN)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к комбинированной химиотерапии с рекомбинантным белком лектином. В частности, настоящее изобретение относится к цитотоксическому эффекту рекомбинантного белка лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в комбинации с другими терапевтическими агентами, причем другие терапевтические агенты представляют собой противораковые агенты. Предложенные комбинации обладают высокой синергией и весьма эффективны против некоторых видов рака.

A1

202190973

202190973

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ С РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент
5 Индии № 201821022667, поданной 18 декабря 2018 года, и 201821043455, поданной 19 ноября 2018 года, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к биофармацевтическим комбинациям
10 рекомбинантного белка лектина с другими терапевтическими агентами к их антипролиферативному действию в отношении сдерживания неконтролируемой пролиферации клеток при раке.

Уровень техники

Рак начинается с первичной опухоли, которая представляет собой припухлость или
15 болезненное разрастание, которые образуются в результате избыточного роста и деления клеток. Опухоли могут быть доброкачественными, предраковыми или злокачественными, или могут означать патологическое изменение без онкологического потенциала. Доброкачественная опухоль представляет собой нераковую опухоль, а злокачественная опухоль представляет собой раковую опухоль. Рак возникает в том случае, если
20 патологические клетки делятся неконтролируемым образом. Иногда рак распространяется на другие части тела, это явление называют вторичной опухолью или метастазом.

Способы лечения рака включают хирургическое удаление раковых тканей, химиотерапию, полихимиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию и т.д. Указанные способы лечения часто являются инвазивными технологиями, которые также поражают нормальные
25 здоровые клетки наряду с раковыми клетками. Указанные способы лечения также применяют в комбинации для достижения синергетического эффекта, приводящего к усилению терапевтического потенциала совместно применяемых лекарственных препаратов, снижению дозы, уменьшению токсичности лекарственных препаратов и отсрочке возникновения лекарственной устойчивости.

30 Химиотерапевтические средства лечения рака выбирают на основе типа пролиферации раковых клеток. Химиотерапевтические агенты обладают различными свойствами, например, антиметаболические агенты препятствуют выработке или использованию метаболитов, необходимых для рака; антимикротубулиновые агенты препятствуют образованию микротрубочек, необходимых для митоза; алкилирующие агенты могут
35 осуществлять алкилирование ДНК, что блокирует репликацию ДНК; агенты на основе платины могут образовывать поперечные сшивки в ДНК; противоопухолевые антибиотики

и ингибиторы топоизомеразы подавляют фермент топоизомеразу, необходимую для репликации ДНК.

Онкофетальный антиген Томсона-Фриденрайха ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}-\alpha\text{-O-Ser/Thr}$, T или TF) экспрессируется более чем в 90% случаях рака, включая рак полости рта, рак толстой кишки, рак яичников, а также рак мочевого пузыря, и экспрессия TF коррелирует с развитием и метастазом опухоли. В предшествующей патентной заявке авторов настоящего изобретения 350/MUM/2009 описан рекомбинантный белок лектина, выделенный из склероциальных тел грибов *Sclerotium rolfsii*, обладающий высокой специфичностью связывания с онкофетальным углеводным антигеном TF.

Комбинированная терапия для лечения рака представляет собой эффективный способ лечения благодаря снижению нежелательной цитотоксичности для здоровых клеток. Сложность этого заболевания, его склонность к распространению за пределы первоначального очага и появлению устойчивости к некоторым лекарствам, а также его генетическое разнообразие подчеркивают необходимость различных подходов для борьбы с ним. Комбинированная терапия не только повышает шансы на исцеление или долгосрочную ремиссию, но и уменьшает повреждение жизненных органов и тканей в большей степени, чем при использовании одного подхода. Один тип лечения иногда может обуславливать более высокую восприимчивость опухоли к лечению с использованием второго подхода. Некоторые химиотерапевтические препараты, например, могут увеличивать восприимчивость опухоли к лучевой терапии. В других случаях лекарственные средства могут иметь синергетический эффект при совместном введении и усиливать действие друг друга, в результате чего комбинированная эффективность выше, чем их действие при введении по отдельности. Их использование в комбинации имеет мультипликативный эффект: терапевтический эффект увеличивается во много раз. US5053386 (1991) относится к композиции и способам лечения, включающим лектины, агглютинин *Abrin* и *Abrus*, для подавления послеоперационного метастаза злокачественной опухоли. В указанном документе также описано применение белка в комбинации с радиационной терапией и/или химиотерапией.

В публикации «Molecular and cellular biochemistry» (том 394 (1-2); с. - 225-235; 2014 год) описано действие лектина из корейской омелы (агглютинин *Viscum album* var. *coloratum*, VCA) и доксорубина (DOX) в клетках рака молочной железы человека MCF-7 (положительные по эстроген-рецепторам) и MDA-MB231 (отрицательные по эстроген-рецепторам), в комбинации и отдельно. Комбинация VCA и DOX продемонстрировала мощный синергетический эффект в отношении подавления клеточного роста по сравнению с применением VCA или DOX по отдельности.

В публикации *Oncotarget* (том: 8 (26), с.: 42466-42477, 2017 год) описано комбинированное лечение с применением пеметрекседа и связанного с сиаловой кислотой лектина,

выделенного из ооцитов *Rana catesbeiana* (cSBL), обеспечивающее более высокую дозозависимую цитотоксичность, чем комбинация пеметрекседа и цисплатина, которая является стандартом лечения мезотелиомы.

5 Однако проблема заключается в том, что не все указанные комбинированные терапии приводят к благоприятному действию. Таким образом, настоящее исследование сфокусировано на разработке новых и эффективных партнеров для антипролиферативных комбинаций.

При борьбе с угрожающим жизни заболеванием, таким как рак, насущной необходимостью является разработка наилучшего способа его предотвращения и лечения.
10 Комбинированная терапия, по-видимому, является одним из таких вариантов.

Задача настоящего изобретения

Основной задачей настоящего изобретения является обеспечение альтернативного способа лечения или предупреждения роста раковых клеток. Более конкретно, задачей является разработка доступного и эффективного способа лечения или предупреждения
15 роста раковых клеток.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение эффективной терапии для предупреждения или лечения рака. Конкретная задача настоящего изобретения заключается в обеспечении комбинированной терапии для предупреждения или лечения рака, причем указанная комбинация представляет собой синергетическую комбинацию,
20 содержащую рекомбинантный белок лектина.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение терапевтически эффективной комбинации для предупреждения и/или лечения рака.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение эффективных концентраций терапевтически эффективной синергетической комбинации для
25 предупреждения и/или лечения рака.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение фармацевтически приемлемой лекарственной формы эффективных концентраций терапевтически эффективной комбинации для предупреждения и/или лечения рака.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение комбинаций
30 рекомбинантного белка лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, пригодных для предупреждения, лечения или подавления пролиферации раковых клеток.

Сущность изобретения

Главным аспектом настоящего изобретения является терапевтически эффективная
35 комбинация, содержащая рекомбинантный белок лектина и один или более других терапевтических агентов.

Предпочтительно, указанная комбинация является синергетической.

Предпочтительно, концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл.

5 Предпочтительно, предложенную терапевтически эффективную комбинацию применяют для предупреждения или лечения рака у субъекта.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, предложен рекомбинантный белок лектина для лечения или предупреждения рака у субъекта, причем рекомбинантный белок лектина вводят в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами, и при этом указанный другой терапевтический агент вводят одновременно,
10 отдельно или последовательно.

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, предложен способ лечения или предупреждения рака или подавления роста раковых клеток у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества рекомбинантного белка лектина в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами, причем указанный
15 другой терапевтический агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

В соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, предложена комбинированная терапия для предупреждения, пролиферации, лечения или исцеления рака или опухоли у субъекта, включающая введение рекомбинантного белка лектина в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами, и при этом указанный
20 другой терапевтический агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Преимущественно, указанный другой терапевтический агент представляет собой противораковый агент.

Предпочтительно, указанный противораковый агент представляет собой противоопухолевый антибиотик.

25 Предпочтительно, указанный противораковый агент представляет собой антиметаболит, алкилирующий антинеопластический агент, антимиотубулиновый агент и/или ингибитор топоизомеразы I.

Более предпочтительно, указанный противораковый агент представляет собой оксазафосфорин, азотистый иприт, алкилирующий антинеопластический агент, ингибитор
30 топоизомеразы I, ингибитор топоизомеразы II, алкалоид барвинка, таксан, антифолат или антагонист пиримидина.

Более предпочтительно, указанный антиметаболит выбран из 5-фторурацила (5-FU), гемцитабина, метотрексата, пеметрекседа или капецитабина.

Более предпочтительно, указанный алкилирующий антинеопластический агент
35 представляет собой антинеопластический агент на основе платины, выбранный из цисплатина или карбоплатина.

Более предпочтительно, указанный антимикротубулиновый агент выбран из паклитаксела, доцетаксела, абраксана или таксотера.

Более предпочтительно, указанный ингибитор топоизомеразы I выбран из иринотекана или топотекана.

- 5 Преимущественно, указанный противораковый агент представляет собой цисплатин, и предложенную комбинацию применяют для лечения или предупреждения у субъекта рака полости рта, рака яичников или рака мочевого пузыря.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак полости рта, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 10 до 90 мкг/мл, и концентрация цисплатина составляет от 0,1 до 1,5 мкМ, или концентрация рекомбинантного лектина составляет 5 мкг/мл, и концентрация цисплатина составляет от 0,5 до 1,5 мкМ.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак яичников, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 1 до 2,5 мкг/мл, и концентрация цисплатина составляет от 0,25 до 5 мкМ, или концентрация рекомбинантного лектина составляет 5 мкг/мл, и концентрация цисплатина составляет от 1,0 до 5 мкМ, или концентрация рекомбинантного лектина составляет от 10 до 20 мкг/мл, и концентрация цисплатина составляет от 0,01 до 5 мкМ.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак мочевого пузыря, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 5 до 80 мкг/мл, и концентрация цисплатина составляет от 1 до 500 мкМ.

Преимущественно, указанный противораковый агент представляет собой 5-FU, и предложенную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака полости рта, поджелудочной железы или толстой кишки.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак полости рта, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 5 до 90 мкг/мл, и концентрация 5-FU составляет от 0,01 до 5 мкМ.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак поджелудочной железы, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 10 до 80 мкг/мл, и концентрация 5-FU составляет от 1 до 250 мкМ, или концентрация рекомбинантного лектина составляет 5 мкг/мл, и концентрация 5-FU составляет от 1 до 50 или 250 мкМ.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак толстой кишки, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 5 до 80 мкг/мл, и концентрация 5-FU составляет от 10 до 200 мкМ, или концентрация рекомбинантного лектина составляет 1 мкг/мл, и концентрация 5-FU составляет от 50 до 200 мкМ.

- 35 Преимущественно, указанный противораковый агент представляет собой иринотекан, и предложенную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака толстой кишки.

Предпочтительно, если концентрация рекомбинантного лектина составляет от 40 до 80 мкг/мл, и концентрация иринотекана составляет от 1 до 50 мкМ, или если концентрация рекомбинантного лектина составляет 20 мкг/мл, и концентрация иринотекана составляет от 1 или 10 до 50 мкМ.

- 5 Преимущественно, указанный противораковый агент представляет собой паклитаксел для лечения или предупреждения рака яичника или молочной железы.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак яичника, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 1 до 20 мкг/мл, и концентрация паклитаксела составляет от 0,25 до 5 нМ.

- 10 Предпочтительно, если рак представляет собой рак молочной железы, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 20 до 80 мкг/мл, и концентрация паклитаксела составляет от 0,1 до 10 нМ; или концентрация рекомбинантного лектина составляет 10 мкг/мл, и концентрация паклитаксела составляет от 1 до 10 нМ.

- 15 Преимущественно, противораковый агент представляет собой гемцитабин, и предложенную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака мочевого пузыря или поджелудочной железы.

Предпочтительно, если рак представляет собой рак мочевого пузыря, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 2,5 до 80 мкг/мл, и концентрация гемцитабина составляет от 1 до 300 мкМ.

- 20 Предпочтительно, если рак представляет собой рак поджелудочной железы, то концентрация рекомбинантного лектина составляет от 5 до 20 мкг/мл, и концентрация гемцитабина составляет от 5 до 25 мкМ, или концентрация рекомбинантного лектина составляет от 40 до 80 мкг/мл, и концентрация гемцитабина составляет от 1 до 25 мкМ.

- 25 Преимущественно, противораковый агент представляет собой карбоплатин, и предложенную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака молочной железы.

- 30 Предпочтительно, если концентрация рекомбинантного лектина составляет от 5 до 80 мкг/мл, и концентрация карбоплатина составляет от 50 до 1000 мкМ; или если концентрация рекомбинантного лектина составляет 2,5 мкг/мл, и концентрация карбоплатина составляет от 100 до 1000 мкМ.

Преимущественно, рекомбинантный белок лектина представляет собой белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или имеющий по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии с SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

- 35 Предпочтительно, концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл. Более предпочтительно, концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 1 мкг/мл до 90 мкг/мл.

Предпочтительно, концентрация указанного другого терапевтического агента составляет от 0,001 нМ до 1000 мкМ.

Предпочтительно, концентрация цисплатина составляет от 0,01 мкМ до 500 мкМ.

Предпочтительно, концентрация 5-фторурацила (5-FU) составляет от 0,01 мкМ до 250 мкМ.

5 Предпочтительно, концентрация иринотекана составляет от 0,1 мкМ до 50 мкМ.

Предпочтительно, концентрация паклитаксела составляет от 0,001 нМ до 10 нМ.

Предпочтительно, концентрация гемцитабина составляет от 0,01 мкМ до 300 мкМ.

Предпочтительно, концентрация карбоплатина составляет от 10 мкМ до 1000 мкМ.

Преимущественно, предложенная комбинация содержит дозу рекомбинантного лектина и дозу другого терапевтического агента, подходящую для достижения терапевтического эффекта.

Предпочтительно, доза рекомбинантного лектина подходит для достижения концентрации рекомбинантного лектина *in vivo* от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл.

15 Предпочтительно, доза указанного другого терапевтического агента подходит для достижения концентрации другого терапевтического агента *in vivo* от 0,001 нМ до 1000 мкМ.

Предпочтительно, доза цисплатина подходит для достижения концентрации цисплатина *in vivo* от 0,01 мкМ до 500 мкМ.

Предпочтительно, доза 5-фторурацила (5-FU) подходит для достижения концентрации 5-фторурацила (5-FU) *in vivo* от 0,01 мкМ до 250 мкМ.

20 Предпочтительно, доза иринотекана подходит для достижения концентрации иринотекана *in vivo* от 0,1 мкМ до 50 мкМ.

Предпочтительно, доза паклитаксела подходит для достижения концентрации паклитаксела *in vivo* от 0,001 нМ до 10 нМ.

25 Предпочтительно, доза гемцитабина подходит для достижения концентрации гемцитабина *in vivo* от 0,01 мкМ до 300 мкМ.

Преимущественно, предложенная комбинация рекомбинантного белка лектина и другого терапевтического агента представляет собой композицию. Предпочтительно, предложенная композиция дополнительно содержит одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

30 В соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения, предложен рекомбинантный белок лектина в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами для лечения или предупреждения рака, причем указанный другой терапевтический агент выбран из одного или более из 5-фторурацила (5-FU), гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина или иринотекана.

35 Предпочтительно, рекомбинантный лектин предназначен для лечения рака полости рта, рака яичников или рака мочевого пузыря, причем рекомбинантный белок лектина вводят в

комбинации с цисплатином, и при этом цисплатин вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, рекомбинантный лектин предназначен для лечения рака полости рта, поджелудочной железы или толстой кишки, причем рекомбинантный белок лектина вводят в комбинации с 5-FU, и при этом 5-FU вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, рекомбинантный лектин предназначен для лечения рака толстой кишки, причем рекомбинантный белок лектина вводят в комбинации с иринотеканом, и при этом иринотекан вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, рекомбинантный лектин предназначен для лечения рака яичника или рака молочной железы, причем рекомбинантный белок лектина вводят в комбинации с паклитакселом, и при этом паклитаксел вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, рекомбинантный лектин предназначен для лечения рака мочевого пузыря или рака поджелудочной железы, причем рекомбинантный белок лектина вводят в комбинации с гемцитабином, и при этом гемцитабин вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, рекомбинантный лектин предназначен для лечения рака молочной железы, причем рекомбинантный белок лектина вводят в комбинации с карбоплатином, и при этом карбоплатин вводят одновременно, отдельно или последовательно.

В соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения, предложен терапевтический агент для лечения или предупреждения рака в комбинации с рекомбинантным белком лектином, причем указанный терапевтический агент выбран из одного или более из 5-фторурацила (5-FU), гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина или иринотекана.

Предпочтительно, терапевтический агент предназначен для лечения рака полости рта, рака яичников или рака мочевого пузыря, причем указанный терапевтический агент представляет собой цисплатин, и при этом цисплатин вводят в комбинации с рекомбинантным белком лектином, и рекомбинантный белок лектина вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, терапевтический агент предназначен для лечения рака полости рта, поджелудочной железы или толстой кишки, причем указанный терапевтический агент представляет собой 5-FU, и при этом 5-FU вводят в комбинации с рекомбинантным белком лектином, и рекомбинантный белок лектина вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, терапевтический агент предназначен для лечения рака толстой кишки, причем указанный терапевтический агент представляет собой иринотекан, и при этом

иринотекан вводят в комбинации с рекомбинантным белком лектином, и рекомбинантный белок лектина вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, терапевтический агент предназначен для лечения рака яичника или рака молочной железы, причем указанный терапевтический агент представляет собой паклитаксел, и при этом паклитаксел вводят в комбинации с рекомбинантным белком лектином, и рекомбинантный белок лектина вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, терапевтический агент предназначен для лечения рака мочевого пузыря или рака поджелудочной железы, причем указанный терапевтический агент представляет собой гемцитабин, и при этом гемцитабин вводят в комбинации с рекомбинантным белком лектином, и рекомбинантный белок лектина вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Предпочтительно, терапевтический агент предназначен для лечения рака молочной железы, причем указанный терапевтический агент представляет собой карбоплатин, и при этом карбоплатин вводят в комбинации с рекомбинантным белком лектином, и рекомбинантный белок лектина вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Описание изобретения

Определения

Термин «белок» при использовании в данной заявке относится к полимеру из аминокислотных остатков.

Термин «аминокислота» при использовании в данной заявке относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые выполняют функцию, подобную природным аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, и включают протеиногенные аминокислоты. Природные аминокислоты также включают аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках. Синтетические аминокислоты включают неканонические аминокислоты, такие как селеноцистеин и пирролизин. Обычно синтетические аминокислоты не являются протеиногенными аминокислотами.

Термины «рак» и «опухоль» использованы в настоящем изобретении взаимозаменяемо и имеют такое же значение, которое подразумевается специалистом в данной области техники. Они возникают, когда нормальные клетки разрастаются неконтролируемым образом и вытесняют здоровые клетки тела. Образование таких увеличенных в размере разрастаний нарушает нормальное функционирование ткани/органа/организма. Рак может возникать в любом месте тела и также может распространяться на другие части тела. Если раковые клетки распространяются по организму, такое явление называют метастазом.

Термин «рекомбинантный» означает нуклеиновую кислоту или полипептид, искусственно или синтетические (т.е. неприродным образом) измененные посредством вмешательства человека. Такое изменение может быть осуществлено в отношении материала, находящегося в его естественном окружении или состоянии, или материала, изъятых из него. Например, «рекомбинантная нуклеиновая кислота» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая получена посредством осуществления рекомбинации нуклеиновых кислот, например, во время клонирования, шаффлинга ДНК или других общеизвестных методик молекулярной биологии. «Молекула рекомбинантной ДНК» состоит из сегментов ДНК, связанных друг с другом с помощью таких технологий молекулярной биологии. Термин «рекомбинантный белок» или «рекомбинантный полипептид» при использовании в данной заявке относится к молекуле белка, которая экспрессирована с помощью молекулы рекомбинантной ДНК.

Термин «лектин» при использовании в данной заявке относится к белку, связывающему углеводы. Более конкретно, рекомбинантный белок лектина согласно настоящему изобретению представляет собой лектин, полученный из лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL). Лектин *Sclerotium rolfsii* (SRL) представляет собой лектин, выделенный из склероциальных тел почвенных фитопатогенных грибов *S. rolfsii*.

Термины «гомология» или «гомологичный» при использовании в данной заявке относятся к двум или более упоминаемым объектам, которые имеют по меньшей мере частичную идентичность в пределах заданной области или части. Участки, области или домены гомологии или идентичности относятся к частям двух или более упоминаемых объектов, которые являются подобными или одинаковыми. Так, если две последовательности являются одинаковыми в пределах одной или более областей последовательности, то они идентичны в указанных областях. По существу гомологичная относится к молекуле, которая структурно или функционально сохранена, то есть имеет или предположительно имеет по меньшей мере одинаковую структуру или функцию (например, биологическую функцию или активность) с эталонной молекулой. Или это может означать, что указанная молекула содержит релевантную/соответствующую область или часть, которая гомологична аналогичной части эталонной молекулы.

В одном варианте реализации процент «гомологии» между двумя последовательностями определяют по алгоритму BLASTP с параметрами по умолчанию (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* 1997, 1 сентября; 25(17):3389-402). В частности, алгоритм BLAST доступен в интернете по адресу URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. В альтернативном варианте реализации для общего выравнивания последовательностей процент гомологии между двумя последовательностями определяют по алгоритму EMBOSS Needle, используя параметры по умолчанию. В частности, алгоритм EMBOSS Needle доступен в интернете по адресу URL: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

Если не указано иное, термин «гомология» использован в данном описании взаимозаменяемо с термином «идентичность последовательностей».

Термин «рекомбинантный белок лектина» при использовании в данной заявке включает любую фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, пролекарство или любое
5 другое соединение, которое при введении пациенту может обеспечивать (прямо или косвенно) соединение, описанное в настоящем документе. Получение солей, сольватов, гидратов и пролекарств можно осуществлять способами, известными в данной области техники.

При использовании в данной заявке термины «терапевтические средства» и «терапия»
10 могут относиться к любому способу, композиции и/или активному ингредиенту, которые можно использовать для лечения, предупреждения и/или контроля заболевания или одного или более его симптомов.

Термин «комбинированная терапия» в настоящем описании включает введение пациенту, страдающему от рака, указанных терапевтических агентов в одной или в отдельных
15 фармацевтических лекарственных формах и в одно время или в разное время. При введении терапевтических агентов в разное время их следует вводить с достаточно малым разрывом по времени для обеспечения усиления или достижения синергетического ответа. Термин «химиотерапия» относится к применению лекарственных препаратов для лечения рака. При использовании в данной заявке «химиотерапевтический агент» представляет
20 собой соединение, подходящее для лечения рака.

Терапевтический агент, который можно использовать в комбинации с рекомбинантным белком лектином, предпочтительно представляет собой химиотерапевтический агент. Не существует ограничений в отношении химиотерапевтического агента (термин «химиотерапевтический агент» имеет такое же значение, которое подразумевается
25 специалистом в данной области техники), который можно использовать согласно настоящему изобретению. Неограничивающие примеры таких химиотерапевтических агентов представляют собой алкилирующие агент, такие как, например, митомицин С, циклофосфамид, бусульфан, ифосфамид, изосфамид, мелфалан, гексаметилмеламин, тиотепа, хлорамбуцил, мехлорэтамин или дакарбазин; антиметаболиты, такие как,
30 например, гемцитабин, капецитабин, 5-фторурацил, цитарабин, 2-фтордезоксцитидин, метотрексат, идатрексат, томудекс или триметрексат; ингибиторы топоизомеразы II, такие как, например, доксорубин, эпирубин, этопозид, тенипозид или митоксантрон; ингибиторы топоизомеразы I, такие как, например, иринотекан (CPT-11), 7-этил-10-гидроксикамптотецин (SN-38) или топотекан; антимитотические препараты, такие как,
35 например, паклитаксел, доцетаксел, винбластин, винкристин или винорелбин; и производные платины, такие как, например, цисплатин, оксалиплатин, спиролатин или карбоплатин.

Химиотерапевтические агенты можно широко классифицировать так, как описано выше. Их можно также дополнительно разделить на подклассы, как описано в следующей таблице.

Основной класс	Подкласс	Химиотерапевтические агенты
Алкилирующие агенты	Оксазафосфорины	циклофосфамид, ифосфамид, изосфамид,
	Азотные иприты	мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, мехлорэтамин
	Агенты на основе платины	Цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, спироплатин
	Прочик	тиотепа, дакарбазин; митомицин С, гексаметилмеламин
Ингибиторы топоизомеразы	Топоизомераза I	иринотекан (СРТ-11), 7-этил-10-гидроксикамптотецин (SN-38) или топотекан
	Топоизомераза II	доксорубицин, эпирубицин, этопозид, тенипозид или митоксантрон;
Ингибиторы митоза	Алкалоиды барвинка	винбластин, винкристин или винорелбин;
	Таксаны	паклитаксел, доцетаксел,
Антиметаболиты	Антифолаты	метотрексат или триметрексат; томудекс
	Антагонисты пиримидина	гемцитабин, капецитабин, 5-фторурацил, цитарабин, 2-фтордезоксцитидин,
	Прочик	идатрексат.

- 5 Термин «лучевая терапия» или «радиотерапия» представляет собой лечение рака и других заболеваний ионизирующим излучением. Ионизирующее излучение выделяет энергию, которая повреждает или разрушает клетки в области, подлежащей лечению, посредством повреждения их генетического материала, что обуславливает невозможность продолжения роста указанных клеток. Несмотря на то, что излучение повреждает и
- 10 раковые клетки, и нормальные клетки, последние способны самовосстанавливаться и правильно функционировать. Лучевая терапия, используемая согласно настоящему изобретению, может включать, но не ограничивается этим, применение гамма-лучей, рентгеновских лучей и/или направленную доставку радиоизотопов в опухолевые клетки. Также предусмотрены другие формы ДНК-повреждающих факторов, такие как микроволны
- 15 и УФ-излучение. Кроме того, предусмотрено, что лучевая терапия может включать применение антител с радиоактивной меткой для доставки доз радиации непосредственно в очаг рака (радиоиммунотерапия) и/или включать применение радиосенсибилизатора. Термин «иммунотерапия» основан на применении иммунных эффекторных клеток и молекул для направленного воздействия и разрушения раковых клеток. Само антитело
- 20 может служить в качестве эффектора такой терапии, или оно может привлекать другие клетки для фактического киллинга клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным соединением или токсином (химиотерапевтическим агентом, радионуклидом, цепью рицина А, холерным токсином, коклюшным токсином и т.д.) и

служить лишь в качестве нацеливающего агента. Альтернативно, эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая прямо или косвенно взаимодействует с мишенью опухолевой клетки. Различные эффекторские клетки включают цитотоксические Т-клетки и клетки естественные киллеры (NK).

- 5 Комбинация терапевтических возможностей, т.е. прямой цитотоксической активности и ингибирования или снижения ErbB2, обеспечивает терапевтический эффект при лечении рака, сверхэкспрессирующего ErbB2.

При использовании в данной заявке «фармацевтически приемлемая соль» относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединений, которые
10 не являются биологически или иным образом нежелательными. Фармацевтически приемлемые соли относятся к фармацевтически приемлемым солям соединений, и указанные соли получают из различных органических и неорганических противоионов, хорошо известных в данной области техники.

Термин «фармацевтическая комбинация» относится к любой комбинации первого и
15 второго фармацевтического ингредиента, смешанной в одну композицию или сохраняемой по отдельности. Термин «фармацевтическая композиция» или «фармацевтически приемлемая композиция», или «фармацевтически приемлемая лекарственная форма» относится к смеси соединения, описанного в настоящем документе, с фармацевтическими вспомогательными веществами, такими как разбавители или носители (см., например,
20 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22e изд., Pharmaceutical Press (15 сентября, 2012) и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6e издание, Raymond Rowe, Pharmaceutical Press (2009)). Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения в организм. Фармацевтические композиции обычно специально получают для конкретного предполагаемого способа введения.

25 Термины «эффективный» или «терапевтически эффективный» относятся к действию, достаточному для инициации требуемого биологического ответа. Специалистам в данной области техники понятно, что действие комбинации согласно настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов как требуемая биологическая конечная точка, фармакокинетика доставляемых агентов, заболевание, подлежащее
30 лечению, способ введения и конкретный пациент. Лечение обычно является «эффективным», если уменьшается один или более симптомов или клинических маркеров. Альтернативно, лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания, расстройства или медицинского состояния замедлено или остановлено.

Значения показателя аддитивности (CI), основанные на модели аддитивности Леве,
35 определяли для оценки природы межлекарственных взаимодействий, которые могут быть аддитивными (CI=1), антагонистическими (CI>1) или синергетическими (CI<1) для различных концентраций лекарств и уровней эффекта (Fa, доля погибших клеток;

ингибирование пролиферации раковых клеток). Значения CI рассчитывали по линиям тренда линейной регрессии с помощью программного обеспечения CompuSyn (ComboSyn Inc., Парамус, штат Нью-Джерси), затем способом Chou et al., в котором гиперболические и сигмоидальные кривые зависимости эффекта от дозы преобразовывали в линейную форму (Chou TC (2010) Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res 70: 440-6, инструкции также доступны на сайте ComboSyn, Inc., www.combosyn.com).

Синергетический эффект обеспечивает возможность эффективного лечения заболевания с применением сниженных количеств (доз) по сравнению с монотерапией. Более низкие дозы обеспечивают уменьшение токсичности без снижения эффективности. Кроме того, синергетический эффект может обуславливать повышенную эффективность. Наконец, синергия может приводить к улучшению предотвращения или облегчения заболевания, по сравнению с любой монотерапией. Термин «аддитивный» относится к сумме любых двух или более терапевтических агентов в комбинации. При использовании в данной заявке термин «антагонистический» относится к блокированию (например, снижению или предотвращению) биологической активности. Термин «ингибировать» или «ингибирование» означает снижение измеримого количества.

При использовании в данной заявке термин «противораковый агент» относится к веществу или терапевтическому способу лечения (например, лучевой терапии), который подавляет функцию раковых клеток, замедляет их образование и/или вызывает их разрушение *in vitro* или *in vivo*.

Термин «противоопухолевый антибиотик» относится к химическому веществу, которое обладает противоопухолевым действием. В некоторых вариантах реализации «противоопухолевый антибиотик», при использовании в данной заявке, не является антибактериальным антибиотиком, используемым для лечения инфекций. Он представляет собой такой тип противоракового лекарства, который блокирует рост клеток, взаимодействуя с ДНК.

Термин «цитотоксический» использован в контексте эффекта терапевтических агентов согласно настоящему изобретению в отношении линий раковых клеток и означает «токсичный для клеток». Терапевтические агенты, которые эффективны для разрушения раковых клеток, называют цитотоксическими или описывают как обладающие цитотоксичностью.

Термин «IC50» или IC50 относится к ингибирующей дозе, которая вызывает 50% ингибирование данного количественно измеримого параметра. Указанное количественное значение означает, сколько конкретного лекарства или другого вещества (ингибитора) необходимо для ингибирования данного биологического, биохимического или химического

параметра (или компонента параметра, т.е. фермента, клетки, клеточного рецептора или микроорганизма) наполовину.

Термин «синергетический» относится к комбинации двух или более терапевтических агентов, которая является более эффективной, чем аддитивное действие любых двух или более отдельных агентов. Синергия фармакологических агентов может быть

количественно определена расчетом значений показателя аддитивности (CI). Значения CI могут быть рассчитаны по измеренным значениям IC₅₀ для двух лекарственных агентов A и B по формуле, представленной ниже.

$$CI = \frac{DA_{50}}{ICA_{50}} + \frac{DB_{50}}{ICB_{50}} + \frac{DA_{50} \times DB_{50}}{ICA_{50} \times ICB_{50}}$$

где,

DA(50) = концентрация лекарственного агента A в комбинации с B для обеспечения 50% цитотоксичности

ICA(50) = концентрация лекарственного агента A в отдельности для обеспечения 50% цитотоксичности

DB(50) = концентрация лекарственного агента B в комбинации с A для обеспечения 50% цитотоксичности

ICB(50) = концентрация лекарственного агента B в отдельности для обеспечения 50% цитотоксичности

где лекарственный агент A представляет собой лектин согласно настоящему изобретению (например, белок с SEQ ID NO: 1), и лекарственный агент B представляет собой другой тестируемый терапевтический агент.

Синергию, аддитивный эффект или антагонизм определяют по следующим критериям:

CI > 1 – означает антагонизм

CI = 1 – означает аддитивный эффект

CI < 1 – означает синергию.

Таким образом, если рассчитанное значение CI меньше единицы, это означает, что лекарственные агенты A и B обладают синергетическим эффектом.

При использовании в данной заявке «субъект» относится к животному, которое является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. «Животное» включает хладнокровных и теплокровных позвоночных и беспозвоночных, таких как рыбы, моллюски и ракообразные, рептилии и, в частности, млекопитающие. «Млекопитающее» включает, без ограничения, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, собак, кошек, овец, коз, коров, лошадей, приматов, таких как обезьяны, шимпанзе и человекообразные, и, в частности, людей.

Кроме того, любое лекарственное соединение, упомянутое в настоящем документе, может быть в аморфной форме или в кристаллической форме, в форме свободного соединения

или в форме сольватов (например, гидратов), и предусмотрено, что все формы входят в объем настоящего изобретения. Способы сольватации общеизвестны в данной области техники.

Краткое описание прилагаемых последовательностей

5 SEQ ID NO: 1: представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (описанный как Rec-2 в WO 2010/095143).

SEQ ID NO: 2: представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (описанный как Rec-3 в WO 2010/095143).

10 SEQ ID NO: 3: представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (описанный WO 2014/203261).

Рекомбинантный белок лектина, имеющий аминокислотную последовательность of SEQ ID NO: 1

TYKIT VRVYQ TNPDA FFHPV EKTWV KYANG GTWTI TDDQH VLTMG GSGTS GTLRF
HADNG ESFTA TFGVH NYKRW CDIVT NLAAD ETGMV INQQY YSQKN REEAR ERQLS
15 NYQVK NAKGR NFQIV YTEAE GNDLH ANLII G

Рекомбинантный белок лектина, имеющий аминокислотную последовательность of SEQ ID NO: 2

20 VYKIT VRVYQ TNPDA FFHPV EKTWV KYANG GTWSI TDDQH VLTMG GSGTS GTLRF
HADNG ESFTA TFGVH NYKRW CDIVT NLAAD ETGMV INQQY YSQKN REEAR ERQLS
NYQVK NAKGR NFQIV YTEAE GNDLH ANLII G

Рекомбинантный белок лектина, имеющий аминокислотную последовательность of SEQ ID NO: 3

25 VYKIT VRVYQ TNPDA FFHPV EKTWV KYADG GTWSI TDDQH VLTMG GSGTS GTLRF
HADNG ESFTA TFGVH DYKRW CDIVT DLAAD ETGMV INQEY YSEKD REEAR ERQNS
NYEVK DAKGR NFEIV YTEAE GNDLH ADLII G

Подробное описание изобретения

30 Настоящее изобретение относится, в целом, к терапевтически эффективной комбинации, содержащей рекомбинантный белок лектина и один или более других терапевтических агентов.

В некоторых вариантах реализации предложена терапевтически эффективная комбинация, содержащая рекомбинантный белок лектина и один или более других терапевтических агентов, причем указанная комбинация является синергетической. В 35 некоторых вариантах реализации концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл.

Терапия

Терапевтически эффективная комбинация согласно настоящему изобретению предназначена для предотвращения роста или метастаза опухоли, лечения или исцеления рака. В соответствии с некоторыми вариантами реализации, предложенную синергетическую комбинацию можно использовать для предупреждения или лечения аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, переходноклеточной карциномы, базальноклеточной карциномы, сарком, лимфом, карцином эпителиальных клеток или карцином неэпителиальных клеток. В соответствии с конкретным вариантом реализации, комбинированную терапию согласно настоящему изобретению можно использовать для предупреждения или лечения у субъекта рака поджелудочной железы, абдоминального рака, рака печени, рака предстательной железы, рака полости рта, рака толстой кишки, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака почки, рака желудка, рака молочной железы, рака костного мозга, меланомы, лейкоза или рака центральной нервной системы.

В соответствии с конкретным вариантом реализации, комбинированную терапию согласно настоящему изобретению можно использовать для предупреждения или лечения рака поджелудочной железы, рака полости рта, рака толстой кишки, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака молочной железы.

Белок лектин

Рекомбинантный белок лектина представляет собой белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или, в некоторых вариантах реализации, белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный белок лектина может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 2 или 3. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный белок лектина содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный белок лектина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В некоторых вариантах реализации белок лектин содержит менее 200 аминокислотных остатков, предпочтительно менее 150 аминокислотных остатков.

Другой терапевтический агент

В некоторых вариантах реализации другой терапевтический агент представляет собой противораковый агент, используемый в химиотерапии для лечения рака. В некоторых вариантах реализации другой терапевтический агент выбран из алкилирующих агентов, таких как, например, митомицин С, циклофосфамид, бусульфан, ифосфамид, изосфамид, мелфалан, гексаметилмеламин, тиотепа, хлорамбуцил, мехлорэтамин или дакарбазин;

антиметаболитов, таких как, например, гемцитабин, капецитабин, 5-фторурацил, цитарабин, 2-фтордезоксцитидин, метотрексат, идатрексат, томудекс или триметрексат; ингибиторов топоизомеразы II, таких как, например, доксорубин, эпирубин, этопозид, тенипозид или митоксантрон; ингибиторов топоизомеразы I, таких как, например, иринотекан (CPT-11), 7-этил-10-гидроксикамптотецин (SN-38) или топотекан; антимитотических препаратов, таких как, например, паклитаксел, доцетаксел, винбластин, винкристин или винорелбин; и производных платины, таких как, например, цисплатин, оксалиплатин, спироплатин или карбоплатин.

Согласно Американскому онкологическому обществу (www.cancer.org),

химиотерапевтический агент, используемый для лечения рака молочной железы, выбран из паклитаксел таксола, доцетаксел таксотера, доксорубина, эпирубина, цисплатина, карбоплатина, винорелбина, капецитабина, гемцитабина, иксабепилона и эрибулина. Аналогично, для лечения рака поджелудочной железы химиотерапевтический агент выбран из гемцитабина, 5-фторурацила, оксалиплатина, паклитаксела, капецитабина, цисплатина и иринотекана. Кроме того, для лечения рака полости рта и ротоглотки химиотерапевтический агент выбран из цисплатина, карбоплатина, 5-фторурацила (5-FU), паклитаксела, доцетаксела и гидроксимочевины. Аналогично, для лечения рака толстой или прямой кишки химиотерапевтический агент выбран из 5-FU, капецитабина, иринотекана, оксалиплатина и комбинации трифлуридина и типирацила. Для лечения рака яичников лекарственный препарат выбран из соединений платины, таких как цисплатин или карбоплатин, и таксана, например, паклитаксела или доцетаксела, или в комбинации, а для лечения рака мочевого пузыря химиотерапевтический агент выбран из гемцитабина, цисплатина, метотрексата, винбластина, доксорубина, карбоплатина или их комбинаций. В соответствии с конкретным вариантом реализации настоящего изобретения, другой терапевтический агент может быть выбран из паклитаксела, цисплатина и карбоплатина для лечения рака молочной железы или рака яичника, цисплатина и 5-FU для лечения рака полости рта, цисплатина и гемцитабина для лечения рака мочевого пузыря, 5-U и гемцитабина для лечения рака поджелудочной железы и 5-FU и иринотекана для лечения рака толстой кишки.

30 Схема лечения

Терапевтически эффективная комбинация может включать введение субъекту рекомбинантного белка лектина и другого терапевтического агента в одной или в отдельных фармацевтических лекарственных формах и в одно время или в разное время, причем рекомбинантный белок лектина и другой терапевтический агент можно вводить одновременно, раздельно или последовательно относительно друг друга.

Термин «одновременное введение» при использовании в данной заявке означает, что композицию, содержащую рекомбинантный белок лектина и другой терапевтический агент,

вводят с временным интервалом не более примерно 15 минут, более конкретно не более примерно 10, 5 или 1 минуты. Если рекомбинантный белок лектина и терапевтический агент вводят одновременно, то рекомбинантный белок лектина и терапевтический агент могут содержаться в одной композиции (например, в композиции, содержащей и рекомбинантный белок лектина, и один или более терапевтических агентов) или в разных композициях (например, рекомбинантный белок лектина содержится в одной композиции, а один или более терапевтических агентов содержатся в другой композиции).

При «последовательном введении» другой терапевтический агент вводят либо до, либо после введения рекомбинантного белка лектина. При последовательном введении рекомбинантный белок лектина и другой терапевтический агент(ы) можно вводить с временным интервалом более примерно 15 минут, конкретнее более примерно 20, 30, 40, 50 и 60 или более минут. Первым можно вводить либо рекомбинантный белок лектина, либо другой терапевтический агент(ы). Рекомбинантный белок лектина и другой терапевтический агент(ы) содержатся в разных композициях, которые могут находиться в одной или в разных упаковках.

При «раздельном введении» рекомбинантный белок лектина и другой терапевтический агент(ы) можно вводить последовательно, причем один из них вводят первым, а другой вторым, или наоборот. Временной интервал между двумя введениями составляет более 60 минут.

В другом варианте реализации предложено применение рекомбинантного белка лектина для лечения или предупреждения рака, включающее введение рекомбинантного белка лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в комбинации с другим терапевтическим агентом, причем другой терапевтический агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

В конкретном варианте реализации предложено применение рекомбинантного белка лектина для предупреждения или лечения рака у субъекта, включающее введение указанному субъекту эффективного количества рекомбинантного белка лектина в комбинации с другим противораковым агентом, выбранным из антиметаболита, алкилирующего антинеопластического агента, антимицротубулинового агента и ингибитора топоизомеразы I, причем антиметаболит выбран из 5-FU, гемцитабина, метотрексата, пеметрекседа или капецитабина, алкилирующий антинеопластический агент представляет собой антинеопластический агент на основе платины, выбранный из цисплатина или карбоплатина, антимицротубулиновый агент представляет собой паклитаксел, доцетаксел, абраксан или таксотер, и ингибитор топоизомеразы I представляет собой иринотекан или топотекан, и при этом другой противораковый агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

В другом конкретном варианте реализации предложено применение рекомбинантного белка лектина для лечения или предупреждения рака, включающее введение рекомбинантного белка лектина в комбинации с другим противораковым агентом, выбранным из паклитаксела, 5-фторурацила, цисплатина, карбоплатина, иринотекана и гемцитабина, и при этом другой противораковый агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения или предупреждения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества рекомбинантного белка в комбинации с другим терапевтическим агентом, причем другой терапевтический агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

В конкретном варианте реализации предложен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества рекомбинантного белка лектина в комбинации с другим противораковым агентом, выбранным из антиметаболита, алкилирующего антинеопластического агента, антимиотубулинового агента и ингибитора топоизомеразы I, причем антиметаболит выбран из 5-FU, гемцитабина, метотрексата, пеметрекседа или капецитабина, алкилирующий антинеопластический агент представляет собой антинеопластический агент на основе платины, выбранный из цисплатина или карбоплатина, антимиотубулиновый агент представляет собой паклитаксел, доцетаксел, абраксан или таксотер, и ингибитор топоизомеразы I представляет собой иринотекан или топотекан, и при этом другой противораковый агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

В другом конкретном варианте реализации предложен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества рекомбинантного белка лектина в комбинации с другим противораковым агентом, выбранным из паклитаксела, 5-FU, цисплатина, карбоплатина, иринотекана и гемцитабина, и при этом другой противораковый агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Иллюстративные комбинации

Рекомбинантный белок лектина, используемый отдельно, демонстрирует эффективную цитотоксичность. Однако в комбинации с другим терапевтическим агентом действие на экспериментальные клеточные линии было неожиданно высоким. Такая комбинация демонстрирует не только эффективное аддитивное действие, но и высокую синергию. Такие комбинации были весьма эффективными для ингибирования роста раковых клеток.

В другом конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложена синергетическая комбинация, содержащая рекомбинантный белок лектина и другой противораковый агент, выбранный из паклитаксела, 5-FU, карбоплатина, цисплатина,

иринотекана и гемцитабина. Предложенную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака.

5 Главный аспект настоящего изобретения представляет собой синергетическую комбинацию, содержащую рекомбинантный белок лектина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и цисплатин, причем указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака молочной железы, полости рта, яичника или мочевого пузыря.

10 Другой главный аспект настоящего изобретения представляет собой синергетическую комбинацию, содержащую рекомбинантный белок лектина и 5-FU, причем указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака поджелудочной железы, полости рта или толстой кишки.

15 Дополнительный главный аспект настоящего изобретения представляет собой синергетическую комбинацию, содержащую рекомбинантный белок лектина и иринотекан, причем указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака толстой кишки.

Другой главный аспект настоящего изобретения представляет собой синергетическую комбинацию, содержащую рекомбинантный белок лектина и паклитаксел, причем указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака яичника и молочной железы.

20 Другой главный аспект настоящего изобретения представляет собой синергетическую комбинацию, содержащую рекомбинантный белок лектина и гемцитабин, причем указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака мочевого пузыря и поджелудочной железы.

25 Другой главный аспект изобретения представляет собой синергетическую комбинацию, содержащую рекомбинантный белок лектина и карбоплатин, причем указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения рака молочной железы.

В соответствии с другим вариантом реализации, комбинированная терапия может включать введение компонентов согласно настоящему изобретению одновременно с лучевой терапией.

30 Фармацевтическая композиция

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой композицию, содержащую рекомбинантный белок лектина в комбинации с другим терапевтическим агентом и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

35 В соответствии с указанным аспектом настоящего изобретения, комбинированный препарат представлен в подходящей фармацевтически приемлемой форме / фармацевтической композиции. Препарат может представлять собой подходящую пероральную форму или форму для парентерального введения, или имплантат.

Указанный препарат, например, может быть в форме таблеток, капсул, пастилок, суспензий, растворов, эмульсий, порошков или сиропов для внутривенного, внутримышечного, интраперитонеального, подкожного, внутривенного введения, инъекции депо, интратекального, трансдермального, сублингвального, внутривенного, перорального или ингаляционного введения.

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения фармацевтическая композиция также содержит одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество относится к неактивным фармацевтическим ингредиентам в лекарственной форме, известным опытным специалистам, таким как стабилизатор, солюбилизатор, консервант, разрыхлители, связующие агенты, наполнители и смазывающие вещества, или любые другие, известные специалистам в данной области техники.

Композиция, используемая согласно настоящему изобретению, содержит 50 мМ основания Tris (триметамин), 150 мМ хлорида натрия с pH $8,0 \pm 0,2$. Однако такая парентеральная композиция содержит вспомогательные вещества, не ограничиваясь ими, декстрозу, глицерин, хлорид натрия или маннит в качестве модификаторов тоничности; аскорбиновую кислоту, ацетилцистеин, соли сернистой кислоты (бисульфит, метабисульфит) или моноглицерин в качестве антиоксидантов; фенол, метакрезол, бензиловый спирт, парабены (метил, пропил, бутил), хлорбутанол, тимеросал и соли фенилртути (ацетат, борат, нитрат) в качестве противомикробных агентов; этилендиаминтетраацетат кальция-динатрия, этилендиаминтетраауксусную кислоту (ЭДТК), ЭДТА динатрия, ЭДТА натрия, диэтилентриаминпентаауксусную кислоту или ее кальциевую соль в качестве хелатообразующих агентов; полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (Tween 80), сорбитанмоноолеат, полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат (Tween 20), лецитин, сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена (Pluronic) или триолеат сорбита (Span 85) в качестве поверхностно-активных веществ; и пропиленгликоль, глицерин, этанол, полиэтиленгликоль, сорбит, диметилацетамид или Cremophor EL в качестве соразтворителя. Другие фармацевтические композиции получают в соответствии с известным уровнем техники, доступным для специалистов в данной области техники, с применением вспомогательных веществ, перечисленных в стандартных справочниках и одобренных регулирующими органами в различных странах.

Предпочтительное количество рекомбинантного белка лектина и другого терапевтического агента в фармацевтической композиции варьируется в соответствии с формой композиции, способом введения, типом, возрастом и генетическим профилем субъекта, а также стадией рака и способом лечения.

Концентрации и дозы

В соответствии с некоторыми вариантами реализации, эффективная концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл. В конкретном варианте реализации эффективная концентрация составляет от 1 мкг/мл до 90 мкг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами реализации, эффективная концентрация другого терапевтического агента составляет от 0,001 нМ до 1000 мкМ. Специалистам в данной области техники известен тот факт, что в случае комбинаций эффективная концентрация представляет собой концентрацию всех ингредиентов, которые при объединении обеспечивают синергетический эффект. Таким образом, эффективная концентрация рекомбинантного белка лектина варьируется в зависимости от другого терапевтического агента, способа лечения и типа рака. Аналогично, эффективная концентрация каждого терапевтического агента является разной для различных типов рака при использовании вместе с рекомбинантным белком лектином или по отдельности. Например, согласно настоящему изобретению, в случае клеточных линий рака яичника эффективная синергетическая концентрация рекомбинантного белка лектина составляла от 1 мкг/мл до 20 мкг/мл, причем синергетический эффект не наблюдали для клеточной линии рака молочной железы в концентрации рекомбинантного белка лектина 2,5 мкг/мл даже при использовании паклитаксела в качестве другого терапевтического агента в обоих случаях. Аналогично, эффективные синергетические концентрации паклитаксела для обоих указанных видов рака являются различными. Таким образом, концентрации всех активных агентов варьируются в зависимости от типа рака, и специалистам в данной области техники это хорошо известно.

Авторами настоящего изобретения проведены несколько исследований на разных раковых клеточных линиях для исследования влияния рекомбинантного белка лектина в отдельности и в комбинации с терапевтическими агентами, перечисленными выше, для лечения некоторых видов рака. Авторами настоящего изобретения выбраны гемцитабин и 5-FU для рака поджелудочной железы, паклитаксел и карбоплатин для рака молочной железы, цисплатин и 5-FU для рака полости рта, 5-FU и иринотекан для рака толстой кишки, цисплатин и паклитаксел для рака яичников, и цисплатин и гемцитабин для рака мочевого пузыря.

Лечение или предупреждение может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества лектина. В некоторых вариантах реализации лектин вводят в дозе от 0,1 до 1000 мкг/кг, от 0,5 до 100 мг/кг или от 1 до 50 мг/кг. Специалисты в данной области техники могут определить вводимое количество лектина в соответствии с природой патологического состояния, подлежащего лечению, и субъекта.

Лечение или предупреждение может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества другого терапевтического агента. В некоторых вариантах

реализации другой терапевтический агент вводят в дозе 1-10000 мг на единицу площади поверхности тела (мг/м²), предпочтительно 10-1000 мг/м², предпочтительно 50-600 мг/м². Таким образом, в настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок лектин и фармацевтически приемлемый разбавитель или вспомогательное вещество. Иллюстративные разбавители и вспомогательные вещества включают стерилизованную воду, физиологический солевой раствор и/или фармацевтически приемлемый буфер. Введение лектина или композиции можно осуществлять любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь ими, инъекцию (включая внутривенную (болюс или инфузию), внутриартериальную, интраперитонеальную, подкожную (болюс или инфузию), интравентрикулярную, внутримышечную или субарахноидальную), пероральный прием (например, таблетки, геля, пастилки или жидкости), ингаляцию, местное введение, через слизистую (например, через слизистую полости рта, носовой полости или прямой кишки), посредством доставки в форме спрея, таблетки, трансдермального пластыря, подкожного имплантата или в форме суппозитория. В некоторых вариантах реализации лектин (такой как лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3) или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, вводят субъекту энтерально, парентерально или местно. Лектин или фармацевтическую композицию можно вводить в лекарственной форме, которая является твердой (такой как таблетка или капсула), представляет собой лиофилизированный порошок, жидкость (такую как раствор или суспензия), полутвердое вещество или в любой другой форме, известной специалистам в данной области техники. Лектин или фармацевтическую композицию можно вводить субъекту посредством внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, подкожной или внутривенной инъекции раствора или суспензии, посредством инъекции депо, или ее можно вводить интратекально, трансдермально, сублингвально или пероральным, местным или ингаляционным способом. Субъект может представлять собой млекопитающее. В некоторых вариантах реализации субъектом является человек. В частности, субъект может представлять собой человека, страдающего от рака.

Примеры

Примеры согласно настоящему изобретению демонстрируют действие SEQ ID NO: 1 в отдельности и в комбинации с репрезентативными противораковыми агентами против выбранных раковых клеток. Противораковые агенты, выбранные согласно настоящему изобретению, представляют каждый класс химиотерапевтических агентов, то есть антиметаболиты, алкилирующие антинеопластические агенты, антимицротубулиновые агенты и ингибиторы топоизомеразы I. Так, специалистам в данной области техники понятен тот факт, что любой другой противораковый агент, не включенный в приведенные ниже примеры, но принадлежащий к указанному классу терапевтических агентов,

перечисленных выше, будет демонстрировать аналогичный синергетический эффект при некотором изменении концентрации. Таким образом, примеры, перечисленные ниже, представлены лишь с целью иллюстрации, и они никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

- 5 Клеточные линии, использованные в экспериментах, приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Пример 1: Цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1, гемцитабина и 5-фторурацила (5-FU) по отдельности, а также синергетический цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1 в комбинации с гемцитабином и 5-FU в клетках рака поджелудочной железы (клеточная линия PANC-1)

- 10 Проводили исследование для определения синергетического цитотоксического эффекта SEQ ID NO: 1 в комбинации с химиотерапевтическими агентами, гемцитабином и 5-фторурацилом, в клеточной линии рака поджелудочной железы (PANC-1). Исследование проводили в двух фазах, описанных в примере 1-1 и в примере 1-2.

- 15 Пример 1-1. Измерение значений IC50 гемцитабина и 5-FU в присутствии SEQ ID NO: 1 по цитотоксичности в клеточной линии PANC-1

- Проводили исследование для определения влияния концентрации рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1, на IC50 гемцитабина по цитотоксичности в клетках PANC-1. И наоборот, влияние концентрации гемцитабина на IC50 рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1.

- 20 Аналогично, проводили другое исследование для 5-FU в комбинации с рекомбинантным лектином с SEQ ID NO: 1.

- Клетки выдерживали в контакте с рекомбинантным лектином с SEQ ID NO: 1 и химиотерапевтическим агентом в течение 48 часов и измеряли цитотоксический эффект (процентную цитотоксичность).

- 25 Цитотоксический эффект определяли общеизвестным колориметрическим анализом MTT (Mossmann, T. 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays Journal of Immunological Methods, том 65, сс. 55-63) для анализа метаболической активности клеток.

- 30 На основании данных процентной цитотоксичности определяли значения IC50, используя программное обеспечение GraphPad Prism версии 4.01. Определённые значения IC50 представлены ниже в таблице 1 и в таблице 2.

Таблица 1: Значения IC50 SEQ ID NO: 1 и гемцитабина по отдельности и в комбинации в отношении цитотоксичности в клеточной линии PANC-1

Концентрация гемцитабина (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ гемцитабина (мкМ)
0	25,060	0	7,407
0,01	55,490	2,5	15,940
0,1	19,450	5	10,790
1	14,130	10	3,036
5	12,230	20	0,039
25	2,044	40	0,038
50	0,917	80	10,610

Таблица 2: Значения IC50 SEQ ID NO: 1 и 5-фторурацила (5-FU) по отдельности и в комбинации против клеточной линии PANC-1

Концентрация 5-FU (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ 5-FU (мкМ)
0	24,630	0	86,99
0,1	686,900	2,5	296,80
1	22,490	5	1,409
10	6,842	10	1,257
50	1,690	20	0,869
100	1,070	40	8,454
250	0,098	80	0,725

5

Таблицы 1 и 2 относятся к IC50 для SEQ ID NO: 1 в отдельности или в комбинации с гемцитабином или 5-FU. Наблюдали, что IC50 в отношении клеток рака поджелудочной железы была существенно снижена при использовании рекомбинантного белка лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 в комбинации с гемцитабином или 5-фторурацилом (5-FU).

10

Пример 1-2. Расчет значений CI для гемцитабина и 5-FU с SEQ ID NO: 1

В дополнительном исследовании клетки PANC-1 обрабатывали гемцитабином (0,01 мкМ – 50 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл) в течение 48 часов. Цитотоксический эффект каждой комбинации определяли анализом MTT. Таким же образом другую группу клеток обрабатывали 5-FU (0,1 мкМ – 250 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл).

15

Используя такой же способ, как в примере 1-1, измеряли значение IC50 для гемцитабина при данной концентрации рекомбинантного лектина с SEQ ID NO: 1 и определяли значение IC50 для рекомбинантного лектина с SEQ ID NO: 1 при данной концентрации гемцитабина.

Измеряли также значение IC50 для гемцитабина и рекомбинантного лектина с SEQ ID NO: 1 по отдельности. То же самое осуществляли с использованием 5-FU вместо гемцитабина. Для каждой комбинации концентраций лекарственных соединений определяли значения показателя аддитивности (CI). Значения CI рассчитывали на основании значений IC50, используя формулу, приведенную ниже.

$$CI = \frac{DA_{50}}{ICA_{50}} + \frac{DB_{50}}{ICB_{50}} + \frac{DA_{50} \times DB_{50}}{ICA_{50} \times ICB_{50}}$$

где,

DA(50) = концентрация лекарственного агента А в комбинации с В для обеспечения 50% цитотоксичности

ICA(50) = концентрация лекарственного агента А в отдельности для обеспечения 50% цитотоксичности

DB(50) = концентрация лекарственного агента В в комбинации с А для обеспечения 50% цитотоксичности

ICB(50) = концентрация лекарственного агента В в отдельности для обеспечения 50% цитотоксичности

Причем лекарственное соединение А представляет собой SEQ ID NO: 1, и лекарственное соединение В представляет собой другой терапевтический агент.

Синергию, аддитивный эффект или антагонизм определяли по следующим критериям:

CI > 1 – означает антагонизм

CI = 1 – означает аддитивный эффект

CI < 1 – означает синергию.

Результаты расчетов показателя аддитивности для исследования комбинации SEQ ID NO: 1 с гемцитабином и 5-FU против клеточной линии PANC-1 представлены в следующей таблице.

Таблица 3: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и гемцитабина через 48 часов в клеточной линии PANC-1

		Концентрация гемцитабина (мкМ)					
		0,01	0,1	1	5	25	50
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	2,5	9,131	6,897	3,532	2,231	2,231	6,819
	5	4,598	3,363	1,504	<u>0,786</u>	<u>0,785</u>	3,320
	10	3,929	2,842	1,205	<u>0,572</u>	<u>0,572</u>	2,804
	20	3,690	2,656	1,098	<u>0,496</u>	<u>0,496</u>	2,620
	40	2,409	1,657	<u>0,525</u>	<u>0,087</u>	<u>0,087</u>	1,631
	80	2,267	1,547	<u>0,461</u>	<u>0,042</u>	<u>0,042</u>	1,521

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для обеих комбинаций против линии клеток поджелудочной железы, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. $CI < 1$), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и гемцитабина эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:

5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 5 мкМ и 25 мкМ гемцитабина;

40 мкг/мл и 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 1 мкМ, 5 мкМ и 25 мкМ гемцитабина.

Антагонизм наблюдали при всех концентрациях SEQ ID NO: 1 с 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 50 мкМ гемцитабина. При 2,5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 наблюдали антагонизм для всех концентраций гемцитабина. Антагонизм также наблюдали для 5 мкг/мл и 10 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 1 мкМ гемцитабина.

Аддитивный эффект наблюдали при 20 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 1 мкМ гемцитабина.

Таблица 4: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и 5-FU против клеточной линии PANC-1

		Концентрация 5-FU (мкМ)					
		0,1	1	10	50	100	250
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	2,5	126,454	28,357	28,306	28,177	30,696	28,129
	5	7,440	<u>0,944</u>	<u>0,941</u>	<u>0,932</u>	1,099	<u>0,929</u>
	10	4,637	<u>0,298</u>	<u>0,296</u>	<u>0,291</u>	<u>0,402</u>	<u>0,288</u>
	20	3,715	<u>0,086</u>	<u>0,084</u>	<u>0,079</u>	<u>0,172</u>	<u>0,078</u>
	40	3,604	<u>0,060</u>	<u>0,059</u>	<u>0,054</u>	<u>0,145</u>	<u>0,052</u>
	80	3,429	<u>0,020</u>	<u>0,018</u>	<u>0,014</u>	<u>0,102</u>	<u>0,012</u>

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для обеих комбинаций против панкреатической клеточной линии, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект, подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и 5-FU эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:

2,5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 1 мкМ – 50 мкМ и 250 мкМ 5-FU;

10 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 1 мкМ – 250 мкМ 5-FU.

Антагонизм наблюдали при низких концентрациях обоих соединений, SEQ ID NO: 1 и 5-FU. Аддитивный эффект наблюдали при 5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 100 мкМ 5-FU.

Результаты, представленные в таблицах 1 – 4, свидетельствуют о том, что SEQ ID NO: 1 демонстрирует синергетический эффект в комбинации с гемцитабином и 5-фторурацилом. Указанные комбинации были весьма эффективными для ингибирования роста раковых

клеток. Используемая концентрация SEQ ID NO: 1 составила от примерно 2,5 мкг/мл до примерно 80 мкг/мл. Концентрацию другого терапевтического агента(ов), т.е. отличного от SEQ ID NO: 1, согласно настоящему изобретению, составила от 1 мкМ до примерно 250 мкМ.

5

Пример 2: Цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1, паклитаксела и карбоплатина по отдельности, синергетический цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1 в комбинации с паклитакселом и карбоплатином в отношении клеток рака молочной железы (клеточная линия MDA-MB-231)

10 Проводили исследование для определения синергетического цитотоксического эффекта SEQ ID NO: 1 в комбинации с химиотерапевтическими агентами, паклитакселом и карбоплатином, в клеточной линии рака молочной железы (MDA-MB-231). Исследование проводили в двух фазах, описанных в примере 2-1 и в примере 2-2.

Пример 2-1. Измерение значений IC₅₀ для клеток MDA-MB-231 паклитаксела и карбоплатина в присутствии SEQ ID NO: 1

15

Проводили исследование для определения влияния концентрации рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1, на IC₅₀ паклитаксела по цитотоксичности в клетках MDA-MB-231. И наоборот, влияние концентрации паклитаксела на IC₅₀ рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1.

20 Аналогично, проводили другое исследование для карбоплатина в комбинации с рекомбинантным лектином с SEQ ID NO: 1.

Исследование проводили с помощью такой же технологии, как в примере 1-1. Определённые значения IC₅₀ представлены ниже в таблице 5 и в таблице 6.

Таблица 5: Значения IC₅₀ SEQ ID NO: 1 и паклитаксела по отдельности и в комбинации против клеточной линии MDA-MB-231.

25

Концентрация паклитаксела (нМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)
0	19,800
0,001	25,370
0,01	21,220
0,1	13,700
1	8,720
5	5,775
10	2,248

Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ паклитаксела (нМ)
0	1,638
2,5	3,980
5	9,307
10	0,389
20	0,123
40	3,56 x 10 ⁻⁵
80	5,75 x 10 ⁻¹⁰

Таблица 6: Значения IC50 SEQ ID NO: 1 и карбоплатина по отдельности и в комбинации против клеточной линии MDA-MB-231.

Концентрация карбоплатина (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ карбоплатина (мкМ)
0	14,310	0	477,100
10	7,188	2,5	226,100
50	3,584	5	3,985
100	4,290	10	4,925
200	2,073	20	8,444
500	0,523	40	1,421
1000	0,044	80	5,874

Таблицы 5 и 6 относятся к IC50 для SEQ ID NO: 1 в отдельности и в комбинации с паклитакселом или карбоплатином. Наблюдали, что IC50 против клеток рака молочной железы была существенно снижена при использовании SEQ ID NO: 1 в комбинации с паклитакселом или карбоплатином.

Пример 2-2. Расчет значений CI для паклитаксела и карбоплатина с SEQ ID NO: 1

В дополнительном исследовании клетки MDA-MB-231 обрабатывали паклитакселом (0,001 нМ – 10 нМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл) в течение 48 часов. Таким же образом другую группу клеток обрабатывали карбоплатином (10 мкМ – 1000 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл). Определяли значения показателя аддитивности для каждой комбинации лекарственных агентов, и определяли достигнутый антагонистический, аддитивный или синергетический эффект, как описано в примере 1-2. Результаты представлены в следующей таблице.

Таблица 7: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и паклитаксела против клеточной линии MDA-MB-231.

		Концентрация паклитаксела (нМ)					
		0,001	0,01	0,1	1	5	10
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	2,5	6,824	14,244	1,823	1,453	1,281	1,281
	5	6,106	12,843	1,564	1,227	1,072	1,072
	10	4,803	10,305	1,094	<u>0,819</u>	<u>0,692</u>	<u>0,692</u>
	20	3,940	8,625	<u>0,782</u>	<u>0,549</u>	<u>0,440</u>	<u>0,440</u>
	40	3,430	7,631	<u>0,598</u>	<u>0,389</u>	<u>0,292</u>	<u>0,292</u>
	80	2,819	6,441	<u>0,378</u>	<u>0,197</u>	<u>0,114</u>	<u>0,114</u>

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для обеих комбинаций против клеточной линии рака молочной железы, как показано в

представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. $CI < 1$), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и паклитаксела эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:

5 10 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 1 нМ – 10 нМ паклитаксела;

20 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,1 нМ паклитаксела.

Антагонизм наблюдали при низких концентрациях обоих соединений, SEQ ID NO: 1 (2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл) и паклитаксела (0,001 нМ и 0,01 нМ).

Аддитивный эффект наблюдали при 5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 5 нМ и 10 нМ паклитаксела и

10 10 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,1 нМ паклитаксела.

Таблица 8: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и карбоплатина против клеточной линии MDA-MB-231.

		Концентрация карбоплатина (мкМ)					
		10	50	100	200	500	1000
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	2,5	2,005	1,214	<u>0,515</u>	<u>0,518</u>	<u>0,529</u>	<u>0,507</u>
	5	1,501	<u>0,843</u>	<u>0,261</u>	<u>0,263</u>	<u>0,273</u>	<u>0,254</u>
	10	1,600	<u>0,916</u>	<u>0,311</u>	<u>0,313</u>	<u>0,323</u>	<u>0,304</u>
	20	1,290	<u>0,687</u>	<u>0,154</u>	<u>0,157</u>	<u>0,165</u>	<u>0,148</u>
	40	1,073	<u>0,528</u>	<u>0,045</u>	<u>0,047</u>	<u>0,055</u>	<u>0,040</u>
	80	1,006	<u>0,478</u>	<u>0,011</u>	<u>0,013</u>	<u>0,021</u>	<u>0,006</u>

Наблюдала синергию для обеих комбинаций против клеточной линии рака молочной железы, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. $CI < 1$), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и карбоплатина эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:

2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 100 мкМ – 1000 мкМ карбоплатина;

20 5 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 50 мкМ карбоплатина.

Антагонизм наблюдали при 2,5 мкг/мл – 20 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 10 мкМ карбоплатина.

Антагонизм также наблюдали при 2,5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 50 мкМ карбоплатина.

Аддитивный эффект наблюдали при 40 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 10 мкМ карбоплатина.

25 Полученные результаты свидетельствуют о том, что SEQ ID NO: 1 демонстрирует синергетический эффект в комбинации с паклитакселом или карбоплатином.

Пример 3: Цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1, 5-FU и цисплатина по отдельности, синергетический цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1 в комбинации с 5-FU и цисплатином в клетках рака полости рта (клеточная линия KB).

Проводили исследование для определения синергетического цитотоксического эффекта SEQ ID NO: 1 в комбинации с химиотерапевтическими агентами, 5-FU и цисплатином, в клеточной линии рака полости рта (клеточная линия KB). Исследование проводили в двух фазах, описанных в примере 3-1 и в примере 3-2.

Пример 3-1. Измерение значений IC₅₀ для клеток KB 5-FU и цисплатина в присутствии SEQ ID NO: 1

Проводили исследование для определения влияния концентрации рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1, на IC₅₀ 5-FU по цитотоксичности в клетках KB. И наоборот, влияние концентрации 5-FU на IC₅₀ рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1.

Аналогично, проводили другое исследование для цисплатина в комбинации с рекомбинантным лектином с SEQ ID NO: 1.

Исследование проводили с помощью такой же технологии, как в примере 1-1. Определённые значения IC₅₀ представлены ниже в таблице 9 и в таблице 10.

Таблица 9: Значения IC₅₀ SEQ ID NO: 1 и 5-FU по отдельности и в комбинации против клеточной линии KB

Концентрация 5-FU (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ 5-FU (мкМ)
0	17,3800	0	0,01498
0,01	0,5800	5	0,00010
0,1	0,9080	10	5,31 × 10 ⁻⁶
0,25	0,5010	20	1,34 × 10 ⁻⁵
0,5	0,1141	30	1,19 × 10 ⁻⁶
1	0,0555	40	5,22 × 10 ⁻¹¹
5	0,0871	90	1,40 × 10 ⁻⁸

Таблица 10: Значения IC50 SEQ ID NO: 1 и цисплатина по отдельности и в комбинации против клеточной линии KB

Концентрация цисплатина (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ цисплатина (мкМ)
0	38,110	0	0,72200
0,1	21,190	5	0,37490
0,25	11,240	10	0,26880
0,5	2,694	20	0,13390
0,75	0,597	30	0,06616
1,0	0,316	40	0,00712
1,5	0,303	90	0,00993

Таблицы 9 и 10 относятся к IC50 для SEQ ID NO: 1 в отдельности и в комбинации с 5-FU или цисплатином. Наблюдали, что IC50 против клеток рака полости рта была существенно снижена при использовании SEQ ID NO: 1 в комбинации с 5-FU и цисплатином.

Пример 3-2. Расчет значений CI для 5-FU и цисплатина с SEQ ID NO: 1

В дополнительном исследовании клетки KB обрабатывали 5-FU (0,01 мкМ – 5,0 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (5,0 мкг/мл – 90 мкг/мл) в течение 48 часов. Таким же образом другую группу клеток обрабатывали цисплатином (0,1 мкМ – 1,5 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (5,0 мкг/мл – 90 мкг/мл). Определяли значения показателя аддитивности для каждой комбинации лекарственных агентов, и определяли достигнутый антагонистический, аддитивный или синергетический эффект, как описано в примере 1-2.

Результаты представлены в следующей таблице.

Таблица 11: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и 5-FU против клеточной линии KB

		Концентрация 5-FU (мкМ)					
		0,01	0,1	0,25	0,5	1	5
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	5	<u>0,0406</u>	<u>0,0338</u>	<u>0,0343</u>	<u>0,0335</u>	<u>0,0334</u>	<u>0,0334</u>
	10	<u>0,0596</u>	<u>0,0526</u>	<u>0,0532</u>	<u>0,0523</u>	<u>0,0522</u>	<u>0,0522</u>
	20	<u>0,0360</u>	<u>0,0292</u>	<u>0,0297</u>	<u>0,0289</u>	<u>0,0288</u>	<u>0,0288</u>
	30	<u>0,0136</u>	<u>0,0069</u>	<u>0,0075</u>	<u>0,0066</u>	<u>0,0066</u>	<u>0,0066</u>
	40	<u>0,0102</u>	<u>0,0035</u>	<u>0,0041</u>	<u>0,0033</u>	<u>0,0032</u>	<u>0,0032</u>
	90	<u>0,0120</u>	<u>0,0054</u>	<u>0,0059</u>	<u>0,0051</u>	<u>0,0050</u>	<u>0,0050</u>

Таблица 12: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и цисплатина против клеточной линии KB

		Концентрация цисплатина (мкМ)					
		0,1	0,25	0,5	0,75	1	1,5
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	5	1,364	1,135	<u>0,845</u>	<u>0,699</u>	<u>0,571</u>	<u>0,577</u>
	10	<u>0,967</u>	<u>0,777</u>	<u>0,535</u>	<u>0,414</u>	<u>0,308</u>	<u>0,313</u>
	20	<u>0,627</u>	<u>0,469</u>	<u>0,269</u>	<u>0,169</u>	<u>0,081</u>	<u>0,085</u>
	30	<u>0,543</u>	<u>0,394</u>	<u>0,204</u>	<u>0,109</u>	<u>0,026</u>	<u>0,030</u>
	40	<u>0,532</u>	<u>0,384</u>	<u>0,195</u>	<u>0,101</u>	<u>0,018</u>	<u>0,022</u>
	90	<u>0,531</u>	<u>0,383</u>	<u>0,195</u>	<u>0,100</u>	<u>0,018</u>	<u>0,022</u>

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для обеих комбинаций против клеточной линии KB, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. CI < 1), подчеркнуты. Комбинация SEQ ID NO: 1 и 5-FU демонстрировала синергию при всех исследованных концентрациях (SEQ ID NO: 1 – от 5,0 мкг/мл до 90 мкг/мл и 5-FU – от 0,01 мкМ до 5 мкМ). При этом для комбинации SEQ ID NO: 1 и цисплатина синергию наблюдали при концентрациях:

10 мкг/мл – 90 мкг/мл SEQ ID NO: 1 и от 0,1 мкМ до 1,5 мкМ цисплатина, и 5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 и от 0,5 мкМ до 1,5 мкМ цисплатина.

Антагонизм наблюдали при низких концентрациях обоих соединений, SEQ ID NO: 1 и цисплатина.

Пример 4: Цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1, 5-FU и иринотекана по отдельности, синергетический цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1 в комбинации с 5-FU и иринотеканом в клетках рака толстой кишки (клеточная линия HT-29):

Проводили исследование для определения синергетического цитотоксического эффекта SEQ ID NO: 1 в комбинации с химиотерапевтическими агентами, 5-FU и иринотеканом, в клеточной линии рака толстой кишки (HT-29). Исследование проводили в двух фазах, описанных в примере 4-1 и в примере 4-2.

Пример 4-1. Измерение значений IC50 для клеток HT-29 5-FU и иринотекана в присутствии SEQ ID NO: 1

Проводили исследование для определения влияния концентрации рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1, на IC50 5-FU по цитотоксичности в клетках HT-29. И наоборот, влияние концентрации 5-FU на IC50 рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1.

Аналогично, проводили другое исследование для иринотекана в комбинации с рекомбинантным лектином с SEQ ID NO: 1.

Исследование проводили с помощью такой же технологии, как в примере 1-1. Определённые значения IC50 представлены ниже в таблице 13 и в таблице 14.

Таблица 13: IC50 SEQ ID NO: 1 и 5-FU по отдельности и в комбинации против клеточной линии HT-29

Концентрация 5-FU (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)
0	25,470
5	22,990
10	6,374
50	1,667
100	1,387
150	1,216
200	1,334

Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ 5-FU (мкМ)
0	137,300
1	172,600
5	25,860
10	4,513
20	0,282
40	1,241
80	4,884

5

Таблица 14: IC50 SEQ ID NO: 1 и иринотекана по отдельности и в комбинации против клеточной линии HT-29

Концентрация иринотекана (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)
0	18,320
0,1	73,480
1	36,280
5	23,520
10	9,995
25	8,258
50	1,395

Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ иринотекана (мкМ)
0	16,200
1	49,240
5	2,779
10	5,449
20	1,338
40	0,278
80	0,167

Таблицы 13 и 14 относятся к IC50 для SEQ ID NO: 1 в отдельности и в комбинации с 5-FU или иринотеканом. Наблюдали, что IC50 против клеток рака толстой кишки была существенно снижена при использовании SEQ ID NO: 1 в комбинации с 5-FU и иринотеканом.

Пример 4-2. Расчет значений CI для 5-FU и иринотекана с SEQ ID NO: 1

В дополнительном исследовании клетки HT-29 обрабатывали 5-FU (5 мкМ – 200 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (1 мкг/мл – 80 мкг/мл) в течение 48 часов. Таким же образом другую группу клеток обрабатывали иринотеканом (0,1 мкМ – 50 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (1 мкг/мл – 80 мкг/мл). Определяли значения показателя аддитивности для каждой комбинации лекарственных агентов, и определяли достигнутый антагонистический,

15

аддитивный или синергетический эффект, как описано в примере 1-2. Результаты представлены в следующей таблице.

Таблица 15: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и 5-FU против клеточной линии HT-29

		Концентрация 5-FU (мкМ)					
		5	10	50	100	150	200
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	1	3,294	1,261	<u>0,965</u>	<u>0,907</u>	<u>0,920</u>	<u>0,970</u>
	5	1,822	<u>0,486</u>	<u>0,291</u>	<u>0,253</u>	<u>0,262</u>	<u>0,295</u>
	10	1,405	<u>0,266</u>	<u>0,100</u>	<u>0,068</u>	<u>0,075</u>	<u>0,103</u>
	20	1,380	<u>0,253</u>	<u>0,089</u>	<u>0,057</u>	<u>0,064</u>	<u>0,092</u>
	40	1,365	<u>0,245</u>	<u>0,082</u>	<u>0,050</u>	<u>0,057</u>	<u>0,085</u>
	80	1,375	<u>0,251</u>	<u>0,087</u>	<u>0,055</u>	<u>0,0619</u>	<u>0,0898</u>

5

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для обеих комбинаций против клеточной линии рака толстой кишки, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. CI < 1), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и 5-FU эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:

10

5 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с концентрацией 5-FU 10 мкМ – 200 мкМ;

1 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с концентрацией 5-FU 50 мкМ – 200 мкМ.

Антагонизм наблюдали при всех концентрациях SEQ ID NO: 1 с концентрацией 5-FU 5 мкМ и для комбинации, содержащей 1 мкг/мл SEQ ID NO: 1 и 5-FU в концентрации 10 мкМ.

15

Таблица 16: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и иринотекана против клеточной линии HT-29

		Концентрация иринотекана (мкМ)					
		0,1	1	5	10	25	50
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	1	19,321	4,894	5,723	4,446	4,117	4,082
	5	11,039	2,492	2,983	2,227	2,031	2,011
	10	8,226	1,676	2,052	1,472	1,323	1,307
	20	5,243	<u>0,811</u>	1,065	<u>0,673</u>	<u>0,572</u>	<u>0,562</u>
	40	4,860	<u>0,700</u>	<u>0,939</u>	<u>0,571</u>	<u>0,476</u>	<u>0,466</u>
	80	3,347	<u>0,261</u>	<u>0,438</u>	<u>0,165</u>	<u>0,095</u>	<u>0,087</u>

20

Наблюдали синергетический эффект для обеих комбинаций против клеточной линии рака толстой кишки, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. CI < 1), подчеркнуты. Для

комбинации SEQ ID NO: 1 и иринотекана эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1: 20 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с концентрацией иринотекана 1 мкМ – 50 мкМ (кроме 5 мкМ).

- 5 Антагонизм наблюдали для SEQ ID NO: 1 в концентрации 1 мкг/мл – 80 мкг/мл с 0,1 мкМ иринотекана и в концентрации 1 мкг/мл – 10 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,01 – 50 мкМ иринотекана.

Аддитивный эффект наблюдали при 20 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 5 мкМ иринотекана.

- 10 **Пример 5: Цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1, цисплатина и паклитаксела по отдельности, синергетический цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1 в комбинации с цисплатином и паклитакселом в клеточной линии рака яичника (клеточная линия PA-1):**

- Проводили исследование для определения синергетического цитотоксического эффекта SEQ ID NO: 1 в комбинации с химиотерапевтическими агентами, цисплатином и паклитакселом, в клеточной линии рака яичника (клеточная линия PA-1). Исследование проводили в двух фазах, описанных в примере 5-1 и в примере 5-2.

Пример 5-1. Измерение значений IC50 цисплатина и паклитаксела в присутствии SEQ ID NO: 1 по цитотоксичности в клеточной линии PA-1

- 20 Проводили исследование для определения влияния концентрации рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1, на IC50 цисплатина по цитотоксичности в клетках MDA-MB-231. И наоборот, влияние концентрации цисплатина на IC50 рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1.

- Аналогично, проводили другое исследование для паклитаксела в комбинации с рекомбинантным лектином с SEQ ID NO: 1.

- 25 Исследование проводили с помощью такой же технологии, как в примере 1-1. Определённые значения IC50 представлены ниже в таблице 17 и в таблице 18.

Таблица 17: IC50 SEQ ID NO: 1 и цисплатина по отдельности и в комбинации против клеточной линии PA-1

Концентрация цисплатина (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)
0	12,070
0,01	8,520
0,1	6,033
0,25	4,455
0,5	0,912
1	0,321
5	0,0036

Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ цисплатина (мкМ)
0	0,08566
1	0,716
2,5	0,314
5	0,093
10	0,0042
15	0,0005
20	0,0001

Таблица 18: IC50 SEQ ID NO: 1 и паклитаксела по отдельности и в комбинации против клеточной линии PA-1

5

Концентрация паклитаксела (нМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)
0	8,822
0,01	5,794
0,1	6,545
0,25	4,893
0,5	3,917
1	3,031
5	0,709

Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ паклитаксела (нМ)
0	4,044
1	3,622
2,5	3,478
5	0,222
10	5,37 × 10 ⁻⁴
15	4,13 × 10 ⁻⁶
20	1,02 × 10 ⁻⁶

Таблицы 17 и 18 относятся к значениям IC50 для SEQ ID NO: 1 в отдельности и в комбинации с цисплатином или паклитакселом. Наблюдали, что IC50 против клеток рака яичника была существенно снижена при использовании SEQ ID NO: 1 в комбинации с цисплатином или паклитакселом.

10

Пример 5-2. Расчет значений CI для цисплатина и паклитаксела с SEQ ID NO: 1

В дополнительном исследовании клетки PA-1 обрабатывали цисплатином (0,01 мкМ – 5 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (1 мкг/мл – 20 мкг/мл) в течение 48 часов. Таким же образом другую группу клеток обрабатывали паклитакселом (0,01 нМ – 5 нМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (1 мкг/мл – 20 мкг/мл). Определяли значения показателя аддитивности для каждой комбинации лекарственных агентов, и определяли достигнутый антагонистический, аддитивный или синергетический эффект, как описано в примере 1-2. Результаты представлены в следующей таблице.

15

Таблица 19: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и цисплатина против клеточной линии PA-1

		Концентрация цисплатина (мкМ)					
		0,01	0,1	0,25	0,5	1	5
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	1	2,131	1,330	<u>0,891</u>	<u>0,714</u>	<u>0,707</u>	<u>0,706</u>
	2,5	1,753	1,049	<u>0,663</u>	<u>0,507</u>	<u>0,501</u>	<u>0,500</u>
	5	1,513	<u>0,870</u>	<u>0,518</u>	<u>0,376</u>	<u>0,370</u>	<u>0,369</u>
	10	<u>0,974</u>	<u>0,469</u>	<u>0,192</u>	<u>0,081</u>	<u>0,076</u>	<u>0,076</u>
	15	<u>0,884</u>	<u>0,402</u>	<u>0,138</u>	<u>0,032</u>	<u>0,027</u>	<u>0,027</u>
	20	<u>0,836</u>	<u>0,367</u>	<u>0,109</u>	<u>0,005</u>	<u>0,0009</u>	<u>0,0004</u>

- В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для
- 5 обеих комбинаций против клеточной линии рака яичника, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. CI < 1), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и цисплатина эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:
- 10 для всех испытанных концентраций (от 1 мкг/мл до 20 мкг/мл) SEQ ID NO: 1 с 0,25 мкМ – 5 мкМ цисплатина;
- 5 мкг/мл – 20 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,1 мкМ цисплатина;
- 10 мкг/мл – 20 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,01 мкМ цисплатина.
- Антагонизм наблюдали при 1 мкг/мл – 5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,01 мкМ цисплатина.
- 15 Антагонизм наблюдали при 1 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,1 мкМ цисплатина.
- Аддитивный эффект наблюдали при 2,5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,1 мкМ цисплатина.

Таблица 20: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и паклитаксела против клеточной линии PA-1

		Концентрация паклитаксела (нМ)					
		0,01	0,1	0,25	0,5	1	5
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	1	2,141	2,082	<u>0,748</u>	<u>0,657</u>	<u>0,657</u>	<u>0,657</u>
	2,5	2,302	2,240	<u>0,838</u>	<u>0,742</u>	<u>0,742</u>	<u>0,742</u>
	5	1,947	1,892	<u>0,640</u>	<u>0,555</u>	<u>0,555</u>	<u>0,555</u>
	10	1,737	1,686	<u>0,523</u>	<u>0,444</u>	<u>0,444</u>	<u>0,444</u>
	15	1,547	1,499	<u>0,417</u>	<u>0,344</u>	<u>0,344</u>	<u>0,344</u>
	20	1,048	1,009	<u>0,140</u>	<u>0,080</u>	<u>0,0803</u>	<u>0,0803</u>

- 20 В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для обеих комбинаций против клеточной линии рака яичника, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект

(т.е. $CI < 1$), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и паклитаксела эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:

5 для всех испытанных концентраций (от 1 мкг/мл до 20 мкг/мл) SEQ ID NO: 1 с 0,25 нМ – 5 нМ паклитаксела.

Антагонизм наблюдали при 1 мкг/мл – 15 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,01 нМ – 0,1 нМ паклитаксела. Аддитивный эффект наблюдали при 20 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 0,01 нМ – 0,1 нМ паклитаксела.

10 Полученные результаты свидетельствуют о том, что SEQ ID NO: 1 демонстрирует синергетический эффект в комбинации с цисплатином или паклитакселем.

Пример 6: Цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1, цисплатина и гемцитабина по отдельности, синергетический цитотоксический эффект SEQ ID NO: 1 в комбинации с цисплатином и гемцитабином в клеточной линии рака мочевого пузыря (клеточная линия T24):

15 Проводили исследование для определения синергетического цитотоксического эффекта SEQ ID NO: 1 в комбинации с химиотерапевтическими агентами, цисплатином и гемцитабином, в клеточной линии рака мочевого пузыря (клеточная линия T24). Исследование проводили в двух фазах, описанных в примере 6-1 и в примере 6-2.

20 Пример 6-1. Измерение значений IC50 цисплатина и гемцитабина для клеток T24 в присутствии SEQ ID NO: 1

Проводили исследование для определения влияния концентрации рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1, на IC50 цисплатина по цитотоксичности в клетках T24. И наоборот, влияние концентрации цисплатина на IC50 рекомбинантного лектина, представленного SEQ ID NO: 1.

25 Аналогично, проводили другое исследование для гемцитабина в комбинации с рекомбинантным лектином с SEQ ID NO: 1.

Исследование проводили с помощью такой же технологии, как в примере 1-1. Определённые значения IC50 представлены ниже в таблице 21 и в таблице 22.

Таблица 21: IC50 SEQ ID NO: 1 и цисплатина по отдельности и в комбинации против клеточной линии T24

Концентрация цисплатина (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ цисплатина (мкМ)
0	11,470	0	39,020
1	11,460	2,5	22,870
10	2,375	5	3,79500
25	1,062	10	0,09708
50	1,081	20	0,03436
100	0,944	40	0,08363
500	0,716	80	0,01342

Таблица 22: IC50 SEQ ID NO: 1 и гемцитабина по отдельности и в комбинации против клеточной линии T24

5

Концентрация гемцитабина (мкМ)	IC ₅₀ SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	IC ₅₀ гемцитабина (мкМ)
0	10,350	0	15,420
1	2,242	2,5	0,802
10	0,892	5	0,14090
50	0,626	10	0,00032
100	0,155	20	0,00002
200	0,149	40	6,05 x 10 ⁻¹⁹
300	0,029	80	7,18 x 10 ⁻¹⁰

Таблицы 21 и 22 относятся к IC50 для SEQ ID NO: 1 в отдельности и в комбинации с цисплатином и гемцитабином. Значения IC50 против клеток рака мочевого пузыря были существенно снижены при использовании SEQ ID NO: 1 в комбинации с цисплатином и гемцитабином.

10

Пример 6-2. Расчет значений CI для цисплатина и гемцитабина с SEQ ID NO: 1

В дополнительном исследовании клетки T24 обрабатывали цисплатином (1 мкМ – 500 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл) в течение 48 часов. Таким же образом другую группу клеток обрабатывали гемцитабином (1 мкМ – 300 мкМ) в комбинации с SEQ ID NO: 1 (2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл). Определяли значения показателя аддитивности для каждой комбинации лекарственных агентов, и определяли достигнутый антагонистический, аддитивный или синергетический эффект, как описано в примере 1-2. Результаты представлены в следующей таблице.

15

Таблица 23: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и цисплатина против клеточной линии T24

		Концентрация цисплатина (мкМ)					
		1	10	25	50	100	500
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	2,5	2,171	1,194	1,004	1,001	1,003	1,000
	5	<u>0,915</u>	<u>0,324</u>	<u>0,210</u>	<u>0,208</u>	<u>0,210</u>	<u>0,207</u>
	10	<u>0,733</u>	<u>0,199</u>	<u>0,095</u>	<u>0,094</u>	<u>0,095</u>	<u>0,093</u>
	20	<u>0,736</u>	<u>0,201</u>	<u>0,097</u>	<u>0,095</u>	<u>0,097</u>	<u>0,095</u>
	40	<u>0,717</u>	<u>0,188</u>	<u>0,085</u>	<u>0,083</u>	<u>0,085</u>	<u>0,083</u>
	80	<u>0,685</u>	<u>0,166</u>	<u>0,065</u>	<u>0,063</u>	<u>0,065</u>	<u>0,063</u>

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, наблюдали синергию для обеих комбинаций против клеточной линии рака мочевого пузыря, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. CI < 1), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и цисплатина эффективную концентрацию с точки зрения синергетического цитотоксического эффекта наблюдали для концентрации SEQ ID NO: 1:

5 мкг/мл – 80 мкг/мл SEQ ID NO: 1 со всеми испытанными концентрациями (1 мкМ – 500 мкМ) цисплатина.

Антагонизм наблюдали при 2,5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 1 мкМ и 10 мкМ цисплатина.

Аддитивный эффект наблюдали при 2,5 мкг/мл SEQ ID NO: 1 с 25 мкМ – 500 мкМ цисплатина.

Таблица 24: Значения CI для комбинации SEQ ID NO: 1 и гемцитабина против клеточной линии T24

		Концентрация гемцитабина (мкМ)					
		1	10	50	100	200	300
Концентрация SEQ ID NO: 1 (мкг/мл)	2,5	<u>0,280</u>	<u>0,228</u>	<u>0,217</u>	<u>0,217</u>	<u>0,217</u>	<u>0,217</u>
	5	<u>0,143</u>	<u>0,096</u>	<u>0,086</u>	<u>0,086</u>	<u>0,086</u>	<u>0,086</u>
	10	<u>0,116</u>	<u>0,070</u>	<u>0,061</u>	<u>0,060</u>	<u>0,060</u>	<u>0,060</u>
	20	<u>0,068</u>	<u>0,024</u>	<u>0,015</u>	<u>0,015</u>	<u>0,015</u>	<u>0,015</u>
	40	<u>0,067</u>	<u>0,024</u>	<u>0,014</u>	<u>0,014</u>	<u>0,014</u>	<u>0,014</u>
	80	<u>0,055</u>	<u>0,012</u>	<u>0,003</u>	<u>0,003</u>	<u>0,003</u>	<u>0,003</u>

Наблюдали синергию для обеих комбинаций против клеточной линии рака мочевого пузыря, как показано в представленной выше таблице. Пары концентраций, который демонстрировали синергетический эффект (т.е. CI < 1), подчеркнуты. Для комбинации SEQ ID NO: 1 и гемцитабина синергетический цитотоксический эффект наблюдали при всех концентрациях (2,5 мкМ – 80 мкМ SEQ ID NO: 1 с 1 мкМ – 300 мкМ гемцитабина).

Обобщение примеров

Обзор концентраций, при которых наблюдали синергию в испытанных клеточных линиях согласно настоящему изобретению, обобщенно представлен в следующей таблице:

Таблица 25. Концентрации SEQ ID NO: 1 в комбинации с другими терапевтическими агентами, продемонстрировавшие синергетический эффект в клеточных линиях рака полости рта, толстой кишки, яичника и мочевого пузыря.

Рак	Клеточные линии	Терапевтические агенты	Концентрация SEQ ID NO: 1	Концентрация других терапевтических агентов
Поджелудочной железы	PANC-1	Гемцитабин	5 – 20 мкг/мл	5 мкМ – 25 мкМ
			40 – 80 мкг/мл	1 мкМ – 25 мкМ
		5-FU	10 – 80 мкг/мл	1 мкМ – 250 мкМ
			5 мкг/мл	1 – 50 мкМ и 250 мкМ
Молочной железы	MDA-MB-231	Паклитаксел	20 – 80 мкг/мл	0,1 нМ – 10 нМ
			10 мкг/мл	1 нМ – 10 нМ
		Карбоплатин	5 – 80 мкг/мл	50 мкМ – 1000 мкМ
			2,5 мкг/мл	100 мкМ – 1000 мкМ
Полости рта	KB	5-FU	5 – 90 мкг/мл	0,01 – 5 мкМ
			10 – 90 мкг/мл	0,1 – 1,5 мкМ
		Цисплатин	5 мкг/мл	0,5 – 1,5 мкМ
			5 – 80 мкг/мл	10 – 200 мкМ
Толстой кишки	HT-29	5-FU	1 мкг/мл	50 – 200 мкМ
			40 – 80 мкг/мл	1 – 50 мкМ
		Иринотекан	20 мкг/мл	1 и 10 – 50 мкМ
			1 – 2,5 мкг/мл	0,25 – 5 мкМ
Яичника	PA-1	Цисплатин	5 мкг/мл	0,1 – 5 мкМ
			10 – 20 мкг/мл	0,01 – 5 мкМ
			1 – 20 мкг/мл	0,25 – 5 нМ
		Паклитаксел	1 – 20 мкг/мл	0,25 – 5 нМ
Мочевого пузыря	T-24	Цисплатин	5 – 80 мкг/мл	1 – 500 мкМ
		Гемцитабин	2,5 – 80 мкг/мл	1 – 300 мкМ

Формула изобретения

1. Терапевтически эффективная комбинация, содержащая рекомбинантный белок лектина и один или более других терапевтических агентов, причем указанная комбинация является синергетической, и при этом концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл.
2. Терапевтически эффективная комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что указанную комбинацию применяют для предупреждения или лечения рака у субъекта.
3. Применение рекомбинантного белка лектина для лечения или предупреждения рака у субъекта, включающее введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного белка лектина, причем указанный рекомбинантный белок лектина вводят субъекту в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами, и при этом указанный другой терапевтический агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.
4. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного белка лектина в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами, и при этом другой терапевтический агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.
5. Комбинированная терапия для предупреждения, лечения или исцеления рака или опухоли или пролиферации у субъекта с применением рекомбинантного белка лектина, причем указанная комбинированная терапия включает введение рекомбинантного белка лектина в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами, и при этом указанный другой терапевтический агент вводят одновременно, отдельно или последовательно.
6. Терапевтически эффективная комбинация по п. 1 или 2, применение по п. 3, способ лечения по п. 4 или комбинированная терапия по п. 5, отличающиеся тем, что указанный другой терапевтический агент представляет собой противораковый агент.
7. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 6, отличающиеся тем, что указанный противораковый агент представляет собой антиметаболит, алкилирующий антинеопластический агент, антимицротубулиновый агент и/или ингибитор топоизомеразы I.

8. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 7, отличающиеся тем, что указанный антиметаболит выбран из 5-фторурацила (5-FU), гемцитабина, метотрексата, пеметрекседа или капецитабина.
9. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 7 или 8, отличающиеся тем, что указанный алкилирующий антинеопластический агент представляет собой антинеопластический агент на основе платины, выбранный из цисплатина или карбоплатина.
10. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по любому из пп. 7-9, отличающиеся тем, что указанный antimикротубулиновый агент выбран из паклитаксела, доцетаксела, абраксана или таксотера.
11. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по любому из пп. 7-10, отличающиеся тем, что указанный ингибитор топоизомеразы I выбран из иринотекана или топотекана.
12. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 9, отличающиеся тем, что указанный противораковый агент представляет собой цисплатин, и при этом указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения у субъекта рака полости рта, яичника или мочевого пузыря.
13. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 8, отличающиеся тем, что указанный противораковый агент представляет собой 5-FU, и при этом указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения у субъекта рака полости рта, поджелудочной железы или толстой кишки.
14. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 11, отличающиеся тем, что противораковый агент представляет собой иринотекан, и при этом указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения у субъекта рака толстой кишки.
15. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 10, отличающиеся тем, что указанный противораковый агент представляет собой паклитаксел, и при этом указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения у субъекта рака яичника или молочной железы.

16. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 8, отличающиеся тем, что указанный противораковый агент представляет собой гемцитабин, и при этом указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения у субъекта рака мочевого пузыря или поджелудочной железы.
17. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 9, отличающиеся тем, что указанный противораковый агент представляет собой карбоплатин, и при этом указанную комбинацию применяют для лечения или предупреждения у субъекта рака молочной железы.
18. Терапевтически эффективная комбинация по любому из пп. 1, 2 или 6 – 17, применение по любому из пп. 3 или 6 – 17, способ лечения по любому из пп. 4 или 6 – 17 или комбинированная терапия по любому из пп. 5 или 6 – 17, отличающиеся тем, что рекомбинантный белок лектина представляет собой белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или имеющий по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии с SEQ ID NO: 1, 2 или 3.
19. Применение по любому из пп. 3 или 6 – 18, способ лечения по любому из пп. 4 или 6 – 18 или комбинированная терапия по любому из пп. 5 или 6 – 18, отличающиеся тем, что концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 0,5 мкг/мл до 100 мкг/мл.
20. Терапевтически эффективная комбинация по любому из пп. 1, 2 или 6 – 18, применение по любому из пп. 3 или 6 – 19, способ лечения по любому из пп. 4 или 6 – 19 или комбинированная терапия по любому из пп. 5 или 6 – 19, отличающиеся тем, что концентрация рекомбинантного белка лектина составляет от 1 мкг/мл до 90 мкг/мл.
21. Терапевтически эффективная комбинация по любому из пп. 1, 2 или 6 – 18 или 20, применение по любому из пп. 3 или 6 – 20, способ лечения по любому из пп. 4 или 6 – 20 или комбинированная терапия по любому из пп. 5 или 6 – 20, отличающиеся тем, что концентрация указанного другого терапевтического агента составляет от 0,001 нМ до 1000 мкМ.
22. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 9 или 12, отличающиеся тем, что концентрация цисплатина составляет от 0,01 мкМ до 500 мкМ.

23. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 8 или 13, отличающиеся тем, что концентрация 5-фторурацила (5-FU) составляет от 0,01 мкМ до 250 мкМ.
24. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 11 или 14, отличающиеся тем, что концентрация иринотекана составляет от 0,1 мкМ до 50 мкМ.
25. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 10 или 15, отличающиеся тем, что концентрация паклитаксела составляет от 0,001 нМ до 10 нМ.
26. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 8 или 16, отличающиеся тем, что концентрация гемцитабина составляет от 0,01 мкМ до 300 мкМ.
27. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 9 или 17, отличающиеся тем, что концентрация карбоплатина составляет от 10 мкМ до 1000 мкМ.
28. Терапевтически эффективная комбинация по любому из пп. 1, 2, 3 или 7 – 18, или 20 – 27, применение по любому из пп. 3 или 6 – 27, способ лечения по любому из пп. 4 или 6 – 27 или комбинированная терапия по любому из пп. 5 – 27, отличающиеся тем, что указанная комбинация рекомбинантного белка лектина и другого терапевтического агента представляет собой композицию.
29. Терапевтически эффективная комбинация, применение, способ лечения или комбинированная терапия по п. 28, отличающиеся тем, что указанная композиция дополнительно содержит одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.
30. Рекомбинантный белок лектина в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами для лечения или предупреждения рака, причем другой терапевтический агент выбран из одного или более из 5-фторурацила (5-FU), гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина или иринотекана.
31. Терапевтический агент для лечения или предупреждения рака в комбинации с рекомбинантным белком лектина, причем указанный терапевтический агент выбран из одного или более из 5-фторурацила (5-FU), гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина или иринотекана.