

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293128 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.06

(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

(54) ПРОТИВОРАКОВЫЕ БЕЛКИ

(31) 202021019406

(32) 2020.05.07

(33) IN

(86) PCT/IB2021/053503

(87) WO 2021/224724 2021.11.11

(71) Заявитель:
ЮНИКЕМ ЛАБОРАТОРИЗ ЛТД (IN)

(72) Изобретатель:
Сате Дхананджей, Ияппан
Сарванакумар, Павар Дилип (IN)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака посредством ингибирования ангиогенеза у субъекта. Лечение включает введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного лектина.

A1

202293128

202293128

A1

ПРОТИВОРАКОВЫЕ БЕЛКИ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к применению лектина в лечении рака. В частности, настоящее изобретение относится к применению белка – лектина, оказывающего антиангиогенное и апоптотическое действия на раковые клетки.

Предшествующий уровень техники

Активная иммунная система обуславливает здоровый индивид, поскольку иммунная система защищает от нескольких заболеваний или патологических состояний. Также полагают, что иммунная система противостоит даже образованию рака за счет разрушения раковой клетки. Когда иммунная система не может так действовать, это может приводить к образованию рака. Слово «рак» описывает целый ряд заболеваний, которые характеризуются нерегулируемым ростом и неконтролируемым делением патологических клеток. Рак может возникать фактически из любой ткани или органа в организме человека. Несмотря на недавние разработки в медицине и понимание молекулярной основы рака, точные причины какого-либо данного типа рака неизвестны у конкретного индивида. При условии данного недостатка знания, по-прежнему очень сложно находить виды лечения рака, которые были бы эффективными для конкретного индивида.

Поиск эффективного лечения рака также проблематичен, поскольку при раке у индивида часто развивается устойчивость к разным терапевтическим стратегиям. Кроме того, эффективное средство лечения рака может становиться менее эффективным, поскольку определенные типы раковых заболеваний могут распространяться из их первичного источника или очага. Данный процесс, называемый метастазированием, обеспечивает распространение раковых клеток в другие жизненно важные части организма через кровеносную и лимфатическую системы.

Кроме того, другие проблемы, с которыми сталкиваются при лечении данных клеток, метастазированных в удаленную ткань, включают метастазированные клетки, выживающие в удаленной ткани за счет преодоления местной иммунной защиты и приобретения ими своего собственного кровоснабжения и питательных веществ в результате процесса ангиогенеза. Тем не менее, образование метастазов остается ключевой причиной того, почему эффективные виды лечения рака сложно разработать.

Существующие противораковые терапии в настоящее время включают разные методики абляции, такие как хирургические способы; криогенные или тепловые способы на ткани, ультразвуковые, радиочастотные и радиационные; химические способы, такие как фармацевтические, цитотоксические средства, моноклональные антитела; или трансартериальная химиоиммобилизация (TACE - от англ. trans-arterial chemo immobilization) и их комбинации в соответствии с конкретными схемами в зависимости от конкретного типа и стадии рака, подлежащего лечению. Однако, данные терапии связаны по существу с высокими затратами. Кроме того, современные варианты лечения являются высоко инвазивными со значимой токсичностью и побочными эффектами и приводят к общему низкому качеству жизни пациентов.

Специфичность в отношении злокачественных клеток помогает избежать повреждения здоровых клеток и уменьшить токсичность, ассоциированную с терапией. На протяжении озлокачествления и метастазирования, гликаны модифицируются из-за измененного патофизиологического состояния и измененного гликозилирования раковыми клетками. Данные модифицированные гликаны можно легко выявлять посредством белка, специфично связывающего гликан, или опухолеспецифического белка – лектина (далее в данном документе, лектина). Кроме того, данные белки также играют значительную роль в декодировании информации, связанной с гликанами. Лектины представляют собой встречающиеся в природе белки, связывающие углеводы; которые могут специфично выявлять антиген, ассоциированный с раком, за счет измененного гликозилирования. Благодаря своей уникальной способности и специфичности лектины полезны в диагностических и терапевтических целях.

Онкофетальный антиген Томсена–Фриденрейха ($\text{Gal}\beta 1\text{--}3\text{GalNAc-}\alpha\text{-O-Ser/Thr}$, T или TF), который экспрессируется при более чем 90% человеческих раковых заболеваний и коррелирует с прогрессированием опухоли и метастазированием. В предыдущей патентной заявке заявителя WO2010/095143 раскрыт лектин, выделенный из гриба *Sclerotium rolfsii*, обладающий высокой специфичностью связывания в отношении TF.

В патенте номер CN106397554 описан способ получения и применения с предоставлением белка - лектина *Cordyceps militaris* (CCM). Лектин-CCM и его антипролиферативные активности тестировали *in vitro* на линии клеток рака шейки матки человека HeLA.

В патенте номер KR1020030091386 описан способ получения экстракта омелы корейской (*Viscum album coloratum*) с ингредиентом лектином в экстракте.

При введении мышинной экспериментальной модели лектин демонстрировал повышенную противоопухолевую и противометастатическую активность.

Рекомбинантные лектины омелы использованы для лечения рака кожи, в частности, злокачественной меланомы в форме метастатической опухоли (стадия III и стадия IV). В патенте номер RU0002639445 упоминается фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный лектин омелы, для лечения меланотического рака. Известно, что лечение рекомбинантными лектинами омелы значительно увеличивает выживаемость раковых пациентов.

В патенте номер US7045300 описан белок - лектин, MFA (агглютинин *Maackia fauriei*), выделенный из корейского бобового растения *Maackia fauriei*, используемый в качестве диагностического средства в случае раковых заболеваний и терапевтически используемый в качестве антипролиферативного средства (или противоракового средства) при заболеваниях, при которых существует N-ацетилнейраминавая кислота, в частности, при раке молочной железы, меланоме или гепатоме.

В патенте США 10294295 описан способ лечения рака посредством модуляции ангиогенеза с помощью антагониста VEGF (от англ. Vascular endothelial growth factor - Фактор роста эндотелия сосудов), в частности, последовательности галектина-1 использовали в качестве антагониста VEGF для ингибирования ангиогенеза для лечения рака.

В патенте номер KR1020030028855 описана противораковая композиция, содержащая экстракт омелы корейской (*Viscum album coloratum*) с лектином в качестве активного ингредиента для ингибирования метастазов посредством ингибирования ангиогенеза и ингибирования теломеразной активности.

Даже при том, что существует немного сообщений о лектине, демонстрирующем эффективность в качестве противоопухолевых средств, они хорошо не изучены. Лектины демонстрируют высокую специфичность, меньшую цитотоксичность и легко синтезируются в большом масштабе. Существует насущная необходимость в разработке лектинов в качестве нового, дешевого и лучшего способа лечения опухолей. Необходимо знать молекулярный механизм действия лектинов или комбинации лектина с любыми противораковыми лекарственными средствами для усиления их терапевтического потенциала.

Целью настоящего изобретения является изучение и разработка лектинов таким образом, чтобы сделать их доступными в качестве противоопухолевых средств.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно одному аспекту изобретения предложен рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака.

5 Согласно еще одному аспекту изобретения предложен рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака посредством ингибирования ангиогенеза в раковой клетке, включающем введение терапевтически эффективного количества белка – рекомбинантного лектина.

10 Согласно еще одному аспекту изобретения предложен рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака посредством индукции апоптоза в раковой клетке, включающем введение терапевтически эффективного количества белка – рекомбинантного лектина. Согласно данному аспекту лектин индуцирует раннюю и позднюю стадию апоптоза в раковых клетках.

15 Согласно еще одному аспекту изобретения предложен белок - рекомбинантный лектин в качестве ингибитора ангиогенеза и/или индуктора апоптоза с предотвращением, таким образом, метастазирования раковых клеток.

Апоптоз представляет собой процесс запрограммированной гибели клеток посредством сигнальных путей. Термин «индукция апоптоза» означает в данном документе активацию сигнальных путей, ответственных за запрограммированную гибель клеток опухолевых клеток.

20 Метастазы представляют собой распространение раковых клеток из их первичного источника к другим жизненно важным частям организма через кровеносную и лимфатическую системы. Термин «предотвращение метастазов» означает в данном документе уменьшение метастазов из первичного источника или очага рака посредством уменьшения распространения к жизненно важным органам и частям организма.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения рака посредством ингибирования ангиогенеза в раковых клетках, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества белка – рекомбинантного лектина.

30 В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения рака посредством индукции апоптоза в раковых клетках, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества белка – рекомбинантного лектина.

35 Согласно одному аспекту изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения в способе лечения рака, содержащая терапевтически эффективное количество белка – рекомбинантного лектина и фармацевтически

приемлемое вспомогательное вещество, где композиция ингибирует ангиогенез в раковых клетках.

Согласно еще одному аспекту изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения в способе лечения рака, содержащая терапевтически эффективное количество белка рекомбинантного – лектина и фармацевтически эффективное приемлемое вспомогательное вещество, где композиция индуцирует апоптоз в раковых клетках.

Согласно еще одному аспекту изобретения предложен способ предотвращения ангиогенеза в опухолевых клетках с использованием терапевтически эффективного количества белка – рекомбинантного лектина.

Согласно еще одному аспекту изобретения предложен способ индукции апоптоза опухолевых клеток с использованием терапевтически эффективного количества белка - рекомбинантного лектина.

Согласно предшествующим аспектам изобретения рак представляет собой карциному, такую как аденокарцинома или плоскоклеточная карцинома.

Согласно конкретному аспекту настоящего изобретения аденокарцинома представляет собой карциному пищевода, поджелудочной железы, предстательной железы, шейки матки, молочной железы, толстой кишки или колоректальной аденокарциномы, легкого, желчного протока, влагалища, мочевого протока или аденокарциному желудка.

Согласно конкретному аспекту настоящего изобретения плоскоклеточная карцинома представляет собой рак плоских клеток кожи, легкого, ротовой полости, щитовидной железы, пищевода, влагалища, шейки матки, яичника, головы и/или шеи, предстательной железы или мочевого пузыря.

Согласно еще одному конкретному аспекту настоящего изобретения рак представляет собой рак головного мозга.

Согласно любому из предшествующих аспектов изобретения эффективная концентрация белка – рекомбинантного лектина составляет от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл.

Согласно любому из предшествующих аспектов изобретения терапевтически эффективная доза белка – рекомбинантного лектина составляет от примерно 0,1 мг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела субъекта.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения рекомбинантный лектин ингибирует миграцию и/или пролиферацию эндотелиальных клеток, модулирует секрецию VEGF и уменьшает содержание гемоглобина и неоваскуляризацию в раковых клетках.

Согласно любому из предшествующих аспектов изобретения рекомбинантный лектин модулирует один или более маркеров или сигнальных путей, выбранных из нижеследующего: ATF-2, ERK1/2; JNK; MEK-1; P90RSK; STAT-3; p53; MMP; HGF; C-kit; Her-2; GMSCF; IL-6 (от англ. interleukin – интерлейкин); IL-8; p38/MAPK (от англ. mitogen-activated protein kinase - митоген-активированная протеинкиназа); PDGF (от англ. platelet-derived growth factor - фактор роста тромбоцитов); TNFR (от англ. Tumor Necrosis Factor Receptor - рецептор фактора некроза опухоли); MPO; Галектин-3; Fol-1; CD40L; Ангиопоэтин-2; Калликреин-5; Остеопонтин; TNF- α (от англ. tumor necrosis factor - Фактор некроза опухоли); Эндоглин; MAPK/EGFR/Ras/Raf; ADBR1; CCR5; IL-4/STAT6; NF-KB; PI3K/AKT/FOXO3; PKC/CA2+; и TNF- α /JNK, TRAIL через FADD, каспазу - 3, Лептин, Контактин-1, Notch-1 и HGFR/c-MET.

Согласно любому из предшествующих аспектов рекомбинантный лектин представлен аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 60%-ной идентичностью с SEQ ID NO.1, или аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной гомологией с SEQ ID NO.1. Согласно конкретному аспекту рекомбинантный лектин выбран из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4.

Согласно любому из предшествующих аспектов рекомбинантный лектин представляет собой белок - модифицированный лектин (а именно, белок рекомбинантный – лектин, имеющий по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углевода), как определено в WO2020/044296, который включен в данный документ посредством ссылки, в частности, в отношении определения лектина. В конкретном аспекте рекомбинантный лектин содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углевода SEQ ID NO.1 или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 60%-ной гомологией с SEQ ID NO.1 .

В еще одном конкретном аспекте сайт связывания углевода представляет собой первичный и/или вторичный сайт связывания углевода.

В еще одном конкретном аспекте первичный сайт связывания углевода содержит положение, выбранное из 1 или более из 27, 28, 47, 48, 70, 71, 72 и 105 в SEQ ID NO.1 или в аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 60%-ной гомологией с SEQ ID NO.1.

В еще одном конкретном аспекте положение модификации аминокислоты выбрано из одного или более из:

- i) 27 и/или 28;
- ii) 47 и/или 48;
- iii) 70, 71 и/или 72; и/или
- iv) 105.

5 В еще одном конкретном аспекте вторичный сайт связывания углевода содержит положение, выбранное из одного или более из 77, 78, 80, 101, 112 и 114 в SEQ ID NO.1 или в аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 60%-ной гомологией с SEQ ID NO.1.

10 В еще одном конкретном аспекте положение модификации аминокислоты выбрано из одного или более из:

- i) 77, 78 и/или 80;
- ii) 101; и/или
- iii) 112 и/или 114.

15 В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты, такую, что заменяющая аминокислота заменяет исходную аминокислоту.

В еще одном конкретном аспекте замена аминокислоты в первичном сайте связывания углевода выбрана из одной или более из нижеследующего:

20 i) в положении 27: консервативная, благоприятная или неблагоприятная аминокислота, где консервативная аминокислота является неполярной или кислой; благоприятной является полярная или основная и неблагоприятная аминокислота является неполярной;

25 ii) в положении 28: консервативная, благоприятная, нейтральная или неблагоприятная аминокислота, где консервативная аминокислота является неполярной; благоприятной является полярная, нейтральная является кислой или основной и неблагоприятная аминокислота является полярной;

iii) в положении 47: неблагоприятная аминокислота, которая является основной или неполярной;

30 iv) в положении 48: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной;

v) в положении 70: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной;

vi) в положении 71: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной;

35 vii) в положении 72: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной; и/или

viii) в положении 105: консервативная, благоприятная, нейтральная или неблагоприятная аминокислота, где консервативная аминокислота является основной или неполярной; благоприятной является полярная, нейтральной является кислая, основная или полярная и/или неблагоприятная аминокислота является полярной, неполярной или кислой.

В еще одном конкретном аспекте замена аминокислоты во вторичном сайте связывания углевода выбрана из одной или более из нижеследующего:

i) в положении 77: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной;

ii) в положении 78: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной;

iii) в положении 80: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной;

iv) в положении 101: благоприятная, неблагоприятная или нейтральная аминокислота, где благоприятная аминокислота является полярной или основной, неблагоприятная аминокислота является неполярной и нейтральная аминокислота является неполярной или кислой;

v) в положении 112: неблагоприятная аминокислота, которая является неполярной;

vi) в положении 114: неблагоприятная аминокислота, которая является полярной;

В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок лектин содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в N-конце SEQ ID NO. 1 или в аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 60%-ной гомологией с SEQ ID NO. 1, где N-конец содержит положение, выбранное из: 1 и/или 2 в SEQ ID NO. 1, или соответствующее положение в последовательности, обладающей по меньшей мере 60%-ной, 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 97%-ной или 99%-ной гомологией с ней.

В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты в положении 1, и где заменяющая аминокислота не является треонином или валином.

В еще одном конкретном аспекте заменяющая аминокислота выбрана из: аланина, глицина, пролина или серина.

В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты в положении 2, и где заменяющая аминокислота представляет собой триптофан.

В еще одном конкретном аспекте отщепление метионина – инициатора увеличено или уменьшено, по сравнению с контролем.

В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты в положении 76 представляет собой замену аминокислоты неполярной аминокислотой.

5 В еще одном конкретном аспекте неполярная аминокислота выбрана из: глицина, валина или лейцина.

В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты в положении 44 или 89 представляет собой замену аминокислоты неполярной аминокислотой.

10 В еще одном конкретном аспекте неполярная аминокислота выбрана из: лейцина, изолейцина или валина.

В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок лектин растворим, частично растворим или нерастворим и/или обладает цитотоксичностью.

15 В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок – лектин обладает цитотоксичностью, которая составляет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% контроля.

В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок лектин обладает цитотоксичностью в процентах, которая составляет меньше чем 10% контроля или не обладает цитотоксичностью.

20 В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок лектин обладает цитотоксичностью в процентах, которая составляет по меньшей мере 10%-ное, 20%-ное, 30%-ное, 40%-ное, 50%-ное, 60%-ное, 70%-ное, 80%-ное, 90%-ное или 100%-ное увеличение, по сравнению с цитотоксичностью контроля.

В еще одном конкретном аспекте длина модифицированного белка лектина равна или меньше чем 500, 400, 300, 200 или 150 аминокислот.

25 В еще одном конкретном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения ангиогенеза в опухолевых клетках с использованием терапевтически эффективного количества рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

30 В еще одном конкретном аспекте согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ индукции апоптоза опухолевых клеток с использованием терапевтически эффективного количества рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

35 В еще одном конкретном аспекте согласно настоящему изобретению предложен эффективный антиангиогенез с использованием от примерно 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

Настоящее изобретение дополнительно относится к эффективному антиангиогенезу в опухолевых клетках с использованием от примерно 0,1 мкг/мл до 200 мкг/мл концентрации рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

5 Настоящее изобретение дополнительно относится к эффективному апоптозу с использованием от примерно 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

Настоящее изобретение дополнительно относится к эффективному апоптозу опухолевых клеток с использованием от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200
10 мкг/мл концентрации рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

В еще одном конкретном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы и/или рака головного мозга посредством предотвращения ангиогенеза и/или посредством
15 индукции апоптоза в опухолевых клетках с использованием рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

В еще одном конкретном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы и/или рака головного мозга посредством предотвращения ангиогенеза и/или посредством
20 индукции апоптоза с использованием от примерно 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

В еще одном конкретном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы и/или
25 рака головного мозга посредством предотвращения ангиогенеза и/или посредством индукции апоптоза в опухолевых клетках с использованием от примерно 0,1 мкг/мл до 200 мкг/мл концентрации рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

Настоящее изобретение также относится к оценке апоптотического действия
30 *in vitro* рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в линии клеток рака молочной железы, линии клеток рака толстой кишки, линии клеток рака поджелудочной железы и линиях клеток рака головного мозга.

Настоящее изобретение дополнительно относится к оценке модулирующего
35 действия рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную

последовательность SEQ ID NO. 2, на ключевые сигнальные пути, участвующие в патогенезе рака.

Настоящее изобретение дополнительно относится к оценке противоопухолевого потенциала рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному лектину, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в качестве ингибитора ангиогенеза и/или индуктора апоптоза, с предотвращением, таким образом, метастазирования раковых клеток.

Краткое описание прилагаемых последовательностей

SEQ ID NO. 1: представляет нативную аминокислотную последовательность лектина *S. rolf sii*.

SEQ ID NO. 2: представляет вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolf sii* (указан как Rec-2 в WO 2010/095143).

SEQ ID NO. 3: представляет вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolf sii* (указан как Rec-3 в WO 2010/095143).

SEQ ID NO. 4: представляет вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolf sii* (указан в WO 2014/203261).

Подробное описание изобретения

Термин «лектин», в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к белку, связывающему углевод.

Термин «белок», в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к полимеру из аминокислотных остатков.

Термин «аминокислота», в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые обладают функцией, которая похожа на встречающиеся в природе аминокислоты. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, и включают протеиногенные аминокислоты. Встречающиеся в природе аминокислоты также включают аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках. Синтетические аминокислоты включают неканонические аминокислоты, такие как селеноцистеин и пирролизин.

Типичные синтетические аминокислоты не являются протеиногенными аминокислотами.

Понятно, что аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии с разными биохимическими свойствами. Примеры включают: полярные аминокислоты, неполярные аминокислоты, кислые аминокислоты и основные аминокислоты. В одном воплощении аминокислота, используемая для модификации аминокислоты, представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из полярных, неполярных, кислых, основных аминокислот, селеноцистеина, пирролизина и неканонических аминокислот, но не ограничивающейся ими.

Термины «гомология» или «гомологичный», в том виде, в котором они используются в данном документе, относятся к двум или более приведенным сущностным объектам, которые обладают общей по меньшей мере частичной идентичностью по данной области или участку. Гомологичные или идентичные области, участки или домены относятся к части двух или более приведенных сущностных объектов, которые обладают гомологией или являются одинаковыми. Таким образом, в том случае, когда две последовательности являются идентичными по одной или более областям последовательности, они обладают идентичностью в данных областях. Существенная гомология относится к молекуле, которая является структурно или функционально консервативной, таким образом, что она имеет или, как предсказано, имеет по меньшей мере частичную структуру или функцию одной или более из структур или функций (например, биологическая функция или активность) референсной молекулы или релевантной/соответствующей области или части референсной молекулы, которой она гомологична.

В одном воплощении «гомология», выраженная в процентах, между двумя последовательностями определяется с использованием алгоритма BLASTP с параметрами по умолчанию (Altschul et al. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-02). В частности, алгоритм BLAST может быть доступен в интернете с использованием URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. В альтернативном воплощении, для глобальных выравниваний последовательностей, гомология, выраженная в процентах, между двумя последовательностями определяется с использованием алгоритма EMBOSS Needle с использованием параметров по умолчанию. В частности, алгоритм EMBOSS Needle может быть доступен в интернете с использованием URL: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

Если не указано иное, термин «гомология» использует взаимозаменяемо с термином «идентичность последовательностей» в настоящем описании изобретения.

Термин «рекомбинантный» означает, что нуклеиновую кислоту или полипептид искусственно или синтетически (а именно, не природным образом) изменен в результате вмешательства человека. Изменение можно проводить на материале, в пределах или удаленном из его естественной окружающей среды или состояния. Например, «рекомбинантная нуклеиновая кислота» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая получена посредством осуществления рекомбинации нуклеиновых кислот, например, во время клонирования, перестановки в ДНК или других хорошо известных способов молекулярной биологии. «Рекомбинантная молекула ДНК» состоит из сегментов ДНК, соединенных вместе посредством таких методик молекулярной биологии. Термин «рекомбинантный белок» или «рекомбинантный полипептид», в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к молекуле белка, которая экспрессируется с использованием рекомбинантной молекулы ДНК. Рекомбинантный белок согласно настоящему изобретению представляет собой белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID 1, которая также называется SEQ ID 1.

Термин «рекомбинантный белок» предназначен в данном документе для охвата любой фармацевтически приемлемой соли, сольвата, гидрата, пролекарства или любого другого соединения, которое, при введении пациенту, способно обеспечивать (прямо или опосредованно) соединение, как описано в данном документе. Получение солей, сольватов, гидратов и пролекарств можно осуществлять способами, известными в данной области.

Термины «эффективный» или «терапевтически эффективный» относятся к эффекту, достаточному для того, чтобы вызвать желательный биологический ответ. Как будет ясно обычным специалистам в данной области, эффект комбинации по изобретению может варьировать в зависимости от таких факторов, как желательный биологический конечный результат, фармакокинетика доставляемых средств, заболевание, подлежащее лечению, способ введения и пациент. Лечение обычно является «эффективным», если один или более симптомов или клинических маркеров уменьшаются. В качестве альтернативы, лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания, нарушения или медицинского состояния уменьшено или остановлено.

Термин «терапевтически эффективное количество», в том виде, в котором он используется в данном документе, представляет собой количество, достаточное для воздействия на желательные клинические результаты (а именно, достижения терапевтической эффективности). Терапевтически эффективное количество можно вводить за одно или более введений. В целях данного изобретения, терапевтически

эффективное количество рекомбинантного белка представляет собой количество, которое является достаточным для временного облегчения, улучшения состояния, стабилизации, обращения, предупреждения, замедления или задержки прогрессирования болезненного состояния.

5 Термин «фармацевтическая композиция» или «фармацевтически приемлемая композиция» или «фармацевтически приемлемый препарат» относится к смеси соединения, раскрытого в данном документе, с фармацевтическими вспомогательными веществами, такими как разбавители или носители (см., например, Reminton: The Science and Practice of Pharmacy 22nd ed., Parmaceutical Press (Sep. 15, 2012) и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition, Raymond Rowe, Rharmaceutical Press (2009)). Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения организму. Фармацевтические композиции будут обычно изготовлены для конкретного предполагаемого пути введения.

15 Термин «сигнальный путь» относится к каскаду химической реакции, в которой группа молекулы в клетке работает вместе с поддержанием процессов, таких как клеточные функции, дифференцировка клеток, пролиферация клеток и гибель клеток. При активации/ингибировании сигнального пути сигнал от биологически активной молекулы связывается с конкретным белковым рецептором на или в клетке и активирует данный сигнал. Пир активации первой молекулы передается сигнал активации на другую молекулу, и процесс повторяется до тех пор, пока не будет достигнута клеточная функция. Ненормальная активация сигнального пути может приводить к заболеваниям, таким как рак. Нацеливание на конкретную молекулу, ответственную за патологический сигнальный путь, может приводить к лечению рака.

25 Согласно первому аспекту изобретения предложен лектин для применения в способе лечения рака.

30 Согласно еще одному аспекту изобретения предложен рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака посредством ингибирования ангиогенеза в раковой клетке, где способ включает введение терапевтически эффективного количества белка - рекомбинантного лектина.

35 Как известно в данной области «ангиогенез» представляет собой рост новых кровеносных сосудов. Антиангиогенные средства представляют собой известные противораковые лекарственные средства, которые действуют посредством предотвращения роста кровеносных сосудов опухолей. Таким образом, в том виде, в котором она используется в данном документе, фразу «ингибирование ангиогенеза» будут понимать как предотвращение, откладывание или уменьшение

образования кровеносных сосудов. Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что лектины способны оказывать противораковое действие посредством ингибирования ангиогенеза.

Будет понятно, что ангиогенез предотвращается/ингибируется в опухоли, такой как опухоль в организме млекопитающего, например, организме человека.

Лектин может встречаться в природе. В одном воплощении лектин происходит из группы, состоящей из гриба и растений, но не ограничивающейся ими.

В некоторых воплощениях лектин представляет собой грибной лектин. Подходящие грибные лектины могут происходить из *Agaricus bisporus* (например, ABL), *Sclerotium rolfii* (например, SRL) и *Xerocomus chrysenteron* (например, XCL).

В некоторых воплощениях лектин происходит из почвенного фитопатогенного гриба, такого как *S. rolfii*. Под «происходящий из» будет подразумеваться, что лектин содержит аминокислотную последовательность, которая идентична или похожа на нативную последовательность и синтезируется в лаборатории с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Лектин может содержать аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 60%-ной, 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной гомологией с нативной последовательностью.

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность обладает по меньшей мере 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной гомологией с SEQ ID NO: 1.

Лектин может содержать аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 60%-ной гомологией с SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность обладает по меньшей мере 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной гомологией с SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях лектин содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Лектин может быть рекомбинантным или он может синтезироваться *de novo*. Способы получения рекомбинантных белков будут хорошо известны специалистам в данной области. Например, может быть предоставлена рекомбинантная молекула ДНК, такая как плазида или вирусный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с промотором, который может осуществлять контроль над

экспрессией лектина в подходящей клетке-хозяине. Молекула рекомбинантной ДНК может быть вставлена в подходящую клетку-хозяина с использованием способов, известных в данной области, например, посредством трансформации. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические клетки (например, *E. coli*) и как клетки
 5 низших эукариот (например, дрожжевые клетки), так и клетки высших эукариот. Затем клетку-хозяина можно культивировать в соответствующих условиях, в которых экспрессируется рекомбинантный лектин. Рекомбинантный лектин, таким образом, может быть получен посредством выделения из клетки-хозяина в виде экспрессионного продукта. Рекомбинантные белки могут быть очищены
 10 посредством общепринятых методик, известных в данной области, обычно общепринятых хроматографических методов.

В некоторых воплощениях лектин специфичен в отношении антигена TF. В некоторых воплощениях лектин специфичен в отношении О-гликанов.

В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} (концентрация
 15 полумаксимального ингибирования) не больше чем 100 мкг/мл, не больше чем 80 мкг/мл, не больше чем 50 мкг/мл, не больше чем 25 мкг/мл, не больше чем 20 мкг/мл, не больше чем 15 мкг/мл или не больше чем 10 мкг/мл против линии раковых клеток человека.

В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} не больше чем 25
 20 мкг/мл против линии клеток карциномы яичника, такой как клеточная линия PA-1 человека.

В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} не больше чем 20 мкг/мл против линии клеток карциномы шейки матки, такой как клеточная линия KB человека.

В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} не больше чем 50
 25 мкг/мл против линии клеток карциномы толстой и прямой кишки, такой как клеточная линия HT-29 человека.

В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} не больше чем 25 мкг/мл против линии раковых клеток поджелудочной железы (например,
 30 эпителиоидная карцинома поджелудочной железы или протоковая эпителиоидная карцинома), такой как клеточная линия PANC-1 человека.

В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} не больше чем 10 мкг/мл против линии клеток рака молочной железы (например, аденокарцинома
 35 груди, аденокарцинома молочной железы или метастатическая карцинома молочной железы), такой как клеточная линия MDA-MB-231 человека.

В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} не больше чем 15 мкг/мл против линии раковых клеток мочевого пузыря (например, карцинома мочевого пузыря или переходно-клеточная карцинома), такой как клеточная линия T-24 человека.

- 5 В некоторых воплощениях лектин имеет значение IC_{50} не больше чем 15 мкг/мл и 20 мкг/мл против линий опухолевых клеток головного мозга, таких как U251MG (глиобластома) и IOMM-Lee (менингиома), соответственно.

- Значения IC_{50} для данного терапевтического средства могут быть определены с использованием стандартных методик, которые будут известны специалисту. Например, значение IC_{50} лектина для определенного типа рака можно определять *in vitro* с использованием подходящей клеточной линии, которая репрезентативна для того типа рака. Кратко, клеточную линию можно обрабатывать белком – лектином, возможно вместе с контрольным агентом, который представляет собой утвержденное противораковое средство. Клеточную цитотоксичность можно
- 10 оценивать в необработанном образце, исследуемом образце и контроле, используя способы, хорошо известные специалисту в данной области, которые могут включать анализ жизнеспособности клеток на основе Кальцеина АМ или МТТ-тест или любой другой способ, известный специалисту. Цитотоксичность, выраженная в процентах, относительно необработанных клеток может быть рассчитана с использованием
- 15 формулы:

$$\text{Цитотоксичность} = [(RFU_{\text{необработан.}} - RFU_{\text{образец}}) / RFU_{\text{необработан.}}] * 100$$

RFU (от англ. relative fluorescence unit): относительные единицы флуоресценции

- Значение IC_{50} можно рассчитывать, используя программное обеспечение, известное специалисту, такое как программное обеспечение Pad Prism версия 4.01.
- 25

- Лектин может быть предложен в фармацевтически приемлемой форме, такой как жидкость (например, в водном растворе или суспензии или в виде масляного раствора или суспензии), твердое вещество (например, капсула или таблетка), лиофилизированный порошок, спрей, крем, лосьон или гель, везикулярные системы
- 30 доставки лекарственного средства, такие как билосомы, липосомы, ниосомы, трансферосомы, этосомы, сфингосомы, фармакосомы, многослойные везикулы, микросфера и т.п., но не ограниченные ими.

- В том виде, в котором он используется в данном документе, термин «водный раствор» представляет собой раствор, который получают в результате растворения
- 35 твердого или лиофилизированного средства, такого как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1, в воде или в буфере,

содержащем воду. Водный раствор также образуется, когда средство, такое как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1, находится в жидкой форме и смешивается с водой или буфером, содержащим воду.

5 Термины «рак», «опухоль» и «опухолевый» могут использоваться взаимозаменяемо в настоящей заявке, как будет понятно специалисту в данной области. Раковые заболевания или опухоли происходят в результате патологического роста клеток. Они образуются, когда нормальные клетки выходят из под контроля и осуществляют вытеснение. Образование опухолей часто влияет
10 на нормальное функционирование ткани, органа или организма.

Рак может начаться в любом месте в организме и может также распространяться на другие части организма. Распространение раковых клеток называется метастазированием. Таким образом, термин «рак» охватывает как первичный, так и метастатический рак. В том виде, в котором он используется в
15 данном документе, термин «рак» включает солидные опухоли и опухоли системы крови, но не ограничивается ими. Термин «рак» включает заболевания кожи, тканей, органов, кости, хряща. Примеры раковых заболеваний, которые можно лечить способами и композициями по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются раком желчного протока, мочевого пузыря, кости, головного мозга,
20 молочной железы, шейки матки, толстой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта (включая подвздошную кишку, толстую кишку, прямую кишку и/или задний проход), головы, почки, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, поджелудочной железы, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка, щитовидной железы, мочевого протока, влагалища и матки.

25 Опухоль может быть доброкачественной или злокачественной на любой стадии злокачественности.

Рак может представлять собой рак эпителиальных тканей, неэпителиальных тканей, клеток, которые образуют кожу, или ткани, выстилающей органы, клеток иммунной системы, соединительной ткани или клеток спинного мозга или головного
30 мозга.

В некоторых воплощениях рак может представлять собой солидную опухоль.

Рак может представлять собой карциному. В некоторых воплощениях рак может представлять собой аденокарциному. Аденокарцинома может представлять собой аденокарциному пищевода, поджелудочной железы, предстательной железы,
35 шейки матки, молочной железы, толстой кишки или или колоректальной

аденокарциномы, легкого, желчного протока, влагалища, мочевого протока или желудка.

В некоторых воплощениях рак представляет собой плоскоклеточную карциному. Плоскоклеточная карцинома может представлять собой плоскоклеточную карциному кожи, ротовой полости, легкого, щитовидной железы, пищевода, влагалища, шейки матки, яичника, головы и/или шеи, предстательной железы или мочевого пузыря.

В каком-то конкретном воплощении рак может представлять собой опухоль/рак головного мозга, который мог бы включать глиобластому, менингиому, астроцитому, глиому и нейробластому.

Будет понятно, что термин «лечение» может включать по существу вылечивание рака, предотвращение или замедление прогрессирования или уменьшение тяжести заболевания, предотвращение или уменьшение метастазов, ингибирование роста опухоли, уменьшение массы опухоли или устранение опухолей и/или улучшение (или временно или постоянно) симптомов, ассоциированных с заболеванием. Будет ясно, что симптомы будут варьировать в зависимости от типа рака, но могут включать боль, уменьшение или потерю функции, тошноту и/или неспособность, лихорадку, образование опухоли, иммуносупрессию и/или утомляемость.

Лечение может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества лектина. В некоторых воплощениях лектин вводят в дозе от примерно 0,05 мг/кг до примерно 1000 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 100 мг/кг.

В некоторых воплощениях лечение включает введение субъекту лектина таким образом, что эффективная концентрация лектина у субъекта составляет от примерно 0,001 мкг/мл до примерно 1000 мкг/мл, от 0,05 мкг/мл до примерно 500 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до 200 мкг/мл, от 0,15 мкг/мл до 150 мкг/мл.

В некоторых воплощениях рак выбран из рака молочной железы (например, аденокарциномы молочной железы), карциномы шейки матки, рака яичника (например, плоскоклеточной карциномы яичника) и рака поджелудочной железы (например, аденокарциномы поджелудочной железы), рака мочевого пузыря (например, уротелиальной карциномы), рака головного мозга (например, глиобластомы, менингиомы, астроцитомы, глиомы и нейробластомы), и лечение включает введение субъекту лектина, таким образом, что эффективная концентрация лектина у субъекта составляет от 0,1 мкг/мл до 200 мкг/мл.

В некоторых воплощениях лечение включает введение нецитотоксичной концентрации лектина.

Введение лектина может осуществляться любым подходящим путем, включая, но, не ограничиваясь нижеследующим: инъекция (включая внутривенную (болюс или инфузия), внутриартериальную, внутривнутрибрюшинную, подкожную (болюс или инфузия), внутримышечную или субарахноидальную), пероральный прием внутрь (например, таблетка, гель, леденец или жидкость), ингаляция, местная, через слизистую оболочку (как например, слизистую оболочку ротовой полости, носовой полости или прямой кишки), посредством доставки в форме спрея, таблетки, трансдермального пластыря, подкожного имплантата или в форме суппозитория.

Субъект может представлять собой субъект – млекопитающее. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека.

Антиангиогенез

Антиангиогенез играет важную роль в росте и прогрессировании рака. Кровеносные сосуды, проникающие в паренхиму опухоли, обеспечивают питание и кислород для размножения клеток. Контроль опухолевого ангиогенеза зависит от чистого баланса нескольких активаторов (ангиогенные факторы) и ингибиторов (антиангиогенные факторы), которые секретируются как опухолевыми клетками, так и инфильтрирующими клетками хозяина, такими как макрофаги и фибробласты. Ангиогенные факторы индуцируют секрецию эндотелиальными клетками протеаз и активаторов плазминогена, которые деградируют базальную мембрану сосудов, приводя к клеточной инвазии в окружающий матрикс и образованию новых сосудов. Сильные антиангиогенные молекулы ингибируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток посредством связывания с проангиогенными факторами или блокирования активностей рецепторов на поверхности эндотелиальных клеток.

Таким образом, в некоторых воплощениях, лектин способен ингибировать миграцию и/или пролиферацию клеток, таких как эндотелиальные клетки.

Способность лектина ингибировать миграцию и/или пролиферацию клеток можно тестировать, используя стандартные методики, такие как методики, описанные в данном документе.

Нецитотоксические концентрации рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, демонстрирующего антипролиферативное и, следовательно, антиангиогенное действия в эндотелиальных клетках, могут составлять от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл.

Оценку антипролиферативного действия рекомбинантного лектина проводили с Доксорубицином в качестве положительного контроля.

Рекомбинантный лектин демонстрировал дозозависимое ингибирующее действие, оказываемое на опосредованную сывороткой пролиферацию клеток.

Рекомбинантные лектины по настоящему изобретению, такие как имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, демонстрировали дозозависимое ингибирующее действие на опосредованную сывороткой пролиферацию клеток. Нецитотоксические концентрации рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, демонстрировали антипролиферативное и, следовательно, антиангиогенное действия в эндотелиальных клетках, в концентрациях, которые находились в интервале от примерно 20 мкг/мл до 100 мкг/мл.

Определение антиангиогенного действия рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в человеческих эндотелиальных клетках EA.Hy926 проводили с концентрацией лектина, находящейся в интервале от примерно 0,1 мкг/мл до 200 мкг/мл. Концентрация от 20 мкг/мл до 100 мкг/мл приводила к ингибированию пролиферации эндотелиальных клеток на от 15,51% до 58,53%, по сравнению с контролем. Такой же диапазон концентраций приводил к ингибированию миграции эндотелиальных клеток на от 71,5% до 82,4%, по сравнению в контролем (DMEM), после 72 ч.

Настоящее изобретение дополнительно относится к оценке *in vivo* антиангиогенного потенциала рекомбинантного лектина (такого как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, с использованием анализа на основе матригелевой пробки у мышей C57BL/6. Группа мышей, обрабатываемых рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, демонстрировала 23,6%-ное уменьшение в содержании гемоглобина в гомогенате матригелевой пробки, тогда как группа, обработанная Сунитинибом, демонстрировала максимальное уменьшение, а именно, 59,2% в содержании гемоглобина в гомогенате матригелевой пробки. Кроме того, неоваскуляризация незначительно уменьшалась у мышей, обрабатываемых рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в количестве 10 мг/кг.

Настоящее изобретение дополнительно относится к оценке модулирующего действия рекомбинантных лектинов, (таких как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2), на сигнальные пути, участвующие в патогенезе рака.

Лектин может модулировать один или более биомаркеров, выбранных из: MEK-1; P90RSK; STAT-3; p53; MMPs; HGF; EGF; C-kit; VEGF; VEGFR; Her-2/3;

GMSCF; IL-6; IL-8; p38/MAPK; PDGF; MPO; Fcγ-1; CD40L; Ангиопоэтина-2; Остеопонтина; Эндоглина; PlGF; BMP-9; Эндотелина-1.

Продemonстрировано модулирующее действие рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, на разные сигнальные пути и на ингибирование путей MAPK/EGFR/Ras/Raf, CCR5, IL-4/STAT6, NF-κB, PI3K/AKT/FOXO3, PKC/Ca²⁺ и TNF-α/JNK, которые играют крайне важную роль при раке.

В некоторых воплощениях лектин модулирует один или более биомаркеров или сигнальные пути, выбранные из MAPK/EGFR/Ras/Raf; ADRB1; CCR5; NF-κB; PI3K/AKT/FOXO3; и PKC/CA²⁺.

Диапазон ингибирующих концентраций рекомбинантного лектина для путей MAPK/EGFR/Ras/Raf и ADRB1 составляет от 0,158 мкг/мл до 50 мкг/мл с эффективным ингибированием от 2% до 48% и от 26% до 49%, соответственно, для данных двух путей.

Диапазон ингибирующих концентраций рекомбинантного лектина для путей NF-κB, TNF-α/JNK и PI3K/AKT/FOXO3 составляет от 0,5 мкг/мл до 50 мкг/мл с эффективным ингибированием от 3% до 13%, от 12% до 45% и от 2% до 73%, соответственно для 3 путей.

Диапазон ингибирующих концентраций рекомбинантного лектина для пути CCR5 находится в диапазоне от 0,058 мкг/мл до 50 мкг/мл с эффективным ингибированием 21% - 70%.

Диапазон ингибирующих концентраций рекомбинантного лектина для пути PKC/Ca²⁺ находится в диапазоне от 0,00158 мкг/мл до 0,5 мкг/мл с эффективным ингибированием от 5% до 19%.

В некоторых воплощениях лектин модулирует уровни VEGF. Будет понятно, что, в том виде, в котором он используется в данном документе, термин «модулирует» относится к способности средства повышать или снижать уровень экспрессии или активности биомаркера или сигнального пути, по сравнению с нормальными уровнями (а именно, в необработанных клетках). В некоторых воплощениях лектин повышает уровень экспрессии VEGF в клетках, таких как раковые клетки.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – от англ. Vascular epidermal growth factor) является важной ангиогенной молекулой, ассоциированной с неоваскуляризацией, и ключевым регулятором регенерации эндотелиальных клеток сосудов. Снижение в уровнях VEGF обычно ассоциировано с антиангиогенными свойствами. Однако, активность некоторых противораковых средств, таких как

ингибитор протеасом (PSI - от англ. proteasome inhibitor), который, как показано, оказывает значимые противораковые действия в отношении карциномы толстой кишки C-26, ассоциирован с повышающей регуляцией VEGF, как на уровне экспрессии мРНК, так продукции белка. Предполагают, что более высокий уровень

5 продукции VEGF может делать эндотелиальные клетки чувствительными к проапоптозной активности PSI и ассоциирован с ингибированием роста опухоли.

Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что обработка раковых клеток лектином в соответствии с настоящим изобретением приводила к повышению в уровнях VEGF, по сравнению с необработанными клетками. Без

10 ограничения теорией, полагают, что лектины по настоящему изобретению могут оказывать свое противораковое действие образом, по аналогии с PSI, посредством увеличения чувствительности эндотелиальных клеток к проапоптозной активности лектина, оказывая, таким образом, антиангиогенное действие.

Таким образом, в некоторых воплощениях лектин дополнительно индуцирует

15 апоптоз раковых клеток.

Антиангиогенное действие лектина можно определять по уменьшению массы или объема опухоли, по ингибированию, выраженному в процентах, роста опухоли (%TGI – от англ. tumour growth inhibition) или по исчезновению опухолей. В некоторых воплощениях антиангиогенное действие лектина можно определять по

20 увеличению времени, которое требуется для достижения опухолью заранее установленной массы или объема, по сравнению с необработанным контролем.

В некоторых воплощениях лектин ингибирует (или может ингибировать) рост опухоли на по меньшей мере 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или по меньшей мере 60%. Ингибирование роста опухоли, %, (%TGI) можно определять с

25 использованием способов, описанных в данном документе.

В некоторых воплощениях лектин воздействует (или может воздействовать) на задержку роста опухоли по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 или по меньшей мере на 14 суток. Задержку роста опухоли (TGD – от англ. Tumour Growth Delay) можно определять, используя способы, описанные в данном документе.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение лектина субъекту, где лектин

30 воздействует на лечение рака за счет ингибирования ангиогенеза.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу предупреждения ангиогенеза в опухоли у субъекта с использованием лектина

35 согласно настоящему изобретению.

В некоторых воплощениях способ предупреждения ангиогенеза в опухоли включает использование нецитотоксической концентрации лектина, такого как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность. Нецитотоксическая концентрация лектина может составлять от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл. Способ может включать приведение раствора лектина (например, раствора рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность, в концентрации от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл) в контакт с опухолевыми клетками.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится действию антиангиогенеза в опухолевых клетках с использованием от примерно 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела лектина, такого как рекомбинантный лектин, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность.

В том виде, в котором они используются в данном документе, ссылки на мг/кг массы тела относятся к массе тела млекопитающего, такой как масса тела человека.

Согласно аспекту раствор рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность, с концентрацией от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл, приводят в контакт с опухолевыми клетками тела млекопитающего с количеством от примерно 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела млекопитающего для эффективного антиангиогенного действия в опухолевых клетках.

Апоптоз

Согласно еще одному аспекту изобретения предложен лектин для применения в способе лечения рака посредством индукции апоптоза.

Согласно изобретению предложен рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака посредством индукции апоптоза в раковой клетке, включающем введение терапевтически эффективного количества белка - рекомбинантного лектина. Согласно данному аспекту лектин индуцирует раннюю и позднюю стадию апоптоза в раковых клетках.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу индукции апоптоза в опухоли у субъекта с использованием рекомбинантного лектина согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к оценке *in vitro* апоптотического действия лектина (такого как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2) на линию раковых клеток, например, линию раковых клеток молочной железы и/или линию раковых клеток поджелудочной железы. Апоптотическое действие *in vitro* лектинов можно определять с использованием стандартных методик анализа, которые известны специалисту.

Оценку апоптотического действия *in vitro* рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, на MDA-MB-231 в качестве линии клеток рака молочной железы и линии клеток PANC-1 в качестве линии клеток рака поджелудочной железы проводили, используя анализ JC-1. Оценку проводили, используя концентрацию рекомбинантного лектина примерно 2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл, с Доксорубицином в качестве положительного контроля.

Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, приводил к значимой деполяризации митохондриальной мембраны в диапазоне 9,5% - 51,7% в случае клеточной линии PANC-1 и 19,8%-54,1% в случае клеточной линии MDA-MB-231.

Оценка апоптотического действия *in vitro* SEQ ID NO. 2 на клеточные линии MDA-MB-231 и PANC-1 с использованием окрашивания Аннексином-V показывала, что рекомбинантный лектин оказывал апоптотическое действие на ранних и сильно поздних стадиях на линии раковых клеток, по сравнению со стандартом (доксорубицин), который демонстрировал апоптотическое действие только на поздних стадиях. Дополнительный анализ клеточного цикла указал на увеличение популяции апоптотических клеток при обработке SEQ ID NO. 2.

Настоящее изобретение дополнительно относится к оценке модулирующего действия рекомбинантных лектинов (таких как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2) на сигнальные пути, участвующие в патогенезе рака.

SEQ ID NO. 2 индуцировал апоптоз посредством модуляции одного или более биомаркеров, выбранных из: MEK-1; P90RSK; STAT-3; p53; C-kit; IL-6; IL-8; p38/MAPK; MPO; FcγR-1; CD40L; ATF-2, ERK1/2; JNK; TNFR; Галектина-3; Калликреина-5 и TNF-α.

Продemonстрировано модулирующее действие рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, на разные сигнальные пути и на ингибирование путей MAPK/EGFR/Ras/Raf, CCR5, IL-4/STAT6,

NF-KB, PI3K/AKT/FOXO3, PKC/Ca²⁺ и TNF-альфа/JNK, которые играют крайне важную роль при раке.

В некоторых воплощениях SEQ ID NO. 2 модулирует один или более биомаркеров или сигнальных путей, выбранных из IL-4/STAT6; NF-KB; PI3K/AKT/FOXO3; и TNF-α/JNK.

Диапазон ингибирующих концентраций рекомбинантного лектина для путей NF-KB, PI3K/AKT/FOXO3 и TNF-альфа/JNK составляет от 0,5 мкг/мл до 50 мкг/мл с эффективным ингибированием от 3% до 13%, от 2% до 73% и от 12% до 45%, соответственно, для 3 путей.

Диапазон ингибирующих концентраций рекомбинантного лектина для пути IL-4/STAT6 представляет собой диапазон 0,0158 мкг/мл – 0,5 мкг/мл с эффективным ингибированием от 16% до 28%.

В некоторых воплощениях способ индукции апоптоза в опухоли включает использование нецитотоксической концентрации лектина, такого как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность. Нецитотоксическая концентрация лектина может составлять от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл. Способ может включать приведение рекомбинантного лектина или раствора рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность, в концентрации от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл, в контакт с опухолевыми клетками.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к воздействию на апоптоз в опухолевых клетках с использованием от примерно 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела рекомбинантного лектина, такого как рекомбинантный лектин, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность.

Лечение рака или эффективный апоптоз опухолевых клеток можно определять по уменьшению в объеме опухоли или по исчезновению одной или более опухолей.

В некоторых воплощениях рекомбинантный лектин содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No 1 или SEQ ID No 2 или SEQ ID No 3 или SEQ ID No 4.

Композиция

Способ лечения рака, способ предупреждения ангиогенеза или способ индукции апоптоза может включать приведение опухоли в контакт с композицией,

содержащей рекомбинантный лектин. Например, раствор рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность, может быть приведен в контакт с опухолевыми клетками. Концентрация рекомбинантного лектина в композиции может составлять от
 5 примерно 0,001 мкг/мл до примерно 1000 мкг/мл, от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 500 мкг/мл, от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл или от примерно 0,15 мкг/мл до примерно 150 мкг/мл.

Способ лечения рака, способ предупреждения ангиогенеза или способ индукции апоптоза может включать введение рекомбинантного лектина в
 10 количестве от примерно 0,05 мг/кг до примерно 1000 мг/кг или от примерно 0,1 мг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела млекопитающего.

Согласно еще одному аспекту способа лечения аденокарциномы или плоскоклеточной карциномы или рака мозга посредством предупреждения ангиогенеза и/или посредством индукции апоптоза в опухолевых клетках, где способ
 15 включает приведение опухолевых клеток в контакт с раствором рекомбинантного лектина, такого как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1 или ее гомологичную последовательность. Концентрация раствора рекомбинантного лектина (например, SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2) может находиться в форме от примерно 0,1 мкг/мл до 200 мкг/мл.

Настоящее изобретение дополнительно относится к оценке противоопухолевого потенциала рекомбинантных лектинов, таких как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2.

Противоопухолевый потенциал рекомбинантного лектина, имеющего
 25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, оценивали с использованием модели ксенотрансплантата PA-1 (тератокарцинома яичника). Голые мыши, обработанные рекомбинантным лектином, демонстрировали значимое уменьшение в размере опухоли при обработке.

Противоопухолевый потенциал рекомбинантного лектина также оценивали, используя модель ксенотрансплантата KB (карцинома шейки матки). Ингибирование
 30 роста опухоли в процентах было сопоставимо со стандартом (Доксорубицин).

Противоопухолевый потенциал рекомбинантного лектина также оценивали, используя модель ксенотрансплантата HT-29 (аденокарцинома толстой и прямой кишки). Животные, обработанные рекомбинантным лектином в количестве 20 мг/кг и
 35 30 мг/кг массы тела (ежедневно), демонстрировали значимое уменьшение объема опухоли, по сравнению с группой контроля – носителя.

Животных дополнительно обрабатывали рекомбинантным лектином с использованием модели ксенотрансплантата T24 (карцинома мочевого пузыря/переходно-клеточная карцинома). Рекомбинантный лектин демонстрировал ощутимый противоопухолевый потенциал, который был сопоставим с группой, обрабатываемой Доксорубицином, в модели ксенотрансплантата T24.

Противоопухолевый потенциал рекомбинантного лектина дополнительно оценивали с использованием линий раковых клеток молочной железы (MCF-7 и MDA-MB-231). Ингибирование роста опухоли в процентах было сопоставимо со стандартом (Доксорубицин) в обоих случаях.

Дополнительные линии клеток PANC-1 (карцинома поджелудочной железы/протоковая эпителиоидная карцинома) также обрабатывали рекомбинантным лектином. Рекомбинантный лектин демонстрировал ощутимый противоопухолевый потенциал, по сравнению с клеточными линиями, обработанными Гемцитабином.

Настоящее изобретение дополнительно относится к рекомбинантному лектину (например, рекомбинантному лектину, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2) для применения в качестве ингибитора ангиогенеза или индуктора апоптоза, ингибирующему, таким образом, метастазы раковых клеток и/или вызывающему запрограммированную гибель клеток.

Следует понимать, что любое из воплощений, описанных в данном документе, можно объединять друг с другом и с любым аспектом изобретения, если не указано иное.

Настоящий набор примеров демонстрирует наилучший способ исполнения и никаким образом не ограничивает объем изобретения.

Примеры

Пример 1: Противораковый потенциал рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2

Очищенный рекомбинантный лектин SEQ ID NO. 2 исследовали в отношении его противоракового потенциала в разных клеточных линиях. Он показал цитотоксическую активность в 10 разных линиях раковых клеток. Краткий способ анализа выглядел следующим образом:

1. Конкретное число раковых/нормальных клеток высевали в 96-луночный планшет для культивирования тканей.

2. После инкубации в течение ночи клетки обрабатывали соответствующим исследуемым веществом на протяжении заранее определенного временного интервала (48 ч – 72 ч).

3. Цитотоксическую/антипролиферативную активность исследуемого вещества оценивали хемилюминесцентным/флуоресцентным/колориметрическим способом выявления.

5 4. Цитотоксичность в процентах рассчитывали с использованием статистического инструмента.

10 Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, демонстрировал цитотоксическое действие на всех 10 исследуемых линиях раковых клеток и не демонстрировал цитотоксического действия на нормальных клетках (PBMC) (от англ. peripheral blood mononuclear cell - моноклеарная клетка периферической крови). Он демонстрировал лучший эффект в MDA-MB-231 (клетки трижды негативной аденокарциномы молочной железы), в сравнении с MCF-7 (аденокарцинома молочной железы). Результаты обобщены ниже в таблице.

15 **Каткое изложение клеточного *in vitro* анализа цитотоксичности/антипролиферации**

S. No.	Клеточная линия	Тип рака	% Цитотоксичность	
			SEQ ID NO 2	Доксорубицин/5-FU
1	AGS	Желудок	65,3	81,0
2	HT-29	Толстая кишка	54,9	75,0
3	PA-1	Яичник	72,0	82,3
4	KB	Шейка матки	64,0	92,0
5	MCF-7	Молочная железа	28,0	64,9
6	MDA-MB-231	Молочная железа	60,9	50,2
7	MDA-MB-453	Молочная железа	46,6	71,4
8	MIAPaCa-2	Поджелудочная железа	47,5	63,9
9	PANC-1	Поджелудочная железа	60,8	65,1
10	T-24	Мочевой пузырь	93,1	54,5
11	PBMC	Мононуклеарные клетки периферической крови	отсутствие	32,0

Пример 2: *In vivo* исследования эффективности (ксенотрансплантата)

В соответствии с приведенными выше данными, рекомбинантный лектин SEQ ID NO. 2 демонстрировал цитотоксическое антипролиферативное действие на разные линии раковых клеток в анализах *in vitro*. Эффективность рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в качестве противоопухолевого средства оценивали в соответствующем ксенотрансплантате в модельных мышах с ослабленным иммунитетом *in vivo*. Используемые модели ксенотрансплантата представляли собой HT-29, KB, PA-1, MCF-7, PANC-1, T24 и MDA-MB-231. План фундаментального исследования для исследования ксенотрансплантата выглядел следующим образом:

1. Поддержание клеток и получение клеточной суспензии
2. Асептическая инъекция суспензии опухолевых клеток у животного-донора

3. Случайное распределение животных в соответствующие группы

4. В.б. (внутрибрюшинное) дозирование исследуемых веществ в
предварительно установленных дозах

5. В.б. введение стандарта

5 6. После завершения периода дозирования

7. Запись объема опухоли дважды в неделю при ежесуточной записи массы
тела и клинических признаков

Результаты отдельных исследований ксенотрансплантата обобщенно
приведены ниже в таблице

10

Исследования ксенотрансплантата

Группа и лечение	Объем опухоли (мм ³) (Среднее $\pm$ SEM)	Максимальное ингибирование роста опухоли (%)
HT-29 (рак прямой и толстой кишки)		
Контроль - носитель	3675 $\pm$ 937	0
SEQ ID NO 2	1702 $\pm$ 274	56,62
5-Фторурацил	1362 $\pm$ 155	62,94
KB (рак шейки матки)		
Контроль - носитель	1189 $\pm$ 202	0
SEQ ID NO 2	782 $\pm$ 92	60,49
Доксорубицин	616 $\pm$ 118	64,60
PA-1 (тетракарцинома яичника)		
Контроль - носитель	2360 $\pm$ 278	0
SEQ ID NO 2	1050 $\pm$ 132	62,15
Доксорубицин	631 $\pm$ 87	84,48
MCF-7 (рак молочной железы)		
Контроль - носитель	4204 $\pm$ 897	0
SEQ ID NO 2	1256 $\pm$ 132	69,04
Доксорубицин	771 $\pm$ 65	65,23
T24 (карцинома мочевого пузыря/переходно-клеточная карцинома)		
Контроль - носитель	843,1 $\pm$ 51,67	0
SEQ ID NO 2	551,06 $\pm$ 10,02	36,52
Доксорубицин	366,32 $\pm$ 34,28	59,07

Группа и лечение	Объем опухоли (мм ³) (Среднее $\pm$ SEM)	Максимальное ингибирование роста опухоли (%)
PANC-1 (карцинома поджелудочной железы/ протоковая эпителиоидная карцинома)		
Контроль - носитель	1078,74 $\pm$ 214,93	0
SEQ ID NO 2	721,17 $\pm$ 194,63	39,15
Гемцитабин	503,93 $\pm$ 151,27	61,49
MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы/груди)		
Контроль - носитель	952,60 $\pm$ 53,61	0
SEQ ID NO 2	834,80 $\pm$ 126,95	35,21
Доксорубин	808,47 $\pm$ 178,59	42,12

Воздействие рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, на объем опухоли и ингибирование роста опухоли, изображено в указанной выше таблице. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, демонстрировал сильную противораковую активность в мышинной модели с ослабленным иммунитетом при разных раковых заболеваниях.

Пример 3: Оценка модулирующего действия рекомбинантного лектина на сигнальные пути, участвующие в патогенезе рака

Механизм действия рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, исследуют посредством определения его действия на модуляцию ключевых сигнальных путей, участвующих в патогенезе рака. Исследование проводили, используя SelectScreen® Cell-based Pathway Profiling Services, Life Technologies, США. Модулирующие действия лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, на разные клеточные сигнальные пути исследовали в клеточных линиях, сверхэкспрессирующих специфичные маркеры, используя платформы GeneBLazer Beta-lactamase (bla) Reporter Technology и Tango. Исследуемые клеточные линии представляли собой MDA-MB-231 (рак молочной железы человека), KB (рак шейки матки человека), PA-1 (рак яичника человека), PANC-1 (рак поджелудочной железы

человека), HT-29 (рак толстой и прямой кишки человека), T-24 (рак мочевого пузыря человека).

10 мг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, растворяли в 200 мкл буфера TBS (от англ. tris-buffered saline - трис-буферный физиологический раствор) (25 мМ, pH 8,0) с
5 получением маточного раствора 50 мг/мл. Маточные растворы разводили в бессывороточной среде (SFM – от англ. serum free medium) до достижения конечных концентраций в клетках, находящихся в интервале от 0,00158 мкг/мл до 50 мкг/мл. Клетки (32 мкл) разводили в аналитических средах до соответствующей плотности
10 клеток и добавляли в планшеты для анализа. Клетки инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 24 ч. 40 нл 1000X образца и 4 мкл аналитической среды добавляли к клеткам в планшет для анализа и инкубировали в течение 30 минут при 37°C/5% CO₂ в увлажненной камере. Затем, 4 мкл 10X EC80 концентрации активатора добавляли во все лунки, содержащие образец для достижения конечного объема
15 для анализа 40 мкл. Планшет для анализа инкубировали в течение 16 часов при 37°C/5% CO₂ в увлажненной камере. Далее, 8 мкл раствора, загружающего субстрат (LiveBLAzer™-FRET B/G), добавляли в планшет для анализа. Планшет для анализа инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте. Планшет для анализа подвергали снятию показаний на планшет-ридере флуоресценции
20 (Tecan Safire2). Значения испускания флуоресценции при 460 нм и 530 нм получали, используя стандартный планшет-ридер флуоресценции, и определяли модуляцию, %.

$$\%, \text{ Модуляция} = [(A-B)/A] \cdot 100,$$

Где A = измеренное значение флуоресценции в контроле (необработанные
25 клетки)

B = измеренное значение флуоресценции в клетках, обработанных TI

Результаты

Лектин приводил к ингибированию сигнальных путей, как показано ниже в Таблице:

Путь/Маркер	Диапазон концентраций	Эффект (относительно контроля)
MAPK/EGFR/Ras/Raf	0,158 мкг/мл– 50 мкг/мл	ингибирование 2% - 48%
ADBR1	0,158 мкг/мл– 50 мкг/мл	ингибирование 26% - 49%
CCR5	0,058 мкг/мл– 50 мкг/мл	ингибирование 21% - 70%
IL-4/STAT6	0,0158 мкг/мл– 0,5 мкг/мл	ингибирование 16% - 28%
NF-KB	0,5 мкг/мл– 50 мкг/мл	ингибирование 3% - 13%
PI3K/AKT/FOXO3	0,5 мкг/мл– 50 мкг/мл	ингибирование 2% - 73%
PKC/Ca ²⁺	0,00158 мкг/мл– 0,158 мкг/мл	ингибирование 5% - 19%
TNF-альфа/JNK	0,5 мкг/мл– 50 мкг/мл	ингибирование 12% - 45%

Эффект модуляции биомаркеров, относящихся к механизму действия, оказываемый рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, обобщен следующим образом:

- 5 - повышенные уровни HGF, который связывается со своим рецептором C-Met и затем действует на MAPK (от англ. mitogen-activated protein kinase - митоген-активированная протеинкиназа),
 - активированный ATF-2, который представляет собой опухолевый супрессор и действует через индукцию апоптоза,
- 10 - повышенный уровень экспрессии c-kit, который является рецептором для SCF, это оказывает действие ниже на MAPK,
 - повышался уровень экспрессии JNK и ингибируется p53, который активирует AFT-2, приводя к апоптозу,
 - простимулированная экспрессия VEGF, VEGF-A и VEGFR2, которая
- 15 активирует путь Ras-Raf,
 - ингибированная экспрессия EGF, который связывается с EGFR и оказывает противораковое действие через путь Ras-Raf или PKC,

- простимулированный Her-2, который активирует активацию Ras-Raf-MEK1-MAPK-ERK,

- повышенные уровни ERK и MEK-1, которые активировали экспрессию p90RSK и MMP. ERK также действует через stat-3 и NF-KB,

5 - простимулированная экспрессия GMCSF (от англ. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и IL-6, которые действуют через путь JAK-STAT и активируют NF-KB,

- активированная экспрессия IL-4R, который связывается с путем JAK-STAT. IL-4R также действует через плечо PI3K-Akt,

10 - повышенные уровни IL-8, который действует через плечо PI-3K-Akt-FOX3. Также действует через плечо Stat-3-NF-KB, где SEQ ID NO. 2 вызывал увеличение в Stat-3,

- повышенный уровень экспрессии лептина, который связывается со своим рецептором Лептин-R и действует на путь ERK,

15 - повышенные уровни цитокинов (GMCSF, IL-6 и IL-8) могут также взаимодействовать с иммунной системой в микроокружении опухоли, усиливая противораковое иммунопротекторное действие,

- активированный TNF- α , который соединяется с путем JNK,

20 - повышенные уровни экспрессии эндоглина-1, который является рецептором для TGF- β . Эндоглин-1 действует через Smad и активирует экспрессию ATF-2,

- активация PDGF-BB PDGF оказывает противоопухолевые действия через супрессию ангиогенеза,

- активация и TGF-альфа регулирует рост раковых клеток через аутокринный и паракринный пути,

25 - активация Ангиопоэтина-1 и Ангиопоэтина-2 усиливает инфильтрацию под действием TIE2-экспрессирующего макрофага, которые демонстрируют функции супрессии опухоли. Связывание с Tie-2 регулирует путь PI3k,

- активация Калликреина-3 и Калликреина-5, которые действуют в качестве супрессора опухоли, через индукцию апоптоза,

30 - активация TRAIL и TRAIL2 вызывает апоптоз, главным образом в опухолевых клетках, за счет связывания с определенными рецепторами смерти,

- активация Остеопонтина (PON), который связывается с рецепторами $\alpha V\beta 3$ и CD44 и действует через путь Akt,

35 - ингибированный Галектин-2, который или действует через путь Ras-Raf или путь PI3k-Akt. Он также ингибировал Галектин-3, который действует через путь PI3k-Akt,

- повышенный уровень экспрессии Fol-1, который действует через Smad и активирует экспрессию ATF-2,
- ингибированный CD40L, который связывается с CD40 и ингибирует MAPK.

5 **Пример 4: Оценка *in vitro* апоптотического действия лектина**

Для оценки *in vitro* апоптотического действия рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в линии клеток MDA-MB-231 (рак молочной железы) и PANC-1 (рак поджелудочной железы) посредством анализа JC-1, увеличение в деполяризации митохондриальной мембраны

10 использовали в качестве маркера апоптоза. Степень деполяризации митохондриальной мембраны оценивали в клетках MDA-MB-231 и PANC-1 после 16 ч обработки рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, с использованием способа на основе красителя JC-1. Клеточные линии MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека)

15 и PANC-1 (эпителиоидная карцинома поджелудочной железы человека) приобретали у Национального центра цитологии, Пуна (Индия). Клеточные линии выращивали в модифицированной среде Игла Дульбекко (DMEM - от англ. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + 10% инактивированная нагреванием FBS (от англ. Fetal Bovine Serum - фетальная телячья сыворотка) при 37°C (влажность 95%

20 и 5% CO₂). Клеточную линию субкультивировали посредством обработки трипсином с последующим распределением клеточной суспензии по свежим колбам и добавлением свежей культуральной среды. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, разводили в среде, не содержащей сыворотку. Доксорубицин использовали в качестве положительного

25 контроля, и маточный раствор получали в диметилсульфоксиде (ДМСО). Клетки MDA-MB-231 и PANC-1 обрабатывали трипсином, подсчитывали и высевали в лунки плоскодонного 96-луночного планшета (планшета с темными стенками) при плотности, соответствующей 10x10³ клеток/лунка/180 мкл DMEM с 10% FBS. Затем клетки инкубировали в течение ночи в условиях выращивания для того, чтобы

30 обеспечить восстановление клеток и экспоненциальный рост. Клетки обрабатывали рекомбинантным лектином SEQ ID NO. 2 (20 мкл маточного раствора) для достижения конечных концентраций 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл и 80 мкг/мл. Аналогично, клетки обрабатывали доксорубицином для достижения конечных концентраций 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ и 50 мкМ.

35 После соответствующих обработок клетки в указанном выше планшете инкубировали в течение 16 ч в инкубаторе CO₂ при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%.

После 16 ч инкубации супернатанты отбрасывали и 100 мкл раствора красителя JC1 (полученного посредством разведения 1 мМ маточного раствора ДМСО до 10 мкМ в 1хPBS) добавляли в каждую лунку. Затем, клетки инкубировали с красителем в инкубаторе CO₂ при 37°C в течение 15 мин. После 15 мин инкубации супернатант удаляли, и клетки промывали дважды 1хPBS, и затем в каждую лунку добавляли 100 мкл 1хPBS.

Красную флуоресценцию (возбуждение при 550 нм, испускание при 600 нм) и зеленую флуоресценцию (возбуждение при 485 нм, испускание при 535 нм) измеряли, используя планшет-ридер Biotek Synergy HT. Потенциал митохондриальной мембраны (ΔΨМ) рассчитывали как отношение интенсивности красной флуоресценции к интенсивности зеленой флуоресценции, описанное следующим образом:

$$\Delta\Psi M = \text{интенсивность красной флуоресценции} / \text{интенсивность зеленой флуоресценции}$$

Выраженное в процентах уменьшение отношения Красная флуоресценция/Зеленая флуоресценция, соответствующее каждой обработке, рассчитывали, используя следующую формулу:

$$\%, \text{ Уменьшение} = [(R-X)/R] \cdot 100,$$

Где X = ΔΨм соответствует обработанным клеткам

R = ΔΨМ соответствует лункам контроля.

Наблюдали, что рекомбинантный лектин приводил к деполяризации митохондриальной мембраны в диапазоне 9,5% - 51,7% в случае клеточной линии PANC-1 и 19,8%-54,1% в случае клеточной линии MDA-MB-231 (Таблица 1 и 2).

Таблица 1: Выраженное в процентах уменьшение в потенциале митохондриальной мембраны (MMP) в случае клеточной линии MDA-MB-231

Образец	Концентрация	Средняя красная флуоресценция	Средняя зеленая флуоресценция	Отношение красная / зеленая	Уменьшение в процентах в ММР (%)
Необработанные клетки	-	1348,5	565,3	2,39	0
Доксорубицин (мкМ)	0,1 мкМ	465,3	473,0	0,98	58,8
	1 мкМ	343,3	345,5	0,99	58,3
	10 мкМ	580,7	534,0	1,09	54,4
	25 мкМ	376,7	336,3	1,12	53,0
	50 мкМ	663,7	318,0	2,09	12,5
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	769,7	703,0	1,09	54,1
	5 мкг/мл	709,3	560,0	1,27	46,9
	10 мкг/мл	1098,3	596,3	1,84	22,8
	20 мкг/мл	929,3	497,3	1,87	21,7
	40 мкг/мл	1009,0	535,7	1,88	21,0
	80 мкг/мл	957,3	500,3	1,91	19,8

Таблица 2: Уменьшение в потенциале митохондриальной мембраны (ММР) в случае клеточной линии PANC-1

Образец	Концентрация	Средняя красная флуоресценция	Средняя зеленая флуоресценция	Отношение красная / зеленая	Уменьшение в процентах в MMP (%)
Необработанные клетки	-	517,7	247,7	2,09	0
Доксорубицин (мкМ)	0,1 мкМ	653,7	258,5	2,53	-21,0
	1 мкМ	555,3	282,3	1,97	5,9
	10 мкМ	350,0	208,3	1,68	19,6
	25 мкМ	283,0	186,3	1,52	27,3
	50 мкМ	192,5	161,7	1,19	43,0
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	595,7	315,0	1,89	9,5
	5 мкг/мл	452,3	293,3	1,54	26,2
	10 мкг/мл	301,7	271,7	1,11	46,9
	20 мкг/мл	265,7	234,3	1,13	45,8
	40 мкг/мл	266,0	263,3	1,01	51,7
	80 мкг/мл	272,0	257,0	1,06	49,4

Пример 5: Оценка проапоптотического действия лектина в линии раковых клеток молочной железы человека (MDA-MB-231) и линии раковых клеток поджелудочной железы человека (PANC-1) посредством окрашивания Аннексином-V и анализа клеточного цикла

Клеточные линии MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека) и PANC-1 (эпителиоидная карцинома поджелудочной железы человека) приобретали у Национального центра цитологии, Пуна (Индия). Клеточные линии поддерживали в DMEM + 10% FBS (инактивированная нагреванием) при 37°C с 5% CO₂, и влажности 95%. Антибиотики Пенициллин (100 Ед/мл) и Стрептомицин (100 мкг/мл) добавляли к среде. Клеточные линии субкультивировали посредством обработки трипсином с последующим разделением клеточной суспензии на свежие колбы и добавлением свежей культуральной среды.

Маточный раствор рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, разводили в бессывороточной среде (SFM) при разных концентрациях, соответствующих 10-кратным высоким концентрациям (объемная масса) конечной эффективной концентрации. Доксорубицин использовали в качестве положительного контроля, и маточный раствор получали в ДМСО.

Окрашивание Аннексином:

Клетки подсчитывали, используя гемоцитометр, и высевали в культуральные планшеты при плотности $0,4 \times 10^6$ клеток/лунка в DMEM+10% FBS в 6-луночных планшетах. Клетки инкубировали в течение ночи для того, чтобы обеспечить восстановление клеток и экспоненциальный рост. После инкубации в течение ночи клетки обрабатывали лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в DMEM+0% FBS при концентрациях, находящихся в интервале от 2,5 мкг/мл до 80 мкг/мл. Необработанные клетки были включены в качестве контрольной группы для образца. Клетки, обработанные Доксорубицином, были включены в качестве группы положительного контроля. Клетки, обработанные ДМСО, были включены в качестве контрольной группы для Доксорубицина. После обработки клетки инкубировали в течение периода времени 24 ч.

После инкубации проапоптотическое действие оценивали, используя набор для анализа на основе Аннексина, следующим образом: Реагент Аннексина содержит краситель Аннексин-V+7-AAD, который избирательно метит апоптотические клетки в разных фазах. Четыре популяции клеток можно определить по графикам проточной цитометрии следующим образом:

а) Вверху слева (UL) – 7-AAD(+)/Аннексин(-) или некротические клетки

б) Вверху справа (UR) - 7-AAD(+)/Аннексин(+) или клетки на поздних стадиях апоптоза

в) Снизу слева (LL) - 7-AAD(-)/Аннексин(-) или жизнеспособные/неапоптотические клетки

г) Снизу справа (LR) - 7-AAD(-)/Аннексин(+) или клетки на ранних стадиях апоптоза

Клетки аккуратно собирали в предварительно меченные стерильные центрифужные пробирки и центрифугировали при $300 \times g$ в течение 5-7 мин. Супернатант отбрасывали, и осадок ресуспендировали в 200 мкл свежей культуральной среды.

100 мкл клеточной суспензии переносили в предварительно меченные стерильные центрифужные пробирки.

100 мкл реагента Аннексина-V добавляли в каждую пробирку и инкубировали в течение 30 мин при RT (от англ. room temperature – комнатная температура) в темноте.

Клетки, окрашенные Аннексином-V, затем переносили в 96-луночные планшеты и помещали на проточный цитометр (Guava technologies). Определяли

процент клеток на ранней стадии апоптоза, поздней стадии апоптоза и некротической фазе.

Кратное увеличение в апоптозных клетках (обработанных исследуемыми веществами) определяли, по сравнению с контролем (необработанные клетки).

5

Анализ клеточного цикла

Клетки подсчитывали, используя гемоцитометр, и помещали в культуральные планшеты при плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/лунка в DMEM+10% FBS в 6-луночных планшетах. Клетки инкубировали в течение ночи для обеспечения восстановления клеток и экспоненциального роста. После инкубации в течение ночи клетки подвергали сывороточному голоданию в DMEM+1% FBS в течение 4 ч. Спустя 4 ч, клетки обрабатывали исследуемыми веществами в DMEM + 0% FBS в концентрациях, находящихся в диапазоне 2,5 мкг/мл - 80 мкг/мл. Необработанные клетки включали в качестве контрольной группы для исследуемого вещества.

Клетки, обработанные Доксорубицином, включали в качестве группы положительного контроля. Клетки, обработанные ДМСО, включали в качестве контрольной группы для Доксорубина. После обработки клетки инкубировали в течение периода времени 24 ч. После инкубации проапоптотическое действие по клеточному циклу определяли следующим образом: реагент для определения клеточного цикла содержит краситель PI, который окрашивает ДНК клеток в разных фазах клеточного цикла; Sub(G0/G1), G1, S, G2 и M. Клетки в фазе Sub(G0/G1) соответствуют апоптозным клеткам.

Сбор и фиксация

Клетки аккуратно собирали в предварительно меченные центрифужные пробирки и центрифугировали при 450 g в течение 5 мин, RT (низкое тормозное давление). Супернатанты аккуратно удаляли (не дотрагиваясь до осадка) и отбрасывали. 1 мл 1X PBS добавляли к осадку и аккуратно ресуспендировали для получения гомогенной суспензии. Клетки центрифугировали при 450 g в течение 5 мин, RT (низкое тормозное давление) (стадия промывки). Супернатант аккуратно удаляли, оставляя приблизительно 100 мкл PBS (от англ. Phosphate buffered saline - фосфатно-солевой буферный раствор). Клетки аккуратно ресуспендировали все еще тщательно в остаточном PBS. Ледяной 70%-ный этанол (300 мкл) добавляли по каплям в клетки в каждую пробирку при перемешивании с помощью вортекса на низкой скорости (стадия фиксации). Клетки хранили при 4°C в течение 24 ч перед окрашиванием.

Окрашивание

Клетки, фиксированные этанолом, центрифугировали при 450 g в течение 5 мин, RT (низкое тормозное давление). Супернатант аккуратно удаляли (чтобы не задеть осадок) и отбрасывали. (Осадок не мог быть виден, а образовывал тонкую пленку на поверхности пробирки). 1 мл 1X PBS добавляли в осадок и аккуратно ресуспендировали. Клетки инкубировали в течение 1 мин при RT. Клетки центрифугировали при 450 g в течение 5 мин, RT (низкое тормозное давление) (стадия промывки). Супернатант аккуратно удаляли, оставляя приблизительно 20 мкл – 50 мкл PBS. 200 мкл реагента для определения клеточного цикла добавляли в каждую пробирку.

Клетки осторожно ресуспендировали, смешивали и инкубировали в течение 30 мин, при RT, в темноте. Окрашенные образцы переносили в 96-луночные планшеты и помещали на проточный цитометр (Guava technologies). Определяли процент клеток в Sub (G0/G1) фазе. Кратное увеличение в апоптозных клетках (обработанных исследуемыми веществами) определяли, по сравнению с контролем (необработанные клетки).

Результаты

Результаты (как изображено ниже в Таблице 3 – 10) демонстрируют, что лектин индуцировал увеличение в клетках на поздних стадиях апоптоза и некротических клетках. Кроме того, увеличение популяции апоптозных (SubG0/G1) клеток также наблюдали при обработке клеток лектином.

Таблица 3: Апоптотическое действие лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в клетках MDA-MB-231 в соответствии с окрашиванием Аннексином-V

Образец (в MDA-MB-231)		% Популяция клеток			
		LL	LR	UR	UL
		Аннекс - 7AAD -	Аннекс + 7AAD -	Аннекс + 7AAD +	Аннекс - 7AAD +
		Жизнеспособные	Ранние стадии апоптоза	Поздние стадии апоптоза	Некротические
Контроль		98,1	0,5	0,6	0,7
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	75,7	7,9	13,2	3,2
	5 мкг/мл	72,3	7,0	8,2	12,5
	10 мкг/мл	64,1	5,8	9,5	20,6
	20 мкг/мл	58,5	2,9	5,9	32,7
	80 мкг/мл	61,0	5,3	7,7	26,0
Доксорубицин	10 мкМ	0,7	6,8	92,5	0,0
	100 мкМ	0,0	0,0	100,0	0,0

Таблица 4: Апоптотическое действие лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в клетках PANC-1 в соответствии с окрашиванием Аннексином-V

Образец (в PANC-1)		% Популяция клеток			
		LL	LR	UR	UL
		Аннекс-7AAD-	Аннекс + 7AAD-	Аннекс + 7AAD+	Аннекс - 7AAD+
		Жизнеспособные	Ранние стадии апоптоза	Поздние стадии апоптоза	Некротические
Контроль		89,2	0,1	0,4	10,4
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	87,7	0,5	1,0	10,8
	5 мкг/мл	81,3	0,4	2,8	15,5
	10 мкг/мл	78,7	0,0	0,4	20,8
	20 мкг/мл	71,5	0,0	0,4	28,1
	80 мкг/мл	72,8	0,0	0,5	26,7
Доксорубицин	10 мкМ	25,6	6,0	67,9	0,5
	100 мкМ	1,3	1,9	96,6	0,1

Таблица 5: Кратное увеличение в апоптозе в клетках MDA-MB-231 в соответствии с окрашиванием Аннексином-V

Образец (в MDA-MB-231)		Кратное увеличение (относительно контроля)		
		LR	UR	UL
		Аннекс+ 7-AAD-	Аннекс + 7-AAD+	Аннекс - 7-AAD+
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	15,8	22,0	4,6
	5 мкг/мл	14,0	13,7	17,9
	10 мкг/мл	11,6	15,8	29,4
	20 мкг/мл	5,8	9,8	46,7
	80 мкг/мл	10,6	12,8	37,1
Доксорубицин	10 мкМ	13,6	115,6	-
	100 мкМ	-	125,0	-

Таблица 6: Кратное увеличение в апоптозе в клетках PANC-1 в соответствии с окрашиванием Аннексином-V

Образец (в PANC-1)		Кратное увеличение (относительно контроля)		
		LR	UR	UL
		Аннекс+ 7-AAD-	Аннекс + 7-AAD+	Аннекс - 7-AAD+
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	5,0	2,5	1,0
	5 мкг/мл	4,0	7,0	1,5
	10 мкг/мл	-	1,0	2,0
	20 мкг/мл	-	1,0	2,7
	80 мкг/мл	-	1,3	2,6
Доксорубицин	10 мкМ	60,0	169,8	-
	100 мкМ	-	241,5	-

Таблица 7: Апоптотическое действие лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в клетках MDA-MB-231 в соответствии с анализом клеточного цикла

Образец (в MDA-MB-231)		% Популяция клеток			
		Апоптозные Sub(G0/G1)	G0/G1	S	G2/M
Контроль		2,46	64,40	8,18	16,79
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	10,05	65,21	6,10	12,97
	5 мкг/мл	5,75	61,99	8,15	15,40
	10 мкг/мл	6,65	60,71	7,36	15,50
	20 мкг/мл	15,43	55,66	6,55	13,35
	80 мкг/мл	35,62	42,49	8,09	10,14
Доксорубицин	10 мкМ	11,09	40,26	22,70	18,52
	100 мкМ	92,02	5,64	1,17	0,83

5

Таблица 8: Апоптотическое действие лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в клетках PANC-1 в соответствии с анализом клеточного цикла

Образец (в PANC-1)		% Популяция клеток			
		Апоптозные Sub (G0/G1)	G0/G1	S	G2/M
Контроль		1,77	39,98	10,34	24,80
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	1,60	38,89	9,89	24,83
	5 мкг/мл	2,54	40,09	10,31	23,83
	10 мкг/мл	4,23	44,43	10,15	23,92
	20 мкг/мл	3,92	44,24	10,83	23,79
	80 мкг/мл	6,21	39,63	9,58	27,41
Доксорубицин	10 мкМ	14,74	15,84	18,45	27,44
	100 мкМ	89,13	9,65	0,59	0,15

Таблица 9: Кратное увеличение в апоптозе в клетках MDA-MB-231 в соответствии с анализом клеточного цикла

Образец (в MDA-MB-231)		Кратное увеличение (относительно Контроля)
		Апоптозные Sub(G0/G1)
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	4,1
	5 мкг/мл	2,3
	10 мкг/мл	2,7
	20 мкг/мл	6,3
	80 мкг/мл	14,5
Доксорубицин	10 мкМ	5,0
	100 мкМ	41,5

5 Таблица 10: Кратное увеличение в апоптозе клеток PANC-1 в соответствии с анализом клеточного цикла

Образец (в PANC-1)		Кратное увеличение (относительно контроля)
		Апоптозные Sub(G0/G1)
SEQ ID NO. 2	2,5 мкг/мл	-
	5 мкг/мл	1,4
	10 мкг/мл	2,4
	20 мкг/мл	2,2
	80 мкг/мл	3,5
Доксорубицин	10 мкМ	7,9
	100 мкМ	47,9

Результаты по апоптотическому действию рекомбинантного лектина SEQ ID NO. 2 на клеточную линию MDA-MB-231 демонстрировали, что он индуцировал увеличение в клетках на ранних стадиях, поздних стадиях апоптоза и некротических клетках. Кроме того, увеличение популяции апоптозных (Sub G0/G1) клеток также наблюдали при обработке клеток SEQ ID NO. 2.

Результаты по апоптотическому действию рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в клеточной линии PANC-1 индуцировал увеличение в клетках на поздних стадиях апоптоза и некротических клетках. Кроме того, увеличение популяции апоптозных (Sub G0/G1) клеток также наблюдали при обработке клеток SEQ ID NO. 2.

Пример 6: Антиангиогенное действие лектина на эндотелиальные клетки человека

Клеточная линия, используемая для исследования, представляла собой EA.hy926 (эндотелиальные клетки человека), которые приобретали у Национального центра цитологии, Пуна (Индия). Клеточную линию поддерживали в DMEM + 10% FBS (инактивированная нагреванием) при 37°C с 5% CO₂ и влажности 95%. Клетки подсчитывали, используя гемоцитометр и высевали в 96-луночные планшеты при плотности 5x10³ клеток/луночка/180 мкл среды для выращивания. После инкубации в течение ночи клетки обрабатывали рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в концентрациях, находящихся в интервале от примерно 2,5-100 мкг/мл. Необработанные клетки с полной средой (10% FBS) служили в качестве контроля – полной среды, клетки с

бессывороточной средой служили в качестве контроля SFM и клетки, обработанные Паклитакселом, служили в качестве положительного контроля.

После 3 суток инкубации, действие рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, на пролиферацию клеток определяли по МТТ-тесту. 20 мкл 5 мг/мл раствора МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид добавляли во все лунки с последующей дополнительной инкубацией в течение 3 ч при 37°C. Супернатант отсасывали, и 150 мкл ДМСО добавляли в каждую лунку для растворения кристаллов формазана. Поглощение каждой лунки затем считывали при 540 нм, используя микропланшет-ридер Synergy HT. Рассчитывали цитотоксичность в процентах, соответствующую каждой обработке.

Миграция клеток в соответствии с анализом методом застания царапины в эндотелиальных клетках

Клетки EA.hy926 подсчитывали, используя гемоцитометр, и высевали в 6-луночные планшеты при плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/лунка. Клетки инкубировали в течение ночи в условиях выращивания, как описано выше, таким образом, чтобы обеспечить восстановление клеток и экспоненциальный рост. После инкубации в течение ночи маленькая линейная царапина (репрезентативный порез) была создана в слившемся монослое (середина лунки) посредством соскабливания стерильным наконечником микропипетки на 200 мкл. Микрофотографии данной царапины делали в момент времени 0 ч (исходный момент времени). Клетки промывали бессывороточной DMEM и группировали для обработки в двух разных условиях в отношении сыворотки:

А: TI в бессывороточной среде (SFM)

Контроль исходного значения: клетки плюс DMEM

Положительный контроль/контроль - валидация: контроль исходного значения плюс Положительный контроль

Тест: Контроль исходного значения + исследуемое вещество

В: TI в DMEM +1% FBS

Контроль исходного значения: Клетки плюс DMEM плюс 1% FBS

Положительный контроль/контроль – валидация: Контроль исходного значения плюс Положительный контроль

Тест: Контроль исходного значения плюс исследуемое вещество

Микрофотографии царапины делали в моменты времени 24 ч - 72 ч. Микрофотографии, полученные на указанной выше стадии, анализировали для

количественной оценки площади замыкания пореза, используя программное обеспечение инструмента ImageJ. Рассчитывали миграцию в процентах относительно необработанных клеток в разные моменты времени.

5 **Таблица 11: Воздействие SEQ ID NO. 2 на миграцию эндотелиальных клеток в SFM**

Ингибирование миграции относительно необработанных клеток				
Образец	Концентрация	Время обработки (часы)		
		24	48	72
Необработанные клетки	Необработанные клетки	0	0	0
Паклитаксел (нМ)	0,1	26,5	21,1	7,8
	1	28,5	36,8	32,7
	2,5	51,4	51,6	42,8
	5	43,7	45,2	47,3
	10	58,9	60,2	56,3
SEQ ID No 2 (мкг/мл)	20	74	81,1	82,4
	40	80,5	82,3	82,2
	50	79,9	81	79,5
	60	82,0	77,3	76,0
	80	80,5	78,2	74,5
	100	55,7	73,2	71,5

Таблица 12: Воздействие SEQ ID NO. 2 на миграцию эндотелиальных клеток в 1% FBS

Ингибирование миграции относительно необработанных клеток			
Образец	Концентрация	Время обработки (часы)	
		24	48
Необработанные клетки	Необработанные клетки	0	0
Паклитаксел (нМ)	0,1	-1,1	-0,2
	1	7,8	2,1
	2,5	25,9	18,3
	5	25,0	10,6
	10	44,4	37,2
SEQ ID NO: 2 (мкг/мл)	20	0,8	5,4
	40	28,5	35,3
	50	30,0	42,9
	60	50,1	63,5
	80	65,6	77,8
	100	73,8	73,1

Секреция VEGF в раковых клетках

Секрецию VEGF исследовали в MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека) и PANC-1 (эпителиоидная карцинома поджелудочной железы человека), которые приобретали у Национального центра цитологии, Пуна (Индия). Клеточные линии поддерживали в DMEM + 10% FBS (инактивирована нагреванием) при 37°C с 5% CO₂ и влажностью 95%. Клетки подсчитывали и высевали в 6-луночные планшеты в течение 24 ч при плотности 0,5x10⁶ клеток/лунка. Клетки инкубировали в течение ночи в условиях выращивания, как описано выше, таким образом, чтобы обеспечить восстановление клеток и экспоненциальный рост. Клетки обрабатывали каждым исследуемым веществом в разных концентрациях в течение 24 ч в бессывороточных средах. Доксорубицин использовали в качестве положительного контроля. Секретируемые уровни VEGF определяли в супернатантах после 24 часов, используя набор для ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay - твердофазный иммуноферментный анализ) VEGF человека (R&D systems) в соответствии с протоколом производителя. Изменение в уровнях VEGF, соответствующих каждой обработке, рассчитывали с использованием следующей формулы:

$\%, \text{Изменение} = [R-X]/R \cdot 100,$

Где X = поглощение лунок, соответствующих обработанным клеткам

R = поглощение необработанных клеток (клетки, поддерживаемые в среде для выращивания)

5

Результаты

Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ингибировал миграцию эндотелиальных клеток (Таблица 13).

10

Таблица 13. Воздействие лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на пролиферацию эндотелиальных клеток, спустя 72 ч

Образец	Концентрация	Среднее	SD	% ингибирование FBS-стимулируемого роста клеток
Только DMEM	-	0,66	0,00	58,89
DMEM + 10% FBS	-	1,60	0,02	0,00
SEQ ID NO. 2 (мкг/мл)	2,5	1,761	0,006	-9,83
	5	1,799	0,027	-12,16
	10	1,870	0,012	-16,59
	20	1,355	0,011	15,51
	40	1,135	0,012	29,22
	80	0,698	0,004	56,50
	100	0,665	0,008	58,53
Паклитаксел (нМ)	1	0,93	0,01	42,03
	10	0,89	0,01	44,67
	100	0,57	0,01	64,46
	1000	0,45	0,00	71,65

Наблюдали, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, повышал уровень VEGF в клетках MDA-MB-231

15

при наибольших концентрациях, тестируемых в диапазоне 2,5-80 мкг/мл, по сравнению с необработанным контролем (Таблица 14). Увеличение в уровнях VEGF в присутствии лектина также наблюдали для клеток PANC-1 во всех концентрациях, тестируемых в том же диапазоне концентраций (Таблица 15).

5

Таблица 14: Воздействие лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на высвобождение VEGF в клетках MDA-MB-231

Образец	Концентрация	Среднее поглощение при 450 нМ	Уровень VEGF (пг/мл)	Уменьшение в процентах в уровнях VEGF
Необработанные клетки		0,796	463,3	0
Доксорубицин (мкМ)	10	0,176	49,9	89,2
	100	0,145	29,0	93,7
SEQ ID NO. 2 (мкг/мл)	2,5	0,970	579,3	-25,0
	5	0,763	441,0	4,8
	10	1,072	647,5	-39,8
	20	1,552	967,3	-108,8
	80	2,222	1413,9	-205,2

10

Таблица 15: Воздействие лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на высвобождение VEGF в клетках PANC-1

Образец	Концентрация	Среднее поглощение при 450 нМ	Уровень VEGF (пг/мл)	Уменьшение в процентах в уровнях VEGF
Необработанные клетки		1,633	1021,0	0
Доксорубицин (мкМ)	10	0,506	269,7	73,6
	100	0,483	254,6	75,1
SEQ ID NO. 2 (мкг/мл)	2,5	1,717	1077,5	-5,5
	5	1,821	1146,8	-12,3
	10	2,085	1322,6	-29,5
	20	2,202	1400,6	-37,2
	80	2,006	1269,9	-24,4

Пример 7: Оценка *in-vivo* антиангиогенного потенциала рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, с использованием анализа на основе матригелевой пробки у мышей c57bl/6

5 Здоровых мышей C57BL/6 отбирали и распределяли на основе массы тела по пяти группам (G1-G4, n=7). Каждой мыши группы G2-G4 подкожно инъецировали в область правой боковой поверхности 500 мкл матригеля, содержащего 500 нг FGF-2 (bFGF). Тогда как мышам группы G1 подкожно инъецировали в область правой боковой поверхности 500 мкл только матригеля. В данном анализе

10 соединения, индуцирующие ангиогенез, такие как bFGF, вводили в холодный жидкий матригель, который после подкожной инъекции затвердевал, и они обеспечивают проницаемость клеток-хозяев и образование новых кровеносных сосудов (неоваскуляризация).

Таблица 16: Распределение по группам

Группа	Обработка	Доза, Способ и Схема	Число животных
G1	Отрицательный контроль	10 мл/кг, в.б., qdx15 (1 раз в сутки, 15 суток)	7
G2	Положительный контроль	10 мл/кг, в.б., qdx15	7
G3	Сунитиниб	55 мл/кг, п.о. (перорально), qdx15	7
G4	SEQ ID NO. 2	10 мл/кг, в.б., qdx15	7

Брали требуемое количество исследуемых веществ и добавляли к соответствующему объему трис-буферного физиологического раствора (TBS) для достижения требуемых концентраций. Объем дозы, который давали животному, составлял 10 мл/кг.

Ежесуточные наблюдения в клетке содержания проводили для выявления каких-либо клинических признаков или смертности и записывали на протяжении всего периода эксперимента.

Результаты

1. Содержание гемоглобина в участке матригелевой пробки

Группа G3 (Сунитиниб, 55 мг/кг) демонстрировала максимальное уменьшение, а именно 59,2% в содержании гемоглобина в гомогенате матригелевой пробки, тогда как Группа G4 (рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, 10 мг/кг; qdx15) демонстрировала 23,6%-ное уменьшение содержания гемоглобина, по сравнению с положительным контролем (Таблица 17).

Таблица 17. Содержание гемоглобина в участке матригелевой пробки

G1		G2		G3		G4	
Отрицательный контроль (10 мл/кг, qdx15)		Положительный контроль (10 мл/кг, qdx15)		Сунитиниб (55 мг/кг, qdx15)		SEQ ID NO. 2 (10 мг/кг, qdx15)	
Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
5,67	1,15	53,76	11,74	21,92	3,11	41,10	7,00

2. Гематоксилин и Эозин (H&E) для гистологического наблюдения

Тяжесть неоваскуляризации сильно усиливалась в группе положительного контроля (G2), по сравнению с группой отрицательного контроля (G1), тогда как
 5 неоваскуляризация немного уменьшалась у мышей, обработанных рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в количестве 10 мг/кг, в.б., qdx15 (G4) (Таблица 18).

Таблица 18: Гистологическое наблюдение

G1; Отрицательный контроль, (10 мл/кг, qdx15)							
Инфильтрация фибробластами		Неоваскуляризация		Клеточная инфильтрация MN		Жировая клеточная инфильтрация	
Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
1,14	0,14	0,00	0,00	1,14	0,14	0,71	0,36
G2; Положительный контроль, (10 мл/кг, qdx15)							
Инфильтрация фибробластами		Неоваскуляризация		Клеточная инфильтрация MN		Жировая клеточная инфильтрация	
Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
3,86	0,14	2,86	0,14	3,00	0,00	1,86	0,26
G3; Сунитиниб (55 мг/кг, qdx15)							
Инфильтрация фибробластами		Неоваскуляризация		Клеточная инфильтрация MN		Жировая клеточная инфильтрация	
Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
2,43	0,20	1,14	0,14	1,57	0,20	0,71	0,18
G4; рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, (10 мг/кг, qdx15)							
Инфильтрация фибробластами		Неоваскуляризация		Клеточная инфильтрация MN		Жировая клеточная инфильтрация	
Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
3,29	0,18	2,43	0,30	2,71	0,18	1,57	0,30

Содержание гемоглобина в матригелевой пробке и неоваскуляризация гистологии матригелевой пробки указывает на то, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, (10 мг/кг; qdx15), демонстрировал антиангиогенную активность, по сравнению с группой положительного контроля, с использованием анализа матригелевой пробки у мышей C57BL/6.

Пример 8: Исследование цитотоксичности, апоптоза на опухоли головного мозга

Цитотоксичность

Цитотоксические действия *in vitro* рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, исследовали в панели клеточных линий опухоли головного мозга, состоящей из глиобластомы человека: LN-18, глиобластомы человека U251MG; нейробластомы человека: SH-SY-5Y; менингиомы человека: IOMM-Lee; астроцитомы человека: U87MG; С6 крысы (Глиома), посредством МТТ-теста. SEQ ID NO. 2 получали в виде водного раствора (12,17 мг/мл), и маточный раствор SEQ ID NO. 2 разводили в бессывороточной среде (SFM) в разных концентрациях, соответствующих 10-кратной высокой концентрации. Клетки считали, используя гемоцитометр, и высевали в 96-луночные планшеты, и клетки инкубировали в течение ночи в 5% CO₂ инкубаторе при 37°C. После 24 ч инкубации, клетки обрабатывали разными концентрациями SEQ ID NO. 2, находящимися в интервале 2,5 мкг/мл - 100 мкг/мл. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Клетки, обработанные Эверолимусом и Доксорубицином, использовали в качестве положительного контроля. После 72 ч инкубации действие SEQ ID NO. 2 на цитотоксичность клеток определяли посредством МТТ-теста. Планшеты вынимали, и 20 мкл 5 мг/мл раствора МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид добавляли во все лунки. Клетки инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Супернатант отсасывали, и 150 мкл ДМСО добавляли в каждую лунку для растворения кристаллов формазана. Затем поглощение каждой лунки считывали при 540 нм, используя микропланшет-ридер Synergy HT.

Результаты

- Выраженное в процентах ингибирование исследований цитотоксичности SEQ ID NO. 2 против глиобластомы человека: LN-18, глиобластомы человека: U251MG; нейробластомы человека: SH-SY-5Y; менингиомы человека: IOMM-Lee; астроцитомы человека: U87MG; С6 крысы (глиома) представлено в Таблице 19.
- SEQ ID NO. 2 демонстрировал значимую цитотоксичность при следующем типе опухоли головного мозга: глиобластома, менингиома и астроцитома.
- SEQ ID NO. 2 демонстрировал хорошую цитотоксичность при следующем клеточном типе опухоли головного мозга: тип нейробластома и тип глиома.
- Цитотоксичность наблюдали следующим образом: LN-18 (глиобластома) > U251MG (глиобластома) > IOMM-Lee (менингиома) > U87MG (астроцитома) > С6 (глиома) > SH-SY-5Y (нейробластома)
- SEQ ID NO. 2 демонстрировал хорошую селективность при типе головного мозга Глиобластома и умеренную селективность при менингиомах.

Таблица 19: Выраженное в процентах ингибирование исследований цитотоксичности SEQ ID NO. 2 против глиобластомы человека: LN-18, глиобластомы человека: U251MG; нейробластомы человека: SH-SY-5Y; менингиомы человека: IOMM-Lee; астроцитомы человека: U87MG; С6 крысы (глиома)

Клеточная линия	% исследований цитотоксичности			
	SEQ ID No 2 (2,5 мкг/мл - 100 мкг/мл)	Доксорубицин (0,1 мМ-100 мкМ)	Эверолимус (0,05 мкМ-50 мкМ)	Значение IC ₅₀ SEQ ID NO. 2
Глиобластома (LN-18)	39,6%-75,3%	6,5%-47,7%	3,5%-90,7%	4,35 мкг/мл
Глиобластома (U251MG)	35,1%-74,1	11,2%-78,6%	32,8%-71%	11,05 мкг/мл
Менингиома (IOMM-Lee)	15,4%-64,3%	46,6%-54,5%	44,7%-97,4%	18,37 мкг/мл
Астроцитома (U87MG)	8,9%-51,8%	46,6%-72,4%	43,6%-88,0%	98,88 мкг/мл
Глиома (С6)	18,8-48,3%	57,8%-86,3%	50,3%-97,2%	>100 мкг/мл
Нейробластома (SH-SY5Y)	10,3%-46,9%	21,7%-61,7%	29,7%-70,1%	>100 мкг/мл

Апоптоз

Проводили оценку проапоптотического действия SEQ ID NO. 2 в линиях опухолевых клеток головного мозга U251MG & IOMM Lee. Клетки обрабатывали SEQ ID NO. 2 в разных концентрациях около значений IC₅₀. Полученное воздействие на апоптоз определяли по экстернализации фосфатидилсерина (PS – от англ. Phosphatidyl Serine) на клеточной мембране посредством окрашивания Аннексином-V, деполяризации митохондриальной мембраны посредством окрашивания JC-1 и анализу распределения клеточного цикла по окрашиванию йодидом пропидия (PI – от англ. Propidium Iodide). Увеличение маркеров апоптоза в клеточных линиях U251MG и IOMM-Lee отражало проапоптотический потенциал SEQ ID NO. 2 в опухоли головного мозга.

- Экстернализация PS на клеточной мембране в соответствии с окрашиванием Аннексином-V на клеточной линии U251MG: SEQ ID NO. 2 (1 мкг/мл – 80 мкг/мл) демонстрировал увеличение популяции на ранних и поздних стадиях апоптоза в 3 раза – 5 раз ($p < 0,001$) и 2 раза – 5 раз ($p < 0,05$), по сравнению с Контролем (необработанные клетки), соответственно.

- Экстернализация PS на клеточной мембране в соответствии с окрашиванием Аннексином-V на клеточной линии IOMM-Lee: SEQ ID NO. 2 (1 мкг/мл – 80 мкг/мл) демонстрировал увеличение популяции на ранних и поздних стадиях апоптоза в 22 раза – 28 раз ($p < 0,001$) и 2 раза – 5 раз, по сравнению с Контролем, соответственно.

- Деполяризация митохондриальной мембраны клеточной линии U251MG: SEQ ID NO. 2 (1 мкг/мл – 80 мкг/мл) демонстрировал увеличение деполяризации митохондриальной мембраны на 36,8% - 60,9% ($p < 0,001$), по сравнению с Контролем (необработанные клетки).

- Деполяризация митохондриальной мембраны клеточной линии IOMM-Lee: SEQ ID NO. 2 (1 мкг/мл – 80 мкг/мл) демонстрировал увеличение деполяризации митохондриальной мембраны на 16,1% - 36,4% ($p < 0,001$), по сравнению с Контролем (необработанные клетки).

- Увеличение в популяции Sub(G0/G1) в анализе клеточного цикла в клеточной линии U251MG: SEQ ID NO. 2 (1 мкг/мл – 80 мкг/мл) демонстрировал увеличение в апоптозной популяции Sub(G0/G1) в 1,5 раза – 4,3 раза ($p < 0,001$), по сравнению с Контролем

- Увеличение в популяции Sub (G0/G1) в анализе клеточного цикла в линии клеток IOMM-Lee: SEQ ID NO. 2 (1 мкг/мл – 500 мкг/мл) демонстрировал увеличение в апоптозной популяции Sub(G0/G1) в 1,1 раза - 35,3 раза ($p < 0,001$), по сравнению с Контролем (необработанные клетки).

Пример 9: Объяснение механизма действия SEQ ID NO. 2 в опухоли головного мозга посредством мультиплексного анализа

Воздействие SEQ ID NO. 2 на экспрессию следующих 7 биомаркеров оценивали в клеточной линии менингиомы человека (IOMM-Lee) с использованием мультиплексного анализа: TNF-альфа, VEGF, VEGFR2, HGF, HGFR/c-MET, PDGF-BB и Контактин-1. Уровни еще одного маркера, Notch-1, также оценивали посредством ELISA в той же клеточной линии. Данные 8 биомаркеров играют крайне важную роль в патогенезе и прогрессировании опухоли головного мозга. Менингиому человека (клетки IOMM-Lee) обрабатывали SEQ ID NO. 2 в

концентрациях, включая IC_{50} , в течение 48 ч. Супернатанты собирали, и исследовали уровни данных 8 маркеров.

SEQ ID NO. 2 приводил к значимому ингибированию ($p < 0,01$, $p < 0,001$) биомаркеров (VEGF, VEGFR2, HGF, HGFR/c-MET, PDGF-BB, Notch-1), по сравнению с необработанным контролем.

Уровни TNF- α и Контактин-1 также ингибировались под действием SEQ ID NO. 2.

Таблица 20: Выраженное в процентах ингибирование SEQ ID NO. 2, оказываемое на уровни биомаркеров опухоли головного мозга в IOMM-Lee

Биомаркеры	Seq. ID No 2 (1 мкг/мл - 80 мкг/мл)	Доксорубицин		Эверолимус	
		1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	5 мкМ
TNF- α	16,8%-42,3%	67,8%	42,3%	42,3%	100%
VEGF	3,9%-49,3%	53%	93,4%	45,8%	53,3%
VEGFR2	17,8%-22,5%	38,2%	50,1%	27,6%	100%
HGF	43,8%-93%	45,3%	84%	59,2%	80,8%
HGFR/c-MET	5,5%-19,3%	45,5%	55,2%	21,2%	41%
PDGF-BB	33,6%-100%	12%	100%	1,5%	67,9%
Контактин-1	0,3%-27,2%	50%	23,3%	14,9%	31,3%
Notch-1	81,2%-99,8%	8%	10,6%	75,9%	-

Пример 10: Цитотоксическое действие SEQ ID NO. 2 в раковых клеточных линиях

In vitro противораковый потенциал рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1, в разных клеточных линиях в соответствии с анализом на основе Кальцеина AM

Очищенный рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, исследовали в отношении его противоракового потенциала в разных клеточных линиях. Противораковый потенциал рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, оценивали *in vitro* на 13 разных линиях раковых клеток и 3 нормальных типах клеток с использованием анализа на основе Кальцеина AM.

Все линии раковых клеток приобретали у Национального центра цитологии, Пуна (Индия). Клеточные линии поддерживали в условиях, как описано ниже в Таблице 21. Клеточные линии субкультивировали посредством обработки трипсином с последующим разделением клеточной суспензии по свежим пробиркам и добавлением свежей культуральной среды.

Таблица 21. Подробности клеточных линий, используемых в *in vitro* противораковых исследованиях, в соответствии с анализом на основе Кальцеина АМ

S No	Название клеточной линии/клеток	Среда для выращивания
1	SW620 (аденокарцинома толстой и прямой кишки человека)	DMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
2	HT-29 (аденокарцинома толстой и прямой кишки человека)	DMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
3	PA-1 (карцинома яичника человека)	EMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
4	SKOV-3 (аденокарцинома яичника человека)	DMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
5	MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека)	DMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
6	A549 (карцинома легкого человека)	DMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
7	AGS (аденокарцинома желудка человека)	EMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
8	ZR-75-1 (протоковая карцинома человека)	EMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
9	KB (папиллярная карцинома человека)	EMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
10	PC-3 (рак предстательной железы человека)	RPMI-1640 + 10% инактивированная нагреванием FBS
11	SiHa (плоскоклеточная карцинома шейки матки человека)	EMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
12	THP-1 (острый моноцитарный лейкоз человека)	RPMI-1640 + 0,05 мМ бета-меркаптоэтанол + 10% инактивированная нагреванием FBS
13	SK-Mel-28 (меланома человека)	EMEM + 10% инактивированная нагреванием FBS
14	PBMC (моноклеарные клетки периферической крови)	RPMI-1640 + 10% инактивированная нагреванием FBS
15	MCF-10A (эпителиальные клетки молочной железы человека)	MEGM
16	Первичные эпителиальные клетки молочной железы (HMEC – от англ. Human Primary mammary epithelial cell)	MEGM

Все клеточные линии выращивали в установленных средах при 37°C с влажностью 95% и 5% CO₂. Доксорубин использовали в качестве положительного контроля. Маточные растворы рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, получали в диметилсульфоксиде (ДМСО) и использовали в конечных концентрациях 2,5, 5, 10,

20, 40 и 80 мкг/мл. Аналогично, маточный раствор Доксорубина получали в ДМСО и использовали в конечных концентрациях 0,1, 1, 10 и 100 мкМ.

Определение цитотоксической активности

5 Клетки обрабатывали трипсином, подсчитывали методом трипанового синего в камере Neubauer и высевали в лунки плоскодонного 96-луночного планшета (планшет с темными стенками, плоскодонный) при плотности, соответствующей 10×10^3 клеток/лунка/180 мкл среды.

10 После инкубации в течение ночи клетки обрабатывали исследуемым веществом (20 мкл) при концентрациях, находящихся в интервале 2,5-80 мкг/мл, таким образом, чтобы общий объем в каждой лунке составлял 200 мкл. Клетки, соответствующие группе положительного контроля, обрабатывали Доксорубицином. Необработанные клетки служили в качестве отрицательного контроля, который не получает никакой обработки.

15 Клетки инкубировали с исследуемыми веществами или положительным контролем в течение определенного периода времени 48 ч. После инкубации цитотоксичность клеток оценивали, используя набор для анализа жизнеспособности клеток на основе Кальцеина АМ от R&D systems (кат. №. 4892-010-K).

20 Флуоресценцию измеряли при спектрах 485 нм (возбуждение)/528 нм (испускание) с использованием микропланшет-ридера Synergy HT.

Выраженную в процентах цитотоксичность относительно необработанных клеток рассчитывали, используя формулу:

Цитотоксичность = $\frac{[(RFU_{\text{необработанные}} - RFU_{\text{образец}})]}{RFU_{\text{необработанные}}} \times 100$,

25 RFU: относительные единицы флуоресценции

Значение IC_{50} рассчитывали, используя программное обеспечение Graph-Pad Prism версия 4.01.

30 Результаты продемонстрировали, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, показывал цитотоксическое действие на клеточные линии AGS (аденокарцинома желудка человека), KB (карцинома шейки матки человека), PA-1 (карцинома яичника человека) и HT-29 (аденокарцинома толстой и прямой кишки человека) со значениями IC_{50} 42,6, 18,4, 20,3 и 42,0 мкг/мл, соответственно. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, показывал значение IC_{50} больше 80 мкг/мл для других раковых клеток, как таковое у нормальных клеток. Результаты обобщены в Таблице 22.

Таблица 22. Краткое изложение *in vitro* противоракового потенциала рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в разных клеточных линиях в соответствии с анализом на основе Кальцеина АМ

S. No.	Название клеточной линии	Цитотоксичность при самой высокой тестируемой концентрации*		IC ₅₀ SEQ ID2
		SEQ 2	Доксорубицин	
1	SW620 - (аденокарцинома толстой и прямой кишки человека)	6,18	93,5	>80
2	HT-29 - (аденокарцинома толстой и прямой кишки человека)	59,8	75,0	42,0
3	PA-1 - (карцинома яичника человека)	72,0	82,3	20,3
4	SKOV-3 - (аденокарцинома яичника человека)	-18,6	61,74	>80
5	MCF-7 - (аденокарцинома молочной железы человека)	-94,9	60,7	>80
6	A549 - (карцинома легкого человека)	30,1	78,4	>80
7	AGS - (аденокарцинома желудка человека)	66,5	81,0	42,6
8	ZR-75-1 - (протоковая карцинома человека)	-0,6	52,6	>80
9	KB - (карцинома шейки матки человека)	64,1	92,0	18,4
10	PC-3 - (рак предстательной железы человека)	35,0	75,3	>80
11	SiHa - (плоскоклеточная карцинома шейки матки человека)	8,7	87,2	>80
12	THP-1 - (острый моноцитарный лейкоз человека)	2,44	33,6	>80
13	SK-Mel-28 - (меланома человека)	18,2	65,9	>80
14	PBMC - (моноклеарные клетки периферической крови)	37,4	64,3	>80
15	MCF-10A - (эпителиальные клетки молочной железы человека)	43,5	93,8	>80
16	Первичные эпителиальные клетки молочной железы человека (HMEC)	44,5	87,6	>80

*Концентрация рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, составляла 80 мкг/мл и концентрация доксорубина составляла 100 мкМ.

***In vitro* противораковый потенциал рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, в разных клеточных линиях в соответствии с МТТ-тестом**

Очищенный рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, исследовали в отношении его противоракового потенциала в разных клеточных линиях. Противораковый потенциал рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, оценивали *in vitro* на 7 разных линиях раковых клеток и одной нормальной клеточной линии с использованием МТТ-теста.

Все линии раковых клеток приобретали у Национального центра цитологии, Пуна (Индия). Клеточные линии поддерживали в условиях, как упомянуто в Таблице 23. Клеточные линии субкультивировали посредством обработки трипсином с последующим распределением клеточной суспензии по свежим пробиркам и добавлением свежей культуральной среды.

Таблица 23: Детальная информация о клеточных линиях, используемых в *in vitro* противораковых исследованиях с использованием анализа на основе Кальцеина АМ

S No	Название клеточной линии/клеток	Среда для выращивания
1	PANC-1 (эпителиоидная карцинома поджелудочной железы человека)	DMEM + 10% FBS
2	MIA PaCa-2 (карцинома поджелудочной железы человека)	DMEM + 10% FBS
3	MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека)	DMEM + 10% FBS
4	MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека)	DMEM + 10% FBS
5	MDA-MB-453 (метастазированная карцинома молочной железы человека)	DMEM + 10% FBS
6	T-47D (протоковая карцинома молочной железы человека)	DMEM + 10% FBS
7	T24 (рак мочевого пузыря человека)	McCoy 5A + 10% FBS
8	PBMC (моноклеарные клетки периферической крови)	RPMI-1640 + 10% FBS

Все клеточные линии выращивали в установленных средах при 37°C с влажностью 95% и 5% CO₂. Доксорубицин использовали в качестве положительного контроля. Маточные растворы рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, получали в ДМСО и использовали в конечных концентрациях 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл и 80 мкг/мл. Аналогично, маточный раствор Доксорубина получали в ДМСО и использовали в конечной концентрации 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ.

Определение цитотоксической активности

Клетки обрабатывали трипсином, подсчитывали методом Трипанового синего в камере Neubauer и высевали в лунки плоскодонного 96-луночного планшета при плотности, соответствующей 10 x10³ клеток/лунка/200 мкл среды.

После инкубации в течение ночи среды в планшете пополняли 180 мкл/лунка, и затем клетки обрабатывали 20 мкл каждого исследуемого вещества в концентрациях, находящихся в интервале от 2,5 мкг/мл – 80 мкг/мл в трехкратной повторности, таким образом, что общий объем в каждой лунке составляет 200 мкл.

Клетки, соответствующие группе положительного контроля, обрабатывали Доксорубицином. Необработанные клетки служили в качестве отрицательного контроля. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами или положительным контролем в течение периода времени 48 ч. После инкубации клеточная

цитотоксичность оценивали, используя МТТ-тест. Поглощение измеряли при 540 нм. Выраженная в процентах цитотоксичность, соответствующую каждой обработке, рассчитывали, используя формулу: %, Цитотоксичность = $(1-X/R)*100$,

Где X = поглощение лунок, соответствующих обработанным клеткам

5 R = поглощение необработанных клеток (клетки, поддерживаемые только в среде для выращивания)

Значение IC₅₀ рассчитывали, используя программное обеспечение Graph-Pad Prism версия 4.01.

10 Результаты продемонстрировали, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, демонстрировал цитотоксическое действие, оказываемое на линии клеток PANC-1 (эпителиоидная карцинома поджелудочной железы человека), MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека) и T24 (рак мочевого пузыря человека) со значениями IC₅₀ 24,3 мкг/мл, 9,7 мкг/мл и 10,4 мкг/мл, соответственно. Рекомбинантный лектин, 15 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, показывал значение IC₅₀ больше 80 мкг/мл для всех других клеточных линий. Результаты обобщены в Таблице 24.

Таблица 24: Сводные данные по клеточному анализу *in vitro* цитотоксичности/ антипролиферации

S No	Название клеточной линии	Цитотоксичность при самой высокой тестируемой концентрации*		IC ₅₀ SEQ ID2
		SEQ 2	Доксорубицин	
1	PANC-1 - (эпителиоидная карцинома поджелудочной железы человека)	60,8	65,1	24,3
2	MIA PaCa-2 - (карцинома поджелудочной железы человека)	47,5	63,9	>80
3	MCF-7 - (аденокарцинома молочной железы человека)	28	64,9	>80
4	MDA-MB-231 - (аденокарцинома молочной железы человека)	60,9	50,2	9,7
5	MDA-MB-453 - (метастазированная карцинома молочной железы человека)	46,6	71,4	>80
6	T-47D - (протоковая карцинома молочной железы человека)	28,1	51,1	>80
7	T24 - (рак мочевого пузыря человека)	93,1	54,4	10,4
8	PBMC - (моноклеарные клетки периферической крови)	2,1	32,0	>80

*Концентрация рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, составляла 80 мкг/мл и концентрация доксорубицина составляла 75 мкМ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака посредством ингибирования ангиогенеза у субъекта, включающем введение терапевтически эффективного количества указанного рекомбинантного лектина.

2. Рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака посредством индукции апоптоза у субъекта, включающем введение терапевтически эффективного количества указанного рекомбинантного лектина.

3. Рекомбинантный лектин по п. 1 и п. 2, где указанный рак представляет собой карциному.

4. Рекомбинантный лектин по п. 3, где указанный рак представляет собой аденокарциному или плоскоклеточную карциному.

5. Рекомбинантный лектин по п. 4, где аденокарцинома выбрана из аденокарциномы пищевода, аденокарциномы поджелудочной железы, аденокарциномы предстательной железы, аденокарциномы шейки матки, аденокарциномы молочной железы, аденокарциномы толстой кишки или колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы легкого, аденокарциномы желчного протока, аденокарциномы влагалища, аденокарциномы мочевого протока или аденокарциномы желудка.

6. Рекомбинантный лектин по п. 4, где плоскоклеточная карцинома представляет собой плоскоклеточную карциному кожи, плоскоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному ротовой полости, плоскоклеточную карциному щитовидной железы, плоскоклеточную карциному пищевода, плоскоклеточную карциному влагалища, плоскоклеточную карциному шейки матки, плоскоклеточную карциному яичника, плоскоклеточную карциному головы и/или шеи, плоскоклеточную карциному предстательной железы или плоскоклеточную карциному мочевого пузыря.

7. Рекомбинантный лектин по п. 3, где рак представляет собой рак головного мозга.

8. Рекомбинантный лектин по любому из п.п. 1-7, где указанный рекомбинантный лектин представлен аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 60%-ной идентичностью с SEQ ID NO. 1.

9. Рекомбинантный лектин по п. 8, где указанная аминокислотная последовательность обладает по меньшей мере 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной гомологией с SEQ ID NO. 1.

10. Рекомбинантный лектин по п. 8 и п. 9, где указанная аминокислотная последовательность выбрана из SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4.

11. Рекомбинантный лектин по п.п. 1-10, где эффективная концентрация рекомбинантного лектина составляет от 0,1 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл.

12. Рекомбинантный лектин по п.п. 1-10, где терапевтически эффективная доза рекомбинантного лектина составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта.

13. Рекомбинантный лектин по любому из п.п. 1-12, где указанный лектин ингибирует миграцию и/или пролиферацию эндотелиальных клеток.

14. Рекомбинантный лектин по любому из п.п. 1-13, где указанный лектин модулирует секрецию VEGF.

15. Рекомбинантный лектин по любому из п.п. 1-14, где указанный лектин уменьшает содержание гемоглобина и неоваскуляризацию в раковых клетках.

16. Рекомбинантный лектин по любому из п.п. 1-15, где лектин модулирует один или более сигнальных путей, выбранных из следующего: ATF-2, ERK1/2; JNK; MEK-1; P90RSK; STAT-3; p53; MMP; HGF; C-kit; Her-2; GMSCF; IL-6; IL-8; p38/MAPK; PDGF; TNFR; MPO; Галектин-3; Fcγ-1; CD40L; Ангиопоэтин-2; Калликреин-5; Остеопонтин; TNF-α; Эндоглин; CCR5; TRAIL через FADD и каспазу-3, Лептин; MAPK/EGFR/Ras/Raf; ADRB1; IL-4/STAT6; NF-KB; TNF-α/JNK, PKC/CA2⁺; и PI3K/AKT/FOXO3.

17. Рекомбинантный лектин по п. 2, где указанный лектин индуцирует раннюю и позднюю стадию апоптоза в раковых клетках.

18. Способ предупреждения ангиогенеза в раковых клетках с использованием белка – рекомбинантного лектина.

19. Способ индукции апоптоза опухолевых клеток с использованием белка – рекомбинантного лектина.

20. Способ лечения рака посредством ингибирования ангиогенеза в раковых клетках, где указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного лектина.

21. Способ лечения рака посредством индукции апоптоза в раковых клетках, где указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного лектина.

22. Фармацевтическая композиция для применения в способе лечения рака, содержащая белок-рекомбинантный лектин и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где указанная композиция ингибирует ангиогенез в раковых клетках.

23. Фармацевтическая композиция для применения в способе лечения рака, содержащая белок-рекомбинантный лектин и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где указанная композиция индуцирует апоптоз в раковых клетках.

24. Способ лечения по п. 19 или п. 20, где указанный способ включает введение лектина по п.п. 1-16.

25. Композиция по п. 21 или п. 22, где указанная композиция содержит лектин по п.п. 1-16.

26. Рекомбинантный лектин для применения в способе лечения рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака молочной железы, рака толстой кишки или колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака яичника или рака головного мозга, включающем введение терапевтически эффективного количества указанного рекомбинантного лектина.