

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042570**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.27

(51) Int. Cl. **C07K 14/82 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201990298

(22) Дата подачи заявки
2017.07.17

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) **16382339.6**

(32) **2016.07.15**

(33) **EP**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/EP2017/067998**

(87) **WO 2018/011433 2018.01.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФУНДАСИО ПРИВАДА ИНСТИТУТ
Д'ИНВЕСТИГАСИО ОНКОЛОХИКА
ДЕ ВАЛЬ ХЕБРОН; ИНСТИТУСИО
КАТАЛАНА ДЕ РЕСЕРКА И
ЭСТУДИС АВАНСАТС (ES)**

(72) Изобретатель:

**Соусек Лаура, Хаусет Гонсалес Тони,
Болье Мари-Эв (ES)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2014180889**

SOUCEK LAURA ET AL.: "Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis", **CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US**, vol. 62, no. 12, 15 June 2002 (2002-06-15), pages 3507-3510, XP002705287, ISSN: 0008-5472, abstract, page 3508, left-hand column, paragraph 2 - page 3509, left-hand column, paragraph 1, figure 2

DATABASE UniProt [Online], 16 March 2016 (2016-03-16), "SubName: Full = C-myc {EC0:0000313 | EMBL:AAQ57178.1}; Flags: Fragment;", XP55413001, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q6WDE6, Database accession no. Q6WDE6, sequence

DATABASE REFSEQ [Online], 27 May 2016 (2016-05-27), "myc proto-oncogene protein isoform X1, partial [*Cricetulus griseus*]", XP55413005, Database accession no. XP003516054, the whole document

DATABASE UniProt [Online], 16 March 2016 (2016-03-16), "SubName: Full = Myc proto-oncogene protein {EC0:0000313 | EMBL:EHB05990.1}", XP002774402, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:G5B9M9, Database accession no. G5B9M9, sequence

(57) Изобретение относится к полипептиду, включающему или состоящему из полипептида с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, и их применению в медицине, в частности, для профилактики и/или лечения рака.

B1**042570****042570****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области онкологических заболеваний и, в частности, к полипептидам, композициям и их применению в медицине, в частности, для профилактики и/или лечения рака.

Уровень техники

Идеальное противоопухолевое лекарственное средство должно быть нацелено на незаменимую функцию, постоянно необходимую для поддержания опухоли, но которая необязательна для поддержания и функционирования любых нормальных тканей. Следовательно, наиболее общей логикой является нацеливание на продукты генов, которые специфически мутируют при раке, исходя из того, что эти мутантные молекулы будут вероятными "драйверами" рака и, возможно, имеющими меньшее значение для нормальных тканей. По этим причинам большое внимание было уделено составлению перечня устойчиво повторяющихся патологических изменений при определенных типах рака. К сожалению, у данного подхода имеется несколько проблем. Во-первых, большинство солидных опухолей человека проходят через эпизоды геномной нестабильности и демонстрируют "мутационный шум", который может скрыть "драйверные" мутации и их соответствующие эффекторные пути. Во-вторых, онкологические заболевания представляют конечный результат процесса, который включает переходы через многочисленные эволюционные критические участки. Для каждого критического участка может потребоваться определенный тип мутации, действие которой после этого становится необязательной для поддержания опухоли, и, следовательно, он не является хорошей терапевтической мишенью после этой точки в развитии опухоли.

Мус представляет белок, содержащий основной мотив спираль-петля-спираль (b-HLH-LZ), "лейциновую застёжку-молнию", участвующий в контроле роста и развитии рака, который функционирует в комплексе со структурно близкими белками Max, Mad и Mnt. Димеры Мус/Max активируют транскрипцию генов и индуцируют пролиферацию клеток или апоптоз. Комплексы Mad/Max и Mnt/Max функционируют в качестве репрессоров и вызывают остановку роста и дифференцировку клеток. Все димеры распознают один и тот же консенсусный сайт ДНК, E-бокс CACGTG.

Мус строго регулируется в нормальных клетках, где его уровни выше в пролиферирующих и ниже в непролиферирующих клетках. Аберрантно высокая и/или нерегулируемая активность Мус причинно связана с большинством злокачественных опухолей и часто ассоциирована с агрессивными, плохо дифференцированными и ангиогенными опухолями. Нарушение регуляции экспрессии Мус происходит за счет сверхэкспрессии в результате амплификации генов, потери контроля транскрипции, нарушения деградации или повышенной стабилизации. Это приводит к аберрантной пролиферации, увеличению выживаемости, изменениям метаболизма, ангиогенезу и воспалению, которые все являются основными признаками злокачественных опухолей. Результаты многочисленных исследований доказали критическую роль Мус в регуляции внутриклеточных и внеклеточных аспектов онкогенеза, позволяя предположить, что нацеливание на его функцию будет иметь терапевтическое значение.

Известно, что понижающая регуляция Мус ингибитором бромодомена BET приводит к регрессии многочисленных типов опухолей. Несмотря на то, что данный подход обладает хорошим потенциалом, он имеет некоторые ограничения, такие как токсичность и многочисленные немишеневые эффекты. Многие небольшие молекулы, нарушающие взаимодействие Мус/Max, показали низкую специфичность *in cellulo*.

Однако ингибитор Мус еще не стал клинически доступным, и его создание связано с различными проблемами: во-первых, Мус является ядерным фактором транскрипции, следовательно, он менее доступен, чем мембранные или цитоплазматические молекулы; во-вторых, у Мус отсутствует ферментативный "активный сайт", на который можно было бы нацелиться; в-третьих, семейство Мус включает три различных белка, c-, N- и L-Мус, которые в определенных условиях являются функционально дублирующими друг друга, поэтому все они требуют одновременного ингибирования. Кроме того, были опасения, что ингибирование Мус будет вызывать серьезные побочные эффекты, ингибируя пролиферацию нормальных тканей. По всем этим причинам создание лекарственного препарата на основе ингибитора Мус является сложной задачей.

Ототус является доминантно-негативным мутантом MYC, содержащим мотив b-HLH-LZ Мус и имеющий четыре аминокислотные замены в "лейциновой застёжке-молнии" Мус (Soucek L. et al., 1998, *Oncogene*, 17, 2463-2472; Soucek L. et al. (2002), *Cancer Res.*, 62:3507-3510). Аминокислотные замены E61T, E68I, R74Q и R75N придают измененную специфичность димеризации белку, который сохраняет способность связываться со своим естественным партнером Max и образовывать гомодимеры с самим собой, а также гетеродимеры с c-, N- и L-Мус дикого типа.

Благодаря этим свойствам Ототус способен предотвратить функцию трансаактивации Мус-зависимых генов как *in vitro*, так и *in vivo*, элиминируя способность Мус связываться со своим связывающим сайтом узнавания ДНК, E-бокс. В то же время Ототус эффективно усиливает Мус-индуцированный апоптоз зависящим от уровня экспрессии Мус образом и, таким образом, усиливает транскрипционную активность Мус. Таким образом, Ототус предотвращает связывание Мус с E-боксами промоторов и трансаактивацию генов-мишеней, одновременно сохраняя Miz-1-зависимое связывание с промоторами и транскрипцию. В присутствии Ототус интерактом Мус направляется на

репрессию, а его активность переключается с проонкогенной на опухолесупрессорную.

В EP 2801370 A1 было показано, что сам пептид Отомус способен эффективно проходить через клеточную мембрану и транслоцироваться в ядро, где он оказывает свой опухолесупрессорный эффект.

Однако в данной области техники все еще существует необходимость в разработке новых более совершенных терапевтических подходов для лечения рака.

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение относится к полипептиду, включающему полипептид с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином.

Во втором аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему:

- а) полипептид или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида по изобретению и
- б) химическую группу, которая способствует захвату клеткой полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

В третьем аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид по изобретению или конъюгат по изобретению.

В четвертом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид по изобретению.

В пятом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полипептид по изобретению, конъюгат по изобретению, полинуклеотид по изобретению или вектор по изобретению.

В шестом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически эффективное количество полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида по изобретению, конъюгата по изобретению, полинуклеотида по изобретению, вектора по изобретению или клетки-хозяина по изобретению, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В седьмом аспекте изобретение относится к полипептиду или функционально эквивалентному варианту указанного полипептида по изобретению, конъюгату по изобретению, полинуклеотиду по изобретению, вектору по изобретению, клетке-хозяину по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в медицине.

В восьмом аспекте изобретение относится к полипептиду или функционально эквивалентному варианту указанного полипептида по изобретению, конъюгату по изобретению, полинуклеотиду по изобретению, вектору по изобретению, клетке-хозяину по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в профилактике и/или лечении рака.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Анализ жизнеспособности клеток показывает, что ОмоCS (несущий изменение C89S) ингибирует рост клеток злокачественной глиомы U87 (панель A) и клеток аденокарциномы легкого A549 (панель B) более эффективно, чем Отомус (в более низкой концентрации). Липофектамин (Lipo) не вызывает эффекта. Для расчета статистической значимости использовали t-критерий. **P<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 2. Анализ клеточной плотности показывает, что ОмоCA (несущий изменение C98A) ингибирует рост клеток аденокарциномы легкого A549 так же эффективно, как ОмоCS (несущий изменение C98S) в более низкой концентрации. Липофектамин (Lipo) не вызывает эффекта.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что полипептид с SEQ ID NO: 1, где цистеин в положении 89 заменен серином, названный ОмоCS, способен оказывать опухолесупрессорный эффект более эффективно, чем Отомус (пример 1). Этот опухолесупрессорный эффект сохраняется, когда цистеин в положении 89 в SEQ ID NO: 1 заменяется другими аминокислотами. Пример 2 показывает, что полипептид с SEQ ID NO: 1, где цистеин в положении 89 заменен аланином, названный ОмоCA, обладает таким же опухолесупрессорным действием, что и ОмоCS.

Полипептид по изобретению.

Следовательно, в первом аспекте изобретение относится к полипептиду, включающему полипептид с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином.

SEQ ID NO: 1 соответствует:

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQA

ETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (SEQ ID NO: 1)

Полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 1 соответствует последовательности белка Отомус, но остаток X в положении 89 не является цистеином. В рамках изобретения термин "Отомус" относится к полипептиду, который состоит из мутированного варианта домена bHLHZip белка Мус, несущего мутации E61T, E68I, R74Q и R75N (где нумерация мутированных положений приведена относительно последовательности области Мус, соответствующей аминокислотам 365-454 полипептида, имеющего номер доступа NP 002458 в базе данных NCBI, по версии от 15 марта 2015 г.). Последователь-

ность с-Мус, представленная в базе данных NCBI под инвентарным номером NP_002458, показана ниже (SEQ ID NO: 5), где область, из которой происходит Отомус, показана подчеркнутой:

```

1  MDFFRVVENQ QPPATMPLNV SFTNRNYDL D YDSVQPYFYC DEEENFYQQQ
QQSELQPPAP
61  SEDIWKKFEL LPTPPLSPSR RSGLCSPSYV AVTPFSLRGD NDGGGGSFST
ADQLEMVTEL
121  LGGDMVNQSF ICDPDETETI KNIIQDCMW SGFSAAAKLV SEKLASYQAA
RKDSGSPNPA
181  RGHSVCTSS LYLQDLASAA SECIDPSVVF PYPLNDSSSP KSCASQDSSA
FSPSSDSLSS
241  STESSPQGSF EPLVLHEETP PTTSSDSEEE QEDEEEIDVV SVEKRQAPGK
RSESGSPSAG
301  GHSKPPHSPL VLKRVHSTH QHNYAAPST RKDYPAKRV KLDVSVRLRQ
ISNNRKCTSP
361  RSSDTEENVK RRTHNVLERQ RRNELKRSFF ALRDQIPELE NNEKAPKVVI
LKKATAYILS

```

421 VQAEEQKLIS EEDLLRKRRE QLKHKLEQLR NSCA (SEQ ID NO: 5)

В рамках изобретения термин "Мус" относится к семейству транскрипционных факторов, которое включает с-Мус, N-Мус и L-Мус. Белок Мус активирует экспрессию многих генов посредством связывания консенсусной последовательности CACGTG (последовательностей энхансерных боксов или E-боксов) и вовлечения гистонацетилаз или НАТ. Однако Мус также может функционировать в качестве транскрипционного репрессора. Посредством связывания фактора транскрипции Miz-1 и вытеснения коактиватора p300, он ингибирует экспрессию генов-мишеней Miz-1. Мус также играет непосредственную роль в контролировании репликации ДНК.

Мотив b-HLH-LZ Мус или основной мотив спираль-петля-спираль, "лейциновая застежка-молния" Мус относится к области, которая определяет димеризацию Мус с белком Мах и связывание с генами-мишенями Мус. Эта область соответствует аминокислотам 365-454 человеческого Мус и характеризуется двумя альфа-спиралями, соединенными петлей (Nair S.K. & Burley S.K., 2003, Cell, 112:193-205).

В предпочтительном варианте осуществления полипептид, включающий полипептид с SEQ ID NO: 1, содержит, состоит или по существу состоит из последовательности SEQ ID NO: 3, показанной ниже.

```

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVIVLKKATAYILSVQ
AETQKLISEIDLRLKQNEQLKHKLEQLRNSXA (SEQ ID NO: 3)

```

В этом контексте "состоящий по существу из" означает, что указанная молекула не будет содержать каких-либо дополнительных последовательностей, которые могли бы изменить активность SEQ ID NO: 3.

Изобретение относится к полипептиду, который содержит, состоит или состоит по существу из SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином. Указанный полипептид может происходить из домена bHLHZip любого белка Мус, известного в данной области, при условии, что мутации, которые приводят к опухолесупрессорному эффекту, сохраняются. Таким образом, полипептид, который можно использовать в настоящем изобретении, может происходить от любых видов млекопитающих, включая, не ограничиваясь этим, домашних и сельскохозяйственных животных (коров, лошадей, свиней, овец, коз, собак, кошек или грызунов), приматов и людей. Предпочтительно, полипептид по изобретению происходит из белка Мус человека (номер доступа NP_002458, версия от 15 марта 2015 г.).

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к полипептиду, состоящему из полипептида с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

Согласно настоящему изобретению остаток в положении 89 в SEQ ID NO: 1 может представлять собой любую аминокислоту, кроме цистеина.

В рамках изобретения термин "цистеин" относится к аминокислоте с формулой $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$. Он кодируется кодонами UGU и UGC. Термин также включает неприродный цистеин

Цистеин может образовывать дисульфидные связи в гомодимерной форме Отомус, следовательно, его мутация с заменой любой другой аминокислотой приведет к невозможности образования дисульфидных связей и должна привести к тем же свойствам эффективности, что и у ОтоCS. Следовательно, остаток в положении 89 в SEQ ID NO: 1 может представлять любую природную, неприродную или синтетическую аминокислоту, кроме цистеина, и, в частности, любую аминокислоту, которая не может быть поперечно сшита с другим мономером полипептида по изобретению с образованием гомодимера.

Термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток" относится к природным и синтетическим

аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Аминокислоты могут обозначаться здесь общеизвестными трехбуквенными символами или однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Термин "аминокислота" включает встречающиеся в природе аминокислоты (Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), необычные природные аминокислоты и неприродные (синтетические) аминокислоты. Аминокислоты предпочтительно находятся в L-конфигурации, но также предусматриваются аминокислоты в D-конфигурации или смеси аминокислот в D- и L-конфигурациях.

Термин "природные аминокислоты" включает алифатические аминокислоты (глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин), гидроксированные аминокислоты (серин и треонин), сульфатированные аминокислоты (метионин), дикарбоновые аминокислоты и их амиды (аспарагиновую кислоту, аспарагин, глутаминовую кислоту и глутамин), аминокислоты, имеющие две основные группы (лизин, аргинин и гистидин), ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) и циклические аминокислоты (пролин). В варианте осуществления остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет алифатическую аминокислоту. В еще одном варианте осуществления остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет сульфатированную аминокислоту. В еще одном варианте осуществления X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет дикарбоновую аминокислоту или ее амиды. В еще одном варианте осуществления остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет аминокислоту, имеющую две основные группы. В еще одном варианте осуществления остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет ароматическую аминокислоту. В еще одном варианте осуществления остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет циклическую аминокислоту. В предпочтительном варианте осуществления остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет гидроксированную аминокислоту, предпочтительно серин. В предпочтительном варианте осуществления остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет аминокислоту, выбранную из серина, треонина и аланина, предпочтительно выбранную из серина и аланина.

В рамках изобретения термин "неприродная аминокислота" относится к карбоновой кислоте или ее производному, замещенной аминогруппой и являющейся структурно связанной с природной аминокислотой. Иллюстративные неограничивающие примеры модифицированных или необычных аминокислот включают 2-аминоадипиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, бета-аланин, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, 2,4-диаминомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин или гидроксипролин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, аллоизолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, 6-N-метиллизин, N-метилвалин, норвалин, норлейцин, орнитин и т.д.

Иллюстративными неограничивающими примерами необычных аминокислот являются гидроксизин и гидроксипролин, тироксин, N-метиларгинин и N-ацетиллизин.

В предпочтительном варианте осуществления остаток X в положении 89 представляет любую другую аминокислоту, которая не может быть поперечно-сшита с другим мономером полипептида по изобретению с образованием гомодимерной пары.

В более предпочтительном варианте осуществления полипептида по изобретению остаток в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет аминокислоту серин.

В рамках изобретения, термин "серин" относится к 2-амино-3-гидроксипропановой кислоте, кодируемой у человека кодонами UCU, UCC, UCA, UCG, AGU и AGC. Термин также включает модифицированные серины, такие как фосфорилированный или сульфатированный серин, в качестве иллюстративного неограничивающего примера N-бензоил-(2R,3S)-3-фенилизосерин, D-циклосерин, L-изосерин, фенилсерин.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид по изобретению содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2:

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQA

ETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA (SEQ ID NO: 2).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления полипептид по изобретению состоит или состоит по существу из SEQ ID NO: 4:

MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQ

AETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA (SEQ ID NO: 4).

В более предпочтительном варианте осуществления полипептида по изобретению остаток в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет аминокислоту аланин.

В рамках изобретения термин "аланин" относится к 2-аминопропановой кислоте, кодируемой у человека кодонами GCU, GCC, GCA и GCG. Термин также включает модифицированные аланины, такие как N-ацетил-L-аланин.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид по изобретению содержит последова-

тельность, показанную в SEQ ID NO: 63:

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQA

ETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA (SEQ ID NO: 63).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления полипептид по изобретению состоит или состоит по существу из SEQ ID NO: 64:

MTENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQ

AETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSAA (SEQ ID NO: 64).

Термин "функционально эквивалентный вариант", когда он относится к SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, относится к любому полипептиду, который получен в результате делеции, инсерции или добавления одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1, или который получен в результате химической модификации полипептида с SEQ ID NO: 1, и который по существу сохраняет опухолесупрессорную активность SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, предпочтительно, который по существу сохраняет опухолесупрессорную активность ОмоСS. Специалистам в данной области будет понятно, что для сохранения опухолесупрессорной активности требуется, чтобы вариант мог димеризоваться с Мус и/или его облигатным партнером p21/p22Мах и ингибировать активность Мус после проникновения в ядро, чтобы он был способен транслоцироваться через клеточную мембрану и чтобы он был способен транслоцироваться через ядерную оболочку. В некоторых вариантах осуществления функционально эквивалентный вариант полипептида по изобретению гомодимеризуется слабее, чем Омомус, или не нуждается превращаться в гомодимеры посредством образования дисульфидного мостика. В частности, образование дисульфидного мостика в гомодимерной форме полипептида по изобретению слабее, чем в полипептиде Омомус.

В рамках изобретения выражение "более слабая гомодимеризация" относится к более низкой способности образовывать облигатные гомодимеры полипептида по изобретению даже в восстанавливающих условиях. В предпочтительном варианте осуществления способность по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% ниже способности образовывать гомодимеры у Омомус.

В рамках изобретения выражение "восстанавливающие условия" относится к присутствию восстанавливающего агента, соединения, которое отдает электрон другим химическим соединениям в окислительно-восстановительной химической реакции. Иллюстративными неограничивающими примерами восстанавливающих агентов являются ДТТ (дитиотреитол), b-меркаптоэтанол или ТСЕР (трис-(2-карбоксиэтил)фосфин). Возможно, что количество гомодимеров является одинаковым в условиях *in vitro*, и что различие между полипептидом по изобретению и Омомус имеет место только в клетках в присутствии партнеров по гетеродимеризации, где отсутствие дисульфида делает возможным потенциально более высокое образование гетеродимеров.

Для определения гомодимеризации пептида можно использовать несколько анализов, и в качестве иллюстративного неограничивающего примера можно указать термическую денатурацию, определяемую круговым дихроизмом, следовательно, димеризацию можно детектировать по фолдингу и количественному анализу термостабильности.

Подходящие функционально эквивалентные варианты включают полипептиды, состоящие по существу из SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином.

В этом контексте выражение "состоящий по существу из" означает, что указанная молекула не будет содержать каких-либо дополнительных последовательностей, которые могли бы изменить активность SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином.

Подходящими функциональными вариантами нацеливающего пептида являются такие, которые имеют степень идентичности относительно пептида с SEQ ID NO: 1 (предпочтительно относительно ОмоСS, SEQ ID NO: 4) на уровне более чем 25% идентичности аминокислотной последовательности, например 25, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. Степень идентичности между двумя полипептидами определяется с использованием компьютерных алгоритмов и методов, которые широко известны специалистам в данной области. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями предпочтительно определяют с использованием алгоритма BLASTP, как описано ранее [BLAST Manual, Altschul S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul S., et al., J. Mol. Biol., 1990; 215:403-410]. В предпочтительном варианте осуществления идентичность последовательности определяется по всей длине полипептида с SEQ ID NO: 1 или по всей длине варианта или обоих.

Функционально эквивалентные варианты полипептида по изобретению также могут включать по-

страницационные модификации, такие как гликозилирование, ацетилирование, изопренилирование, мистроилирование, протеолитический процессинг и т.д.

Альтернативно, подходящими функциональными вариантами нацеливающего пептида являются такие, в которых одно или более положений в полипептиде по изобретению содержит аминокислоту, которая представляет собой консервативную замену аминокислоты, присутствующей в белке, указанном выше. "Консервативные аминокислотные замены" являются результатом замены одной аминокислоты другой, имеющей сходные структурные и/или химические свойства. Например, каждая из следующих шести групп включает аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), серин (S), треонин (T); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспаргин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V) и 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W). Выбор таких консервативных аминокислотных замен находится в компетенции специалиста в данной области и описан, например, Dordo et al. (*J. Mol. Biol.*, 1999, 217:721-739) и Taylor et. al. (*J. Theor. Biol.*, 1986, 119:205-218).

В предпочтительном варианте осуществления вся последовательность функционально эквивалентного варианта SEQ ID NO: 1 не содержит аминокислоты цистеина. Будет понятно, что функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, содержат мутации в положениях, соответствующих мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, обнаруженным в Отомус, полученном из человеческого с-Мус. Положение, в котором должны произойти указанные мутации в функционально эквивалентном варианте, можно определить множественным выравниванием последовательностей различных последовательностей Мус и идентифицировать выравниванием тех положений, соответствующих положениям 61, 68, 74 и 75 в последовательности Отомус, полученного из человеческого с-Мус.

Множественное выравнивание последовательностей является расширением парного выравнивания с включением более двух последовательностей одновременно. С использованием методов множественного выравнивания выравниваются все последовательности в данном ряду запросов. Предпочтительной программой для множественного выравнивания последовательностей (и ее алгоритмом) является ClustalW, Clustal2W или ClustalW XXL (см. Thompson et al. (1994), *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). После сравнения (выравнивания) последовательностей с-Мус из разных организмов и варианта, как здесь описано, специалист в данной области может легко идентифицировать положения в каждой из последовательностей, соответствующие положениям E61T, E68I, R74Q и R75N, найденным в Отомус, и ввести в вариант SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, мутации, соответствующие мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, обнаруженным в Отомус, происходящем из человеческого с-Мус.

Подходящие анализы для определения того, можно ли рассматривать полипептид в качестве функционально эквивалентного варианта SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 SEQ ID NO: 1 не является цистеином, включают, без ограничения:

анализы, с использованием которых оценивают способность полипептида образовывать димерные комплексы с Мах и Мус, такие как анализы, основанные на экспрессии репортерного гена, как описано в публикации Soucek et al. (*Oncogene*, 1998, 17:2463-2472), а также PLA (анализ близкого лигирования белка) или коиммунопреципитация;

анализы, с использованием которых оценивают способность полипептида связываться с сайтом распознавания Мус/Мах в ДНК (сайт CACGTG), такие как анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA), описанный в публикации Soucek et al. (см. выше);

анализы, с использованием которых оценивают способность репрессировать Мус-индуцированную транскрипцию, такие как анализ, основанный на экспрессии репортерного гена под контролем связывающих сайтов ДНК, специфичных для Мус/Мах, как описано Soucek et al. (см. выше);

анализы, основанные на оценке способности генного продукта или полипептида ингибировать рост клеток, экспрессирующих онкоген мус, как описано Soucek et al. (см. выше);

анализы, с использованием которых оценивают способность полипептида усиливать мус-индуцированный апоптоз, такие как анализы, описанные Soucek et al. (*Oncogene*, 1998:17, 2463-2472). Кроме того, можно использовать любой анализ, обычно известный в данной области, для оценки апоптоза в клетке, такой как окрашивание Hoechst, окрашивание пропидиумом йодидом (PI) или аннексином V, трипановым синим, обнаружение эффекта "лестницы"/фрагментации ДНК и TUNEL.

В предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, включает такие последовательности, которые имеют одну или более, предпочтительно все следующие характеристики: способность димеризоваться с Мус и ингибировать его активность, транслокация через клеточную мембрану, транслокация в ядро, неспособность образовывать гомодимеры или пониженная способность образовывать гомодимеры по сравнению с Отомус, жизнеспособность клеток в анализе *in vitro*, как описано в примере 1, ниже, чем у Отомус в количестве 12,5 нМ мРНК, кодирующей полипептид по изобретению. В предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант по изобретению соответствует последовательности, которая опосредует жизнеспособность клеток в анализе *in vitro*,

как описано в примере 1, ниже, чем у Отомус, в количестве 12,5 нМ мРНК, кодирующей полипептид по изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считается функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, если он проявляет активность в одном или более из вышеуказанных анализов, которая составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% от активности SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином (предпочтительно, от активности ОмоСS).

Кроме того, функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, также способны трансдуцировать клетки после того, как вариант контактирует с указанной клеткой.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считается функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, если он способен трансдуцировать клетку-мишень, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% также эффективно, как SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином (предпочтительно как ОмоСS, SEQ ID NO: 4).

Кроме того, функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, также способны транслоцироваться в ядро опухолевой клетки-мишени.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считается функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, если он способен транслоцироваться в ядро опухолевых клеток-мишеней, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% также эффективно, как SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином (предпочтительно, как ОмоСS, SEQ ID NO: 4).

Подходящие анализы для определения того, является ли полипептид функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, с точки зрения его способности транслоцироваться через клеточную мембрану и в ядро, включают двойное мечение клетки реагентом, специфичным для полипептида, и красителем, который специфически окрашивает ядро клетки (например, DAPI или краситель Hoechst). В предпочтительном варианте осуществления детектирование полипептида по изобретению проводят с помощью конфокальной микроскопии или флуоресцентной микроскопии.

Полипептид с SEQ ID NO: 1 по изобретению также содержит домен M2 с-Мус, имеющий последовательность RQRRNELKRSF (SEQ ID NO: 55) (см. публикацию Dang and Lee, Mol. Cell Biol., 1988, 8:4048-4054), что соответствует сигналу ядерной локализации.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, включает последовательность SEQ ID NO: 55.

В рамках изобретения термин "сигнал ядерной локализации" относится к аминокислотной последовательности длиной примерно 4-20 аминокислотных остатков, которая служит для направления белка в ядро. Как правило, последовательность ядерной локализации богата основными аминокислотами, и типичные последовательности хорошо известны в данной области (Gorlich D. (1998) EMBO, 5.17:2721-7).

В некоторых вариантах осуществления NLS выбран из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 (PKKKRKV, SEQ ID NO: 6); NLS нуклеоплазмина (KRPAATKKAGQAKKKK, SEQ ID NO: 7); NLS CBP80 (RRRHSDENDGGQPHKRRK, SEQ ID NO: 8); NLS белка Rev HIV-1 (RQARRNRRRWE, SEQ ID NO: 9); HTLV-I Rex (MPKTRRRPRRSQRKRPT, SEQ ID NO: 10); NLS hnRNP A (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFKPRNQGGY, SEQ ID NO: 11); NLS rpl23a (VHSHKKKKIRTPTFTPTKTLRLRRQPKYPRKSAPRRNKLDHY, SEQ ID NO: 12). В одном варианте осуществления изобретения сигнал ядерной локализации содержит мотив K (K/R) X (K/R) (SEQ ID NO: 13).

Кроме того, функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, также способны достигать ядер трансдуцированных клеток после того, как вариант контактирует с указанной клеткой.

Следует понимать, что функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, содержат NLS, обнаруженный в SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или другой функциональный NLS. В еще одном варианте осуществления полипептид по изобретению не содержит нативный NLS, обнаруженный в SEQ ID NO: 1, а содержит другой функциональный NLS, заменяющий указанный NLS, обнаруженный в SEQ ID NO: 1, или в любой другой части полипептида по изобретению.

Конъюгат по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему:

а) полипептид или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида по изобретению;

б) химическую группу, которая способствует захвату клетками полипептида или функционально

эквивалентного варианта указанного полипептида.

В рамках изобретения термин "конъюгат" относится к двум или более соединениям, которые ковалентно связаны друг с другом, так что у конъюгата сохраняется функция каждого соединения.

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

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

В общем, жирная кислота представляет молекулу, содержащую углеродную цепь с кислотной группой (например, карбоновой кислотой) на конце цепи. Углеродная цепь жирной кислоты может иметь любую длину, однако предпочтительно, чтобы длина углеродной цепи составляла по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более атомов углерода и любое значение в указанном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления длина углеродной цепи составляет от 4 до 18 атомов углерода в цепочечной части жирной кислоты. В некоторых вариантах осуществления углеродная цепь жирной кислоты может содержать нечетное число атомов углерода, однако в некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным четное число атомов углерода в цепи. Жирная кислота, содержащая только простые связи в своей углеродной цепи, называется насыщенной, а жирная кислота, содержащая по меньшей мере одну двойную связь в своей цепи, называется ненасыщенной. Жирная кислота может быть разветвленной, хотя в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения она является неразветвленной. Конкретные жирные кислоты включают, не ограничиваясь этим, линолевую кислоту, олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, линоленовую кислоту, стеариновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, арахидоновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту.

В предпочтительном варианте осуществления химическая группа, которая способствует захвату клетками полипептида, представляет последовательность проникающего в клетку пептида, и в этом случае конъюгат представляет слитый белок, содержащий полипептид по изобретению или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида и последовательность проникающего в клетку пептида.

Термин "слитый белок" относится к белкам, полученным с помощью генной технологии, которые состоят из двух или более функциональных доменов, полученных из разных белков. Слитый белок может быть получен обычными способами, например, посредством генной экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный слитый белок, в подходящей клетке. Понятно, что проникающий в клетку пептид относится к проникающему в клетку пептиду, который отличается от проникающего в клетку пептида, который образует фрагмент полипептида с SEQ ID NO: 1 или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

Термин "последовательность проникающего в клетку пептида" используется в настоящем описании взаимозаменяемо с "CPP", "доменом белковой трансдукции" или "PTD". Термин относится к пептидной цепи различной длины, которая направляет транспорт белка внутрь клетки. Процесс доставки в клетку обычно происходит путем эндоцитоза, но пептид также может быть интернализован в клетку посредством прямой транслокации через мембраны. CPP, как правило, имеют аминокислотный состав, который либо включает высокое относительное содержание положительно заряженных аминокислот, таких как лизин или аргинин, либо имеет последовательности, которые содержат в чередующемся порядке полярные/заряженные аминокислоты и неполярные гидрофобные аминокислоты. Примеры CPP, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, без ограничения:

CPP, обнаруженный в белке *Drosophila antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 14),
 CPP, обнаруженный в ДНК-связывающем белке VP22 вируса простого герпеса 1 (HSV-1) (DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE; SEQ ID NO: 15),
 CPP Bac-7 (RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG; SEQ ID NO: 16),
 CPP белка TAT HIV-1, состоящие из аминокислот 49-57 (RKKRQRR; SEQ ID NO: 17), аминокислот 48-60 (GRKKRRQRRTPQ; SEQ ID NO: 18), аминокислот 47-57 (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 19),
 CPP пептида S413-PV (ALWKTLLKKVLKAPKKRKV; SEQ ID NO: 20),
 CPP пенетратина (RQIKWIFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 21),
 CPP SynB1 (RGGRLSYSRRRFSTSTGR; SEQ ID NO: 22),
 CPP SynB3 (RRLSYSRRRF; SEQ ID NO: 23),
 CPP PTD-4 (PIRRRKLLRLK; SEQ ID NO: 24),
 CPP PTD-5 (RRQRRTSKLMKR; SEQ ID NO: 25),
 CPP FHV Coat-(35-49) (RRRRNRTRRRRRVR; SEQ ID NO: 26),
 CPP BMV Gag-(7-25) (KMTRAQRRAAARRNRWTAR; SEQ ID NO: 27),
 CPP HTLV-II Rex-(4-16) (TRRQRTRRARRNR; SEQ ID NO: 28),
 CPP D-Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 29),
 CPP R9-Tat (GRRRRRRRRRPPQ; SEQ ID NO: 30),

CPP MAP (KLALKLALKLALALKLA; SEQ ID NO: 31),
 CPP SBP (MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 32),
 CPP FBP (GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 33),
 CPP MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 34),
 CPP MPG (ENLS) (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-суа; SEQ ID NO: 35),
 CPP Pep-1 (ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 36),
 CPP Pep-2 (ac-KETWFETWFTWESQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 37), полиаргининовую последовательность, имеющую структуру R_N (где N находится в диапазоне от 4 до 17),
 последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 38),
 последовательность RRRRRRLR (SEQ ID NO: 39),
 последовательность RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 40),
 транспортан (GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL; SEQ ID NO: 41),
 KALAWEAKLAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO: 42),
 RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 43),
 последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 44),
 последовательность RKKRRQRR (SEQ ID NO: 45),
 последовательность YARAAARQARA (SEQ ID NO: 46),
 последовательность THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 47),
 последовательность GGRRARRRRRR (SEQ ID NO: 48).

В предпочтительном варианте осуществления указанный проникающий в клетку пептид не является эндогенным, входящим в состав SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления CPP представляет собой CPP белка TAT HIV-1, состоящего из аминокислот 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 49). В еще одном предпочтительном варианте осуществления CPP представляет последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 50) или RRRRRRRR (SEQ ID NO: 51).

В одном варианте осуществления последовательность проникающего в клетку пептида слита с N-концом полипептида по изобретению или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида. В еще одном варианте осуществления последовательность проникающего в клетку пептида слита с C-концом полипептида по изобретению или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению содержат, помимо собственного проникающего в клетку пептида, обнаруженного в полипептиде с SEQ ID NO: 1 или функционально эквивалентном варианте указанного полипептида по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или более дополнительных проникающих в клетку пептидов.

Подходящие слитые белки по изобретению включают полипептиды OmoCS*TAT и OmoCS*LZArg, как определено ниже:

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
OmoCS*TAT	52	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNS S AGRRKKRRQRRR
OmoCS*LZArg	53	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNS S ARRRRRRRR

В еще одном предпочтительном варианте осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению содержат полипептид по изобретению или его функционально эквивалентный вариант и дополнительно содержат N-концевой или C-концевой сигнал ядерной локализации.

Специалисту в данной области будет понятно, что может быть желательным, чтобы слитый белок дополнительно содержал один или более гибких пептидов, которые соединяют полипептид по изобретению или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида, последовательность проникающего в клетку пептида и/или NLS. Таким образом, в конкретном варианте осуществления полипептид по изобретению непосредственно связан с последовательностью проникающего в клетку пептида. В еще одном конкретном варианте осуществления полипептид по изобретению связан с последовательностью проникающего в клетку пептида через гибкий пептид. В одном варианте осуществления полипептид по изобретению непосредственно связан с NLS. В еще одном варианте осуществления полипептид по изобретению связан с NLS через гибкий пептид.

В конкретном варианте осуществления полипептид по изобретению непосредственно связан с последовательностью проникающего в клетку пептида и с NLS.

В одном варианте осуществления NLS представляет один из NLS, который эндогенно появляется в последовательности Мус, такой как пептид M1 (PAAKRVKLD, SEQ ID NO: 54) или пептид M2 (RQRNELKRSF, SEQ ID NO: 55).

В еще одном варианте осуществления дополнительный NLS относится к NLS, который отличается от эндогенного NLS, обнаруженного в полипептиде с SEQ ID NO: 1 или в функционально эквивалентном варианте указанного полипептида.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению содержат, в дополнение к эндогенному NLS, обнаруженному в полипептиде по изобретению или в его функционально эквивалентном варианте по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 NLS.

В еще одном конкретном варианте осуществления полипептид по изобретению связан с последовательностью проникающего в клетку пептида через первый гибкий пептидный линкер и с NLS через второй гибкий пептидный линкер.

В рамках изобретения термины "гибкий пептид", "спейсерный пептид" или "линкерный пептид" относятся к пептиду, который ковалентно связывает два белка или фрагмента, но который не является частью ни одного из полипептидов, обеспечивая возможность движения одного относительно другого, не оказывая существенного отрицательного влияния на функцию белка или фрагмента. Таким образом, гибкий линкер не оказывает отрицательного влияния на опухолесупрессорную активность полипептидной последовательности, проникающую в клетку активность проникающего в клетку пептида или способность NLS локализоваться в ядре.

Гибкий пептид содержит по меньшей мере одну аминокислоту, по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 12 аминокислот, по меньшей мере 14 аминокислот, по меньшей мере 16 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по меньшей мере 30 аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере 45 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 60 аминокислот, по меньшей мере 70 аминокислот, по меньшей мере 80 аминокислот, по меньшей мере 90 аминокислот или примерно 100 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления гибкий пептид будет обеспечивать движение одного белка относительно другого, с целью повышения растворимости белка и/или увеличения его активности. Подходящие линкерные области включают полиглициновый участок, последовательность GPRRRR (SEQ ID NO: 56) комбинаций остатков глицина, пролина и аланина.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок по изобретению может содержать дополнительную химическую группу, включающую, среди прочего, флуоресцентные группы, биотин, полиэтиленгликоль (ПЭГ), аналоги аминокислот, неприродные аминокислоты, фосфатные группы, гликозильные группы, радиоизотопные метки и фармацевтические молекулы. В еще одних вариантах осуществления гетерологичный полипептид может содержать одну или более химически активных групп, включая, среди прочего, кетон, альдегид, остатки Cys и остатки Lys.

В конкретном варианте осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению содержат метку, связанную с конъюгатом или с С-концевым или N-концевым доменом указанного слитого белка или варианта указанного полипептида. Указанная метка, как правило, представляет пептидную или аминокислотную последовательность, которая может быть использована для выделения или очистки указанного слитого белка. Таким образом, указанная метка способна связываться с одним или несколькими лигандами, например, такими как один или несколько лигандов аффинной матрицы, такой как хроматографический носитель или гранула с высокой аффинностью. Примером указанной метки является гистидиновая метка (His-метка или HT), например метка, содержащая 6 остатков гистидина (His₆ или H₆), которая может связываться на колонке с никелем (Ni²⁺) или кобальтом (Co²⁺) с высокой аффинностью. His-метка обладает необходимым свойством, состоящим в том, что она может связываться со своими лигандами в условиях, в которых денатурируется большинство белков и разрушается большинство белок-белковых взаимодействий. Таким образом, ее можно использовать для удаления белка-приманки, меченного H₆, с последующим разрушением белок-белковых взаимодействий, в которых участвовал белок-приманка.

Дополнительные иллюстративные неограничивающие примеры меток, пригодных для выделения или очистки слитого белка, включают Arg-метку, FLAG-метку (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 57), Strep-метку (WSHPQFEK; SEQ ID NO: 58), эпитоп, который может распознаваться антителом, такой как с-тус-метка (распознаваемый антителом против с-тус), HA-метку (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 59), V5-метку (GKPIPNLLGLDST; SEQ ID NO: 60), SBP-метку, S-метку, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлоза-связывающий домен, хитин-связывающий домен, глутатион-S-трансферазную метку, мальтоза-связывающий белок, NusA, TrxA, DsbA, Avi-метку и т.д. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 60:523-525), аминокислотную последовательность, такую как AHGHRP (SEQ ID NO: 61) или PINDHDNPHLVIHSGMTCXXC (SEQ ID NO: 62), β-галактозидазу и т.п.

При желании, метка может быть использована для выделения или очистки указанного слитого белка.

Полинуклеотид, вектор и клетка-хозяин по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид по изобретению или конъюгат по изобретению.

Термины "полинуклеотид", "нуклеиновая кислота" и "молекула нуклеиновой кислоты" используются взаимозаменяемо для обозначения полимерных форм нуклеотидов любой длины. Полинуклеотиды могут содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или их аналоги. Нуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную в настоящее время. Термин "полинуклеотид" включает, например, одноцепочечные, двухцепочечные и тройные спиральные молекулы, ген или участок гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, нуклеиновокислотные зонды и праймеры. В дополнение к нативной молекуле нуклеиновой кислоты, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может также включать модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты.

В рамках изобретения термин "мРНК" относится к РНК, которая может транслироваться в клетке. В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению представляет собой мРНК. мРНК может быть синтезирована химическим методом, может быть получена с помощью транскрипции *in vitro* или может быть синтезирована *in vivo* в клетке-мишени. Нуклеотидные последовательности, которые образуют полинуклеотид, кодирующий конъюгат или слитый белок по изобретению, находятся в одной и той же правильной рамке считывания для их экспрессии.

В еще одном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид по изобретению.

В рамках изобретения термин "вектор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей необходимые последовательности для того, чтобы после транскрипции и трансляции указанных последовательностей в клетке продуцировался полипептид, кодируемый полинуклеотидом по изобретению. Указанная последовательность операбельно связана с дополнительными сегментами, которые обеспечивают ее автономную репликацию в клетке-хозяине, представляющей интерес. Предпочтительно вектор представляет собой экспрессионный вектор, который определяется как вектор, который в дополнение к областям автономной репликации в клетке-хозяине содержит области, операбельно связанные с нуклеиновой кислотой по изобретению, и которые способны усиливать экспрессию продуктов нуклеиновой кислоты по изобретению. Векторы по изобретению можно получить с использованием методов, широко известных в данной области.

Примеры векторов включают, не ограничиваясь этим, вирусные векторы, "голую" ДНК или векторы экспрессии РНК, плазмидные, космидные или фаговые векторы, векторы экспрессии ДНК или РНК, связанные с катионными конденсирующими агентами, векторы экспрессии ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты. Подходящими векторами, содержащими полинуклеотид по изобретению, являются векторы, полученные из векторов экспрессии в прокариотах, такие как pUC18, pUC19, pBluescript и их производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаги и "челночные" векторы, такие как pSA3 и pAT28, векторы экспрессии в дрожжах, такие как векторы типа 2-микронных плазмид, интегративные плазмиды, векторы YEP, центромерные плазмиды и подобные, векторы экспрессии в клетках насекомых, такие как векторы серии pAC и серии pVL, векторы экспрессии в растениях, такие как векторы серии pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCambia, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE и подобные, и векторы экспрессии в клетках высших эукариот на основе вирусных векторов (аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, а также ретровирусов и, в частности, лентивирусов), а также невирусные векторы, такие как pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d и pTDT1. В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению находится в векторе, выбранном из группы, состоящей из ретровирусных векторов pEGFP или pBabe и лентивирусных векторов pTRIPZ или pSLIK.

Вектор по изобретению можно использовать для трансформации, трансфекции или инфицирования клеток, которые могут быть трансформированы, трансфицированы или инфицированы указанным вектором. Указанные клетки могут представлять прокариотические или эукариотические клетки.

Вектор предпочтительно содержит полинуклеотид по изобретению, операбельно связанный с последовательностями, которые регулируют экспрессию полинуклеотида по изобретению. Регуляторные последовательности для применения в настоящем изобретении могут представлять ядерные промоторы или, альтернативно, энхансерные последовательности и/или другие регуляторные последовательности, которые повышают экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. В принципе, можно использовать любой промотор в настоящем изобретении при условии, что указанный промотор совместим с клетками, в которых должен экспрессироваться полинуклеотид. Таким образом, промоторы, подходящие для реализации настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь этим, конститутивные промоторы, такие как происходящие из геномов эукариотических вирусов, таких как полиомавирус,

аденовирус, SV40, CMV, вирус саркомы птиц, вирус гепатита В, промотор гена металлотioneина, промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса, области LTR ретровирусов, промотор гена иммуноглобулинов, промотор гена актина, промотор гена EF-1альфа, а также индуцибельные промоторы, когда экспрессия белков зависит от добавления молекулы или экзогенного сигнала, такие как тетрациклиновые системы, система NFkB/УФ-свет, система Cre/Lox и промотор генов белков теплового шока, регулируемые промоторы РНК-полимеразы II, описанные в WO 2006/135436, и тканеспецифические промоторы.

В еще одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полипептид по изобретению, конъюгат по изобретению, полинуклеотид по изобретению или вектор по изобретению.

Клетки, подходящие для настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь этим, клетки млекопитающих, растений, насекомых, грибов и бактерий. Бактериальные клетки включают без ограничения клетки грамположительных бактерий, такие как штаммы рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Staphylococcus*, и клетки грамотрицательных бактерий, такие как клетки рода *Escherichia* и *Pseudomonas*. Клетки грибов включают предпочтительно клетки дрожжей, такие как *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* и *Hansenula polymorpha*. Клетки насекомых включают без ограничения клетки *Drosophila* и клетки Sf9. Клетки растений включают среди прочего клетки сельскохозяйственных культур, таких как зерновые, лекарственных или декоративных растений или луковичных. Подходящие для настоящего изобретения клетки млекопитающих включают линии эпителиальных клеток (свиньи и т.д.), линии клеток остеосаркомы (человека и т.д.), линии клеток нейробластомы (человека и т.д.), эпителиальные карциномы (человека и т.д.), глиальные клетки (мышей и т.д.), линии клеток печени (обезьяны и т.д.), клетки СНО (яичника китайского хомячка), клетки COS, клетки ВНК, клетки HeLa, 911, AT1080, A549, 293 или PER.C6, клетки NTERA-2 ECC человека, клетки D3 линии mESC, эмбриональные стволовые клетки, отличные от человеческих, клетки NIH3T3, 293N, REN и MCF-7, и клетки hMSCs.

Все термины и варианты осуществления, описанные ранее, в равной степени применимы к этому аспекту изобретения.

Фармацевтические композиции по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически эффективное количество полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида по изобретению, конъюгата по изобретению, полинуклеотида по изобретению, вектора по изобретению или клетки-хозяина по изобретению, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В рамках настоящего изобретения выражение "фармацевтическая композиция" относится к составу, который адаптирован для введения заранее определенной дозы одного или нескольких терапевтических пригодных агентов в клетку, группу клеток, орган, ткань или животное, где имеет место неконтролируемое деление клеток, как при раке.

В рамках изобретения выражение "фармацевтически эффективное количество" понимается как количество, способное обеспечить терапевтический эффект, и которое может определить специалист в данной области с помощью обычно используемых средств. Количество полипептида по изобретению или его функционально эквивалентного варианта, конъюгата, полинуклеотида, вектора или клетки-хозяина по изобретению или противоопухолевого соединения, которое может быть объединено в фармацевтических композициях по изобретению, будет варьироваться в зависимости от субъекта и конкретного способа введения. Специалисту в данной области будет понятно, что дозировки также можно определить с помощью руководств Goodman and Goldman's, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ninth Edition (1996), Appendix II, p. 1707-1711 и Goodman and Goldman's, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Tenth Edition (2001), Appendix II, p. 475-493.

Подходящая дозировка активного соединения или соединений в фармацевтической композиции будет зависеть от типа рака, подлежащего лечению, тяжести и течения заболевания, от того, вводят композицию в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на пептид или полипептид, и решения лечащего врача. Количество полипептида по изобретению или его функционально эквивалентного варианта, конъюгата, полинуклеотида, вектора или клетки-хозяина по изобретению соответственно вводят пациенту один раз или в течение серии процедур. В зависимости от типа и тяжести заболевания подходящий уровень дозировки обычно составляет примерно от 0,01 до 500 мг на 1 кг массы тела пациента в сутки, которые можно вводить в однократной или многократных дозах. Предпочтительно уровень дозировки будет составлять примерно от 0,1 до примерно 250 мг/кг в сутки; более предпочтительно примерно от 0,5 до примерно 100 мг/кг в сутки. Подходящий уровень дозировки может составлять примерно от 0,01 до 250 мг/кг в сутки, примерно от 0,05 до 100 мг/кг в сутки или примерно от 0,1 до 50 мг/кг в сутки. В этом диапазоне дозировка может составлять от 0,05 до 0,5, от 0,5 до 5 или от 5 до 50 мг/кг в сутки. Для перорального введения композиции предпочтительно обеспечиваются в форме таблеток, содержащих от 1,0 до 1000 мг активного ингредиента, в частности 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 400,0; 500,0; 600,0; 750,0; 800,0; 900,0 и 1000,0 мг активного ингредиента для симптоматической корректировки дозы для пациента, которого лечат. Соединения могут вводиться по схеме от 1 до 4 раз в сутки, предпочтительно 1 или 2 раза в сутки.

Фармацевтические композиции по изобретению также содержат один или более дополнительных фармацевтически приемлемых эксципиентов. "Фармацевтически приемлемый эксципиент" означает терапевтически неактивное вещество, которое используется для включения активного ингредиента и которое является приемлемым для пациента с фармакологической/токсикологической точки зрения и для химика-фармацевта, который производит его, с физической/химической точки зрения с учетом композиции, формуляции, стабильности, приемлемости для пациента и биодоступности. Эксципиент или носитель также включает любое вещество, которое служит для повышения доставки и эффективности активного соединения в фармацевтической композиции. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают одно или более из воды, физиологического раствора, забуференного фосфатом физиологического раствора, декстрозы, глицерина, этанола и тому подобное, а также их комбинаций. Во многих случаях будет предпочтительным включить в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно включать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности или эффективность слитого белка или композиций, составляющих часть фармацевтических композиций. Примеры подходящих носителей хорошо известны в литературе (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). Примерами носителей, без ограничения, является группа сахаридов, таких как лактоза, декстро́за, сахароза, сорбит, маннит, ксилит, эритрит и мальтит; группа крахмалов, таких как кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал и картофельный крахмал; группа целлюлоз, таких как целлюлоза, метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза и гидроксилпропилметилцеллюлоза; и группа наполнителей, таких как желатин и поливинилпирролидон. В некоторых случаях может быть добавлен дезинтегрант, такой как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или альгинат натрия.

Количество и природа фармацевтически приемлемых эксципиентов зависят от требуемой лекарственной формы. Фармацевтически приемлемые эксципиенты известны специалистам в данной области (Fauli y Trillo C. (1993) "Tratado de Farmacia Galenica", Luzan 5, S.A. Ediciones, Madrid). Указанные композиции можно приготовить с помощью общепринятых способов, известных в данной области техники ("Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, US).

Для фармацевтических композиций, содержащих агент, который представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать в любой из различных систем доставки, известных специалистам в данной области техники, включающих нуклеиновую кислоту и системы экспрессии на основе бактерий, вирусов и млекопитающих, например, такие как рекомбинантные экспрессионные конструкции, представленные в настоящем документе. Методы включения ДНК в такие экспрессионные системы хорошо известны специалистам в данной области. ДНК также может быть "голой", как описано, например, в публикации Ulmer et al., Science, 259:1745-49, 1993 и обзоре Cohen, Science 259:1691-1692, 1993. Поглощение "голой" ДНК можно повысить нанесением ДНК на биodeградируемые шарики, которые эффективно транспортируются в клетки.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть доставлены в клетку в соответствии с любым из нескольких способов, описанных в данной области (см., например, Akhtar et al., Trends Cell Bio. 2:139 (1992); Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., Mol. Membr. Biol. 16:129-40 (1999); Hofland and Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-92 (1999); Lee et al., ACS Symp. Ser. 752:184-92 (2000); патент США № 6395713; публикация международной заявки WO 94/02595); Selbo et al., Int. J. Cancer 87:853-59 (2000); Selbo et al., Tumour Biol. 23:103-12 (2002); публикации патентных заявок США № 2001/0007666 и 2003/077829). Такие способы доставки, известные специалистам в данной области, включают, не ограничиваясь этим, инкапсулирование в липосомы, ионтофорез или включение в другие носители, такие как биodeградируемые полимеры; гидрогели; циклодекстрины (см., например, Gonzalez et al., Bioconj. Chem. 10:1068-74 (1999); Wang et al., публикации международных заявок № WO 03/47518 и WO 03/46185); микросферы на основе поли(молочной-гликолевой) кислоты (PLGA) и PLCA (также пригодные для доставки пептидов, полипептидов и других веществ) (см., например, патент США № 6447796; публикация заявки на патент США № 2002/130430); биodeградируемые нанокапсулы; и биоадгезивные микросферы или белковоподобные векторы (публикация международной заявки № WO 00/53722). В еще одном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты для применения в изменении (подавлении или усилении) иммунного ответа в иммунных клетках и для лечения иммунологического заболевания или расстройства также можно формулировать или готовить комплексы с полиэтиленгликолем и его производными, такими как производные полиэтиленгликоля-полиэтиленгликоль-N-ацетилгалактозамина (PEI-PEG-GAL) или полиэтиленгликоль-полиэтиленгликоль-три-N-ацетилгалактозамина (PEI-PEG-triGAL) (см. также, например, публикацию заявки на патент США № 2003/0077829).

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция или фармацевтическая комбинация по изобретению дополнительно содержат вместе или отдельно противоопухолевый агент.

В рамках изобретения термин "противоопухолевый агент" понимается как указанное биологическое или химическое соединение, с помощью которого лечат опухоли или предупреждают их образование. В предпочтительном варианте осуществления указанный противоопухолевый агент выбран из группы, состоящей из цитотоксического агента, антиангиогенного агента, антиметастатического агента и антипролиферативного агента.

В рамках настоящего изобретения термин "цитотоксический агент" относится к агенту, который способен индуцировать гибель клеток и обладает способностью замедлять рост, останавливать рост или разрушать клетки, и в частности, быстро пролиферирующие клетки и, еще более конкретно, опухолевые клетки. Гибель клеток может быть вызвана в результате любого механизма, например, такого как апоптоз, хотя она не ограничивается этой причиной, и также в результате ингибирования метаболизма, вмешательства в организацию цитоскелета или химической модификации ДНК. Термин "цитотоксический агент" включает любой химиотерапевтический агент, в том числе небольшие органические молекулы, пептиды, олигонуклеотиды и т.п.; токсины; ферменты; цитокины; радиоизотопы или радиотерапевтические агенты.

"Антиангиогенный агент" понимается как химическое или биологическое вещество, которое ингибирует или уменьшает образование новых кровеносных сосудов, т.е. ангиогенез.

Антиангиогенные агенты, которые можно использовать с полипептидом по первому аспекту изобретения или со слитым белком по второму аспекту изобретения, включают, без ограничения, антиангиогенный агент, выбранный из группы паклитаксела, 2-метоксиэстрадиола, приномастата, батимастата, BAY 12-9566, карбоксиамидотриазола, CC-1088, декстрометорфана уксусной кислоты, диметилксантена уксусной кислоты, эндостатина, IM-862, маримастата, пенициллина, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, скваламина лактата, SU5416, талидомида, комбрестатина, тамоксифена, COL-3, неовастата, BMS-275291, SU6668, анти-VEGF-антитела, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, интерейкина-12, IM862, амилорида, ангиостатина, ангиостатина KI-3, ангиостатина KI-5, каптоприла, DL-альфа-дифторметилорнитина, DL-альфа-дифторметилорнитина HCl, эндостатина, фумагиллина, гербимицина А, 4-гидроксибензилретинамида, джуглона, ламинина, гексапептида ламинина, пентапептида ламинина, лавендустина А, медроксипрогестерона, миноциклина, ингибитора плацентарной рибонуклеазы, сурамина, тромбоспондина, антител, направленных против проангиогенных факторов (например, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназы, проангиогенных факторов роста (например, Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); ингибиторов mTOR (например, Torisel); α -, β - и γ -интерферона, IL-12, ингибиторов матричной металлопротеиназы (например, COL3, маримастат, батимастат); ZD6474, SUI248, витайксина; ингибиторов PDGFR (например, Gleevec); NM3 и 2-ME2; циклопептидов, таких как цикленгитид.

"Антиметастатический агент" понимается как химическое или биологическое вещество, которое ингибирует или уменьшает метастазирование, т.е. дальнейшее распространение, в основном лимфатическим или кровеносным путем, клеток, вызывающих рак, и рост новых опухолей в местах распространения указанных метастазов.

"Антипролиферативный агент" понимается как химическое или биологическое вещество, которое способно предотвращать или ингибировать образование или рост опухолей. Антипролиферативные агенты включают, не ограничиваясь этим:

(i) антиметаболиты, такие как антиметаболиты фолиевой кислоты (аминоптерин, деноптерин, метотрексат, эдотрексат, триметрексат, нолатрексед, лометрексол, пеметрексед, ралтитрексед, пиритрексим, птероптерин, лейковорин, 10-пропаргил-5,8-дидеазафолат (PDDF, CB3717)), аналоги пурина (кладрибин, клофарабин, флударабин, меркаптопурин, пентостатин, тиогуанин) и аналоги пиримидина (капецитабин, цитарабин или ара-С, децитабин, фторурацил, 5-фторурацил, доксифлуридин, флоксуридин и гемцитабин);

ii) природные продукты, такие как противоопухолевые антибиотики и ингибиторы митоза, такие как алкалоиды барвинка, такие как виндезин, винкрестин, винбластин, винорелбин; таксаны, такие как паклитаксел (TaxolTM), доцетаксел (TaxotereTM); колхицин (NSC 757), тиоколхицин (NSC 361792), производные колхицина (например, NSC 33410) и аллоколхицин (NSC 406042); галихондрин В (NSC 609395); доластатин 10 (NSC 376128); майтанзин (NSC 153858); ризоксин (NSC 332598); эпотилон А, эпотилон В; дискодермолит; эстрамустин; нокодазол;

(iii) гормоны и их антагонисты, такие как тамоксифен, торемифен, анастрозол, арзоксифен, лазофоксифен, ралоксифен, нафоксидин, фулвестрант, аминоклутетимид, тестолактон, атаместан, экземестан, фаздрозол, форместан, летрозол, гозерелин, лейпрорелин или лейпролид, бузерелин, гистрелин, мегестрол и флуоксиместерон;

(iv) биологические агенты, такие как вирусные векторы, альфа-интерферон и интерлейкины;

(v) соединения на основе платины, такие как карбоплатин, [цис-диамминдихлороплатина, (CDDP)], оксалиплатин, ипроплатин, недаплатин, триплатина тетранитрат, тетраплатин, сатраплатин (JM216), JM118 [цис-амминдихлороплатина(II)], JM149 [цис-амминдихлор(циклогексиламин)транс-дигидроксоплатина(IV)], JM335 [транс-амминдихлордигидроксоплатина (IV)], трансплатин, ZD0473,

цис,транс,цис-Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(OOCCH₃)₂Cl, маланат-2-диаминоциклогексано-платин (II), 5-сульфосалицилат-транс-(1,2-диаминоциклогексан)платин(II) (SSP), поли-[(транс-1,2-диаминоциклогексан)платин]карбоксиамилоза (POLY-PLAT) и 4-гидроксисульфонилфенилацетат (транс-1,2-диаминоциклогексан) платина (II) (SAP) и т.п.; и

(vi) ДНК-алкилирующие лекарственные средства, такие как азотистые иприты, нитрозомочевины, производные этиленмина, алкилсульфонаты и триазены, включая, не ограничиваясь этим, циклофосфамид (CytoxanTM), бусульфан, импросульфан, пипосульфан, пипоброман, мелфалан (L-сарколизин), хлорамбуцил, мехлоретамин или мустин, урамустин или урациловый иприт, новембихин, фенестерин, трофосфамид, ифосфамид, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), хлорзотоцин, фотемустин, нимустин, ранимустин, семустин (метил-CCNU), стрептозоцин, тиотепа, триэтиленмеламин, триэтилендиотфосфорамид, прокарбазин, алтретамин, дакарбазин, митозоломид и темозоломид.

В случае фармацевтических композиций или комбинаций по изобретению, которые содержат противоопухолевое средство, композиция может быть представлена в виде одного состава (например, в виде таблетки или капсулы, содержащей фиксированное количество каждого из компонентов) или, с другой стороны, может быть представлена в виде отдельных составов, которые затем объединяют для совместного, последовательного или раздельного введения. Композиции или комбинации по изобретению также включают состав в виде набора компонентов, в котором компоненты составлены по отдельности, но упакованы в одном и том же контейнере. Специалистам в данной области будет понятно, что составление различных компонентов в случае второй фармацевтической композиции по изобретению может быть аналогичным, иными словами, составленным аналогично (в таблетках или пилюлях), что позволяет их вводить одним и тем же путем. В случае, когда различные компоненты по изобретению составлены по отдельности, то два компонента могут быть представлены в блистерной упаковке. Каждый блистер содержит лекарственные средства, которые необходимо принимать в течение дня. Если лекарственные средства должны приниматься несколько раз в день, то лекарственные средства, соответствующие каждому введению, можно поместить в разные секции блистера, предпочтительно с указанием в каждой секции блистера времени суток, когда их следует принимать. Альтернативно, компоненты композиции по изобретению можно формулировать по-разному, так чтобы различные компоненты вводились по-разному. Таким образом, возможно, чтобы первый компонент формулировался в виде таблетки или капсулы для его перорального введения, а второй компонент был составлен для его внутривенного введения, или наоборот. Соотношение компонентов, которые входят в состав композиций, используемых во второй фармацевтической композиции по изобретению, может корректироваться специалистом в данной области в зависимости от противоопухолевого средства, используемого в каждом конкретном случае, а также от целевого показания. Таким образом, изобретение предусматривает композиции, в которых соотношение количеств двух компонентов может составлять от 50:1 до 1:50, в частности от 20:1 до 1:20, от 1:10 до 10:1 или от 5:1 до 1:5.

Фармацевтические композиции или комбинации по изобретению можно вводить любым подходящим путем, таким как пероральный путь, топический путь, ингаляционный или парентеральный путь, при условии, что будут включены фармацевтически приемлемые эксципиенты, необходимые для приготовления желаемой лекарственной формы. Предпочтительным путем введения указанных фармацевтических композиций является внутривенный путь.

"Пероральный путь" понимается как путь, при котором фармацевтическая композиция попадает в организм после ее проглатывания. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может находиться в лекарственной форме, подходящей для ее введения пероральным путем, будь она твердой или жидкой. Лекарственные формы, подходящие для их введения пероральным путем, могут представлять собой таблетки, капсулы, сиропы или растворы и могут содержать любой обычный эксципиент, известный в данной области, такой как связующие вещества, например сироп, камедь, желатин, сорбит или поливинилпирролидон; наполнители, например лактоза, сахар, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицин; смазочные агенты для таблетирования, например стеарат магния; дезинтегрирующие агенты, например крахмал, поливинилпирролидон, натрия гликолят крахмала или микрокристаллическая целлюлоза; или фармацевтически приемлемые смачивающие агенты, такие как лаурилсульфат натрия. Твердые композиции для перорального введения можно приготовить с помощью обычных процессов смешивания, наполнения или прессования. Повторяющиеся операции смешивания можно использовать для полного распределения активного агента в тех композициях, в которых используются большие количества наполнителей. Указанные операции являются общепринятыми в данной области. Таблетки можно приготовить, например, посредством влажного или сухого гранулирования и, возможно, нанесения покрытия в соответствии со способами, известными в обычной фармацевтической практике, в частности, энтеросолюбильного покрытия.

С другой стороны, "топический путь" понимается как введение несистемным путем и включает нанесение фармацевтической композиции по изобретению наружно на эпидермис, в ротовую полость и закапывание указанной композиции в уши, глаза и нос, и при котором он в значительной степени не попадает в кровоток. "Системный путь" понимается как введение пероральным путем, внутривенным путем, внутрибрюшинным путем и внутримышечным путем. "Ингаляция" понимается как введение интра-

назальным путем и пероральной ингаляцией. Лекарственные формы, подходящие для указанного введения, такие как препарат в виде аэрозоля или ингалятор с дозатором, могут быть получены с помощью обычных методик. В одном варианте осуществления путь введения представляет интраназальный путь.

В рамках изобретения термин "парентеральный" включает введение внутривенным путем, внутрибрюшинным путем, внутримышечным путем или подкожным путем. Лекарственные формы для подкожного, внутримышечного и внутривенного введения при парентеральном введении обычно являются предпочтительными.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции по изобретению могут быть адаптированы для их парентерального введения, такие как стерильные растворы, суспензии или лиофилизированные продукты в подходящей разовой лекарственной форме. Фармацевтические композиции, подходящие для ее инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (когда они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий экстемпоре. Для введения внутривенным путем некоторые подходящие носители включают забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить. Она должна быть стабильной в условиях приготовления и хранения и должна быть защищена от загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, которая включает, например, воду, этанол, фармацевтически приемлемый полиол, такой как глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и их подходящие смеси. Нужная текучесть может обеспечиваться, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, обеспечением необходимого размера частиц в случае дисперсии и с помощью поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может достигаться с использованием различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и подобных. Во многих случаях предпочтительно включить в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может достигаться включением в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарат алюминия и желатин.

Инъекционные стерильные растворы можно приготовить включением активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией вышеуказанных ингредиентов, если необходимо, с последующей стерилизацией фильтрованием через стерильные мембраны. Как правило, дисперсии готовят включением активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и остальные необходимые ингредиенты из числа вышеуказанных агентов. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые обеспечивают порошок с активным ингредиентом плюс любой желаемый дополнительный ингредиент из его предварительно профильтрованного стерильного раствора.

Фармацевтические композиции по изобретению можно соответственно вводить посредством импульсной инфузии, например, с уменьшением доз композиции. Предпочтительно дозу вводят посредством инъекций, более предпочтительно посредством внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным.

В одном варианте осуществления первую или вторую фармацевтические композиции по изобретению готовят с носителями, которые будут защищать указанный полипептид от быстрого выведения из организма, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы для введения. Можно использовать биodeградируемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления указанных составов будут понятны специалистам в данной области. Материалы также можно получить коммерческим путем в компаниях Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc.

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

Несмотря на тот факт, что полипептид по изобретению и конъюгаты и слитые белки, содержащие полипептид по изобретению, способны к транслокации через биологические мембраны, специалисту в данной области будет понятно, что также может быть удобным включать конъюгаты или слитые белки, содержащие полипептиды по изобретению, в наночастицы.

В рамках изобретения термин "наночастица" относится к любому материалу, имеющему размеры в диапазоне 1-1000 нм. В некоторых вариантах осуществления наночастицы имеют размеры в диапазоне 2-200 нм, предпочтительно в диапазоне 2-150 нм и еще более предпочтительно в диапазоне 2-100 нм.

Наночастицы могут способствовать сохранению целостности полипептида в биологических жидкостях до тех пор, пока он не достигнет органа-мишени. Кроме того, в случае композиций, содержащих противоопухолевый агент, инкапсулирование композиции может уменьшить вторичные эффекты, вызванные противоопухолевым агентом. Наконец, наночастицы также можно модифицировать таким образом, чтобы включать группы, которые позволяют направлять наночастицу в орган, представляющий интерес.

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

Подходящие наночастицы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают такие наноразмерные материалы, как наночастица на основе липидов, суперпарамагнитная наночастица, нанооболочка, полупроводниковый нанокристалл, квантовая точка, наночастица на основе полимеров, наночастица на основе силикона, наночастица на основе диоксида кремния, наночастица на основе металла, фуллерен и нанотрубка.

Направленная доставка может быть достигнута добавлением лигандов без нарушения способности наночастиц доставлять свои полипептидные нагрузки. Предполагается, что это обеспечит доставку к определенным клеткам, тканям и органам. Специфичность нацеливания систем доставки на основе лигандов основана на распределении рецепторов лигандов на различных типах клеток. Нацеливающий лиганд может быть нековалентно или ковалентно связан с наночастицей и может быть конъюгирован с наночастицами различными способами, как здесь обсуждено.

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

Понятно, что составление продукта по изобретению в виде наночастицы не предназначено или предназначено не только для облегчения проникновения продукта внутрь клетки, но для защиты продукта от деградации и/или для облегчения направленной доставки наночастицы в орган, представляющий интерес.

Фармацевтические композиции по изобретению пригодны для введения млекопитающему любого вида, предпочтительно человеку.

Все термины и варианты осуществления, описанные ранее, в равной степени применимы к этому аспекту изобретения.

Медицинские применения.

В еще одном аспекте изобретение относится к полипептиду или функционально эквивалентному варианту указанного полипептида по изобретению, конъюгату по изобретению, полинуклеотиду по изобретению, вектору по изобретению, клетке-хозяину по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в медицине.

В еще одном аспекте изобретение относится к полипептиду или функционально эквивалентному варианту указанного полипептида по изобретению, конъюгату по изобретению, полинуклеотиду по изобретению, вектору по изобретению, клетке-хозяину по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в профилактике и/или лечении рака.

Альтернативно, изобретение относится к способу профилактики и/или лечения рака, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида по изобретению, конъюгата по изобретению, полинуклеотида по изобретению, вектора по изобретению, клетки-хозяина по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению.

Альтернативно, изобретение относится к применению полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида по изобретению, конъюгата по изобретению, полинуклеотида по изобретению, вектора по изобретению, клетки-хозяина по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения рака.

"Профилактика" понимается как введение соединения на начальной или ранней стадии заболевания или также для предупреждения его возникновения.

Термин "лечение" используется для обозначения введения соединения для контроля прогрессирования заболевания до или после появления клинических признаков. Контроль прогрессирования заболевания понимается как благоприятные или желательные клинические результаты, которые включают, не ограничиваясь этим, уменьшение симптомов, уменьшение продолжительности заболевания, стабилизацию патологических состояний (в частности, предотвращение дополнительных нарушений), задержку прогрессирования заболевания, подавление патологического состояния и ремиссию (как частичную, так и полную). Контроль прогрессирования заболевания также включает продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, когда лечение не проводят.

В рамках изобретения "пациент" включает любое животное, у которого имеется рак, или у которого проявляется симптом или рак, или у которого имеется риск возникновения рака или проявления симптома рака. Подходящие пациенты включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или

морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или животных-компаньонов (таких как кошка или собака). Включаются приматы, отличные от людей, и предпочтительно пациенты-люди.

Термин "рак" относится к заболеванию, характеризующемуся неконтролируемым делением клеток (или увеличением их выживаемости или устойчивости к апоптозу), способностью указанных клеток проникать в другие соседние ткани (инвазия) или распространением в другие области тела, где клетки обычно отсутствуют (метастазирование) через лимфатические и кровеносные сосуды. В зависимости от того, могут ли опухоли распространяться в результате инвазии и метастазирования, они классифицируются как доброкачественные или злокачественные: доброкачественные опухоли представляют собой опухоли, которые не могут распространяться в результате инвазии или метастазирования, т.е. они растут только локально; в то время как злокачественные опухоли представляют собой опухоли, которые способны распространяться в результате инвазии и метастазирования. Способы по настоящему изобретению пригодны для лечения локальных и злокачественных опухолей.

В рамках изобретения термин "рак" включает, не ограничиваясь этим, следующие типы рака: рак молочной железы; рак желчных путей; рак мочевого пузыря; рак головного мозга, включая глиобластомы и медуллобластомы; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстого кишечника; рак эндометрия; рак пищевода; рак желудка; гематологические новообразования, включая острый лимфоцитарный лейкоз и миелолейкоз; Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз/лимфому; волосатоклеточный лейкоз; хронический миелолейкоз, множественную миелому; СПИД-ассоциированные лейкозы и Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых; интраэпителиальные неоплазии, включая болезнь Боуэна и болезнь Педжета; рак печени; рак легких; лимфомы, включая болезнь Ходжкина и лимфоцитарные лимфомы; нейробластомы; рак ротовой полости, включая плоскоклеточный рак; рак яичников, включая опухоли, возникающие из эпителиальных клеток, стромальных клеток, зародышевых клеток и мезенхимальных клеток; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; рак прямой кишки; саркомы, включая лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, фибросаркому и остеосаркому; рак кожи, включая меланому, карциному из клеток Меркеля, саркому Капоши, базальноклеточную карциному и плоскоклеточный рак; рак яичка, включая герминогенные опухоли, такие как семинома, несеминома (тератомы, хориокарциномы), стромальные опухоли и эмбрионально-клеточные опухоли; рак щитовидной железы, включая аденокарциному щитовидной железы и медулярную карциному; и рак почки, включая аденокарциному и опухоль Вильмса. Другие виды рака будут известны специалисту в данной области. В предпочтительном варианте осуществления раком, который поддается лечению, является рак легкого, предпочтительно аденокарцинома легкого, более предпочтительно KRas-опосредованная аденокарцинома легкого.

В предпочтительном варианте осуществления рак представляет солидную опухоль.

Все комбинации соединений по изобретению и типов рака включены в настоящее изобретение.

В предпочтительном варианте осуществления рак выбран из группы, состоящей из глиобластомы и немелкоклеточного рака легких.

"Глиобластома", также известная как глиобластома и астроцитомы IV степени, является наиболее распространенным и наиболее агрессивным раком, который начинается в головном мозге.

В рамках изобретения термин "NSCLC" или "немелкоклеточный рак легкого" относится к группе гетерогенных заболеваний, сгруппированных вместе, поскольку их прогноз и лечение примерно одинаковы в соответствии с гистологической классификацией Всемирной организации здравоохранения/Международной ассоциации по изучению рака легкого (Travis W.D. et al. Histological typing of lung and pleural tumours. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999):

1. Плоскоклеточная карцинома (SCC), составляющая от 30 до 40% NSCLC, начинается в крупных дыхательных путях, но растет медленнее, что означает, что размер этих опухолей зависит от постановки диагноза.

2. Аденокарцинома является наиболее распространенным субтипом NSCLC, на долю которого приходится от 50 до 60% NSCLC, которая начинает развиваться около газообменной поверхности легкого и которая включает субтип, бронхоальвеолярную карциному, которая может иметь различные ответы на лечение.

3. Крупноклеточная карцинома является быстрорастущей формой, которая растет вблизи поверхности легких. Это в первую очередь диагноз исключения, и, когда проводится больше обследований, ее обычно переклассифицируют на плоскоклеточную карциному или аденокарциному.

4. Аденосквамозная карцинома представляет тип рака, который включает два типа клеток: плоские клетки (тонкие, плоские клетки, которые выстилают некоторые органы) и железистоподобные клетки.

5. Карциномы с плеоморфными, саркоматоидными или саркоматозными элементами. Это группа редких опухолей, отражающих непрерывность в гистологической гетерогенности, а также эпителиальную и мезенхимальную дифференцировку.

6. Карциноидная опухоль представляет собой медленно растущую нейроэндокринную опухоль легкого, которая начинается в клетках, способных высвобождать гормон в ответ на стимул, генерированный нервной системой.

7. Карциномы типа слюнных желез начинаются в клетках слюнных желез, расположенных внутри

крупных дыхательных путей легкого.

8. Неклассифицированные карциномы включают онкологические заболевания, которые не входят ни в одну из вышеупомянутых категорий рака легких.

Также изобретение включает следующее:

1. Полипептид, включающий полипептид с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида.

2. Полипептид по п.1, где указанный полипептид состоит из полипептида с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или состоит из функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

3. Полипептид по п.1 или 2, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет серин.

4. Полипептид по п.3, состоящий из SEQ ID NO: 4.

5. Конъюгат, содержащий:

а) полипептид или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида по любому из пп.1-4 и

б) химическую группу, которая способствует захвату клетками полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

6. Конъюгат по п.5, где химическая группа, которая способствует захвату клетками полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида, представляет собой последовательность проникающего в клетку пептида и где указанная последовательность проникающего в клетку пептида и указанный полипептид или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида образуют слитый белок.

7. Конъюгат по п.6, где последовательность проникающего в клетку пептида выбрана из группы, состоящей из GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 38) и RRRRRRLR (SEQ ID NO: 39).

8. Конъюгат по любому из пп.5-7, дополнительно содержащий дополнительный сигнал ядерной локализации, где, в частности, сигнал ядерной локализации выбран из группы, состоящей из PKKKRKV (SEQ ID NO: 6), PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 54) и KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 7).

9. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп.1-4 или конъюгат по любому из пп.5-8.

10. Вектор, включающий полинуклеотид по п.9.

11. Клетка-хозяин, содержащая полипептид по любому из пп.1-4, конъюгат по любому из пп.5-8, полинуклеотид по п.9 или вектор по п.10.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически эффективное количество полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида по любому из пп.1-4, конъюгата по любому из пп.5-8, полинуклеотида по п.9, вектора по п.10 или клетки-хозяина по п.11, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

13. Полипептид или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида по любому из пп.1-4, конъюгат по любому из пп.5-8, полинуклеотид по п.9, вектор по п.10, клетка-хозяин по п.11 или фармацевтическая композиция по п.12 для применения в медицине.

14. Полипептид или его функционально эквивалентный вариант по любому из пп.1-4, конъюгат по любому из пп.5-8, полинуклеотид по п.9, вектор по п.10, клетка-хозяин по п.11 или фармацевтическая композиция по п.12 для применения в профилактике и/или лечении рака.

15. Полипептид или его функционально эквивалентный вариант, конъюгат, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения по п.14, где рак выбран из группы, состоящей из глиобластомы и немелкоклеточного рака легких.

Все термины и варианты осуществления, описанные ранее, в равной степени применимы к этому аспекту изобретения.

Изобретение подробно описано ниже посредством следующих примеров, которые являются чисто иллюстративными и никоим образом не ограничивают объем изобретения.

Примеры

Материалы и методы.

Трансфекция клеток мРНК Omomus и OmocS.

мРНК для Omomus и мутанта OmocS получали от Trilink Biotechnologies в концентрациях 0,782 и 0,876 мг/мл соответственно (ARCA кэпирован и полностью замещен модифицированными 5-метил-С и псевдо-У). Последовательность ДНК Omomus или OmocS вставляли в вектор даунстрим от промотора РНК-полимеразы Т7 и поли(Т)хвоста, расположенного на 3'-конце. Модифицированную 5-метилцитидин-5'-трифосфатом и псевдоуридин-5'-трифосфатом РНК получали транскрипцией *in vitro* с использованием РНК-полимеразы Т7. РНК также кэпировали с использованием аналога кэп-структуры [3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G] РНК. Матричная ДНК-вектор расщепляли, используя ДНКазу, и остаточный трифосфат удаляли обработкой фосфатазой. Затем продукт РНК очищали и оценивали целостность и количество с использованием электрофореза в агарозном геле и спектрофотометра Nanodrop соответственно. РНК хранили при -80°C.

Реагент для трансфекции липофектамин MessengerMAX получали от Thermo Fisher Scientific. Клеточные линии A549 и U87 высевали из расчета 500 и 1000 клеток на лунку соответственно в 96-луночные планшеты. Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% L-глутамин (полная среда). Через 24 ч клетки трансфицировали комплексами липофектамин-мРНК. 3 мкг мРНК на каждые 2 мкл липофектамина отдельно разводили в бессывороточной среде и инкубировали в течение 10 мин. Затем разведения мРНК и липофектамина смешивали и инкубировали в течение 5 мин для образования комплексов. Лунки дважды промывали бессывороточной средой. Клетки обрабатывали серийными разведениями, начиная с 1 до 0,0625 мкг мРНК на лунку в 100 мкл полной бессывороточной среды. Для каждой концентрации контрольные клетки обрабатывали только липофектамином и трехкратные повторы использовали для каждого условия опыта. После 4 ч трансфекции бессывороточные среды и комплексы мРНК-липофектамин удаляли из лунок и заменяли полной средой. Клетки инкубировали в течение 3 суток. Затем жизнеспособность оценивали с использованием CellTiter-Blue от Promega. Поглощение относительно необработанных лунок рассчитывали для каждого условия опыта. Статистическую значимость рассчитывали с использованием t-критерия.

Трансфекция клеток мРНК OmoCS и OmoCA.

мРНК для Omomus и мутанта OmoCA получали от Trilink Biotechnologies (ARCA экпирован и полностью замещен модифицированными 5-метил-С и псевдо-У). Концентрации мРНК для OmoCS и OmoCA определяли при 0,845 и 0,832 мг/мл соответственно с использованием спектрофотометра Nanodrop. Реагент для трансфекции липофектамин MessengerMAX получали от Thermo Fisher Scientific. Клетки A549 высевали из расчета 500 клеток на лунку в 96-луночном планшете. Клетки культивировали в среде Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% L-глутамин (полная среда). Через 24 ч клетки трансфицировали комплексами липофектамин-мРНК. 2 мкг мРНК на каждые 1,5 мкл липофектамина отдельно разводили в бессывороточной среде и инкубировали в течение 10 мин. Затем разведения мРНК и липофектамина смешивали и инкубировали в течение 5 мин для образования комплексов. Лунки дважды промывали бессывороточной средой. Клетки обрабатывали серийными разведениями 1:2, начиная с 1 мкг мРНК на лунку в 50 мкл полной бессывороточной среды (200 нМ). Для каждой концентрации клетки либо не обрабатывали (необработанные), либо обрабатывали только липофектамином (Lipo только) и использовали в качестве контрольных лунок. Трехкратные повторы использовали для каждого условия. После 4 ч трансфекции бессывороточные среды и комплексы мРНК-липофектамин удаляли из лунок и заменяли полной средой. Клетки инкубировали в течение 3 суток. На этой точке клеточную плотность оценивали с использованием окрашивания кристаллическим фиолетовым.

Поглощение относительно необработанных лунок рассчитывали для каждой концентрации.

Пример 1.

Удивительно, но мутант OmoCS демонстрирует более высокое ингибирование роста клеток по сравнению с исходной последовательностью Omomus в низкой концентрации (фиг. 1). Такую повышенную эффективность по сравнению с исходной последовательностью Omomus, по меньшей мере частично можно объяснить гипотезой о том, что окисленный пограничный цистеин гомодимера Omomus будет предотвращать гетеродимеризацию Omomus с Mus или с Max, ограничивая активность Omomus посредством простой конкуренции за связывание с Е-боксом. Вместо этого мутант OmoCS будет повышать другие биологические активности Omomus, способствуя формированию гетеродимерных популяций.

Пример 2.

Удивительно, но мутант OmoCA ведет себя точно так же, как OmoCS в данном анализе пролиферации (фиг. 2).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

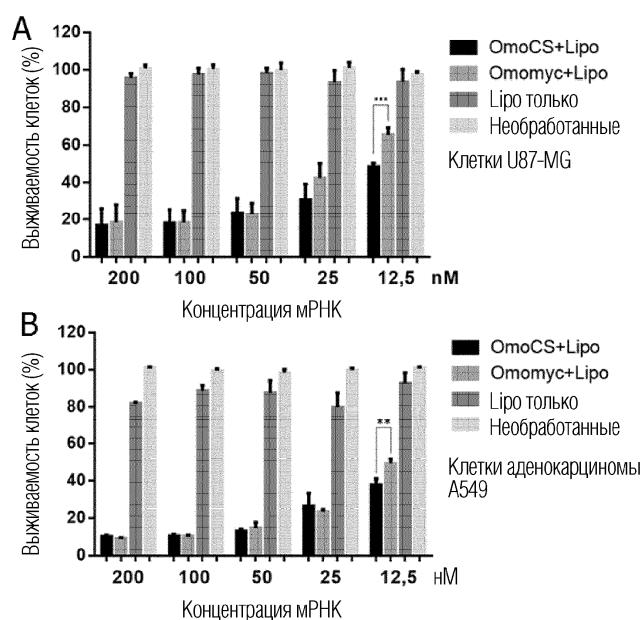
1. Полипептид, включающий полипептид с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином, или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида, который получен в результате делеции, инсерции, добавления или консервативной замены одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1, или который получен в результате химической модификации полипептида с SEQ ID NO: 1, и который по существу сохраняет опухолесупрессорную активность SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином.

2. Полипептид по п.1, где указанный полипептид состоит из полипептида с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином или состоит из функционально эквивалентного варианта указанного полипептида, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином.

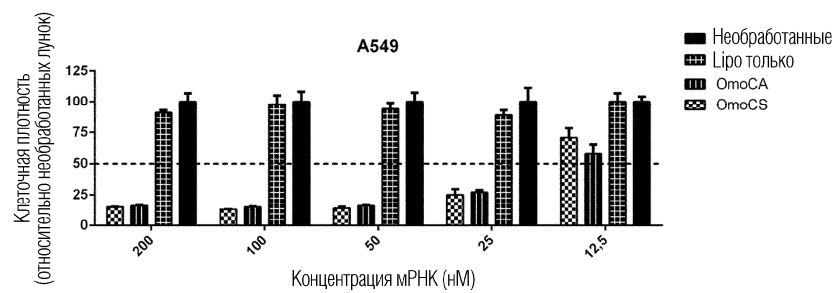
3. Полипептид по п.1, где указанный полипептид состоит из полипептида с SEQ ID NO: 3, где остаток X в положении 90 в SEQ ID NO: 3 не является цистеином.

4. Полипептид по любому из пп.1-3, где остаток X представляет собой серин.

5. Полипептид по п.4, состоящий из SEQ ID NO: 4.
6. Полипептид по любому из пп.1-3, где остаток X представляет собой аланин.
7. Конъюгат, содержащий:
 - а) полипептид или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида по любому из пп.1-6 и
 - б) химическую группу, которая способствует захвату клеткой полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.
8. Конъюгат по п.7, где химическая группа, которая способствует захвату клеткой полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида, представляет собой последовательность проникающего в клетку пептида и где указанная последовательность проникающего в клетку пептида и указанный полипептид или функционально эквивалентный вариант указанного полипептида образуют слитый белок.
9. Конъюгат по п.8, где последовательность проникающего в клетку пептида выбрана из группы, состоящей из GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 38) и RRRRRRLR (SEQ ID NO: 39).
10. Конъюгат по любому из пп.7-9, дополнительно содержащий дополнительный сигнал ядерной локализации, где, в частности, сигнал ядерной локализации выбран из группы, состоящей из PKKKRKV (SEQ ID NO: 6), PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 54) и KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 7).
11. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп.1-6.
12. Полинуклеотид, кодирующий конъюгат по любому из пп.8-10.
13. Вектор, включающий полинуклеотид по любому из пп.11 или 12.
14. Клетка-хозяин, содержащая полипептид по любому из пп.1-6, конъюгат по любому из пп.7-10, полинуклеотид по любому из пп.11 или 12 или вектор по п.13.
15. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически эффективное количество полипептида или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида по любому из пп.1-6, конъюгата по любому из пп.7-10, полинуклеотида по любому из пп.11 или 12 или вектора по п.13 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
16. Применение полипептида или его функционально эквивалентного варианта по любому из пп.1-6, конъюгата по любому из пп.7-10, полинуклеотида по любому из пп.11 или 12, вектора по п.13 или фармацевтической композиции по п.15 для профилактики и/или лечения рака.
17. Применение по п.16, где рак выбран из группы, состоящей из глиобластомы и немелкоклеточного рака легких.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2