



(51) МПК

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 33/32 (2006.01)
A61K 47/66 (2017.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/17 (2006.01); *A61K 31/7105* (2006.01); *A61K 31/704* (2006.01); *A61K 33/32* (2006.01); *A61K 47/66* (2006.01); *A61P 35/04* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016124731, 16.01.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.01.2015Дата регистрации:
19.03.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
17.01.2014 US 61/928,903

(43) Дата публикации заявки: 22.02.2018 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 19.03.2019 Бюл. № 8

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 17.08.2016

(86) Заявка РСТ:
US 2015/011870 (16.01.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/109264 (23.07.2015)Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов и партнёры"

(72) Автор(ы):

МЕДИНА-КАУВЕ Лали К. (US)

(73) Патентообладатель(и):

СИДАРС-СИНАЙ МЕДИКАЛ СЕНТР
(US)(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2012004181 A1, 05.01.12.
KOCHUT A. BACTERIAL INVASION FACTORS: TOOLS FOR CROSSING BIOLOGICAL BARRIERS AND DRUG DELIVERY/ European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 84(2), 2013. US 2012071540 A1, 22.03.12.

R U 2 6 8 2 3 3 5 C 2 3 2 9 8 2 6 9 2 3 2 2 1

R U 2 6 8 2 3 3 5 C 2

(54) РЕЦЕПТОР-НАПРАВЛЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к адресной доставке лекарственного средства. Способ адресной доставки молекулярного груза в головной мозг субъекта, страдающего от злокачественной опухоли головного мозга, включает системное введение субъекту композиции, содержащей: молекулу для адресной доставки лекарственного средства и молекулярный груз, причем молекула для адресной доставки лекарственного средства содержит лиганд, направленно связывающийся

с HER3, сегмент основания пептона и домен, связывающий молекулярный груз; при этом молекула для адресной доставки лекарственного средства и молекулярный груз проникают через гематоэнцефалический барьер в организме субъекта и обеспечивают доставку молекулярного груза в головной мозг субъекта. Изобретение обеспечивает адресную доставку лекарственного средства в головной мозг. 20 з.п. ф-лы, 19 ил., 6 пр.



(19)

RU

(11)

2 682 335⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 33/32 (2006.01)
A61K 47/66 (2017.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 38/17 (2006.01); *A61K 31/7105* (2006.01); *A61K 31/704* (2006.01); *A61K 33/32* (2006.01); *A61K 47/66* (2006.01); *A61P 35/04* (2006.01)

(21)(22) Application: 2016124731, 16.01.2015

(24) Effective date for property rights:

16.01.2015

Registration date:
19.03.2019

Priority:

(30) Convention priority:

17.01.2014 US 61/928,903

(43) Application published: 22.02.2018 Bull. № 6

(45) Date of publication: 19.03.2019 Bull. № 8

(85) Commencement of national phase: 17.08.2016

(86) PCT application:
US 2015/011870 (16.01.2015)(87) PCT publication:
WO 2015/109264 (23.07.2015)Mail address:
191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov
i partnery"

(72) Inventor(s):

MEDINA-KAUVE Lali K. (US)

(73) Proprietor(s):

SIDARS-SINAJ MEDIKAL SENTR (US)

R U
2 6 8 2 3 3 5
C 2
C 5
C 3
C 2
C 8
C 6
C 2
R U**(54) RECEPTOR TARGETING CONSTRUCTS AND USES THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to the targeted drug delivery. Method for targeted delivery of a molecular payload to the brain of a subject suffering from a malignant brain tumour includes systemic administration to the subject of a composition comprising: a molecule for targeted drug delivery and a molecular payload, wherein the molecule for targeted drug delivery comprises a ligand that binds to HER3

in a targeted manner, a peptone base segment and a molecular payload binding domain; wherein the molecule for targeted drug delivery and the molecular payload penetrate the blood-brain barrier in the subject's body and ensure the delivery of the molecular payload to the subject's brain.

EFFECT: invention provides targeted delivery of a drug to the brain.

21 cl, 19 dwg, 6 ex

[001] Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным №61/928903, поданной 17 января 2014 года Lali K. MEDINA-KAUWE и др. под названием «c-MET-TARGEING CONTRUST AND USES THEREOF», полное описание которой включено в данный документ посредством ссылки, включая

5 графические материалы.

ПРАВА ГОСУДАРСТВА

[002] Изобретение, раскрытое в данном документе, было сделано при поддержке государства в рамках грантов CA 140995 и CA 129822, выданных Национальным институтам здравоохранения/Национальному институту рака. Государство имеет

10 определенные права на раскрытое изобретение.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. В частности, настоящее изобретение относится к композициям, которые обеспечивают доставку терапевтических средств в клетки-мишени, такие как раковые клетки.

15 **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[004] Многие типы опухолей, которые устойчивы или приобретают устойчивость к современным методам таргетной терапии, используемым в клинике, характеризуются повышенным содержанием на клеточной поверхности определенных белков, таких как c-Met. Например, злокачественная опухоль легких приобретает устойчивость к

20 ингибиторам EGF-R, таким как Тарцева. Считается, что ингибиторы, подобные Тарцеве, блокируют активность рецепторных тирозинкиназ (известные как ингибиторы тирозинкиназ или TKI), но в большинстве случаев ответ на ингибирование ТК отсутствует. Эти опухоли характеризуются повышенными уровнями белков клеточной поверхности (таких как c-Met) и, таким образом, это делает их отличными кандидатами 25 на применение описанных в данном документе терапевтических подходов, включающих применение композиций, направленных на сверхэкспрессированные белки, и обеспечивающих их проникновение в опухолевые клетки.

[005] В данной области в настоящее время предпринимаются попытки разработать антитела к c-Met или ингибиторы, которые предполагают блокировку передачи сигнала 30 с участием c-Met. Однако предыстория свидетельствует о том, что в большинстве случаев не будет получен ответ на антитела, блокирующие передачу сигнала, или малые молекулы, поскольку для дальнейшей пролиферации опухолевые клетки используют иные пути помимо заблокированных сигнальных путей.

[006] Композиции, описанные в данном документе, позволяют обойти необходимость 35 блокирования передачи сигнала за счет использования рецепторов на клеточной поверхности (например, c-Met), выполняющих функцию ворот для доставки токсичных молекул в опухолевую клетку и для уничтожения опухоли изнутри. Лиганд-направленная доставка делает возможным направленное связывание с опухолевыми клетками, положительными по специфическим поверхностным рецепторам (например, c-Met), а 40 входящий в состав молекулы-транспортера домен, отвечающий за проникновение через клеточную мембрану, обеспечивает проникновение в клетку и ее лизис через мембрану эндосом, образующихся вследствие эндоцитоза, опосредованного рецепторами клеточной поверхности. Белок-транспортер также модифицируют с целью 45 нековалентного связывания с определенными терапевтическими молекулами и их транспортировки посредством, например, ионных взаимодействий.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] В настоящем документе раскрыты молекулы для адресной доставки лекарственного средства, которые содержат лиганд, который направленно связывается

с молекулой клеточной поверхности; домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану; и домен, связывающий молекулярный груз; и фармацевтические композиции, содержащие вышеупомянутое. Также раскрыты способы лечения злокачественной опухоли, подавления прогрессирования рака, предотвращения

5 метастазирования рака и доставки терапевтического соединения в головной мозг субъекта, который в этом нуждается, причем способы включают идентификацию субъекта, который в этом нуждается; обеспечение композиции, содержащей молекулу для адресной доставки лекарственного средства, которая раскрыта в данном документе; и введение субъекту эффективного количества композиции.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[008] На Фигуре 1 показаны результаты поглощения одноцепочечного олигонуклеотида с использованием липофектамина в качестве контроля (ФИГ. 1А) и HerPBK10(ФИГ. 1В).

15 [009] На Фигуре 2 показано, что PBK10 может обеспечивать доставку синтетической мРНК, кодирующей GFP. На ФИГ. 2А в краткой форме представлена информация по мРНК, использованной в этом эксперименте. На ФИГ. 2В показана экспрессия GFP после трансфекции клеток мРНК с помощью липофектина (справа) в сравнении с экспрессией GFP после трансфекции клеток GFP-экспрессирующей плазмидой с помощью липофектина (слева). На ФИГ. 2С представлено схематическое изображение комплексов 20 PBK10-мРНК. На ФИГ. 2D показаны данные связывания с клетками для комплексов PBK10-мРНК. На ФИГ. 2Е показаны результаты поглощения связанных с клеткой комплексов. На ФИГ. 2F показано изображение с результатами экспрессии GFP, тогда как на ФИГ. 2G представлены те же данные в графической форме.

25 [0010] На Фигуре 3 представлено схематическое изображение (A) InlB321, который охватывает минимальный домен для связывания с рецептором с-MET; и (B) InlB321, связанный с внеклеточным доменом с-MET.

30 [0011] На Фигуре 4 представлено схематическое изображение, на котором показана конструкция рекомбинантного гена, кодирующего новый слитый белок, InlB-PBK10 в собранном виде. А. Конструкция pRSET-InlB-PBK10. В. Конструкция pRSET-GFP-InlB. С. Подтверждение наличия клонированных вставок с помощью рестрикционного анализа.

[0012] На Фигуре 5 представлены результаты вестерн-блоттинга, показывающие продукцию рекомбинантных белков InlB, InlB-PBK10 и GFP-InlB в клетках бактерий.

35 [0013] На Фигуре 6 представлен график, на котором показано, что содержание с-MET на клеточной поверхности различается в линиях опухолевых и неопухолевых клеток. Показано относительное содержание рецепторов на поверхности непермеабилизованных клеток, которое было установлено с помощью ИФА компонентов клеточной поверхности, что проводили в 96-луночном формате. Результаты ИФА показывают, что H1993 (клеточная линия рака легких) и MDA-MB-40 40 231 (клеточная линия рака молочной железы) принадлежат к клеткам с наиболее высоким содержанием с-MET на клеточной поверхности. RANKL (клеточная линия рака предстательной железы) и MDA-MB-435 (клеточная линия рака молочной железы) характеризуются умеренным содержанием, тогда как LN-GFP (клеточная линия рака предстательной железы) и Cos-7 (фибробласты почек африканской зелено-мартишки) 45 характеризуются низким содержанием с-MET на клеточной поверхности.

[0014] На Фигуре 7 представлены результаты экспериментов, которые показывают, что пептид, полученный из InlB, распознает с-MET. А. Пептид InlB321 характеризуется избирательным связыванием с клетками, позитивными по с-MET, а не с клетками с

низким уровнем экспрессии с-MET. Флуоресцентно-активируемая клеточная сортировка (FACS) была использована для определения относительного содержания InlB (распознается по иммунофлуоресценции), связанных с клетками, позитивными по с-MET. Данные FACS показывают относительно высокий уровень связывания InlB с клетками с высоким уровнем экспрессии с-MET (H1993), по сравнению с клетками с низким уровнем экспрессии с-MET (LN GFP). В. Подтверждение связывания с-MET с помощью конкурентного ингибиования. Связывание InlB с H1993 может быть ингибировано, если свободный InlB предварительно инкубировать с растворимым пептидом, полученным из внеклеточного, лиганд-связывающего домена с-MET (MET), до связывания с клетками. InlB и MET инкубировали в молярном соотношении 1:1 (MET : InlB), что позволяет предсказать 50% уменьшение уровня связывания рецепторов, если InlB обладает специфичностью к MET. С. Уровень связывания InlB-PBK10 с клетками пропорционален уровням с-MET. InlB-PBK10 характеризовался более высоким уровнем связывания с клетками с более высоким уровнем экспрессии с-MET на клеточной поверхности (MDA-MB-231) по сравнению с клетками, экспрессирующими относительно низкие уровни с-MET (Cos-7), что было установлено с помощью ИФА компонентов клеточной поверхности. Д. Ингибиование связывания с C-MET + клетками конкурирующим лигандом. Проводили предварительное связывание свободного лиганда InlB с клетками MDA-MB-231 в течение 1 ч на льду перед добавлением InlB-PBK10 при повышении концентрации InlB, предварительно связанного с клетками. Е. При взаимодействии InlB-PBK10 с C-MET + клетками в суспензии происходит рецептор-специфическое связывание. Клетки MDA-MB-435 в суспензии инкубировали со свободным лигандом InlB в повышающихся концентрациях и после удаления несвязавшегося InlB клетки инкубировали с InlB-PBK10. Концентрации свободного лиганда InlB подбирали таким образом, чтобы молярные соотношения InlB-PBK10 к InlB составляли: 1:1, 1:5 и 1:10. Для измерения относительного количества соосаждающегося с клетками InlB-PBK10 осуществляли вестерн-блоттинг. Денситометрия полос на иммуноблотах (правая панель) показывает, что уровни связывания InlB-PBK10 уменьшаются по мере увеличения концентрации InlB, что согласуется с данными по связыванию InlB-PBK10 с с-MET.

[0015] На Фигуре 8 показано, что InlB-PBK10 интернализуется в C-MET + клетки.

[0016] На Фигуре 9 показано, что InlB-PBK10 может обеспечивать доставку токсичных молекул в C-MET + клетки. А. Получение частиц InlB-PBK10-Ga. На схеме показана процедура выделения частиц посредством ультрафильтрации после смешивания InlB-PBK10 с Ga-корролом для обеспечения сборки с помощью нековалентной связи. В. Анализ частиц InlB-PBK10-Ga с помощью динамического рассеяния света (ДРС). С. InlB-PBK10 опосредует попадание молекулярного груза на основе коррола в цитозоль. D. I-Dox уменьшает выживаемость опухолевых клеток, позитивных по с-MET. E. Свободный InlB подавляет токсическое действие I-Dox.

[0017] На Фигуре 10 представлено изображение, полученное с помощью Xenogen Spectum, для биораспределения InlB-PBK10 после системного (хвостовая вена) введения мышам линии nu/nu с двусторонними (на боках) подкожными ксенотрансплантатами опухолевых клеток линии MDA-MB-435. А. Визуализация всего тела мыши через указанные интервалы времени после инъекции в хвостовую вену. Синими стрелками обозначены почки. Белыми стрелками обозначены опухоли. В. Изображения опухолей и тканей, полученных после умерщвления той же мыши через интервал времени, равный 4 ч.

[0018] На Фигуре 11 представлена сборка HerMn. А. Схематическое изображение

белка HerPBK10, на котором отмечены функциональные домены. В. Химическая структура Mn-коррола (S2Mn). С Схематическое изображение сборки с помощью нековалентной связи. Д. TEM (вкладка) и анализ частиц HerMn с помощью динамического рассеяния света (ДРС) в растворе.

- 5 [0019] На Фигуре 12 представлены несколько графиков, на которых показано, что HerPBK10 связывается с HER3 и сыворотка крови пациента не подавляет данное связывание. А. ИФА связывания HerPBK10 с иммобилизованным HER3 (внеклеточный домен ErbB3 человека; Prospec) -/+ предварительная инкубация с растворимым пептидом HER3 в качестве конкурентного ингибитора (блокатор HER3). Без обработки: в
10 отсутствие HerPBK10. В. ИФА связывания HerPBK10 с клетками HER2+ -/+ предварительная инкубация с: растворимым пептидом HER3, растворимым пептидом HER4 (пептид ERBB4, Abnova), бетацеллютином (10 мкг/мл) или пертузумабом (Pz) в молярном соотношении 1x и 10x в качестве конкурентных ингибиторов. С. ИФА
15 связывания HerPBK10 с HER2+ клетками (MDA-MB-435) в сыворотке крови, полученной у пяти пациентов с HER2+ и подобранных по возрасту контрольных пациентов (HER2-). Связывание контрольных образцов проводили в бычьей сыворотке, а их связывание с рецепторами подтверждали с помощью конкурентного ингибирования с использованием рекомбинантного лиганда - херегулина (+Her). N=3. *, p<0,05 по сравнению с контролем (-Her: в отсутствие конкурентного ингибитора).
- 20 [0020] На Фигуре 13 показаны результаты того, что HerPBK10 связывается с HER3 мыши. А. Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов I-II (а.к. 20-239, херегулин-связывающий домен) HER3 человека и мыши. Выделенные синим цветом остатки обозначают аминокислотные различия. В. Относительное содержание HER3, установленное с помощью ИФА (без permeabilизации), с использованием антитела к
25 HER3, которое дает перекрестную реакцию как с HER3 мыши, так и человека (1B2E; Cell Signaling Technologies). С. Связывание HerPBK10 с клетками рака молочной железы мыши 4T1. N=3. *, p<0,05 по сравнению с HerPBK10, взятым отдельно.

[0021] На Фигуре 14 представлен график, на котором показаны данные по токсическому действию HerMn на HER2+ и HER2- клетки опухоли человека.

- 30 [0022] На Фигуре 15 представлены снимки, на которых показан механизм цитотоксичности HerMn. А. Снимки, полученные с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа, на которых показано уменьшение мембранный потенциала митохондрий под воздействием HerMn в клетках MDA-MB-435. В. Снимки, полученные с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа, на которых показано опосредованное супероксид-анионом радикалом разрушение актиновых
35 филаментов (красный) и тубулина (зеленый) под воздействием HerMn.

- [0023] На Фигуре 16 показаны данные по взаимодействию S2Ga с TSPO. А-В. В ультраконцентратах оценивали содержание TSPO-связанного коррола путем измерения абсорбции и спектров флуоресценции. С-Д. Данные по взаимодействию HerGa с TSPO
40 *in situ*. Зеленый флуоресцентный краситель JC-1, использованный в С, флуоресцирует в красной области спектра при накоплении в митохондриях. Д - количественная оценка интенсивности флуоресценции в красной области спектра по снимкам С. *, p<0,05.

- [0024] На Фигуре 17 показано биораспределение у мышей с опухолями. Визуализация с помощью Xenogen и количественная оценка интенсивности флуоресценции меченых
45 Alexa680 HerMn, трастузумаба (Tz) и BSA (12 нмоль каждый) после инъекции в хвостовую вену. На графике показана средняя интенсивность флуоресценции -/+ SEM.

[0025] На Фигуре 18 показаны данные по терапевтической эффективности HerMn. А. Рост HER2+ MDA-MB-435 опухолей у самок безтимусных мышей, получавших

ежесуточно внутривенные (через хвостовую вену) инъекции HerMn или S2Mn (5 нмоль коррола/инъекция) один раз/сутки в течение 6 последующих суток. Контрольные группы получали физиологический раствор или HerPBK10 в эквивалентной концентрации по отношению к HerMn. Терапевтические воздействия начинали применять по достижению среднего объема опухоли - 200 мм³. Объемы опухоли измеряли до (1-е сутки), на протяжении (3-и сутки) и после (8-е, 15-е и 22-е сутки) инъекции веществ. N=8-10 опухолей/группа. *p<0,05 (однофакторный дисперсионный анализ). В. Жизнеспособность CDC человека при воздействии HerMn, S2Mn, HerPBK10 или доксорубицина (Dox) в течение 2 суток (сплошные линии) или 5 суток (пунктирные линии). N=3 на концентрацию из трех отдельных экспериментов.

[0026] На Фигуре 19 показано распределение в тканях HerPBK10 у мышей без опухолей.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

[0027] Для удобства ниже приведена подборка некоторых терминов, которые использованы в настоящем описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если иное не указано или не предполагается из контекста, следующие термины и выражения имеют значения, представленные ниже. Если иное не указано или явно не следует из контекста, термины и выражения, представленные ниже, не исключают значение, которым указанный термин или выражение наделены в данной области техники, к которой они относятся. Приведенные определения помогают в описании конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначены для ограничения объема охраны заявленного изобретения, поскольку он ограничивается исключительно формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что и значение, которое обычно известно специалисту в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

[0028] «Благоприятный исход» может включать, но не ограничиваясь этим, снижение или уменьшение степени тяжести заболевания, предотвращение усугубления заболевания, излечение заболевания, предотвращение развития заболевания, снижение риска развития заболевания у пациента и продление жизни или ожидаемой продолжительности жизни. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

[0029] «Злокачественная опухоль» и «злокачественный» относится к или служит для описания физиологического состояния млекопитающих, которое обычно характеризуется неконтролируемым ростом клеток. Примеры злокачественной опухоли, включают, но не ограничиваются ими, лейкозы, миеломы, В-клеточные лимфомы (лимфомы Ходжкина и/или неходжкинские лимфомы), злокачественные опухоли головного мозга, злокачественные опухоли молочной железы, злокачественные опухоли толстого кишечника, злокачественные опухоли легких, гепатоцеллюлярные карциномы, злокачественные опухоли почки, злокачественные опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественные опухоли поджелудочной железы, злокачественные опухоли шейки матки, злокачественные опухоли яичников, злокачественные опухоли печени, злокачественные опухоли мочевого пузыря, злокачественные опухоли мочевыводящих путей, злокачественные опухоли щитовидной железы, злокачественные опухоли почек, карциномы, меланомы, злокачественные опухоли головы и шеи, злокачественные опухоли головного мозга, злокачественные опухоли предстательной железы,

андрогензависимые злокачественные опухоли предстательной железы и андрогеннезависимые злокачественные опухоли предстательной железы.

[0030] Используемый в данном документе термин «химиотерапевтические препараты» или «химиотерапевтические средства» относится к препаратам, используемым для

- 5 лечения злокачественных опухолей, включая, но не ограничиваясь ими, Альбумин-связанный паклитаксел (наб-паклитаксел), Актиномицин, Алитретиноин, полностью транс-ретиноевую кислоту, Азацитидин, Азатиоприн, Бевацизумаб, Бексатотен, Блеомицин, Бортезомиб, Карбоплатин, Капецитабин, Цетуксимаб, Цисплатин, Хлорамбуцил, Циклофосфамид, Цитарбин, Даунорубицин, Доцетаксел, Доксифлуридин, 10 Доксорубицин, Эпирюбицин, Эпотилон, Эрлотиниб, Этопозид, Фторурацил, Гефитиниб, Гемцитабин, Гидроксимочевину, Идарубицин, Иматиниб, Ипилимумаб, Иринотекан, Хлорметин, Мелфалан, Меркаптопурин, Метотрексат, Митоксанtron, Окрелизумаб, Офатумумаб, Оксалиплатин, Паклитаксел, Панитумаб, Пеметрексед, Ритуксимаб, Тафлюпозид, Тенипозид, Тиогуанин, Топотекан, Третиноин, Валрубицин, Вемурафениб, 15 Винбластин, Винクリстин, Виндезин, Винорелбин, Вориностат, Ромидепсин, 5-Фторурацил (5-ФУ), 6-меркаптопурин (6-МП), Кладрибин, Клофарабин, Флоксуридин, Флударабин, Пентостатин, Митомицин, Иксабепилон, Эстрамустин или их комбинацию.

[0031] Термины «субъект» или «индивидуум», или «животное», или «пациент», или «млекопитающее» обозначают любого субъекта, в особенности субъекта-

- 20 млекопитающего, который нуждается в диагностике, прогнозе или лечении. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект имеет злокачественную опухоль. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект имел злокачественную опухоль в определенный период жизни. В различных вариантах реализации изобретения злокачественная опухоль субъекта находится на стадии ремиссии, является 25 рецидивирующей или нерецидивирующей.

[0032] Используемый в данном документе термин «млекопитающее» относится к любому представителю класса Mammalia, включая, но не ограничиваясь ими, людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, животных зоопарка, спортивных животных, домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики,

- 30 крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы; приматов, таких как высшие обезьяны, низшие обезьяны, орангутанги и шимпанзе; представителей семейств псовых, таких как собаки и волки; кошачьих, таких как кошки, львы и тигры; лошадиных, таких как лошади, ослы и зебры; мясомочных животных, таких как коровы, свиньи и овцы; копытных животных, таких как олень и жирафы; грызунов, таких как мыши, крысы, 35 хомяки и морские свинки; и т.д. В определенных вариантах реализации изобретения млекопитающее представляет собой субъекта-человека. Указанный термин не обозначает определенный возраст или пол. Таким образом, подразумевается, что взрослые и новорожденные субъекты, а также плоды либо мужского, либо женского рода, включены в объем этого термина.

- 40 [0033] Используемые в данном документе термины «лечение», «проведение лечения», «терапия» или «терапевтический» относятся как к терапевтическому воздействию, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение выраженности) развития патологического состояния, на которое направлено лечение, предотвращение патологического состояния,

- 45 достижение или получение благоприятного исхода или снижение риска развития заболевания у индивидуума, даже если лечение в конечном итоге является безрезультатным. К субъектам, нуждающимся в лечении, относятся фактически больные субъекты, а также субъекты с предрасположенностью к определенному заболеванию

или субъекты, у которых необходимо предотвратить развитие заболевания. Конкретная процедура или применение препаратов считаются терапевтически эффективными, даже если после применения препаратов субъект не чувствует себя лучше. Таким образом, любое улучшение состояния больного субъекта или любое замедление прогрессирования

- 5 заболевания считается терапевтически эффективным. Примеры лечения злокачественных опухолей включают, по не ограничиваются ими, активное наблюдение, осмотр, хирургическое вмешательство, химиотерапию, иммунотерапию, лучевую терапию (как, например, наружная дистанционная лучевая терапия, стереотаксическая радиохирургия (гамма-нож) и фракционная стереотаксическая лучевая терапия (FSR)), фокальную
- 10 терапию, системную терапию, вакцинотерапию, вирусную терапию, молекулярную таргетную терапию или их комбинации.

[0034] Используемый в данном документе термин «опухоль» относится ко всем типам роста и пролиферации неопластических клеток, как злокачественных, так и доброкачественных, и ко всем типам предраковых и раковых клеток и тканей.

- 15 [0035] Используемый в данном документе термин «терапевтические средства» относится к средствам, которые используются, например, для лечения, подавления, предотвращения, устранения последствий, снижения степени тяжести, снижения вероятности развития, замедления прогрессирования и/или излечения заболевания. Заболевания, которые являются мишениями терапевтических средств, включают, по не
- 20 ограничиваются ими, карциномы, саркомы, лимфомы, лейкозы, герминогенные опухоли, бластомы, антигены, экспрессированные па различных иммунных клетках, и антигены, экспрессированные на клетках, ассоциированных с различными заболеваниями кроветворной системы, аутоиммунными заболеваниями и/или воспалительными заболеваниями.

- 25 [0036] Под термином «около», используемым со значением в контексте настоящего раскрытия, подразумевается, что настоящее раскрытие охватывает приведенное значение $\pm 25\%$ или в качестве альтернативы приведенное значение $\pm 15\%$, или в качестве альтернативы приведенное значение $\pm 10\%$, или в качестве альтернативы приведенное значение $\pm 5\%$. Таким образом, например, под термином «около 50 аминокислот»
- 30 подразумевается $50 \pm 25\%$ аминокислот (т.е., в диапазоне 37-63 аминокислот) или в качестве альтернативы $50 \pm 15\%$ аминокислот (т.е., в диапазоне 42-58 аминокислот) или в качестве альтернативы $50 \pm 10\%$ аминокислот (т.е., в диапазоне 45-55 аминокислот) или в качестве альтернативы $50 \pm 5\%$ аминокислот (т.е., в диапазоне 47-53 аминокислот).

МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

- 35 [0037] В данном документе описаны молекулы для адресной доставки лекарственного средства. Молекула для адресной доставки лекарственного средства включает лиганд, который направленно связывается с молекулой клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз. Лицанд в составе молекулы для адресной доставки лекарственного
- 40 средства обеспечивает доставку молекулы в клетку-мишень, такую как злокачественная клетка. Домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, опосредует проникновение в цитозоль клетки-мишени. Домен, связывающий молекулярный груз, формирует комплекс с терапевтическим средством. Молекула для адресной доставки лекарственного средства в комплексе с терапевтической молекулой обеспечивает
- 45 доставку терапевтического средства в клетку-мишень, такую как злокачественная клетка. В различных вариантах реализации изобретения злокачественная клетка представляет собой любую одну или более клеток из лейкоза, миеломы, В-клеточных лимфом (лимфомы Ходжкина и/или неходжкинские лимфомы), злокачественной опухоли

головного мозга, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли толстого кишечника, злокачественной опухоли легких, гепатоцеллюлярной карциномы, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли

- 5 шейки матки, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли мочевыводящих путей, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли почек, карциномы, меланомы, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли предстательной железы,
- 10 андрогензависимой злокачественной опухоли предстательной железы и андрогеннезависимой злокачественной опухоли предстательной железы.

[0038] В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы для адресной доставки лекарственного средства, раскрытие в данном документе, формируют наночастицы, имеющие диаметр от около 5 нм до около 50 нм. В некоторых вариантах

- 15 реализации изобретения наночастицы имеют размер от около 10 до около 30 нм. Молекулярный груз, т.е., терапевтическое средство, затем связывается с наночастицей. В одном варианте реализации изобретения наночастица содержит коррол в комплексе с металлом, например, коррол в комплексе с марганцем (Mn), железом (Fe) или галлием (Ga). В других вариантах реализации изобретения наночастица содержит белок или
- 20 белковый фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения связывание терапевтического средства с наночастицей осуществляется посредством процесса, выбранного из группы, состоящей из электростатических взаимодействий, гидрофобных взаимодействий, гидрофильных взаимодействий, образования водородной связи и образования ковалентной связи. Как только комбинация наночастица-терапевтическое
- 25 средство попадает в клетку, разрушается связь между наночастицей и терапевтическим средством либо вследствие условий внутри клетки, которые обуславливают нарушение ассоциации наночастицы и терапевтического средства, либо из-за того, что ковалентная связь между этими двумя компонентами подвергается гидролизу ферментом.

[0039] В некоторых вариантах реализации изобретения молекула клеточной

- 30 поверхности представляет собой рецептор, который вовлечен в путь передачи сигнала, который приводит к уменьшению или угнетению апоптоза. Примеры молекул клеточной поверхности, с которыми может направленно связываться лиганд в составе молекулы для адресной доставки лекарственного средства, описанной в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, любую одну или более из 4-1BB, 5T4, антигена
- 35 аденоиномы, альфа-фетопротеина, BAFF, клетки В-клеточной лимфомы, антигена C242, CA-125, карбоангидразы 9 (CA-IX), c-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE). CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, экстра-домена В фибронектина, рецептора фолата 1, GD2, ганглиозида GD3,
- 40 гликопротеина 75, GPNMB, HER2/neu, фактора роста гепатоцитов (HGF), рецепторной киназы рассеивающего фактора человека, рецептора IGF-1, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, рецептора иисулипоподобного фактора роста I, интегрина α5β1, интегрина αvβ3, MORAb-009, MS4A1, MUC1, муцина CanAg, N-гликозилнейраминовой кислоты, NPC-1C, PDGF-R α, PDL192, фосфатидилсерина, клеток карциномы предстательной железы,
- 45 RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, тенасцина C, TGF-бета 2, TGF-β, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевого антигена CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, вимеитина или их комбинаций. Другие молекулы-мишени или частицы, специфические в отношении раковых клеток, известны специалисту в данной области

и могут быть использованы в связи с альтернативными вариантами реализации настоящего изобретения. В одном варианте реализации изобретения мишенью лигандя является с-MET па злокачественной клетке. В одном варианте реализации изобретения лиганд представляет собой HGF. В одном варианте реализации изобретения лиганд 5 представляет собой интерналин В или его фрагмент, или его вариант. В другом варианте реализации лиганд представляет собой бактериальный белок инвазина (Inv).

[0040] Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения лиганд представляет собой природную мишень или молекулу, которая может связываться с молекулой клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации изобретения 10 лиганд представляет собой белок, белковый фрагмент, полипептид или олигопептид. В других вариантах реализации изобретения лиганд представляет собой антитело или фрагмент антитела. В некоторых других вариантах реализации изобретения лиганд представляет собой малую органическую молекулу, которая связывается с молекулой клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации изобретения малая 15 органическая молекула имитирует структуру природной мишени для молекулы клеточной поверхности клетки-мишени и конкурентно связывается с молекулой клеточной поверхности клетки-мишени, тогда как в других вариантах реализации изобретения малая органическая молекула неконкурентно связывается с молекулой клеточной поверхности клетки-мишени.

20 [0041] В некоторых вариантах реализации изобретения домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, представляет собой белок, белковый фрагмент, нолипептид или олигопептид. В определенных вариантах реализации изобретения домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, представляет собой нолипептид, состоящий из около 3-35 аминокислот.

25 [0042] В одном варианте реализации изобретения домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, представляет собой белок, являющийся основанием пептона, или его фрагмент из аденоовириуса. Белок, являющийся основанием пептона, как правило, опосредует связывание аденоовириуса с клеткой, его попадание в клетку и проникновение в цитозоль (например, аденоовириуса серотипа 5) на протяжении 30 ранних стадий инфекции. Основание пептона может содержать RGD-мотив (Arg-Gly-Asp). Используемый в данном документе термин «РВ» относится к сегменту основания пептона.

[0043] В некоторых вариантах реализации изобретения домен, связывающий молекулярный груз, представляет собой белок, белковый фрагмент, полипептид или 35 олигопептид. В определенных вариантах реализации изобретения домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, представляет собой полипептид, состоящий из около 3-35 аминокислот.

[0044] В одном варианте реализации изобретения домен, связывающий молекулярный груз, представляет собой декализиновый мотив, также называемый «К10».

40 Декализиновый мотив содержит десять лизиновых остатков.

[0045] В некоторых вариантах реализации изобретения молекулярный груз, который связывается с доменом, связывающим молекулярный груз, представляет собой нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой 45 кислоты (дДНК), однокодонной дезоксирибонуклеиновой кислоты (одДНК), рибонуклеиновой кислоты (РНК), матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), транспортной рибонуклеиновой кислоты (тРНК), рибосомной рибонуклеиновой кислоты (рРНК), малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты (мИРНК), однокодонной

рибонуклеиновой кислоты (оцРНК) и олигонуклеотидов (либо одноцепочечных, либо двухцепочечных).

[0046] В определенных вариантах реализации изобретения связывание домена, связывающего молекулярный груз, с молекулярным грузом осуществляется посредством процесса, выбранного из группы, состоящей из электростатических взаимодействий, электрофильных взаимодействий, гидрофильных взаимодействий (ван-дер-Ваальсовы силы), водородной связи или ковалентной связи.

[0047] В различных вариантах реализации изобретения мишенью лиганда в составе молекулы для адресной доставки лекарственного средства является молекула клеточной поверхности на злокачественной клетке. В одном варианте реализации изобретения молекула клеточной поверхности представляет собой receptor на злокачественной клетке.

[0048] В одном варианте реализации изобретения в данном документе описана молекула для адресной доставки лекарственного средства, которая включает лиганд, который направленно связывается с молекулой клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз, причем лиганд представляет собой интериалин В (InlB) или его фрагмент, или его вариант, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, представляет собой белок, являющийся основанием пептона, или его

фрагмент, и домен, связывающий молекулярный груз, представляет собой декализиновый мотив. Мишенью интериалина В является белок клеточной поверхности с-Met. Природным лигандом с-MET является фактор роста гепатоцитов (HGF). HGF формирует тетramer и требует образования дисульфидной связи. Интериалин В, полученный из *Listeria monocytogenes*, также распознает и связывает с-MET, но не

подвергается тетрамеризации или не требует образования дисульфидной связи. Интериалин В может быть экспрессирован в виде слитого белка, а слитый белок также связывается с с-Met. InlB не конкурирует с HGF. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства, содержащая InlB, белок, являющийся основанием пептона, и декализиновый мотив, может

дополнительно содержать цитотокическое средство, такое как соединения коррола. Соединения коррола представляют собой норфириноподобные молекулы. Эти соединения могут формировать хелатные комплексы с целым рядом разных металлов (таких как железо, галлий, марганец и т.д.), нековалентно связывать белки-носители, являются цитотокическими и не могут проникать в клетки без белков-носителей.

[0049] В других вариантах реализации изобретения мишенью лиганда является молекула клеточной поверхности CD4 или, в качестве альтернативы, CD19 или CD20. В дополнительных вариантах реализации изобретения мишенью лиганда является один из рецепторов эпидермального фактора роста (HER), например, HER2 или HER3. В другом варианте реализации мишенью лиганда является интегрин.

[0050] В различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства дополнительно содержит терапевтическое средство. Терапевтическое средство формирует комплекс с доменом, связывающим молекулярный груз. В различных вариантах реализации изобретения терапевтические средства включают, но не ограничиваются ими, алкилирующие средства, антиметаболиты,

противоопухолевые антибиотики, ингибиторы митоза, кортикостероиды, цитотокические средства или их комбинации. Комплекс между терапевтическим средством и доменом, связывающим молекулярный груз, может быть ковалентным или нековалентным. В некоторых вариантах реализации изобретения нековалентные

комплексы могут формироваться посредством любого одного или более из ван-дер-Ваальсовых сил, образования водородной связи, электростатических взаимодействий, гидрофобных/гидрофильтных взаимодействий. В некоторых вариантах реализации изобретения взаимодействия между терапевтическим средством и доменом,

- 5 связывающим молекулярный груз, может быть опосредовано линкером. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическое средство представляет собой соединение на основе доксорубицина или коррола.

[0051] Кроме того, в данном документе описаны способы лечения злокачественной опухоли у субъекта, который в этом нуждается. Указанные способы включают

- 10 идентификацию субъекта, который нуждается в лечении, и обеспечение композиции, содержащей молекулу для адресной доставки лекарственного средства, а также введение субъекту эффективного количества композиции для лечения злокачественной опухоли. В различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства включает лиганд, мишенью которого является рецептор на
15 клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз, и дополнительно содержит терапевтическое средство, которое описано в данном документе.

[0052] Кроме того, в данном документе описаны способы подавления прогрессирования злокачественной опухоли у субъекта, который в этом нуждается.

- 20 Указанные способы включают идентификацию субъекта, который нуждается в лечении, и обеспечение композиции, содержащей молекулу для адресной доставки лекарственного средства, а также введение субъекту эффективного количества композиции для подавления прогрессирования рака. В различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства включает лиганд, мишенью
25 которого является рецептор на клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз, и дополнительно содержит терапевтическое средство, которое описано в данном документе.

[0053] Кроме того, в данном документе описаны способы предотвращения

- 30 метастазирования злокачественной опухоли у субъекта, который в этом нуждается. Указанные способы включают идентификацию субъекта, который нуждается в предотвращении метастазирования, и обеспечение композиции, содержащей молекулу для адресной доставки лекарственного средства, а также введение субъекту эффективного количества композиции для предотвращения метастазирования рака. В
35 различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства включает лиганд, мишенью которого является рецептор на клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз, и дополнительно содержит терапевтическое средство, которое описано в данном документе.

- 40 [0054] В данном документе также предложены способы лечения, подавления или предотвращения метастазирования злокачественных опухолей, устойчивых к лекарственным препаратам (например, злокачественная опухоль, устойчивая к ингибитору тирозинкиназы EGFR). Указанные способы включают идентификацию субъекта, который нуждается в лечении, и обеспечение композиции, содержащей
45 молекулу для адресной доставки лекарственного средства, а также введение субъекту эффективного количества композиции для лечения, подавления или предотвращения метастазирования злокачественных опухолей, устойчивых к лекарственным препаратам. В различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки

лекарственного средства включает лиганд, мишенью которого является рецептор на клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз, и дополнительно содержит терапевтическое средство, которое описано в данном документе. В одном варианте реализации изобретения злокачественные опухоли, устойчивые к лекарственным препаратам, характеризуются избыточной экспрессией рецептора, выбранного из группы, состоящей из с-MET, HER2, CD4 и CD20.

[0055] В данном документе также предложены способы доставки терапевтического соединения в головной мозг. Указанные способы включают идентификацию субъекта, который нуждается в такой доставке, и обеспечение композиции, содержащей молекулу для адресной доставки лекарственного средства, а также введение субъекту эффективного количества композиции. В различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства включает лиганд, мишенью которого является рецептор на клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз, и дополнительно содержит терапевтическое средство, которое описано в данном документе. Композиции, описанные в данном документе, на удивление проникают через гематоэнцефалический барьер и обеспечивают доставку молекулярного груза в клетки головного мозга. Таким образом, эти композиции однозначно подходят для лечения злокачественных опухолей, например, метастатических злокачественных опухолей в головном мозге.

[0056] В различных аспектах терапевтических способов, описанных в данном документе, молекула для адресной доставки лекарственного средства в составе композиции включает лиганд, мишенью которого является рецептор на клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз, причем лиганд представляет собой интериалин B (InlB) или его фрагмент, или его вариант, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, представляет собой белок, являющийся основанием пептона, или его фрагмент, и домен, связывающий молекулярный груз, представляет собой декализиновый мотив. Молекула для адресной доставки лекарственного средства дополнительно содержит терапевтическое средство, такое как соединения на основе доксорубицина или коррола.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

[0057] Другой аспект настоящего изобретения относится к лечению злокачественной опухоли (например, лейкоза, миеломы, В-клеточных лимфом (лимфомы Ходжкина и/или неходжкинские лимфомы), злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли толстого кишечника, злокачественной опухоли легких, гепатоцеллюлярной карциномы, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли мочевыводящих путей, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли почек, карциномы, меланомы, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли предстательной железы, андрогензависимой злокачественной опухоли предстательной железы и андрогеннезависимой злокачественной опухоли предстательной железы) путем введения эффективного количества композиции, которая включает молекулы для адресной

доставки лекарственного средства, формирующие комплексы с терапевтическими средствами, которые описаны в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическое средство может представлять собой любой химиотерапевтический препарат, который применим для лечения определенного типа злокачественных опухолей. Терапевтическое средство может представлять собой органическую молекулу, биологическую молекулу (например, пептид или нуклеиновую кислоту) или их комбинацию. В различных вариантах реализации изобретения терапевтические средства включают, по не ограничиваются ими, алкилирующие средства, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, ингибиторы митоза, кортикостероиды, цитотоксические средства или их комбинации. В одном варианте реализации изобретения терапевтическое средство представляет собой соединение на основе коррола. В одном варианте реализации изобретения терапевтическое средство представляет собой молекулу миРНК.

[0058] В некоторых вариантах реализации изобретения композиция, содержащая

эффективное количество молекулы для адресной доставки лекарственного средства, формирующей комплекс с терапевтическим средством, вводят с одним или более химиотерапевтических средств, таких как те, что изложены в данном документе. Эффективные количества композиции и химиотерапевтического средства могут вводить последовательно или одновременно.

[0059] В некоторых вариантах реализации изобретения введение является системным. В некоторых вариантах реализации изобретения введение является местным. Специалистам в данной области известны различные способы введения композиции субъектам. В некоторых аспектах всех вариантов реализации настоящего изобретения композиции вводят посредством способов, включающих введение в ткани глаза, пероральное, парентеральное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальные, введение в дыхательные пути (аэрозольное), ингаляционное, нанесение на кожу, местное введение или введение путем инъекции.

[0060] Дополнительные терапевтические воздействия, которые могут быть использованы с композициями, содержащими эффективное количество молекулы для адресной доставки лекарственного средства, формирующей комплекс с терапевтическим средством, для лечения злокачественной опухоли включают, но не ограничиваются ими, оперативное вмешательство, облучение, иммунотерапию, вакцинацию или их комбинации. Дополнительные терапевтические воздействия могут применяться последовательно или одновременно с терапевтическими воздействиями, включающими введение эффективного количества композиции, содержащей эффективное количество молекулы для адресной доставки лекарственного средства, формирующей комплекс с терапевтическим средством, для лечения злокачественной опухоли (например, меланомы или карциномы яичников).

[0061] В некоторых вариантах реализации изобретения химиотерапевтические средства могут быть выбраны из любого одного или более средств из цитотоксических антибиотиков, антиметаболитов, антимитотических средств, алкилирующих средств, соединений мышьяка, ингибиторов ДНК-токоизомеразы, таксанов, нуклеозидных аналогов, растительных алкалоидов и токсинов; и их синтетических производных. Иллюстративные соединения включают, по не ограничиваются ими, алкилирующие средства: треосульфан и трофосфамид; растительные алкалоиды: винblastин, паклитаксел, доцетаксол; ингибиторы ДНК-токоизомеразы: доксорубицин, эпирюбицин, этопозид, камптотецин, топотскан, иринотекан, тенипозид, криснатол и митомицин; антифолаты: метотрексат, миофеноловая кислота и гидроксимочевина; аналоги

пириимицина: 5-фторурацил, доксифлуридин и цитозин-арабинозид; аналоги пурина: меркаптопурин и тиогуанин; антиметаболиты, блокирующие синтез ДНК: 2'-дезокси-5-фторуридин, глицинат афидиколина и пиразолоимидазол; и антимитотические средства: галихондрин, колхицин и ризоксин. Также могут быть использованы композиции,

- 5 содержащие одно или более химиотерапевтических средств (например, FLAG, CHOP). FLAG содержит флударабин, цитозин-арабинозид (Ara-C) и G-CSF. CHOP содержит циклофосфамид, винкристин, доксорубицин и преднизон. В других вариантах реализации изобретения используются ингибиторы PARP (например, PARP-1 и/или PARP-2), и такие ингибиторы хорошо известны в данной области (например, Олапарив, ABT-888, BSI-
10 201, BGP-15 (N-Gene Research Laboratories, Inc.); INO-1001 (Inotek Pharmaceuticals Inc.); PJ34 (Soriano et al., 2001; Pacher et al., 2002b); 3-аминобензамид (Trevigen); 4-амино-1,8-нафталимид; (Trevigen); 6(5H)-фенантридинон (Trevigen); бензамид (патент США №36397); и NU1025 (Bowman et al).

[0062] Как описано в данном документе, в различных вариантах реализации

- 15 изобретения терапевтические воздействия включают, например, лучевую терапию. Излучение, используемое в лучевой терапии, может представлять собой ионизирующее излучение. Для лечения лучевой терапией излучение может быть гамма-излучением, рентгеновским излучением или протонным пучком. Примеры лучевой терапии включают, по не ограничиваются ими, внешнюю дистанционную лучевую терапию,
20 интерстициальную имплантацию радиоактивных изотопов (I-125, палладия, иридия), радиоактивные изотопы, такие как строний-89, торакальную лучевую терапию, внутрибрюшинную лучевую терапию Р-32 и/или общую абдоминальную и тазовую лучевую терапию. Для общего ознакомления с лучевой терапией см. Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita et al., eds.,
25 J.B. Lippencott Company, Philadelphia. Лучевая терапия может применяться в виде внешней дистанционной лучевой терапии или телетерапии, при которой излучение направлено из дистанционного источника. Также лучевая терапия может применяться в виде внутренней терапии или брахитерапии, при которой радиоактивный источник помещают в теле вблизи злокачественных клеток или массы опухоли. Также охватывается
30 применение фотодинамической терапии, включающей применение фотосенсибилизаторов, таких как гематопорфирин и его производные, Вертопорфин (BPD-MA), фталоцианин, фотосенсибилизатор Рс4, деметоксигипокреллин А; и 2ВА-2-DMHA.

[0063] Как описано в данном документе, в различных вариантах реализации

- 35 изобретения терапевтические воздействия включают, например, иммунотерапию. Иммунотерапия может включать, например, применение противораковых вакцин и/или сенсибилизированных антиген-презентирующих клеток. Иммунотерапия может включать пассивный иммунитет для кратковременной защиты хозяина, достигаемой за счет введения преформированного антитела, направленного против ракового
40 антигена или антигена, ассоциированного определенным заболеванием (например, введение моноклонального антитела, необязательно связанного с химиотерапевтическим средством или токсином, к опухолевому антигену). Иммунотерапия также может быть направлена на использование распознаваемых цитотоксическими лимфоцитами эпитопов линий злокачественных клеток.

- 45 [0064] Как описано в данном документе, в различных вариантах реализации изобретения, терапевтические воздействия включают, например, гормональную терапию. Препараты гормональной терапии могут включать, например, агонисты гормонов, антагонисты гормонов (например, флутамид, бикалутамид, тамоксифен, ралоксифен,

лейпролид ацетат (LUPRON), антагонисты LH-RH), ингибиторы биосинтеза и процессинга гормонов и стероиды (например, дексаметазон, ретиноиды, дельтоиды, бетаметазон, кортизол, кортизон, преднизон, дегидротестостерон, глюокортикоиды, минералокортикоиды, эстроген, тестостерон, прогестины), производные витамина А (например, полностью транс-ретиноевая кислота (ATRA)); аналоги витамина D3; антигестагены (например, мифепристон, онапристон) или антиандрогены (например, ципротерона ацетат).

[0065] Длительность приема и/или дозировка противораковых терапевтических препаратов может варьироваться в зависимости от конкретного противоракового средства или их комбинаций. Соответствующая длительность приема конкретного противоракового терапевтического средства определяется специалистом в данной области. В настоящем изобретении проводится анализ оптимальных схем приема отдельных противораковых средств в течение продолжительного времени, при котором генетическая сигнатура злокачественной опухоли, определяемая способами по настоящему изобретению, является одним из факторов определения оптимальной дозировки и схем приема препарата.

[0066] В различных вариантах реализации изобретения субъект, для которого определяют прогнозируемую эффективность противораковой терапии, представляет собой млекопитающего (например, мышь, крыса, примат, млекопитающее, отличное от человека, домашнее животное, такое как собака, кошка, корова, лошадь), и предпочтительно представляет собой человека. В другом варианте реализации изобретения способов по настоящему изобретению субъект не подвергался химиотерапии или лучевой терапии. В альтернативном варианте реализации изобретения субъект подвергался химиотерапии или лучевой терапии (например, такой как цисплатином, карбоплатином и/или таксаном). В родственных вариантах реализации изобретения дозы воздействия облучения или хемотоксических средств на субъект не превышали обычных или средних доз воздействия па субъекты данного вида. В определенных вариантах реализации изобретения субъект подвергался оперативному вмешательству для удаления раковой или предраковой ткани. В других вариантах реализации изобретения раковая ткань не удаляется, например, раковая ткань может быть локализована в неоперабельном участке тела, как, например, в ткани, которая имеет существенное значение для жизнедеятельности организма, или в участке, оперативное вмешательство в который несет значительный риск причинения вреда пациенту, или, например, если субъект получает противораковую терапию перед удалением раковой ткани.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[0067] В различных вариантах реализации изобретения в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, включающие фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество наряду с терапевтически эффективным количеством молекулы для адресной доставки лекарственного средства, описанной в данном документе, для лечения злокачественной опухоли (например, лейкоза, миеломы, В-клеточных лимфом (лимфомы Ходжкина и/или неходжкинские лимфомы), злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли толстого кишечника, злокачественной опухоли легких, гепатоцеллюлярной карциномы, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли мочевого пузыря,

злокачественной опухоли мочевыводящих путей, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли почек, карциномы, меланомы, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли предстательной железы, андрогензависимой злокачественной опухоли

- 5 предстательной железы и андрогеннезависимой злокачественной опухоли предстательной железы). В различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства включает лиганд, мишенью которого является рецептор на клеточной поверхности, домен, обеспечивающий проникновение через клеточную мембрану, и домен, связывающий молекулярный груз. Молекула для
- 10 адресной доставки лекарственного средства дополнительно содержит терапевтическое средство, которое формирует комплексы с молекулой для адресной доставки лекарственного средства, которая описана в данном документе. В различных вариантах реализации изобретения молекула для адресной доставки лекарственного средства обеспечивает доставку терапевтического средства в злокачественную клетку-мишень.

- 15 [0068] «Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» означает вспомогательное вещество, которое можно использовать в приготовлении фармацевтической композиции, которое, в целом, является безопасным, нетоксичным, и необходимым, и включает вспомогательные вещества, которые приемлемы для использования в ветеринарии, а также фармацевтике. Такие вспомогательные вещества
- 20 могут быть твердыми, жидкими, полужидкими или, в случае аэрозольных композиций, газообразными.

- [0069] В различных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены для доставки посредством любого способа введения. «Путь введения» может относиться к любому пути введения, известному в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, аэрозольный, назальный, пероральный, трансмукозальный, трансдермальный, парентеральный или энтеральный. «Парентеральный» относится к пути введения, который обычно ассоциирован с инъекцией, включая внутриглазничную, внутриглазную, инфузию, внутриартериальную, внутрикапсульную, внутрисердечную, внутрикожную,
- 30 внутримышечную, внутрибрюшинную, внутрилегочную, внутрипозвоночную, внутригрудинную, внутриоболочечную, внутриматочную, внутривенную, субарахноидальную, подкапсультную, подкожную, трансмукозальную или транстрахеальную. В случае применения посредством парентерального пути композиции могут быть представлены в форме растворов или сусpenзий для инфузии или для
- 35 инъекции или в виде лиофилизованных порошков. В случае применения посредством парентерального пути композиции могут быть представлены в форме растворов или сусpenзий для инфузии или для инъекции. В случае применения посредством энтерального пути фармацевтические композиции могут быть представлены в форме таблеток, желатиновых капсул, таблеток, покрытых сахарной оболочкой, сиропов,
- 40 сусpenзий, растворов, порошков, гранул, эмульсий, микросфер или паносфер, или липидных везикул, или полимерных везикул, обеспечивающих контролируемое высвобождение. Как правило, композиции вводят путем инъекции, либо внутривенно, либо внутрибрюшинно. Способы таких видов введения известны специалистам в данной области.

- 45 [0070] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать любой фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к фармацевтически приемлемому материалу, композиции или растворителю, который

вовлечен в перенос или транспорт представляющего интерес соединения из одной ткани, органа или участка тела в другую ткань, орган или участок тела. Например, носитель может представлять собой жидкость или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или материал для инкапсулирования или их комбинацию. Каждый компонент носителя должен быть «фармацевтически приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами лекарственной формы. Он также должен быть подходящим для использования в контакте с любыми тканями или органами, с которыми он может контактировать, то есть он не должен нести риска токсичности, раздражения, аллергического ответа, иммуногенности или любого другого осложнения, которое чрезмерно превышает его терапевтическую пользу.

[0071] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут быть инкапсулированы, таблетированы или приготовлены в виде эмульсии или сиропа для перорального введения. Могут быть добавлены фармацевтически приемлемые твердые или жидкие носители, чтобы усилить или стабилизировать композицию, или облегчить приготовление композиции. Жидкие носители включают сироп, арахисовое масло, оливковое масло, глицерин, физиологический раствор, спирты и воду. Твердые носители включают крахмал, лактозу, сульфат кальция, дигидрат, гипс, стеарат магния или стеариновую кислоту, тальк, пектин, гуммиарабик, агар или желатин. Носитель может также включать материал с замедленным высвобождением, такой, как моностеарат глицерина или дистеарат глицерина, отдельно или вместе с воском.

[0072] Фармацевтические препараты получают, следуя общепринятым методикам фармации, включающим измельчение, смешивание, гранулирование и при необходимости прессование в случае таблеточных форм; или измельчение, смешивание и наполнение в случае форм в виде твердых желатиновых капсул. Если используют жидкий носитель, препарат будет в форме сиропа, эликсира, эмульсии или водной либо неводной суспензии. Такая жидккая лекарственная форма может быть введена непосредственно перорально или заключенной в мягкую желатиновую капсулу.

[0073] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть доставлены в терапевтически эффективном количестве. Точное терапевтически эффективное количество - это количество композиции, которое будет обеспечивать достижение наиболее эффективных результатов в отношении эффективности лечения конкретного субъекта. Это количество будет изменяться в зависимости от различных факторов, включая, но не ограничиваясь ими, характеристики терапевтического соединения (включая активность, фармакокинетику, фармакодинамику и биодоступность), физиологическое состояние субъекта (включая возраст, пол, тип и стадию заболевания, общее состояние здоровья, ответ на конкретную дозировку и тип лекарственного средства), природу фармацевтически приемлемого носителя или носителей в составе лекарственной формы и способ введения. Специалист в области клинических дисциплин и фармакологии сможет определить терапевтически эффективное количество посредством стандартных экспериментов, например, посредством наблюдения за ответом субъекта на введение соединения и соответствующего подбора дозировки. Для получения дополнительных сведений см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000).

[0074] До введения пациентам к действующим веществам могут быть добавлены формообразователи. Предпочтительным может быть использование жидкой лекарственной формы. Например, эти формообразователи могут включать масла, полимеры, витамины, углеводы, аминокислоты, соли, буферы, альбумин, поверхностно-активные вещества, объемообразующие средства или их комбинации.

[0075] Углеводные формообразователи включают сахара и многоатомные сахарные спирты, например, моно-, ди- или полисахариды, или водорастворимые гликаны. Сахариды или гликаны могут включать фруктозу, декстрозу, лактозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, сахарозу, декстран, пуллулан, декстрин, альфа- и бета-

- 5 циклодекстрин, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и карбоксиметилцеллюзу или их смеси. Термин «сахарный спирт» определяется как C4-C8 углеводород, имеющий --ОН группу, и включает галактит, инозит, маннит, ксилит, сорбит, глицерин и арабит. Указанные выше сахара или сахарные спирты могут быть использованы отдельно или в комбинации. Нет установленного предела в отношении используемого количества,
- 10 при условии, что сахар или сахарный спирт растворяется в водном препарате. В одном варианте реализации концентрация сахара или сахарного спирта находится в пределах от 1,0% до 7% мас./об., более предпочтительно от 2,0% до 6,0% мас./об.

[0076] Аминокислотные формообразователи включают левовращающие (L-) формы карнитина, аргинина и бетаина. Однако можно добавлять и другие аминокислоты.

- 15 [0077] В некоторых вариантах реализации изобретения в качестве формообразователей использованы полимеры, которые включают поливинилпирролидон (ПВП) со средней молекулярной массой 2000-3000 или полиэтиленгликоль (ПЭГ) со средней молекулярной массой 3000-5000.

- 20 [0078] В состав композиции также предпочтительно включить буфер для минимизации изменений pH в растворе перед лиофилизацией или после восстановления. Может быть использовано большинство любых физиологических буферов, включая, но не ограничиваясь ими, нитратный, фосфатный, сукцинатный и глутаматный буферы или их смеси. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация составляет от 0,01 до 0,3 моль/л. Поверхностно-активные вещества, которые могут быть добавлены
- 25 в лекарственную форму, приведены в европейских патентах №.270799 и 268110.

- 30 [0079] В дополнение к этому, композиции могут быть химически модифицированы, например, путем ковалентного связывания с полимером в целях увеличения их времени полужизни в кровотоке. Предпочтительные полимеры и способы их присоединения к пептидам описаны в патентах США №№4766106; 4179337; 4495285 и 4609546, которые во всей своей полноте включены в данный документ посредством ссылки.

- 35 Предпочтительными полимерами являются полиоксиэтилированные полиолы и полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ является растворимым в воде при комнатной температуре в некоторых вариантах реализации изобретения и имеет среднюю молекулярную массу от 1000 до 40000, от 2000 до 20000, или от 3000 до 12000. В некоторых вариантах реализации изобретения ПЭГ предпочтительно имеет по меньшей мере одну гидроксильную группу, а более предпочтительно концевую гидроксильную группу. Такая гидроксильная группа может быть активирована таким образом, чтобы она реагировала со свободной аминогруппой на ингибиторе. Однако следует отметить, что для ковалентного связывания ПЭГ с антителом по настоящему изобретению тип
- 40 и количество таких реакционноспособных групп могут варьироваться.

- 45 [0080] Водорастворимые полиоксиэтилированные полиолы также могут быть использованы в настоящем изобретении. Они включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (ПОГ) и тому подобное. Предпочтительно использовать ПОГ. Одна из причин его применения заключается в том, что глицериновый остаток полиоксиэтилированного глицерина аналогичен остатку, который встречается в природных моно-, ди- и триглицеридах животных и человека. Поэтому молекула с такой разветвленной структурой необязательно будет расценена как чужеродная в организме. Молекулярная масса ПОГ

находится в том же диапазоне, что и ПЭГ. Структура ПОГ представлена в публикации Knauf et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:15064-15070, а коньюгаты POG/IL C 2 рассмотрены в патенте США №4766106, причем оба источника в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

- 5 [0081] После приготовления жидкой фармацевтической композиции она может быть лиофилизирована для предотвращения деградации и для сохранения стерильности. Способы лиофилизации жидких композиций известны специалистам в данной области. Непосредственно перед использованием композиция может быть восстановлена стерильным разбавителем (например, раствором Рингера, дистиллированной водой 10 или стерильным физиологическим раствором), который может содержать дополнительные ингредиенты. После восстановления указанную композицию предпочтительно вводят субъектам с использованием способов, которые известны специалистам в данной области.

- [0082] Дозировка и способ введения будет зависеть от конкретного индивидуума.
 15 Обычно композиции вводят таким образом, что доза антител составляет от 1 мкг/кг до 20 мкг/кг, от 20 мкг/кг до 10 мг/кг, от 1 мг/кг до 7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения препарат вводится в виде болюсной дозы для увеличения уровней циркулирующих антител в крови в 10-20 раз и в течение 4-6 часов после болюсной дозы. После болюсной дозы также может быть использована непрерывная 20 инфузия. В таком случае антитела могут быть введены путем инфузии в дозе от 5 мкг/кг/минута до 20 мкг/кг/минута или от 7 мкг/кг/ минута до 15 мкг/кг/ минута.

НАБОРЫ

- [0083] В настоящем изобретении также предложен набор для лечения, подавления и/или предотвращения метастазирования злокачественной опухоли у субъекта, который 25 в этом нуждается. Указанный набор содержит композицию, содержащую молекулу для адресной доставки лекарственного средства, формирующую комплекс с терапевтическим средством, которое описано в данном документе, и инструкции к применению композиции для лечения, подавления и/или предотвращения метастазирования злокачественной опухоли у субъектов, которые в этом нуждаются.

- 30 [0084] Набор представляет собой комплект материалов или компонентов, включающий по меньшей мере одну из композиций по настоящему изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения набор содержит, композицию, содержащую молекулу для адресной доставки лекарственного средства, формирующую комплекс с терапевтическим средством, которое описано выше.

- 35 [0085] Точный состав компонентов, включенных в набор по настоящему изобретению, зависит от цели его предполагаемого применения. В одном варианте реализации изобретения указанный набор составлен конкретно для людей. В дополнительных вариантах реализации изобретения указанный набор составлен для применения в ветеринарии, лечения субъектов, таких как, но не ограничиваясь ими,

- 40 сельскохозяйственные животные, домашние животные и лабораторные животные.

- [0086] В указанный набор могут быть включены инструкции к применению. В «инструкции к применению», как правило, содержится доступная информация с описанием метода, который необходимо использовать с целью достижения желательных результатов при использовании компонентов указанного набора, как, например, для 45 лечения, уменьшения тяжести, подавления или предотвращения нейтропении у субъекта. В указанном наборе необязательно также могут содержаться другие полезные компоненты, такие как дозаторы, растворители, буферы, фармацевтически приемлемые носители, шприцы или другие полезные принадлежности, хорошо знакомые

специалистам в данной области.

[0087] Материалы или компоненты, собранные в указанном наборе, могут поставляться практикующему врачу после хранения любыми удобными и подходящими способами, которые сохраняют их функциональные и полезные свойства. Например, 5 компоненты могут находиться в растворенной, дегидратированной или лиофилизованной форме; они могут поставляться при комнатной температуре, в охлажденном или замороженном виде. Компоненты, как правило, содержатся в подходящем(-их) упаковочном(-ых) материале(-ах). Используемое в данном документе выражение «упаковочный материал» относится к одной или более физических оболочек, 10 используемых для размещения содержимого указанного набора, как, например, композиций по настоящему изобретению и тому подобного. Упаковочный материал получают хорошо известными способами, которые предпочтительно обеспечивают стерильные условия хранения и предотвращение загрязнения. Используемый в данном документе термин «упаковка» относится к подходящему твердому каркасу или 15 материалу, такому как стекло, пластмасса, бумага, фольга и тому подобное, пригодному для хранения отдельных компонентов набора. Таким образом, упаковка, например, может представлять собой флакон, используемый для помещения подходящего количества композиции по настоящему изобретению, содержащей каталитически активное антитело, обладающее сиалидазной активностью, полученное способами, 20 описанными в данном документе. На упаковочном материале обычно содержится внешняя этикетка, па которой указано содержимое и/или цель применения указанного набора и/или его компонентов.

ПРИМЕРЫ

[0088] Следующие примеры приведены для более обширной иллюстрации заявленного 25 изобретения и не должны толковаться, как ограничивающие объем настоящего изобретения. Что касается упоминания конкретных материалов, это осуществляется всего лишь в целях иллюстрации, а не ограничения объема охраны настоящего изобретения. Специалист в данной области сможет разработать эквивалентные способы или реагенты без приложения изобретательских усилий и не отклоняясь от объема 30 настоящего изобретения.

Пример 1: Доставка одноцепочечного олигонуклеотида и синтетической мРНК

[0089] Доставка синтетической мРНК является усовершенствованной альтернативой доставки генов. Векторы, обеспечивающие доставку генов, должны проникнуть в ядро, чтобы обеспечить экспрессию генов, тогда как мРНК требует только доставки в 35 цитоплазму для трансляции белковых продуктов. Такой подход используется для экспрессии, например, так называемых факторов Яманака для индукции плюрипотентности в соматических клетках. Тогда как обычная «липофекция» может быть использована для доставки мРНК *in vitro*, эта и подобные системы не эффективны *in vivo*.

40 [0090] Была доказана эффективность раскрытоого белка, обеспечивающего направленное проникновение в клетку, HerPBK10, в отношении доставки нуклеиновой кислоты и лекарственных веществ *in vivo*. Также был разработан родственный белок, PBK10, для доставки генов и лекарственных веществ. HerPBK10 способствует направленному связыванию и проникновению в клетки посредством взаимодействия 45 с рецептором эпидермального фактора роста человека (HER3), а PBK10 осуществляет это посредством взаимодействия с интегрином.

[0091] Ниже продемонстрирована целесообразность применения HerPBK10 и PBK10 для доставки одноцепочечного олигонуклеотида и синтетической мРНК.

[0092] HerPBK10 обеспечивает транспорт меченого олигонуклеотида в клетки MDA-MB-435. Для того чтобы определить, может ли HerPBK10 опосредовать доставку одноцепочечного олигонуклеотида, Су3-меченный олигонуклеотид (50 пкмоль) инкубировали с HerPBK10 (5 мкг) или Липофектамином 2000 (Invitrogen, Карлсбад,

5 Калифорния, США), коммерчески доступным реагентом для трансфекции в качестве сравнительного контроля, в 0,1 М HEPES/Optimem I (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США) в течение 20 минут при КТ. Полученную в результате смесь добавляли к клеткам MDA-MB-435, которые экспрессируют HER, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

Клетки фиксировали в 4% PFA в течение 15' при КТ и обрабатывали для

10 иммунофлюоресцентного окрашивания антителами против HerPBK10. Для идентификации ядер использовали контрастное окрашивание клеток DAPI. Изображения получали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica SP2. Поглощение, опосредованное липофектамином, приводило к локализации олигонуклеотида внутри клеток, как и ожидалось (Фиг. 1A). Важно отметить, что

15 наблюдалась колокализация HerPBK10 с олигонуклеотидом на протяжении связывания и поглощения комплексов HerPBK10-олиго (Фиг. 1B), что указывает на то, что HerPBK10 опосредует транспорт указанного олигонуклеотида в клетки.

[0093] PBK10 опосредует доставку мРНК. Синтетическая мРНК размером 1 т.п.н., кодирующая GFP (Фиг. 2А), была использована для изучения способности PBK10 20 опосредовать доставку в клетки для экспрессии белка. Экспрессию GFP после трансфекции клеток мРНК с помощью липофектина сравнивали с экспрессией GFP после трансфекции клеток GFP-экспрессирующей плазмидой с помощью липофектина. При трансфекции мРНК с помощью липофектина GFP был экспрессирован в клетках HeLa на уровне, который можно было обнаружить с помощью флуоресцентной 25 микроскопии (Фиг. 2В). PBK10 и синтетическую мРНК, кодирующую GFP, смешивали в весовом соотношении PBK10 : мРНК 20:1 в течение ~20 минут при КТ в HEPES-забуференном физиологическом растворе (HBS) и затем добавляли к адгезивным клеткам HeLa с ~50-70% конфлюентностью. Таким образом, PBK10 формировал 30 комплексы с мРНК, подобные комплексам, обеспечивающим доставку генов, для доставки которых PBK10 был ранее разработан (Фиг. 2С).

[0094] Способность PBK10 опосредовать доставку сначала изучали путем оценки связывания комплексов, образованных между PBK10 и мРНК, с клетками. Комpleксы PBK10-мРНК инкубировали с клетками HeLa на льду для обеспечения связывания с рецепторами, но не для интернализации, затем клетки промывали для удаления 35 свободных (несвязанных) комплексов и анализировали с помощью ИФА для идентификации комплексов, связанных с клеточной поверхностью, с использованием первичного антитела против PBK10. Детекция связывания с клеточной поверхностью на основе ИФА показала, что комплексы (PBK10 + мРНК) связываются с клетками (Фиг. 2D). Клетки также обрабатывали для иммунофлюоресцентного окрашивания 40 антителами против PBK10 отдельно после инкубации PBK10 (без мРНК) с клетками. Для подтверждения поглощения связанных с клеткой комплексов (Е) клетки инкубировали с комплексами на льду, как было ранее описано, промывали, затем подогревали при 37°C для обеспечения интернализации. Клетки фиксировали через 45 указанные интервалы времени после подогрева и обрабатывали для иммунофлюоресцентного окрашивания антителами против PBK10 (зеленый). Для идентификации актина (красный) и ядер (синий), соответственно использовали контрастное окрашивание клеток родамин-фаллоидином и DAPI. Изображения получали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica SPE.

Результаты показывают, что комплексы подвергались интернализации в клетки HeLa в зависимости от времен (Фиг. 2Е). Отдельную группу клеток HeLa фиксировали и обрабатывали для иммунофлюоресцентного окрашивания антителами против GFP через ~24 ч после инкубации клеток с комплексами PBK10-мРНК. Результаты

- 5 показывают, что экспрессия GFP поддавалась обнаружению после PBK10-опосредованной доставки мРНК, хотя и с низкой частотой (небольшое число клеток) (Фиг. 2D). Оптимальное весовое соотношение PBK10:мРНК для обеспечения достаточной экспрессии GFP (поддающейся обнаружению с помощью иммунофлуоресценции) было равно 20 (Фиг. 2Е). Эти результаты, в целом, показывают
- 10 возможность доставки мРНК с помощью PBK10 или HerPBK10, поскольку оба белка взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами сходным образом.

Пример 2: Белковая конструкция, содержащая наночастицы, мишенью которой является с-Met

- [0095] Рецепторная тирозинкиназа (RTK), с-MET, и ее эндогенный лиганд, фактор роста гепатоцитов (HGF), вносят вклад в миграцию клеток, морфогенетическую дифференцировку и организацию трехмерных трубчатых структур, а также клеточный рост и ангиогенез на протяжении нормального гистогенеза. Однако нарушение регуляции с-MET и HGF может вносить вклад в прогрессирование опухоли, и в таких случаях, коррелирует с неблагоприятным прогнозом при целом ряде злокачественных
- 20 опухолей человека.

- [0096] Повышение содержания с-MET на клеточной поверхности было ассоциировано с устойчивостью к лекарственным препаратам, включая приобретенную устойчивость к современным терапевтическим препаратам-блокаторам сигнальных путей и, таким образом, стало важным биомаркером для RTK-направленной терапии. Тогда как большинство терапевтических препаратов, направленных против RTK, были разработаны для подавления исходящих сигнальных путей, которые поддерживают рост опухолей, те опухоли, которые первоначально поддаются такому лечению, почти всегда приобретают устойчивость к подавлению передачи сигнала, тогда как значительная популяция еще изначально устойчива к таким терапевтическим
- 30 препаратам-блокаторам сигнальных путей.

- [0097] Стратегии направленной доставки препаратов в клетки опухолей, которые не требуют подавления передачи сигнала, могут оказаться более эффективными, касательно злокачественных клеток, позитивных по с-MET. Это может быть решено путем применения лигандов, которые распознают с-MET для запуска поглощения клеткой присоединенных терапевтических веществ, таким образом, обходя необходимость в блокировке передачи сигнала. Тогда как HGF потенциально может быть использован для достижения этого эффекта, его потребность в тетрамеризации и образовании дисульфидных связей сопряжена с техническими сложностями для разработки терапевтических средств. Существует возможность получения альтернативного и потенциально более качественного лиганда для направленного связывания с с-MET из бактерий, которая вызывает пищевое отравление.

- [0098] Патоген, поражающий человека, *Listeria monocytogenes*, связывается с с-MET для проникновения в клетки-хозяева через поверхностные белки, называемые Интерналином. В частности, Интерналин В (InlB) запускает рецептор-опосредованный эндоцитоз после связывания с-Met. InlB и HGF распознают разные области с-MET, и InlB не требует тетрамеризации или дисульфидных связей для связывания. Следовательно, InlB может послужить для разработки нанобиологической стратегии для направленной доставки препаратов в клетки опухолей, которая была ранее

разработана для направленного связывания с другими рецепторами, такими как рецептор эндермального фактора роста человека (HER).

[0099] PBK10 представляет собой рекомбинантный белок, полученный из основания пептона капсида аденоовириуса, который может опосредовать доставку генов и лекарственных веществ в клетки благодаря функции основания пептона, обеспечивающей проникновение через мембрану клетки. Было показано, что PBK10 может быть направленно доставлен в опухолевые клетки при слиянии с опухолеспецифическими лигандами. В этом исследовании рецептор-связывающий сайт InlB был получен путем его слияния с PBK10 с использованием методов рекомбинации для получения нового белка, InlB-PBK10, который опосредует направленную доставку цитотоксических средств в раковые клетки, позитивные по с-MET.

[00100] Результаты показывают, что InlB-PBK10 может быть получен в виде растворимого слитого белка, который распознает с-MET на опухолевых клетках различных линий и подвергается быстрой интернализации после связывания с клеткой. InlB-PBK10 формирует нанокластеры с диаметром ~10-20 нм с токсичными соединениями, такими как корролы, и опосредует проникновение корролов в цитоплазму после попадания в клетку, вызывая гибель опухолевых клеток. Таким образом, Inl-PBK10 представляет собой новую конструкцию, опосредующую направленную доставку токсичных молекул в MET-экспрессирующие опухоли.

Уровень техники

[00101] С-MET как опухолеассоциированный биомаркер. Фактор эпителиально-мезенхимального перехода или MET представляет собой рецепторную тирозинкиназу (RTK), которая вначале была открыта как активированный онкоген. Эндогенный лиганд для MET, фактора роста гепатоцитов (HGF), также известный как фактор подвижности клеток, полученный из фибробластов, или рассеивающий фактор (SF), как правило, активирует MET для индукции пролиферации клеток, подвижности клеток, путей, отвечающих за выживание и дифференцировку клеток. MET и HGF, главным образом, экспрессируются в клетках эпителиального и мезенхимального происхождения, соответственно. Паракринная передача сигнала между HGF и MET опосредует эпителиально-мезенхимальные взаимодействия, которые регулируют тканевой рост и морфогенетическую дифференцировку. Передача сигнала с участием HGF-MET в нормальной ткани вносит вклад в эмбриогенез, органогенез, ангиогенез, заживление ран и регенерацию тканей, тогда как нарушенная передача сигнала в этом пути ассоциирована с развитием и прогрессированием опухоли, инвазией опухолевых клеток и метастазированием.

[00102] С-MET состоит из амино (N) -концевого внеклеточного домена, трансмембранныго сегмента и карбокси (C) -концевого внутриклеточного киназного домена. Внеклеточная область состоит из амино (N) -концевого Семафоринового (Sema) домена, расположенного рядом с доменом PSI (содержится в плексинах, семафоринах и интегринах), за которым следует четыре иммуноглобулин (Ig)-подобных домена, которые вместе составляют сайт связывания для HGF. Связывание HGF с рецепторами приводит к димеризации MET, активации передачи сигнала с участием ERK1/2, АКТ и STAT3, фосфопозитид-3-киназы (PI-3K), Ras-Raf-MAPK и фосфолипазы С. Лиганд-индуцированный эндоцитоз MET осуществляется через динамин и клатрин-зависимые пути, которые опосредуют запуск путей эндоцитоза, отвечающих как за деградацию, так и рециркуляцию.

[00103] Нарушение регуляции передачи сигнала с участием с-MET происходит по нескольким механизмам, включая сверхэкспрессию и активацию конститутивных киназ

с или без амплификации генов, мутацию киназных доменов и паракринную/аутокринную активацию с-MET путем сверхэкспрессии HGF. Лиганд-независимая активация с-MET также нарушает нормальную передачу сигнала с участием HGF-MET и может происходить в результате мутаций, вызывающих димеризацию конститутивных доменов, 5 а также в условиях гипоксии. Последнее может активировать HIF-1 α -индуцируемую транскрипцию MET, вызывая повышение содержания белков, усиливающих передачу сигнала с участием HGF и способствующих инвазии.

[00104] Обычно было принято, что гетерогенная экспрессия различных RTK по всей опухоли является основным механизмом устойчивости во многих типах злокачественных 10 опухолей. Терапии, направленные на подавление одной конкретной RTK, часто неэффективны из-за повышения экспрессии или стимуляции лигандами других RTK, которые, в свою очередь, поддерживают передачу сигнала с участием факторов, играющих важную роль для выживания клеток, включая PI3K и митоген-активируемые 15 протеинкиназы (MAPK). Этот механизм устойчивости был выявлен в исследованиях, в которых было показано, что устойчивость к ингибиторам EGFR ассоциирована с компенсаторным усилением передачи сигнала с участием MET при немелкоклеточном раке легких, а также других опухолях, включая злокачественные опухоли молочной 20 железы. В целом, с-MET является подходящим кандидатом для терапевтического воздействия, поскольку он ассоциирован с различными типами злокачественных опухолей, неблагоприятным прогнозом и метастазированием, и может быть полезным биомаркером для идентификации и направленного воздействия на устойчивые опухоли.

[00105] Терапевтические препараты, используемые в настоящее время в клинической практике и направленные на путь HGF/MET, включают либо антитела, направленные против HGF (Фиклатузумаб) или MET (Онартузумаб), либо низкомолекулярные 25 ингибиторы (Тивантиниб или ARQ197), направленные на киназный домен MET. Одна из проблем применения всех этих подходов заключается в том, что их терапевтическая эффективность зависит от подавления сигнальных путей, которые имеют тенденцию к компенсаторной перекрестной регуляции с участием RTK, что упоминалось выше, способствующей развитию устойчивости к этим препаратам. Растет интерес к 30 использованию комбинации терапевтических препаратов для блокировки или нарушения функция множества RTK, в особенности EGF-R и MET, учитывая значительную перекрестную регуляцию между этими двумя рецепторами. Тогда как исследования *in vitro*, в которых изучался этот подход, оказались перспективными в отношении линий опухолевых клеток, как, например, клеток злокачественной опухоли легких, молочной 35 железы, желудочно-кишечного тракта и толстого кишечника, клинические испытания, в которых изучается этот подход, все еще находятся в процессе проведения и остаются неубедительными.

[00106] Белок патогенной бактерии как потенциальное средство для направленного связывания с с-MET. Интериалин B (InlB) представляет собой белок, экспонированный 40 на поверхности поражающей человека патогенной бактерии *L. monocytogenes* (Lm), и способствует попаданию Lm в нефагоцитирующую клетку посредством связывания с с-MET. InlB является представителем большого семейства белков интериалинов Lm, которые состоят из N-концевого альфа-спирального домена Cap, за которым следует разное количество богатых лейцином повторов (LRR), расположенных рядом с 45 иммуноглобулин-подобным доменом, расположенным между двумя участками повторов (IR). В отличие от других интериалинов в структуре InlB также содержится B-повтор и три GW-блока на C-конце. InlB321, фрагмент InlB, способный к связыванию с с-MET с высоким сродством, состоит из белковых доменов, известных как Cap, LRR (домен,

отвечающий за белок-белковые взаимодействия), и IR-участков. Связывание InlB321 с MET осуществляется через два его домена: LRR и IR, которые связываются с такими доменами MET, как IgI и Sema, соответственно.

[00107] InlB обладает некоторыми преимуществами по сравнению с HGF в качестве

- 5 потенциального лиганда для направленной доставки препаратов в клетки опухолей. HGF представляет собой гетеродимерный белок, содержащий 20 сульфидных связей, и требует расщепления пробелка па составные субъединицы, которые могут представлять трудности для рекомбинантного производства, особенно в случае слияния с экзогенными доменами белка. В отличие от этого InlB321 был ранее получен в виде рекомбинантного
- 10 растворимого лиганда в клетках *Escherichia coli* и допускает слияние с другими белками (ФИГ. 3А). В исследованиях *in vitro* было продемонстрировано, что пептид InlB321 может запускать рецептор-опосредованную интернализацию после связывания с MET, что способствует его применению в качестве средства для доставки наночастиц. Также важно отметить, что не наблюдается никакого перекрытия между сайтом связывания
- 15 HGF с MET и сайтом связывания InlB321 с MET (ФИГ. 3В); следовательно, отсутствует конкуренция между этими двумя лигандами за связывание с MET.

[00108] В настоящем исследовании этот пептид перестраивают путем получения из него рекомбинантного белка, слитого с основанием пептона Ad5 (PB), которое

- 20 модифицируют с помощью декализиновой последовательности (K10) на карбоксильном (C)-конце. Полученный в результате мультидоменный белок, InlB-PBK10, обладает функциями транспорта анионных грузов, таких как нуклеиновые кислоты или корролы (опосредованы доменом K10), направленного связывания и интернализации (опосредованы доменом InlB321) и проникновения через мембрану, и внутриклеточного перемещения (опосредованы доменом PB). Представлены результаты по
- 25 конструированию слитого гена InlB-PBK10, получению слитого белка, кодируемого этим рекомбинантным геном, характеристике указанного белка в отношении его способности к связыванию с MET и попадания в клетки, и оценке его способности к доставке цитотоксических молекулярных грузов *in vitro*.

Результаты

- 30 [00109] Возможность конструирования рекомбинантного гена, кодирующего InlB-PBK10. Стратегия получения конструкции гена InlB-PBK10 состояла из двухстадийного способа клонирования, включающего амплификацию InlB321 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), для клонирования в плазмиду pRSET-A, обеспечивающую экспрессию бактериальных генов, с последующей вставкой PBK10 на 3'-конце
- 35 последовательности InlB321. Для этого были сконструированы олигонуклеотидные праймеры с целью введения сайтов рестрикции с помощью ПЦР в InlB321, чтобы соединить эту последовательность с PBK10 для вставки «в рамку считывания» экспрессирующей плазмиды pRSET-A.

[00110] Использованные прямые и обратные олигонуклеотидные праймеры имели

- 40 следующие последовательности, соответственно:

5'-AGTGAGCTCGAGACTATCACTGTG-3' (SEQ ID NO: 1) и

5'- 5'-GTTGGTGACTTTCTCCCCACCCCTCACCCACCCCTCATCTAGATATCCATGGTAT-3' (SEQ ID NO: 2).

- 45 [00111] Сайт рестрикции, SacI, был введен в прямой праймер для помещения рамки считывания InlB321 вблизи N-концевой полигистидиновой последовательности, кодируемой pRSET-A. Сайты рестрикции BglII и KpnI были введены в обратный праймер. SacI и KpnI были использованы для вставки InlB321 в pRSETA, а BglII был использован для последующей вставки PBK10 в 3'-направлении по отношению к последовательности,

кодирующей InlB321. Последовательность, кодирующая аминокислотный мотив Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 3), была включена в обратный праймер для встраивания короткого гибкого линкера между InlB321 и PBK10. Была использована высокоточная полимераза, чтобы гарантировать отсутствие мутаций в ПЦР-продукте InlB321.

[00112] ПЦР-продукт InlB321 размером 800 п.н. был лигирован в pRSETA в сайтах рестрикции SacI и KpnI, в результате чего была получена конструкция плазиды, pRSETA-InlB. Затем PBK10 был встроен в pRSETA-InlB в сайтах рестрикции BglII и HindIII. Для этого PBK10 был вырезан из конструкции плазиды, pRSETA-PBK10, в сайтах рестрикции BamHI и HindIII, и лигирован в pRSETA-InlB после двойного расщепления, в результате чего была получена конструкция pRSETA-InlB-PBK10 (ФИГ. 4А). Также была получена конструкция, pRSETA-GFP-InlB, которая кодирует InlB321 в виде белка, слитого на карбоксильном [C]-конце с зеленым флуоресцентным белком (GFP), для возможных дальнейших *in vitro* и *in vivo* экспериментов по визуализации. Эта конструкция была получена путем расщепления ПЦР-продукта InlB размером 800 п.н., описанного ранее, с помощью SacI и BglII, и лигирования этого продукта в плазиду pRSETA-GFP, в который вставка InlB помещается в рамку считывания с последовательностью, кодирующей GFP (ФИГ. 4В). Все конструкции подвергались двойному расщеплению и оценке путем электрофореза с использованием 1% агарозного геля для подтверждения наличия предполагаемых полос (ФИГ. 4С). В дополнение к этому вес три конструкции были секвенированы для подтверждения их идентичности, а также для проверки того, что в рамки считывания не были введены никакие мутации.

[00113] Рекомбинантные белки InlB, InlB-PBK10 и GFP-InlB могут быть получены в клетках бактерий. Все три конструкции плазиды, описанные ранее, (pRSET-InlB, pRSET-InlB-PBK10 и pRSET-GFP-InlB) были трансформированы в штамм E. Coli, BLR (DE3) pLysS, для последующей экспрессии и очистки белка, что описано в разделе «Способы». Этот штамм отличается большей толерантностью к повторяющимся последовательностям в отличие от более традиционных (т.е. BL21) экспрессирующих штаммов, благодаря чему обеспечивается возможность получения полноразмерных белков, содержащих С-концевые полилизиновые остатки. В то же время плазида pRSET-A кодирует белки, слитые на N-конце с полигистидиновой последовательностью. Этот гистидиновый (His)-тег способствует аффинной очистке с использованием никель-хелатирующей смолы и является эпигоном для распознавания антителами к His-тегу.

[00114] Из всех трех конструкций были получены растворимые белки (InlB, InlB-PBK10 и GFP-InlB) в клетках бактерий, которые могут быть выделены с помощью металло-хелатной аффинной хроматографии с использованием никельсодержащей смолы, как описано в разделе «Способы». Антитела к His-тегу распознавали все три белка, которые мигрировали при проведении денатурирующего гель-электрофореза в соответствии с прогнозируемыми значениями молекулярной массы ~37 кДа (InlB), ~100 кДа (InlB-PBK10) и ~63 кДа (GFP-InlB) (ФИГ. 5).

[00115] Содержание с-MET на клеточной поверхности варьирует среди разных линий опухолевых клеток. Первой целью характеристики InlB-PBK10 было определить, распознает ли этот белок с-MET на опухолевых клетках. Большинство литературных данных, относящихся к уровням с-MET, ассоциированным с разными линиями опухолевых клеток, основаны либо на экспрессии общего белка с-MET, либо на экспрессии РНК и, таким образом, неинформативны касательно уровня с-MET, экспонированного на клеточной поверхности. Таким образом, вначале было важно определить относительное содержание с-MET на клеточной поверхности целого ряда клеточных линий, доступных авторам для применения. Первоначально это оказалось

сложным, потому что большинство антител, доступных для таких анализов, были получены против цитозольных доменов с-MET и использованы для оценки механизмов экспрессии и активации с-MET. Для проведения этого исследования было использовано антитело к MET3, разработанное специально против с-MET клеточной поверхности.

- 5 Авторы использовали ИФА компонентов клеточной поверхности для определения относительного содержания с-MET па поверхности клеток различных линий. Вкратце, этот подход позволяет определить относительное содержание рецепторов на поверхности непермеабилизованных клеток и может быть выполнен в 96-луночном формате, что позволяет как использовать много повторов, так и сохранить
- 10 дорогостоящие реактивы. Полученные авторами результаты ИФА показывают, что H1993 (клеточная линия рака легких) и MDA-MB-231 (клеточная линия рака молочной железы) принадлежат к числу клеточных линий с наиболее высоким содержанием с-MET на клеточной поверхности. RANKL (клеточная линия рака предстательной железы) и MDA-MB-435 (клеточная линия рака молочной железы) характеризуются низким
- 15 содержанием, тогда как LN-GFP (клеточная линия рака предстательной железы) и Cos-7 (фибробласты почек африканской зеленои мартышки) характеризуются низким содержанием с-MET на клеточной поверхности (ФИГ. 6).

[00116] Пептид, полученный из InlB, распознает с-MET. Для того чтобы оценить рецепторную специфичность нацеливающего лиганда, авторы использовали

20 флуоресцентно-активируемую клеточную сортировку (FACS) для определения относительного содержания InlB, связанного с клетками, позитивными по с-MET. Были исследованы две линии опухолевых клеток па предмет связывания InlB: одна линия опухолевых клеток с высокой экспрессией с-MET (H1993) и другая линия опухолевых клеток с низкой экспрессией с-MET (LN GFP). InlB характеризовался пропорционально

25 более высоким уровнем связывания с клетками H1993 по сравнению с клетками LN GFP. (ФИГ. 7A). Для подтверждения того, способен ли InlB специфически связываться с с-MET, авторы использовали растворимый пептид, полученный из внеклеточного, лиганд-связывающего домена MET (MET-пептид), в качестве конкурентного ингибитора за связывание InlB. При использовании ингибитора и лиганда в эквимолярном

30 соотношении прогнозируется уменьшение уровня связывания с рецепторами па 50%. В подтверждение этого использование MET : InlB в эквимолярных (1:1) концентрациях приводило к уменьшению уровня связывания InlB с клетками H1993 на 50%, что свидетельствовало об избирательном связывании с-MET. (ФИГ. 7B).

[00117] Связывание InlB-PBK10 с клетками зависит от уровня с-MET и конкурентно подавляется свободным лигандом. В предыдущем разделе авторы показали, что InlB обладает способностью к связыванию с линиями опухолевых клеток, позитивных по с-MET, через с-MET. Следующей целью было исследовать, будет ли изменяться связывание InlB с рецепторами при включении с состав слитого белка. Для оценки данного свойства авторы изучили связывание InlB-PBK10 с клеточными линиями с

35 высоким уровнем экспрессии с-MET (MDA-MB-231) и низким уровнем экспрессии с-MET (Cos-7) с использованием ИФА компонентов клеточной поверхности. InlB-PBK10 характеризовался высоким уровнем связывания с клетками с более высоким уровнем экспрессии с-MET на клеточной поверхности (MDA-MB-231) но сравнению с клетками, экспрессирующими относительно низкие уровни с-MET (Cos-7) (ФИГ. 7C). Чтобы

40 дополнительно подтвердить, что InlB-PBK10 распознает с-MET, в качестве конкурентного ингибитора был использован свободный лиганд InlB. В присутствии повышающихся концентраций InlB отмечалось снижение уровня связывания InlB-PBK10 с клетками MDA-MB-231, что указывает на то, что InlB-PBK10 связывается с этими

45

клетками через с-MET (ФИГ. 7D).

[00118] InlB-PBK10 характеризуется связыванием с с-MET на клетках в суспензии. В качестве дополнительного подтверждения распознавания с-MET авторы исследовали, может ли InlB-PBK10 связываться с клетками в суспензии (в отличие от предыдущего 5 анализа, в котором оценивалось связывание с адгезивными клетками). Авторы провели анализ методом копреципитации (pull down assay), в котором InlB-PBK10 инкубировали с клетками линии MDA-MB-435, позитивной по с-MET, в суспензии в присутствии повышающихся концентраций свободного лиганда InlB в качестве конкурентного ингибитора. Концентрации свободного лиганда InlB подбирали таким образом, чтобы 10 молярные соотношения InlB-PBK10 : InlB составляли 1:1, 1:5 и 1:10. Количество соосажденного с клетками InlB-PBK10 затем оценивали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антитела, специфического по отношению к InlB-PBK10 (антитело Ad5, которое распознает основание пептона). Уровни связывания InlB-PBK10 уменьшались по мере увеличения концентрации InlB, причем связывание почти 15 полностью подавлялось, тем самым подтверждая, что InlB-PBK10 может распознавать и связывать с-MET на клетках в суспензии (ФИГ. 7E).

[00119] InlB-PBK10 интернализуется в С-MET+ клетки. Для изучения сохранности и детекции InlB-PBK10 после поглощения клетками, авторы вначале инкубировали InlB-PBK10 с тремя разными видами клеток, MDA-MB-231, MDA-MB-435 и H1993, при 4°C 20 для обеспечения связывания с рецепторами, но не для интернализации. Для индукции эпдоцитоза авторы затем инкубировали клетки при 37°C в течение указанных интервалов времени и фиксировали клетки в определенные временные точки вплоть до 30 минут. Иммунофлуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия показывают, что во всех трех клеточных линиях наблюдалось скопление InlB-PBK10 (показан зеленым 25 цветом) на клеточной мемbrane и объединение в очаги на клеточной мемbrane в пределах первых 5 минут связывания. InlB-PBK10 затем накапливался в перинуклеарной области к 30-й минуте. Эти данные показывают, что InlB-PBK10 может интернализоваться и накапливаться внутри клеток в пределах 30 минут после связывания с клетками (ФИГ. 8). Клетки фиксировали в определенные временные точки вплоть до 30 минут и получали снимки с помощью лазерной сканирующей конфокальной 30 микроскопии. Красный, актин; синий, ядро. Шкала, ~10 микрон.

[00120] InlB-PBK10 обеспечивает доставку токсичных молекул в с-MET+ клетки. Для оценки эндосомолитической способности InlB-PBK10 авторы исследовали, может ли он опосредовать попадание в цитоплазму цитотоксических средств, которые по 35 природе неспособны проникать через клеточную мембрану сами по себе. Сульфированные корролы, содержащие галлий (III) (S2Ga или Ga-коррол) интенсивно флюоресцирующие соединения, которые могут спонтанно формировать комплексы с белками. Эти соединения не могут пересекать клеточную мембрану в отсутствие носителя, обеспечивающего проникновение через мембрану, для их доставки в клетки 40 для оценки цитоплазматических мишней для токсического действия. 20-22 В лаборатории Medina-Kauwe ранее было показано, что Ga-корролы сами по себе нетоксичны, но могут вызывать гибель клеток при доставке в HER2+ опухолевые клетки с помощью HerPBK10.

[00121] Для проведения этого исследования InlB-PBK10 смешивали с Ga-корролом 45 для обеспечения сборки с помощью нековалентной связи, и полученный в результате комплекс InlB-PBK10-Ga изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и динамического рассеяния света (ФИГ. 9A, и 9B). На изображениях, полученных с помощью ТЭМ (правые панели ФИГ. 9A), показаны

сферические образования, формирующиеся, когда Ga-коррол (+S2Ga) добавляют к InlB-PBK10 но сравнению с InlB-PBK10, взятым отдельно (-S2Ga). Визуализация показывает, что белок и коррол формируют кластеры с диаметром 10-20 нм. Динамическое рассеяние света, используемое для измерения размера частиц, показывает, что InlB-PBK10 отдельно 5 формирует частицы со средним диаметром 8,4 нм, тогда как диаметр InlBPBK10-Ga составляет около 16,4 нм.

[00122] Для изучения того, ли может InlB-PBK10-Ga проникать в клетки и индуцировать коррол-опосредованное токсическое действие в линиях раковых клеток, позитивных по с-MET, авторы подвергали клетки MDA-MB-435 воздействию 1 мкМ, 10 5 мкМ и 10 мкМ каждого из следующих веществ: InlB-PBK10, S2Ga и InlB-PBK10-Ga. InlB-PBK10-Ga в концентрации 1 мкМ уменьшал жизнеспособность клеток на 60%, тогда как взятый отдельно S2Ga в концентрации 1 мкМ и выше и взятый отдельно InlB-PBK10 не влияли жизнеспособность клеток. Эти данные подтверждают, что InlB-PBK10 обладает эндосомолитической способностью и показывают, что эта конструкция 15 способна к доставке цитотоксических средств, таких как Ga-корролы в клетки, экспрессирующие с-MET на клеточной поверхности (ФИГ. 9С).

[00123] Для дополнительной оценки терапевтической эффективности InlB-PBK10 исследовали, может ли этот белок быть использован для доставки более широко распространенных химиотерапевтических молекул. Доксорубицин (Dox) представляет собой одобренное FDA цитотоксическое средство, которое используют для лечения большого числа типов злокачественных опухолей. Если бы такие лекарственные препараты могли направленно воздействовать главным образом па опухолевые клетки, это было бы большим преимуществом с точки зрения уменьшения побочных эффектов. В этом подходе сначала происходит интеркаляция Dox в двухцепочечный олинуклеотид 25 с образованием ДНК-Dox, который затем может связываться с полилизином InlB-PBK10 (посредством взаимодействий между зарядами с фосфатным остовом ДНК) и формировать комплекс, который авторы обозначили I-Dox. Комплекс I-Dox (5 мкМ, что касается концентрации Dox) инкубировали с указанными клеточными линиями в условиях, описанных в разделе «Способы». InlB-PBK10 инкубировали в эквивалентных 30 концентрациях по отношению к комплексу I-Dox. Жизнеспособность клеток оценивали по метаболической активности (MTT) через 24 ч после воздействия. Комплекс I-Dox оказывал выраженное токсическое действие на клетки с высоким уровнем экспрессии с-MET (H1993) по сравнению с клетками с низким уровнем экспрессии с-MET (LAPC4) (ФИГ. 9Д). Клетки H1993 сначала подвергали обработке свободным лигандом InlB 35 для блокировки с-MET с последующим воздействием I-Dox в тех же самых условиях, что описаны выше. Оказалось, что InlB-PBK10, взятый отдельно, немного, но незначительно уменьшал число клеток, что указывает па то, что основной механизм клеточной гибели был опосредован доставкой Dox. В дополнение к этому, свободный лиганд InlB подавлял цитотоксичность, вызванную I-Dox, что указывает на то, что I- 40 Dox-опосредованная цитотоксичность осуществляется через связывание с-MET и попадание в клетку с доставкой Dox (ФИГ. 9Е).

Ход эксперимента

[00124] Клетки. Клеточные линии рака молочной железы человека (MDA-MB-435* и MDA-MB-231) были получены из Национального института рака. Клеточные линии 45 рака легких человека (H1993) и фибробластов почек африканской зеленой мартышки (Cos-7) были получены из ATCC. Клетки рака яичников (A2780) были получены из Sigma-Aldrich. Линии рака предстательной железы (LNCaP^{Neo/RANKL}, LNCaP^{Neo}) были любезно предоставлены Др. Leland Chung (Медицинский центр Седарс-Синай). MDA-

МВ-435 и МДА-МВ-231 поддерживали в DMEM, 10% об./об. фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Sigma-Aldrich) и 1% об./об. пенициллина/стрептомицина (Sigma-Aldrich) при 5% CO₂. Клетки Н1993 и А2780 поддерживали в RPMI, 10% об./об. FBS и 1% об./об. пенициллина/стрептомицина при 5% CO₂. Клетки Cos-7 поддерживали в среде DMEM/F12, 20% об./об. не подвергавшейся термической инактивации фетальной бычьей сыворотки (ATCC 30-2020) и 1% об./об. пенициллина/стрептомицина (Sigma-Aldrich) в 5% CO₂. LNCaP^{Neo/RANKL}, LNCaP^{Neo} поддерживали в среде RPMI, 10% об./об. ФБС и 1% об./об. пенициллина/стрептомицина и раствора G418-дисульфата (200 мкг) (Sigma Aldrich G8168). Гигромии в концентрации 200 мкг/мл (GEMINI Bio-products 400-123) добавляли к среде культивирования клеток LNCaP^{Neo/RANKL} для поддержания RANKL-экспрессирующей плазмида. Для того чтобы поддерживать эквивалентную конфлюентность между клеточными линиями, в определенных анализах клетки высевали в соответствии с их скоростью роста.

[00125] ДНК-конструкции. Нацеливающая конструкция, InlB-PBK10, была получена по двухстадийному методу клонирования (представлен в краткой форме на ФИГ. 8А), в котором последовательности, кодирующие InlB и PBK10, были последовательно лигированы вместе с получением белок-экспрессирующей плазмида, pRSET-A (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Конструкция плазмида, кодирующая аминокислоты 36-321 интерналина В (pMET-30-InlB321) (CeBiTec), университет Билефельда, Германия), была использована в качестве матрицы для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием прямого и обратного олигонуклеотидного праймеров, содержащих последовательности: 5'-AGTGAGCTCGAGACTATCACTGTG-3' (SEQ ID NO: 1) и

5'-GTTGGTGACTIONTCTCCCCACCTTCACCCACCTTCATCTAGATATCCATGGTAT-3' (SEQ ID NO: 2), соответственно. Сайт рестрикции SacI был введен в прямой праймер для вставки в рамку считывания в pRSET-A. Сайты рестрикции BglII и KpnI были введены в обратный праймер для последующей вставки PBK10 в рамку считывания в 3'-направлении по отношению к последовательности, кодирующей InlB. Обратный праймер также содержит последовательность, кодирующую гибкий линкер (GlyGlySerGlyGlySer) (SEQ III NO: 3) между последовательностями InlB и PBK10. ПЦР-продукт InlB размером 800 п.н. подвергали расщеплению с помощью SacI и KpnI для лигирования в pRSET-A. Полученную в результате конструкцию, pRSETA-InlB, затем подвергали расщеплению BglII и HindIII для помещения вставки PBK10 в рамку считывания с InlB. PBK10 был вырезан из плазмида, pRSET-PBK10, с использованием рестрикционных ферментов BamHI и HindIII, и встроен в сайты BglII-HindIII pRSETA-InlB, в результате чего была получена конструкция pRSET-InlB-PBK10.

[00126] Конструкция pRSETA-GFP-InlB, которая кодирует белок InlB321, слитый на [C] -конце с зеленым флуоресцентным белком (GFP), была получена путем расщепления ПЦР-продукта InlB размером 800 п.н., описанного ранее, с помощью SacI и BglII, и лигирования его в плазмиду pRSETA-GFP для клонирования InlB321 в рамку считывания.

[00127] Экспрессия и очистка белка в клетках бактерий. Культуры бактериальных трансформантов BLR(DE3)pLysS (Novagen, Мадисон, Висконсин, США), культивированные на протяжении ночи, инокулировали в соотношении 1:50 в среду LB, содержащую 0,5 мг/мл ампициллина и 0,034 мг/мл хлорамфеникола, а также 0,0125 мг/мл тетрациклина. Когда значения оптической плотности достигали 0,6 при длине волны 600 нм (OD 600), культуры стимулировали с использованием 0,4 мМ ИПТГ и

выращивали в течение дополнительных 3 ч при 37°C при встряхивании. Культуры собирали и осаждали. Клеточные осадки ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM Tris, pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM ЭДТА, pH 8,0) и лизировали путем добавления 0,1% Triton X-100 и с использованием одного цикла замораживания-оттаивания, причем во время оттаивания добавляли 1 mM фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). После оттаивания в лизаты добавляли 10 mM MgCl₂, и ДНКазу в концентрации 0,01 мг/мл, и лизаты встряхивали в течение 10 минут при комнатной температуре для обеспечения расщепления геномной ДНК перед тем, как лизаты возвращали на лед, после чего к ним добавляли 300 mM NaCl и 10 mM имидазола. Лизаты переносили в предварительно охлажденные центрифужные пробирки, уравновешивали и центрифугировали при 4°C в предварительно охлажденной центрифуге при 39000×g в течение 1 часа. Супернатанты отделяли, наносили на смолу Ni-NTA (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США), предварительно уравновешенную MCAC-10 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM имидазола и 0,1% Triton X-100, pH 8,0), и инкубировали в течение 1 ч на льду. Смолу, содержащую связанный белок, промывали один раз с использованием 20 мл буфера MCAC-10 в течение 10 минут, перемешивая на льду, и три раза MCAC-20 (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM имидазола и 10% глицерина, pH 8,0) с последующим элюированием 2 мл раствора 50 mM Na-fosfата, pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM имидазола и 10% глицерина. В образцах белка одновременно заменяли буфер на буфер с низким содержанием солей и концентрировали посредством ультрафильтрации (Amicon ультрацентрифужные фильтры - Ultracel - 50K (Millipore, Бедфорд, Массачусетс, США), а их концентрации измеряли с использованием набора для количественного определения белка от BioRad (BioRad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США).

[00128] Детекция белка. Электрофорез в полиакриламидном геле в условиях денатурации осуществляли в прерывистой системе гель-буфер, как известно в данной области. Белки были перенесены па нитроцеллюлозную мембрану в электрическом поле с использованием 192 mM глицина, 25 mM Tris и 20% метанола в наборе камер для полусухого переноса белков от BioRad при постоянном напряжении (20 В) в течение 40 мин. Блоты блокировали с использованием 3% бычьего сывороточного альбумина в Tris-забуференном физиологическом растворе (10 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl). Блоты инкубировали на протяжении ночи с антисывороткой к тегу RGS-His (Qiagen) в разведении 1:1500 в блокирующем буфере. Комплексы антитело-антитела детектировали с помощью инкубации со вторичными антителами (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США), контролированными с пероксидазой хрена (HRP), затем следовала реакция с субстратом HRP и реактивами для хемилюминесцентной детекции (Thermo Fisher), а также экспонировали на пленке (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia Biotech).

[00129] Анализ на основе ИФА для оценки экспрессии с-MET на клеточной поверхности. Для определения содержания с-MET в клеточных линиях клетки высевали в 96-луночные планшеты с использованием следующего количества клеток: 8×10³ MDA-MB-231, MDA-MB-435, A2780, LNCaP^{Neo/RANKL}, LNCaP^{Neo} и 9×10³ для H1993 и LAPC4 на лунку. Через 48 часов отбирали среду и быстро промывали клетки натрий-фосфатным буфером (PBS), содержащим 1 mM MgCl₂ и 1 mM CaCl₂ (PBS+), затем фиксировали в 4% PFA в PBS в течение 12 минут при комнатной температуре (КТ), затем промывали 3 раза PBS+ (200 мкл на лунку) перед инкубацией в течение 1 часа в блокирующем растворе (3% BSA/PBS, 100 мкл на лунку) при КТ. Антитело к с-MET (моноклональное антитело мыши к с-MET в концентрации 0,87 мкг/мл; Dr. Knudson) добавляли в лунки в трех повторностях (100 мкл на лунку) и инкубировали в течение 1 ч при КТ. Клетки

промывали три раза PBS+ и инкубировали в течение 1 ч при КТ со вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена в разведении 1:2000. Клетки промывали 3 раза PBS+ и один раз дистиллированной водой, и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора TMB (eBioscience) в соответствии с инструкциями изготовителя. Планшеты 5 инкубировали с субстратом в течение 30 минут (или до образования синего цвета) в темноте, и реакцию останавливали добавлением 100 мкл IN HCl. Абсорбцию измеряли при 450 нм на планшетном спектрофотометре Spectra MaxM2 (Molecular Devices Corp.) Затем проводили анализ с кристаллическим фиолетовым для определения 10 относительного числа клеток. Вкратце, клетки промывали один раз PBS+ (200 мкл/лунку) и инкубировали с 0,1% раствором кристаллического фиолетового (100 мкл/лунку) в течение 15 минут при КТ. Клетки тщательно промывали 4 раза PBS+ (200 мкл/лунку) и инкубировали с 95% раствором этанола (100 мкл/лунку) в течение 10 минут при КТ. Абсорбцию измеряли при 490 нм.

[00130] Анализ связывания с клетками. Для определения связывания InlB-PBK10 в 15 разных концентрациях с клетками, клетки высевали в 96-луночные планшеты в следующих концентрациях: 8×10^3 LNCaP^{Neo/RANKL}, LNCaP^{Neo} и 9×10^3 для H1993 и LAPC4 на лунку. Через 48 часов отбирали среду и клетки быстро промывали с использованием 20 100 мкл буфера A (бессывороточная DMEM, 20 мМ HEPES pH 7,4, 2 мМ MgCl₂, 3% BSA). Клетки инкубировали с 50 мкл буфера A, содержащего указанные концентрации InlB-PBK10 в течение 1 часа на льду с вращением при 4°C. Клетки промывали PBS+ (200 мкл/лунку) один раз и подвергали ИФА компонентов клеточной поверхности, как было ранее описано (ИФА экспрессии с-MET на клеточной поверхности), со 25 следующими модификациями: для детекции InlB-PBK10 планшеты инкубировали на протяжении ночи с первичным антителом (RGS-His; Qiagen) в разведении 1:1500 и один час при комнатной температуре с вторичным антителом (козье антитело к иммуноглобулину мыши, в разведении 1:2000).

[00131] Для проведения анализов конкурентного ингибиования InlB в указанных концентрациях инкубировали с клетками до добавления InlB-PBK10. В частности, 30 клеточные линии, высеванные, как было ранее описано, быстро промывали с 100 мкл Буфера A с последующей инкубацией в 50 мкл буфера A, содержащего 1 мКМ, 5 мКМ или 10 мКМ InlB, в течение одного часа па льду с вращением при 4°C. Клетки промывали один раз Буфером A (100 мкл/лунку) и затем инкубировали с 50 мкл Буфера A, 35 содержащего 1 мКМ InlB-PBK10, в течении 1 часа на льду с вращением при 4°C. Клетки промывали PBS+ (200 мкл/лунку) один раз и обрабатывали для иммунодетекции связанного с клеточной поверхностью InlB-PBK10, как было ранее описано, планшеты инкубировали с антителом, которое распознает домен основания пептона InlB-PBK10 (антитело к Ad5; Abcam) в разведении 1:5000. Планшеты инкубировали со вторичным антителом (козье антитело к иммуноглобулину кролика в разведении 1:2000) в течение 40 1 часа при комнатной температуре. Детекция связывания осуществлялась, как пояснялось ранее, для ИФА экспрессии с-MET на клеточной поверхности.

[00132] Анализ жизнеспособности клеток. Клетки MDA-MB-435 высевали в 96-45 луночные планшеты в количестве 8×10^3 клеток на лунку. Через 48 часов отбирали среду и клетки инкубировали с 30-50 мкл среды, содержащей разные концентрации InlB-PBK10-Ga и S2Ga (1, 5 и 10 мКМ) в течение 4 часов на шейкере при 37°C с 5% CO₂. После 4-х часового периода инкубации добавляли дополнительную среду для доведения общего объема до 100 мкл на лунку и клетки инкубировали приблизительно 24 часа без перемешивания. Для определения жизнеспособности клеток был использован набор

Promega CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Удаляли среду и добавляли 100 мкл свежей среды в лунки. Согласно инструкциям производителя, 2,0 мл раствора MTS смешивали с 100 мкл раствора PMS, и 20 мкл добавляли в каждую лунку. Планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO₂, и определяли абсорбцию при 490

⁵ нм через 1 и 2 часа после добавления МТТ-реактивов. Затем проводили окрашивание кристаллическим фиолетовым для определения относительного количества клеток.

Вкратце, клетки промывали PBS+, содержащим 1 мМ Ca²⁺ и 1 мМ Mg²⁺, затем инкубировали с 0,1% раствором кристаллического фиолетового (100 мкл/лунку) в течение 15 минут при КТ и затем промывали 4 раза PBS+ (200 мкл/лунку). Планшеты инкубировали с 95% раствором этанола (100 мкл/лунку) в течение 10 мин. при КТ, и измеряли абсорбцию при 590 нм.

[00133] Анализы поглощения/внутриклеточного транспорта InlB-PBK10. Для анализов поглощения INLB-PBK10 клетки высевали на покровные стекла в двенадцати-луночный планшет в концентрации 1×10^5 клеток/лунку и выращивали в течении 2 суток. В день обработки планшеты помещали на лед и проводили обработку клеток для проведения указанных экспериментов согласно следующим способам. Для изучения динамики поглощения клетки промывали дважды холодным PBS, а затем 0,4 мл Буфера А, содержащего 8 мкг InlB-PBK10, добавляли в каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч со встряхиванием на льду при 4°C для обеспечения связывания с рецепторами, но не интернализации, а затем клетки промывали холодным PBS для удаления несвязавшегося белка. В лунки затем добавляли предварительно подогретую полную среду, и планшеты инкубировали при 37°C при 5% CO₂ через указанные интервалы времени. Затем брали отдельные покровные стекла, промывали три раза PBS/1% MgCl₂, затем фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре. Покровные стекла промывали три раза PBS, затем инкубировали с 50 мМ хлорида аммония в PBS в течение 5 минут, 0,1% Triton X-100 в PBS в течение 5 минут и затем блокировали 1% BSA в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки на покровных стеклах инкубировали с первичными антителами на протяжении ночи при 4°C, промывали три раза PBS и инкубировали со вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Там, где это указано, после контрастного окрашивания актина и ядер клетки инкубировали с техасским красным x- фаллоидином (Invitrogen T7471) в разведении 1:100 па протяжении инкубации со вторичным антителом с последующей инкубацией в течение 5 минут в DAPI-содержащем растворе в конечной концентрации 300 нМ. Фаллоидин, DAPI и первичные, а также вторичные антитела разводили в 1% BSA в PBS. После обработки вторичным антителом и DAPI клетки на покровных стеклах промывали три раза PBS и заключали в среду Prolong Antifade для заливки (Molecular Probes, Юджин, Орегон, США). Для детекции InlB-PBK10 использовали антитело к RGS-His (Qiagen) в разведении 1:150, а конъюгированное с флуорофором козье антитело к иммуноглобулину мыши (FITC-конъюгированное) в разведении 1:500 использовали для флуоресцентной детекции при 488 нм, для InlB-PBK10, 405 нм (DAPI) для ядер и 532 нм (техасский красный) для F-Актина.

[00134] Сборка InlB-PBK10-Dox (I-Dox). Слитый белок, InlB-PBK10, полученный из капсида вируса, был связан с доксорубицином по стандартным методикам. Вкратце, были получены комплементарные олигонуклеотидные дуплексы путем смешивания с одинаковой молярной концентрацией олигонуклеотида, состоящего из 30 оснований, LLAA-5 (5'-CGCCTGAGCAACGCCGGCATCCGCAAG-3') (SEQ ID NO: 4), и его

соответствующей обратно-комplementарной последовательностью, LLAA-3. Смесь подогревают до температуры кипения в течении 5 минут и охлаждают до комнатной температуры в течении 30 минут для обеспечения отжига олигонуклеотидов.

Двухцепочные олигонуклеотиды смешивали с Dox в молярном соотношении 1:10

5 (ДНК : Dox) и инкубировали при комнатной температуре (КТ) в течении 30 минут с последующей инкубацией с InlB-PBK10 в молярном соотношении InlB-PBK10 : ДНК-Dox 6:1 в HBS, и ультрафильтрацией с использованием фильтрационных мембран с отсечением по молекулярной массе 50k (mwco) (которые подготавливали путем предварительной инкубации с 10% глицерином в течении 2 часов или на протяжении 10 ночи) для отделения I-Dox от неполностью собранных компонентов. Комплексы центрифугировали при 4000xg в течение 15 минут или до уменьшения объема на $\geq 80\%$. Концентрацию Dox в I-Dox определяли путем экстраполяции значений измеренной абсорбции при 480 нм или флуоресценции при 590 им (длина волны возбуждения: 480 нм) в сравнении со значениями абсорбции или флуоресценции для Dox из калибровочной 15 кривой (SpectraMax, Molecular Devices, США). Концентрацию Dox рассчитывали по уравнению Бера-Ламберта: (абсорбция при $\lambda_{\text{макс}}$ / коэффициент экстинкции Dox), где x фактор разведения = концентрация (M), с использованием коэффициента экстинкции Dox, равного $11,500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Дозы I-Dox, использованные в экспериментах, основаны на концентрации Dox в I-Dox.

20 [00135] Сборка InlB-PBK10-Ga. Нековалентная сборка InlB-PBK10 с сульфированным галлий-корролом (S2Ga) происходила при инкубации 10x молярного избытка коррола с InlB-PBK10 в темноте при 4°C в течение 1 часа с мягким перемешиванием.

Несвязавшиеся молекулы коррола удаляли посредством ультрафильтрации через центрифужные концентраторы с отсечением по молекулярной массе 50 K (Millipore Corporation, Биллерика, Массачусетс, США) в соответствии с методиками изготовителя для фильтрации, и комплексы промывали PBS до осветления фильтрата. Ретентаты сохраняли их ярко-зеленый цвет (свидетельствующий о корроловом пигменте) на протяжении всего процесса фильтрации. Ретентаты ресуспендировали в PBS, а абсорбцию образцов измеряли при значении $\lambda_{\text{макс}}$, характерном для коррола, для получения 25 концентрации коррола, как было ранее описано. Несмотря на то, что при связывании S2Ga с белками наблюдается сдвиг $\lambda_{\text{макс}}$, например, с 424 до 429 нм, это не влияет 30 существенно на определение концентрации коррола в комплексах.

[00136] FACS-анализ. Для оценки связывания InlB321, H1993 и Ln GFP клетки 35 культивировали в течение 48 часов. После двукратного промывания PBS клетки отделяли путем инкубации в 2 mM EDTA в течение 5-10 минут при 37°C. К клеткам добавляли PBS, содержащий 0,01% MgCl₂ и CaCl₂ (0,01% PBS+), и осаждали в течение 4 мин при 2000 об/мин. Клетки промывали 0,01% PBS+ еще три раза, ресуспендировали, подсчитывали и разделяли в пробирки Эппendorфа. Образцы осаждали в течение 2 40 минут при 300xg и ресуспендировали в 3% растворе молока в PBS, содержащем указанные концентрации InlB, а также инкубировали на льду в холодильной комнате в течение 1 часа. Клетки затем промывали четыре раза PBS и инкубировали с антителом к RGS-His, разведенным в 150 раз в 3% BSA в PBS в течение 30 мин при комнатной 45 температуре. Клетки промывали четыре раза перед ресуспендированием в 3% BSA со вторичным антителом, меченым Alexa Fluor 647 козьим антителом к IgG мыши (H+L), и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки промывали 4 раза, инкубировали с 0,1% PFA в течение 15 мин, а затем снова промывали четыре раза и анализировали с помощью прибора Beckman Coulter Cyan ADP FACS.

[00137] Для подтверждения того, что связывание InlB321 с клетками осуществляется через с-MET, InlB321 и MET-пептид (YCP2247 SPEED BioSystems. Роквилл, Мэриленд) инкубировали в 3% растворе молока в IxPBS в течение 30-40 мин на льду до связывания с клетками. Анализ связывания осуществляли, как описано выше.

[00138] Анализ связывания с клетками методом копреципитации. Клетки MDA-MB-435, культивированные в течение 48 часов, отделяли с использованием 2 mM EDTA в Ix PBS при 37°C со встряхиванием в течение 5-10 мин. После осаждения клеток в течение 5 мин при 300×g их промывали один раз и ресуспенсировали в Буфере A+3% BSA, а также разделяли на четыре пробирки Эппендорфа (2×10^6 клеток/пробирку). Клетки снова осаждали и ресуспенсировали в 500 мкл буфера A+3% BSA. В три пробирки добавляли 0,4 мкМ, 2 мкМ и 4 мкМ InlB, а в четвертую пробирку белок не добавляли; все пробирки инкубировали на льду в течение 1 ч. После промывки и осаждения всех образцов клеток для удаления несвязавшегося InlB, во все четыре пробирки добавляли 0,4 мкМ InlB-PBK10 в 500 мкл Буфера A с последующим вращением на льду в течение 2 часов для обеспечения связывания с рецепторами, но не для интернализации. Клетки промывали и осаждали три раза, как было описано ранее. Осадки затем супенсировали в 50 мкл буфера для нанесения образцов для ДСН-ПААГ-электрофореза и оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/вестерн-блоттинга с использованием антитела, специфического по отношению к InlB-PBK10 (антитело к Ad5, которое распознает основание пептона) в разведении 1:5000.

Пример 3: биораспределение Inl-PBK10 у мышей линии nu/nu с двусторонними (на боках) подкожными ксенотрансплантатами опухолевых клеток линии MDA-MB-435

Уровень техники

(00139) Как показано в предыдущем примере под названием «Белковая конструкция, содержащая наночастицы, мишенью которой является с-Met», ФИГ. 6, у клеток MDA-MB-435 выявлялось выраженное содержание с-MET на клеточной поверхности. Более того, как показано на ФИГ. 7Е, белковая конструкция, мишенью которой является с-Met, InlB- PBK10, связывается с этими клетками посредством взаимодействия, которое конкурентно подавляется лигандом с-MET, InlB, что свидетельствует о том, что эта конструкция может связываться с этими клетками через с-MET. На ФИГ. 8 показано, что InlB-BK10 попадает в эти клетки после связывания с рецепторами, а на Фигуре 9С показано, что белок может опосредовать доставку токсичной молекулы, неспособной проникать через мембрану (галлий-связанный коррол), в эти клетки, вызывая гибель клеток (чем самым это также является подтверждением того, что Inl-PBK10 способен к разрушению эндосомальной мембранны).

Результаты

[00140] В этом исследовании авторы оценивали биораспределение Inl-PBK10 у мыши с опухолями после ксенотрансплантации клеток линии MDA-MB-435 для определения того, способен ли он накапливаться в этих опухолях *in vivo*. Для этого самки мышей линии nu/nu с двусторонними (на боках) подкожными ксенотрансплантатами опухолевых клеток линии MDA-MB-435 получали однократную инъекцию в хвостовую вену Alexa680-меченого InlB-PBK10 (белок 2 нмоля) и подвергались визуализации с помощью системы Xenogen через указанные интервалы времени после инъекции с использованием фильтров, имеющих длину волны возбуждения 640 нм и испускания 700 нм. Визуализация всего тела животного показывает значительное гашение флуоресцентного сигнала от животного к 4 ч после инъекции (ФИГ. 10А). Через интервал времени 4 ч мышь умерщвляли, а также выделяли опухоли и ткани для дополнительной визуализации. Тогда как в опухолях наблюдается незначительное накопление флуоресцентного

сигнала, значительная часть введенного вещества элиминировалась через почки к 4 часам, тогда как незначительный флуоресцентный сигнал может быть обнаружен в печени (ФИГ. 10В). В остальных тканях, включая сердце, селезенку, легкие, головной мозг и скелетную мышцу, не было выявлено никакого поддающегося детекции

5 флуоресцентного сигнала (ФИГ. 10В). В дополнительные исследования будут включены получение тканей на более ранних и поздних временных точках, чтобы определить, происходит ли доставка в почки в результате быстрой элиминации, а также определение биораспределения с использованием конкурентного ингибитора для подтверждения того, что доставка в опухоль происходит через с-MET.

10 Пример 4: нанобиологическая таргетная терапия опухолей молочной железы с метастазами в головной мозг

[00141] Повышенное содержание молекул субъединицы 3 рецептора эпидермального фактора роста человека (HER3) па клеточной поверхности ассоциировано с

метастатическими опухолями молочной железы, включая опухоли, которые дают

15 метастазы в головной мозг. Тогда как в настоящее время используется целый ряд методов таргетной терапии для борьбы с периферическими опухолями молочной железы, доставка этих молекул к метастатическим очагам в головном мозге затрудняется в связи с наличием гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Примером тому служат HER2+ опухоли молочной железы, которые метастазируют в головной мозг: несмотря

20 на то, что эти опухоли поддаются таргетной терапии за пределами центральной нервной системы (ЦНС) с помощью антител к HER2, таких как трастузумаб, они недоступны воздействию этих же антител, поскольку несмотря на наличие субъединицы HER2 на эндотелии головного мозга, она не опосредует трансцитоз антител через стенку кровеносного сосуда.

25 [00142] С другой стороны, HER3 подвергается быстрому трансцитозу через эндотелий головного мозга при связывании с лигандом, что, как правило, происходит для обеспечения доставки ростовых факторов - нейрорегулинов для обеспечения роста и поддержания нервов. Авторы разработали самособирающуюся нанобиологическую частицу, HerMn, которая использует HER3 в качестве ворот для направленной доставки

30 токсичных молекул в опухолевые клетки. HerMn представляет собой частицу диаметром 10-20 нм, устойчивую к воздействию сыворотки крови, состоящую из рецептор-направленного белка, обеспечивающего проникновение в клетку, HerPBK10, нековалентно связанного с комплексом сульфированного коррола с марганцем (III) (S2Mn или Mn-коррол) (ФИГ. 11). Нацеливающий домен HerPBK10 получают из лиганда,

35 альфа-херегулина, который специфически взаимодействует с субъединицей 3 рецептора эпидермального фактора роста человека (HER3) и быстро индуцирует развитие рецептор-опосредованного эндоцитоза. Так как HER3 является предпочтительным партнером HER2 по димеризации, а гетеродимеры HER2-3 наиболее широко представлены на HER2+ опухолевых клетках, ранее авторами было показано, что HerPBK10 может

40 обеспечивать направленную доставку терапевтических и визуализирующих молекул в HER2+ опухоли у мышей, что опосредовало подавление роста опухоли при использовании в десятикратно меньшей дозе по сравнению с химиотерапевтическим средством, доксорубицином, в отсутствие кардио- и гепатотоксичности и без выраженной иммуногенности. Токсическое действие HerMn, направленное на опухоли, реализуется

45 путем разрушения митохондриальной мембраны и повреждения цитоскелета, опосредованного супероксид-анион радикалами. HerMn также может обеспечивать селективную детекцию опухолей с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) благодаря парамагнитному свойству коррола.

[00143] По-видимому, HerMn попадает в головной мозг после системной инъекции у мышей помимо проявления избирательного накопления и токсического действия на подкожные HER2+ опухоли. Интересно отметить, что Mn-коррол, как известно, оказывает нейропротекторное действие на нормальную ткань благодаря его

- 5 антиоксидантной активности. В подтверждение этого, HerMn поддерживает выживание клеток кардиосфер человека *ex vivo*. В целом, интересно предположить, что HerMn может обладать способностью оказывать избирательное токсическое действие на опухоли молочной железы с метастазами в головной мозг, не действуя на нецелевые ткани за счет направленной активности и способности оказывать благоприятное
- 10 защитное действие на здоровые ткани головного мозга и сердца.

Уровень техники

[00144] Метастазированье в головной мозг представляет серьезную клиническую проблему. Пациенты со злокачественными опухолями молочной железы, которые метастазируют в головной мозг, в среднем живут менее одного года. Несмотря на

- 15 появление большого числа препаратов таргетной терапии для лечения периферических опухолей, большинство из них не подходят для лечения метастазов в головной мозг из-за их неспособности к преодолению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Примером этого является применение моноклонального антитела, трастузумаба (Tz), которое направлено против субъединицы 2 рецептора эпидермального фактора роста человека
- 20 (HER2), для лечения HER2+ злокачественной опухоли молочной железы. HER2+ злокачественные опухоли ассоциированы с агрессивностью, резистентностью к стандартным терапевтическим препаратам, метастазированием и повышенной смирностью. HER2+ опухоли, которые метастазируют в головной мозг, не поддаются лечению Tz, поскольку несмотря на наличие HER2 на эндотелии головного мозга, он
- 25 не способен к трансцитозу через стенку кровеносного сосуда. Для лечения трижды негативного рака молочной железы (TNBC), который является HER2-, а также характеризуется метастатическим поражением головного мозга, существует еще меньше возможностей из-за недостатка специфических биомаркеров на клеточной поверхности. Несмотря на то, что липатиниб (Lp), низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы
- 30 (TKI) HER2 и EGFR, может легко проникать через клеточную мембрану для направленного воздействия на опухоли обоих типов, эти опухоли скорее всего будут устойчивы к таким ингибиторам, частично из-за повышения уровня HER3.

Результаты

[00145] HerPBK10 специфичен по отношению к HER3. HerPBK10 содержит рецептор-

- 35 связывающий участок лиганда HER3, херегулина- α (аминокислоты 35-239, содержащие Ig-подобный и EGF-подобный домены), слитый с фрагментом, который отвечает за проникновение через мембрану клетки, полученным из основания пептона капсидного белка аденоовируса (ФИГ. 11А). Первоначально HerPBK10 был сконструирован как невирусный вектор для переноса генов, имеющий функции связывания молекулярного
- 40 груза, направленного связывания с мембраной, интернализации и проникновения в эндосомы, в раках одной молекулы мультидоменного белка. Так как HER3 является предпочтительным партнером HER2 по димеризации, а гетеродимеры HER2-3 наиболее широко представлены на HER2+ опухолевых клетках, было показано, что HerPBK10 может обеспечивать направленную доставку терапевтических и визуализирующих
- 45 молекул в HER2+ опухоли у мышей, что опосредовало подавление роста опухоли при использовании в десятикратно меньшей дозе по сравнению с химиотерапевтическим средством, доксорубицином, в отсутствие кардио- и гепатотоксичности и без выраженной иммуногенности.

[00146] Специфичность HerPBK10 по отношению к HER3 подтверждается его способностью к связыванию с иммобилизованным пептидом, содержащим внеклеточный домен HER3 человека (ФИГ. 12А). Это свойство подавляется в результате предварительной адсорбции HerPBK10 на поверхности свободного пептида HER3 *in vitro* (ФИГ. 12А). Этот же пептид также подавляет связывание как с HER3+ клетками человека (ФИГ. 12В), так и мыши (ФИГ. 13В-С). Надо отметить, что лиганд-связывающий домен HER3 мыши и человека характеризуется высокой (94%) идентичностью последовательностей (ФИГ. 13А). Несмотря на то, что гетеродимеры HER2-3 наиболее широко представлены на HER2+ опухолевых клетках, антитело, подавляющее гетеродимеризацию, пертузумаб (Pz), не предотвращает связывание HerPBK10 с клеточным HER3 (ФИГ. 12В), что свидетельствует о том, что для связывания HerPBK10 не требуется димеризация HER2-3. Связывание также подавляет пептид HER4 или бетацеллюлин (который блокирует HER4) (ФИГ. 12В), что свидетельствует о том, что HerPBK10 является HER3-специфическим.

[00147] Образцы сыворотки крови, полученные у пациентов с HER2+ опухолями и подобранных по возрасту контрольных пациентов, не предотвращали связывание HerPBK10 с клетками HER2+ в культуре (и между ними не было выявлено статистически значимой разницы), в отличие от группы с добавлением избытка рекомбинантного лиганда (+Her), использованного в качестве конкурентного ингибитора (ФИГ. 12С).

Предыдущие исследования показали, что повторное введение HerPBK10 иммунокомпонентным мышам не приводит к образованию нейтрализующих антител против указанного белка, в количестве, которое бы поддавалось обнаружению. Более того, поликлональные антитела, полученные против цельного аденоовириуса, которые могут распознавать HerPBK10, не предотвращали связывания рецепторов с клетками в культуре.

[00148] Самосборка HerPBK10 с Mn-корролами приводит к образованию наночастиц HerMn. Карбоксильный [C]-конец HerPBK10 состоит из декализинового хвостового участка (ФИГ. 11А), который может опосредовать электрофильное присоединение к анионным молекулам, включая корролы. Корролы представляют собой макроциклические молекулы, обладающие структурным сходством с порфиринаами и подобно им, могут содержать лиганд - металл (ФИГ. 11В). Сульфированные корролы представляют собой амифильные соединения, растворимые в физиологическом растворе, и они могут спонтанно связываться с белками через нековалентные взаимодействия, включая электрофильные и гидрофобные взаимодействия. Анионные сульфонатные группы предотвращают неспецифическое попадание в клетку из-за отталкивания отрицательно заряженной клеточной мембраной, тем самым обеспечивая возможность направленной доставки коррола в клетки-мишени через белок-переносчик. Авторы объединили HerPBK10 с сульфированным корролом в комплексе с марганцем (III) (S2Mn или Mn-коррол) с образованием быстро самособирающихся частиц диаметром 10-20 нм, обозначенных HerMn (ФИГ. 11С-Д). Эти частицы содержат много молекул коррола, связанных с одним белком (25-35 молекул коррола/белок), и могут выдерживать высокоскоростную ультрафильтрацию. Эти результаты согласуются с результатами предыдущих исследований авторов и их сотрудников, в которых было показано, что корролы могут связываться в белковых карманах при незначительной диссоциации, и после связывания с HerPBK10 приобретают устойчивость к переносу на белки сыворотки крови.

[00149] Мишеню HerMn являются HER3+ опухоли. HerMn оказывает избирательное токсическое действие на HER2+/HER3+, а не HER2-/HER3- опухолевые клетки в культуре,

тогда как Mn-коррол не влияет на жизнеспособность клеток. Соответствующие данные показаны на ФИГ. 14, где на каждую клеточную линию воздействовали указанными концентрациями HerMn или S2Mn и исследовали их жизнеспособность через 24 часа с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым (КФ). N=3 на концентрацию, из

5 3 отдельных экспериментов. Было показано, что направленное связывание лиганда HerPBK10 индуцирует быстрый эндоцитоз после связывания с рецепторами. Поскольку сульфированные корролы неспособны сами по себе нарушать целостность эндосомальной мембраны, фрагмент-основания пептона HerPBK10 обеспечивает эффективное разрушение мембраны после эндоцитоза и попадание в цитоплазму.

10 [00150] В одном эксперименте на клетки воздействовали 10 мкМ S2Mn или HerMn, затем TMRM (30 нМ) в HBSS через 24 часа. Результаты показаны на ФИГ. 15А, где контрольные клетки обрабатывали PBS. Снимки, полученные с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа, ФИГ. 15В, показывают опосредованное супероксид-анионом разрушение актиновых филаментов (красный) и тубулина (зеленый)

15 под воздействием HerMn (5 мкМ) через 24 ч после инкубации с клетками MDA-MB-435. S2Mn (5 мкМ), HerPBK10 (с эквивалентной концентрацией белка, что и HerMn) и PBS служили в качестве контролей. На дополнительные клетки воздействовали Tiron (5 мМ) в течение 1 ч до обработки HerMn. Синий, ядро. Шкала = 10 мкм.

[00151] После попадания в цитоплазму, HerMn нарушает потенциал

20 митохондриальной мембраны (ФИГ. 15А) и цитоскелет через увеличение образования супероксиданионов и окислительное повреждение этих структур (ФИГ. 15В), что согласуется с данными по комплексу коррола с галлием (III) (S2Ga или Ga-коррол).

25 [00152] Установлено, что Ga-коррол напрямую связывает белок внешней мембранный митохондрий, TSPO. Результаты показаны на ФИГ. 16. Растворимый рекомбинантный белок TSPO инкубировали с S2Ga в эквивалентных молярных концентрациях (1 мкМ) в течение ~20 минут при комнатной температуре с последующей ультрафильтрацией для удаления свободного, несвязавшегося S2Ga. В ультраконцентратах оценивали содержание коррола, связавшегося с белком TSPO, путем измерения абсорбции и спектров флуоресценции. В указанных случаях, PK11195 был использован в качестве

30 конкурентного ингибитора за сайт связывания порфирина на TSPO (ФИГ. 16А-В).

Приведены данные по взаимодействию HerGa с TSPO *in situ*. Клетки MDA-MB-435 трансфецировали плазмидой, экспрессирующей экзогенный TSPO (в качестве конкурентного ингибитора связывания с эндогенным TSPO), за 24 ч до того, как данные клетки обрабатывали HerGa, и исследовали на предмет HerGa-опосредованного

35 нарушения функции митохондрий, о чем свидетельствовало уменьшение накопления красного флуоресцентного красителя в митохондриях, а также накопление зеленого флуоресцентного красителя в цитоплазме (ФИГ. 16С-D).

40 [00153] TSPO отвечает за транслокацию порфиринов и других метаболитов в митохондрии для метаболизма, взаимодействует с компонентами переходного порового комплекса, отвечающего за проницаемость митохондрий, и вносит вклад в клеточный гомеостаз. Ga-коррол специфически распознает сайт связывания порфирина на TSPO (ФИГ. 16А-В), поскольку связывание коррола может конкурентно подавляться PK11195, который подавляет связывание порфирина с TSPO. Сверхэкспрессия рекомбинантного растворимого TSPO в клетках MDA-MB-435 предотвращает коррол-опосредованное

45 нарушение потенциала митохондриальной мембранны (ФИГ. 16С-D), что указывает на то, что коррол взаимодействует с TSPO *in situ*. Так как Mn-коррол аналогичным образом нарушает потенциал митохондриальной мембранны, что и Ga-коррол, по-видимому, TSPO представляет собой молекулярную мишень Mn-коррола. В модели

ксенотрансплантации опухоли мышам HerMn направляется к опухоли *in vivo* после системного введения в обход большинства нормальных тканей, включая сердце (ФИГ. 17), и подавляет рост опухоли в очень низкой фармакологической дозе (0,008 мг/кг) (ФИГ. 18А). Mn-коррол также является парамагнетиком, следовательно, пригоден для

5 МРТ.

[00154] Обнаружено, что помимо накопления в опухолях после системного введения мышам, HerMn может попадать в головной мозг в отличие от трастузумаба (Tz) (ФИГ. 17). После введения HerPBK10 мышам без опухолей в хвостовую вену также отмечалась его локализация в головном мозге, тогда как после системного введения PBK10 (в

10 котором отсутствует нацеливающий лиганд HER3) не отмечалась доставка в головной мозг (ФИГ. 19). Также было установлено, что HerMn не только нетоксичен для клеток кардиосфер (CDC) человека, но при увеличивающихся дозах с продолжительным

15 воздействием увеличивает жизнеспособность CDC в культуре, в отличие от доксорубицина (который, как известно, отличается кардиотоксичностью), и отдельно

15 взятого HerPBK10, который не оказывает токсичного или ростстимулирующего действия на опухолевые клетки или CDC (ФИГ. 18В). Это подтверждает предыдущие результаты, полученные на модели невропатии зрительного нерва *in vitro* и *in vivo*, в которой было показано, что Mn-коррол может обладать нейропротекторным действием. По-видимому, это является уникальным свойством Mn-коррола, поскольку Ga-коррол не оказывал

20 такого нейропротекторного действия.

[00155] В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что HerMn оказывает благоприятное воздействие на нормальную ткань, при этом оказывает направленное токсическое действие на опухолевую ткань, особенно в случае метастазов в головной мозг с повышенной экспрессией HER3. Направленная специфичность HerMn делает

25 этот вопрос менее значимым, поскольку, по-видимому, лишь незначительная доля частиц после системного введения будет попадать в нормальную ткань (ФИГ. 17). Но поскольку коррол в относительно низких количествах обеспечивает нейропротекцию, а также токсическое действие на опухоль (ФИГ. 18А), эта потенциальная двойная активность заслуживает изучения.

30 Применения

[00156] HerMn обладает способностью к оказанию токсического действия на опухоли молочной железы с метастазами в головной мозг, при этом сохраняя нецелевые ткани как за счет способности к направленной активности, так и способности защищать здоровые ткани головного мозга и сердца.

35 Пример 5: Направленное связывания с бета-1 интегринами с использованием пептида-производного инвазина *Yersinia enterocolitica*

[00157] *Yersinia enterocolitica* представляет собой патогенную бактерию, которая проникает в кишечный эпителий, в особенности в пейеровы бляшки, расположенные в стенке кишечника, и вызывает пищевое отравление. Прикрепление и проникновение

40 через кишечный эпителий осуществляется посредством взаимодействия бактериального белка - инвазина (Inv) с бета-1 интегринами, которые преимущественно экспрессируются на эпителиальных клетках, расположенных выше пейеровых бляшек.

[00158] Плазмида, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую Инвазин (рНIT123-Inv), была использована в качестве матрицы для ПЦР, а

45 олигонуклеотидные праймеры были сконструированы для амплификации минимальной последовательности, кодирующей сайт связывания бета-1 интегрина (~600 п.н.), при этом были введены сайты рестрикции для клонирования в рамку считывания в гены экзогенных пептидов для обеспечения направленной доставки. Используемые праймеры

включали следующие последовательности: 5'-

ACAGAGCTCATAACCGGCATTAACGTGAAT-3' (SEQ ID NO: 6); 5'-

CTGTGTGCGGAGCCGCAATAGGAATTCATC-3' (SEQ ID NO: 7); и 5'-

GATGAATTCCATTGCGGCTCCGCACACAG-3' (SEQ ID NO: 8). Эти праймеры

используются для амплификации и добавления сайтов рестрикции SacI и EcoRI во вставку Inv. Дополнительные праймеры включали следующие последовательности: 5'-

GTCCAAAACCAAGAAAAGGCGGAGCAGCTGTAC-3' (SEQ ID NO: 9); 5'-

ACAATGACGCGTGTACAGCTGCCGTTCTGGTTGGAC-3' (SEQ ID NO: 10); 5'-

CCGCTGTGCGGAGCCGCAAGGAGGAACGCGTACACAC-3' (SEQ ID NO: 11); 5'-

10 GTGTGTACGCGTTCCTCCTGCGGCTCCGCACACAGCGG-3' (SEQ ID NO: 12); и 5'-

ACACACGGATCCTTGCGGCTCCGCACACAGCGG-3' (SEQ ID NO: 13). Эти праймеры

используются для вставки сайтов рестрикции MluI или BamHI для клонирования либо в область белка головы (Knob), либо в полноразмерную конструкцию белка нити (fiber).

[00159] Гены экзогенных пептидов кодируют белки нити и головы капсида

аденовируса (Ad). Нить обозначает каждый из антенноподобных отростков, выступающих из капсида Ad, которые опосредуют первичное связывание с клетками для запуска инфекционного процесса, и состоят из N-концевого длинного фибриллярного домена shaft (центральная часть) за которым следует C-концевой глобулярный домен knob (голова). Домен knob - это домен, который специфически взаимодействует с

рецептором клеточной поверхности и образуется в виде растворимого белка в отсутствие shaft- домена. Inv является эффективным лигандром при слиянии с PBK10.

[00160] Последовательность Inv встраивается в knob-домен с использованием двух стратегий, заключающихся в замене субдоменов knob-домена на Inv, что приводит к получению рекомбинантных knob-конструкций, ABCJ-Inv и AGJ-Inv. Рекомбинантный белок получают в клетках бактерий с помощью векторов pRSET, экспрессирующих эти конструкции, как в виде белка с N-концевым GFP-тегом (GFP-ABCJ-Inv и GFP-AGJ-Inv), так и виде белка, не содержащего тег. Согласно третьей стратегии Inv был встроен в петлю DG knob-домена и использован для трансляции *in vitro* для получения S35-меченого белка. Нативный гель-электрофорез показал, что рекомбинантный белок был способен к образованию олигомеров (димеры и тримеры) аналогично растворимому knob-белку дикого типа (тем самым свидетельствуя о том, что вставка Inv не нарушает третичную структуру слитого белка). Во всех условиях образовался полноразмерный растворимый белок.

[00161] Были также созданы конструкции, в которых Inv был заменен на knob-домен полноразмерного белка нити. Бакуловирусный вектор был использован для экспрессии указанного белка в клетках бактерий. Вторая конструкция нити была создана для экспрессии Inv между shaft- и knob- доменами полноразмерного белка нити, причем сайт расщепления фактора X был введен между Inv и Knob.

Пример 6: Лиганд для CD4

[00162] Для связывания с CD4 достаточно аминокислотной последовательности, T1 TLPCRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTR (SEQ ID NO: 5), полученной из CD4-связывающего домена белка оболочки gp120 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Эта последовательность была получена с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5 (~132 нуклеотидов), клонировали в плазмиду pBluescript (PSK). Анализ окрашенного этидий-бромидом электрофоретического геля показал вырезание вставки (~132 нуклеотидов) из вектора (~3 т.п.н.) с помощью расщепления BamHI-EcoRI. Полученный в результате продукт затем встраивается в рамку считывания с экзогенными

пептидами, такими как РВК10, для направленной доставки таких белков-транспортеров в клетки, экспрессирующие CD4 (т.е. «Т-хелперы»).

(57) Формула изобретения

- 5 1. Способ адресной доставки молекулярного груза в головной мозг субъекта, страдающего от злокачественной опухоли головного мозга, включающий: системное введение субъекту композиции, содержащей:
 - 10 молекулу для адресной доставки лекарственного средства и молекулярный груз, причем молекула для адресной доставки лекарственного средства содержит лиганд, направленно связывающийся с HER3, сегмент основания пептона и домен, связывающий молекулярный груз;
 - 15 при этом молекула для адресной доставки лекарственного средства и молекулярный груз проникают через гематоэнцефалический барьер в организме субъекта и обеспечивают доставку молекулярного груза в головной мозг субъекта.
- 15 2. Способ по п. 1, где молекулярный груз представляет собой терапевтическое средство.
3. Способ по п. 1, где молекулярный груз представляет собой химиотерапевтический препарат.
4. Способ по п. 1, при котором молекулярный груз доставляют в злокачественную 20 клетку в головном мозге.
5. Способ по п. 1, при котором молекулярный груз доставляют в метастазирующую злокачественную опухоль в головном мозге.
6. Способ по п. 1, где лиганд получен из альфа-херегулина.
7. Способ по п. 1, где молекулярный груз включает двуцепочечную молекулу ДНК.
- 25 8. Способ по п. 3, где химиотерапевтический препарат представляет собой доксорубицин.
9. Способ по п. 1, где молекулярный груз включает коррол.
10. Способ по п. 9, где коррол включает марганец, железо или галлий.
11. Способ по п. 1, при котором молекулярный груз доставляют в головной мозг 30 для визуализации в головном мозге.
12. Способ по п. 1, дополнительно включающий визуализацию головного мозга с помощью магнитно-резонансной томографии.
13. Способ по п. 1, где молекулярный груз включает нуклеиновую кислоту.
14. Способ по п. 1, где молекулярный груз включает РНК.
- 35 15. Способ по п. 1, где молекулярный груз включает ДНК.
16. Способ по п. 1, где молекулярный груз включает миРНК.
17. Способ по п. 1, где лиганд включает Ig-подобный и EGF-подобный домены альфа-херегулина.
18. Способ по п. 1, где домен, связывающий молекулярный груз, включает 40 декализиновый мотив.
19. Способ по п. 1, где молекулярный груз связан с доменом, связывающим молекулярный груз, посредством электростатических взаимодействий.
20. Способ по п. 1, где сегмент основания пептона представляет собой белок основания пептона аденоовириуса или его фрагмент.
- 45 21. Способ по любому из пп. 1-20, где молекула для адресной доставки лекарственного средства представляет собой HerPВК10.

1

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER

<120> РЕЦЕПТОР-НАПРАВЛЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> EOS.005PCT

<150> 61/928903

<151> 2014-01-17

<160> 13

<170> PatentIn в версии 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

agtgagctcg agactatcac tgtg 24

<210> 2

<211> 51

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

2

<400> 2

gttggtgact ttctccacc ttcaccacct tcatcttagat atccatggta t 51

<210> 3

<211> 6

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная последовательность

<400> 3

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 4

<211> 30

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 4

cgcctgagca acgcggcgaa catccgcaag 30

<210> 5

<211> 44

2

3

<212> ПРТ

<213> Вирус иммунодефицита человека

<400> 5

Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln

1 5 10 15

Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg

20 25 30

Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg

35 40

<210> 6

<211> 30

<212> ДНК

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 6

acagagctca taaccggcat taacgtgaat 30

<210> 7

<211> 30

<212> ДНК

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 7

ctgtgtgcgg agccgcaata ggaattcatc 30

<210> 8

<211> 30

<212> ДНК

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 8

gatgaattcc tattgcggct ccgcacacag 30

<210> 9

<211> 33

<212> ДНК

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 9

gtccaaaacc aagaaaaggc ggaggcagctg tac 33

<210> 10

<211> 45

<212> ДНК

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 10

acaatgacgc gtgtacagct gctccgcctt ttcttggttt tggac 45

<210> 11

<211> 39

<212> ДНК

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 11

ccgctgtgtg cgaggccgca aggaggaacg cgtacacac 39

<210> 12

<211> 39

<212> ДНК

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 12

gtgtgtacgc gttcccttgcgacacagcg 39

<210> 13

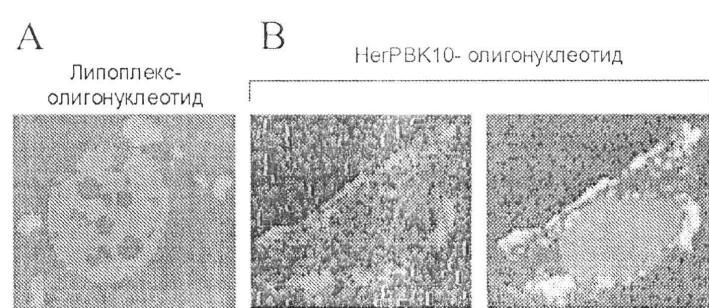
<211> 33

<212> ДНК

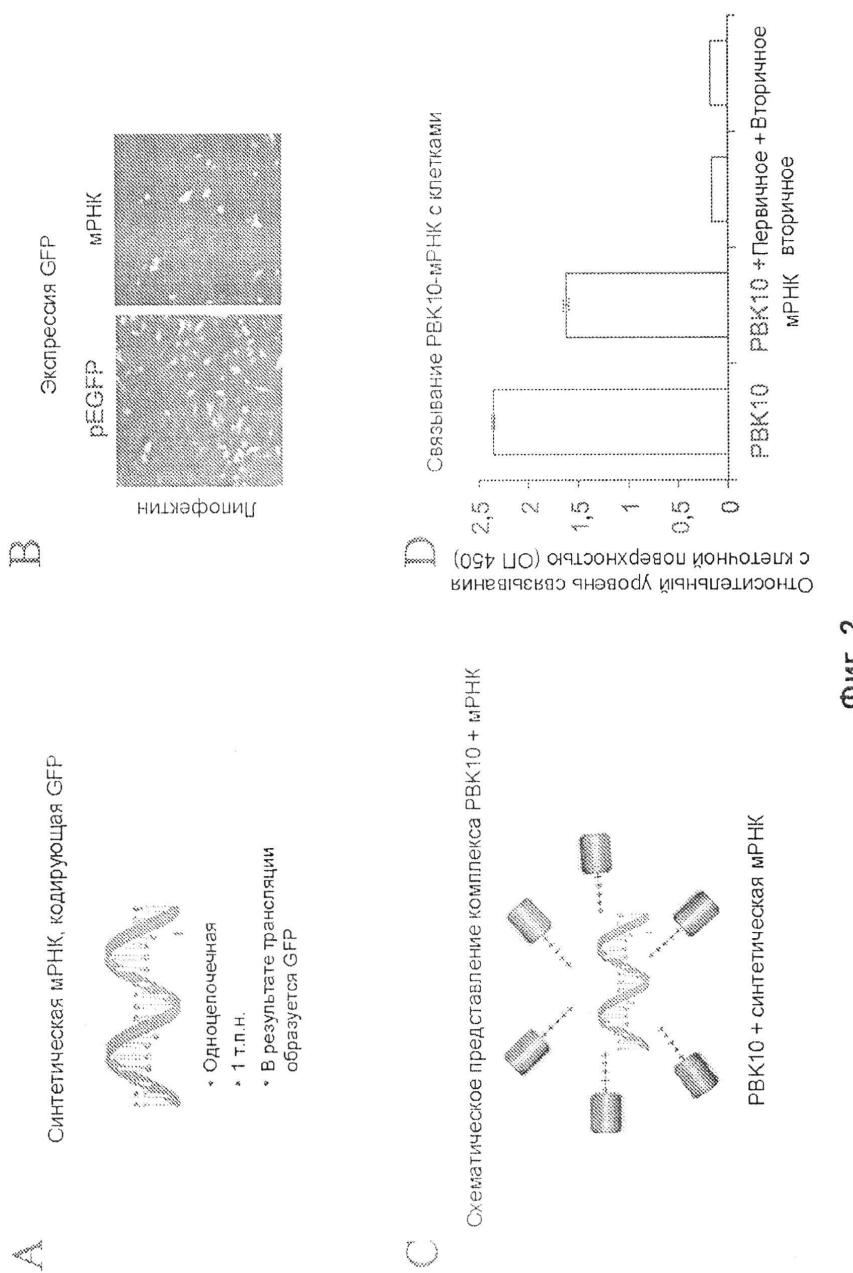
<213> Yersinia enterocolitica

<400> 13

acacacggat ccttgccgct ccgcacacag cg 33



Фиг. 1



3/22

E

Попадание PBK10-мРНК в клетку

0 мин. 5 мин. 120 мин.

Зеленый, комплекс PBK10/мРНК;
красный, актин; синий, ядро**F**

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии GFP

Липофекチン+рEGFP Липофекチン +мРНК PBK10+мРНК

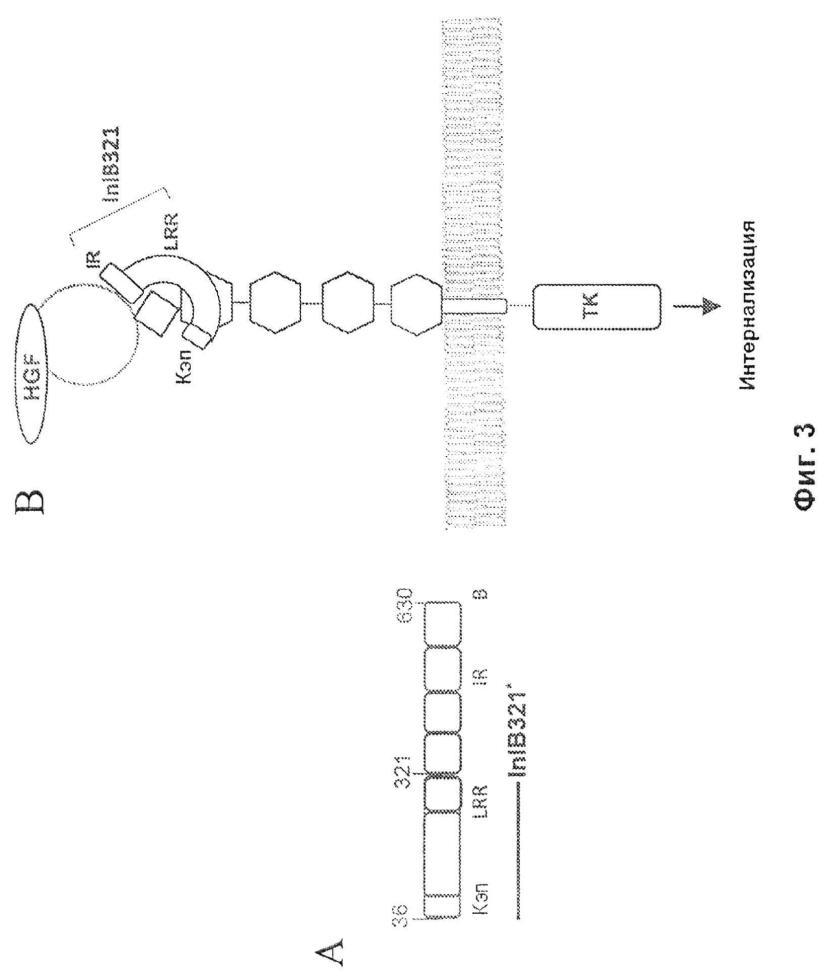


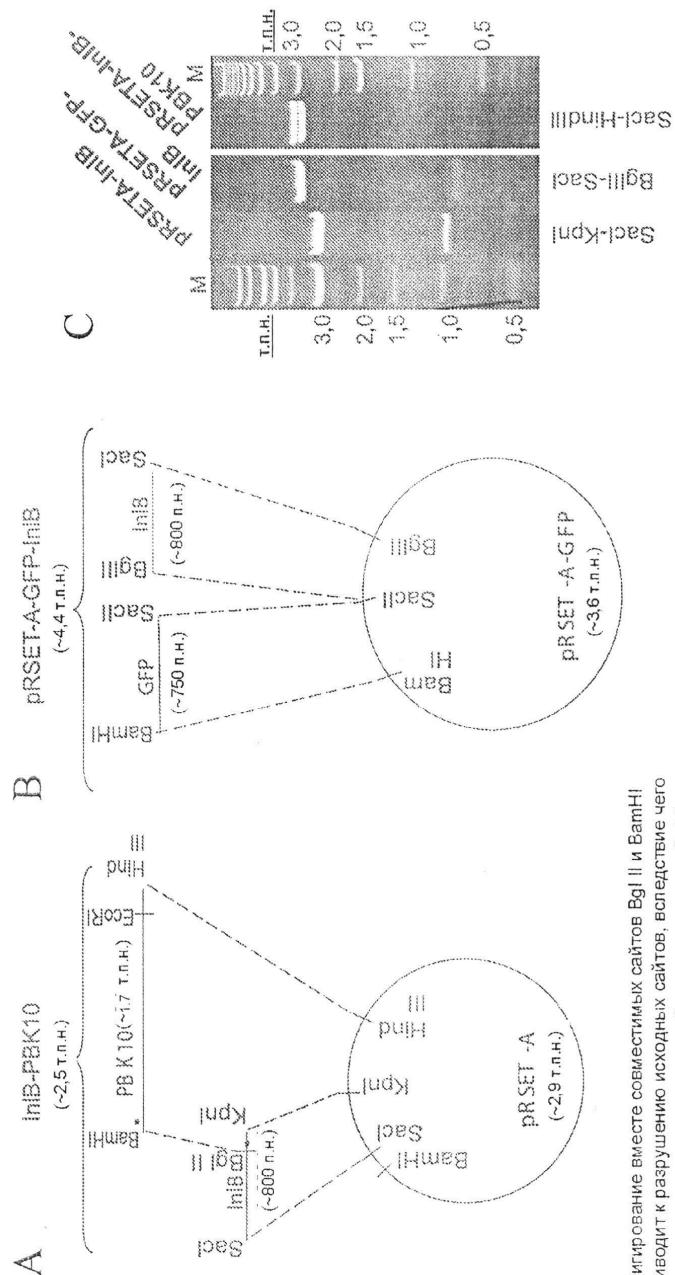
Зеленый, GFP; Красный, актин; синий, ядро

G

Оптимальное соотношение PBK10:мРНК

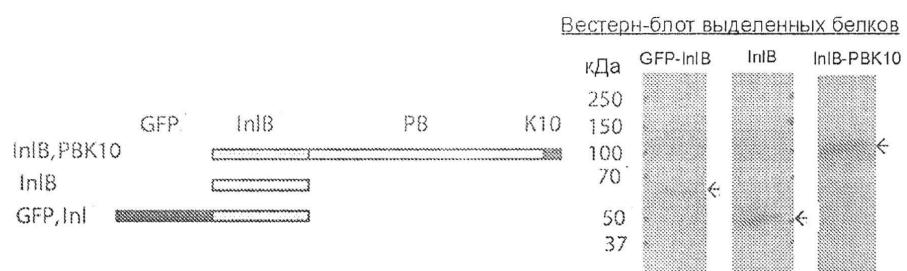
**Фиг. 2**

**Фиг. 3**

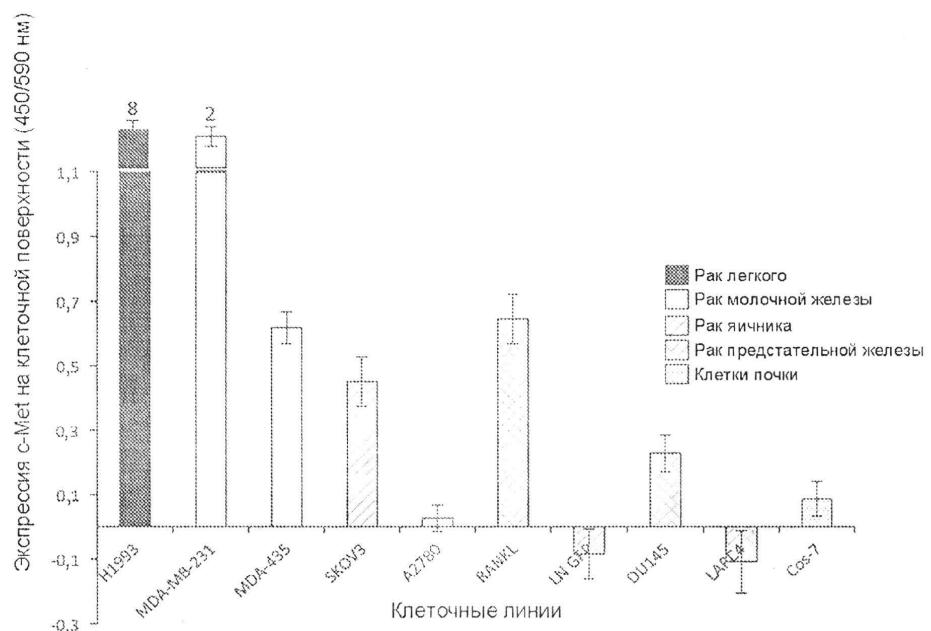


Фиг. 4

* Лигирование вместе совместимых сайтов Bgl II и BamHI приводит к разрушению исходных сайтов, вследствие чего продукт лигирования не может быть распознан ни Bgl II, ни BamHI для последующего расщепления

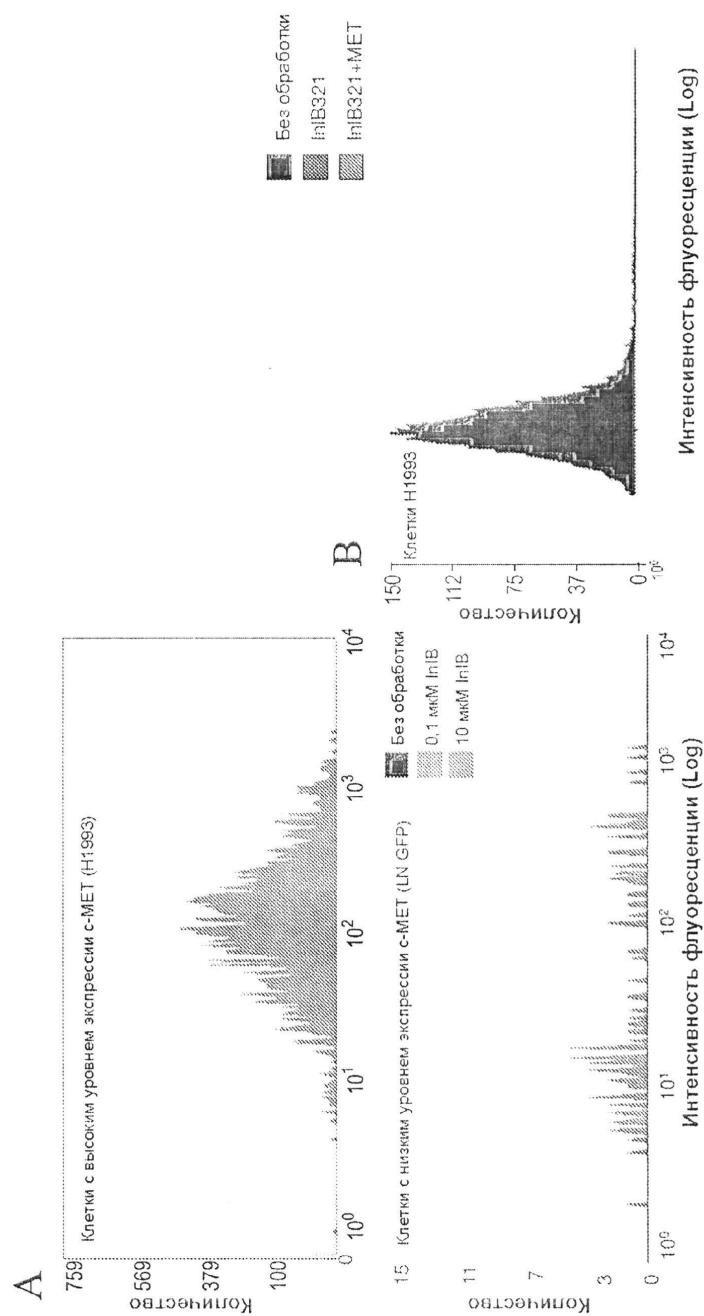


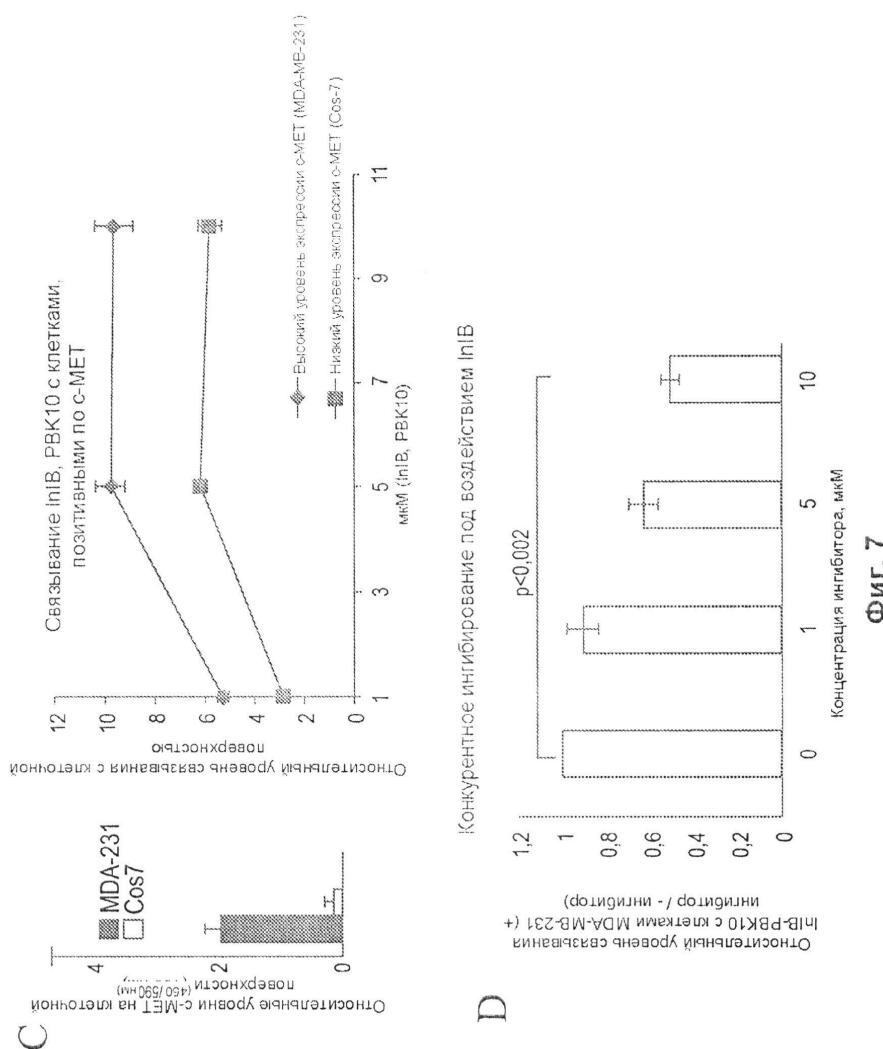
Фиг. 5



Фиг. 6

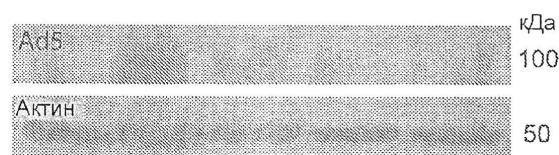
7/22

**Фиг. 7**

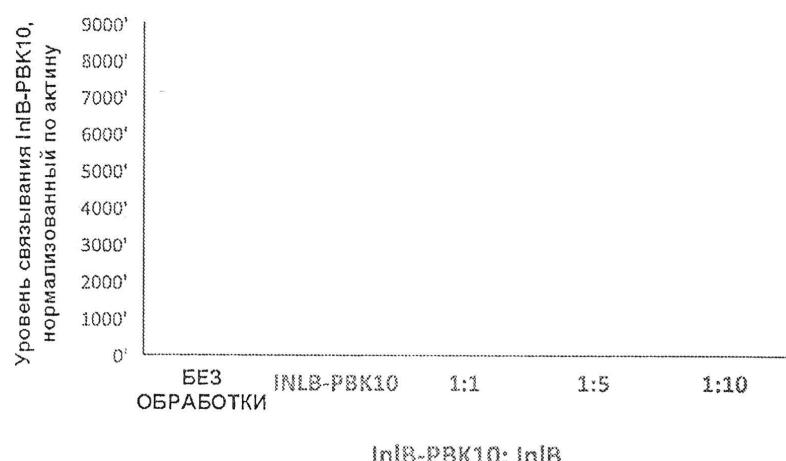


Фиг. 7

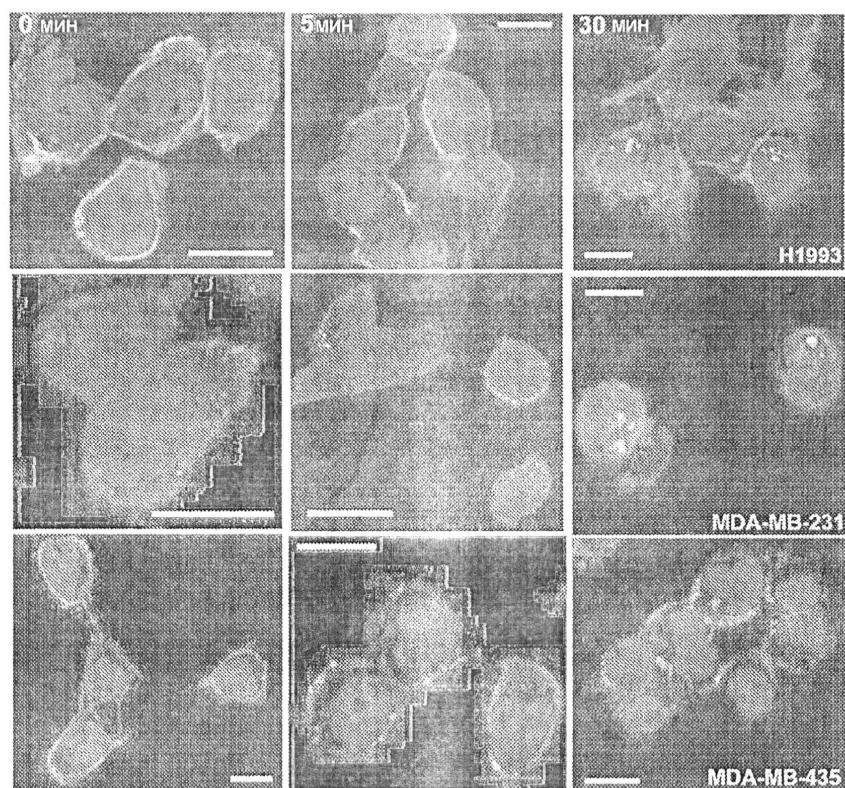
E



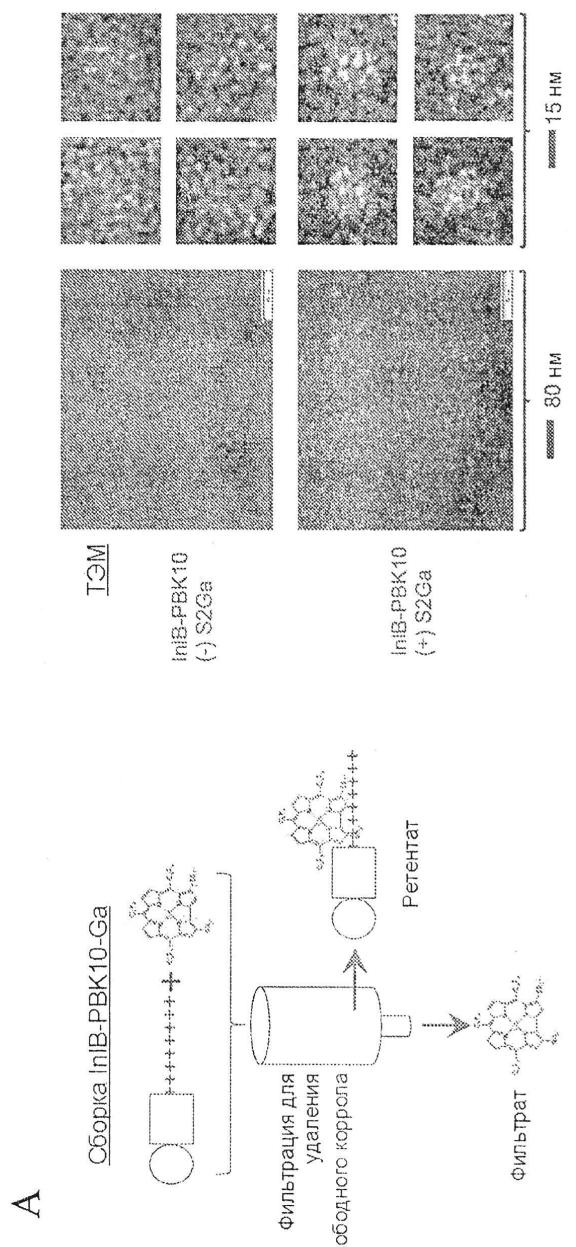
- Дорожка 1: Без обработки
- Дорожка 2: Только InIB-PBK10
- Дорожка 3: 1:1 InIB-PBK10; InIB
- Дорожка 4: 1:5 InIB-PBK10; InIB
- Дорожка 5: 1:10 InIB-PBK10; InIB



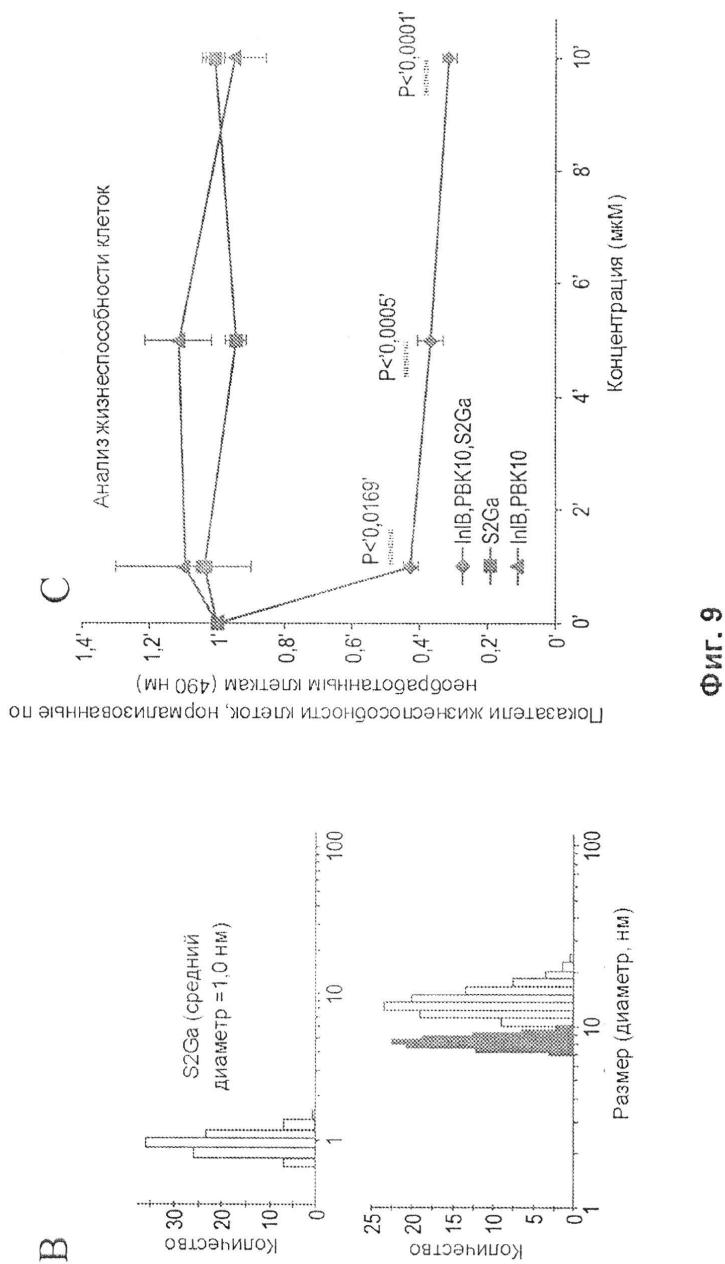
Фиг. 7



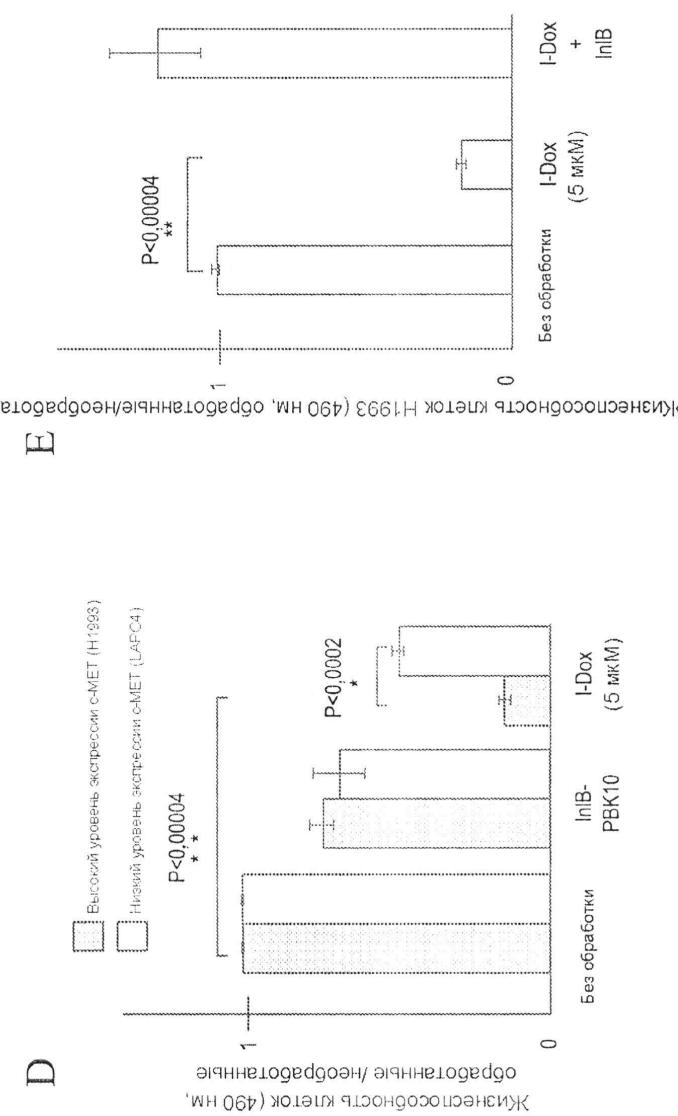
Фиг. 8



Фиг. 9

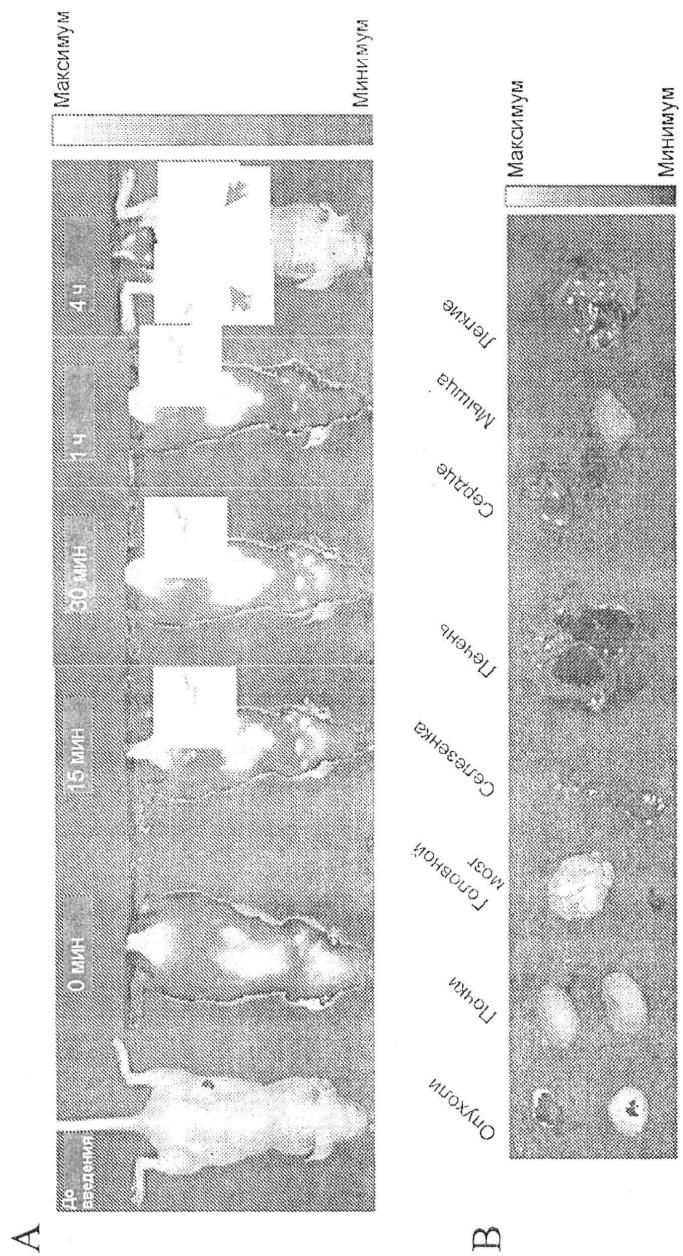


Фиг. 9



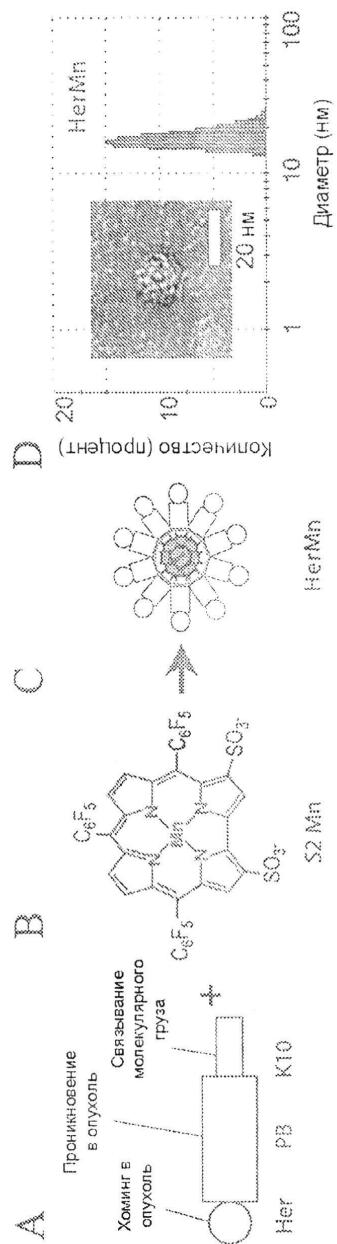
Фиг. 9

14/22

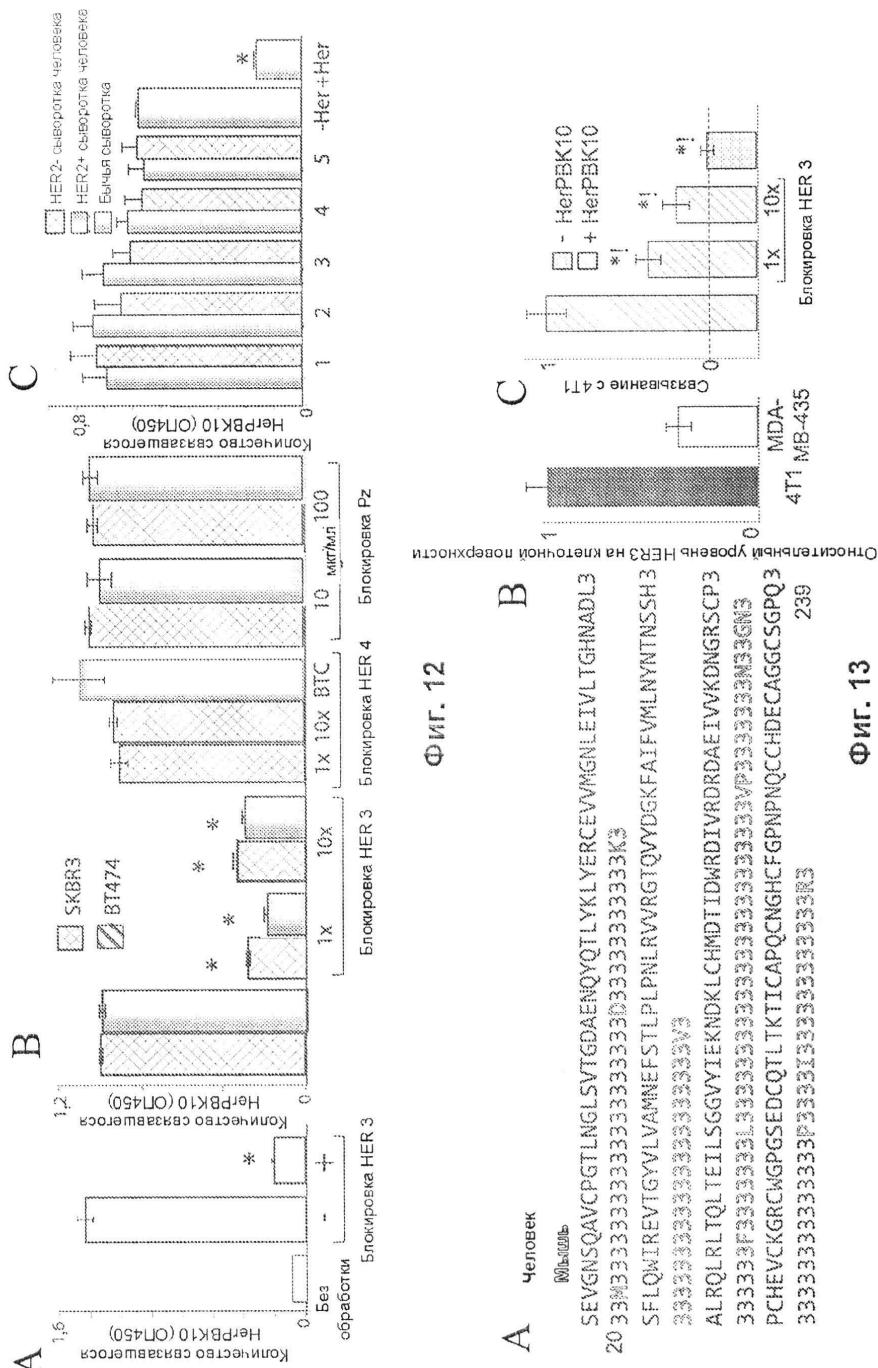


ФИГ. 10

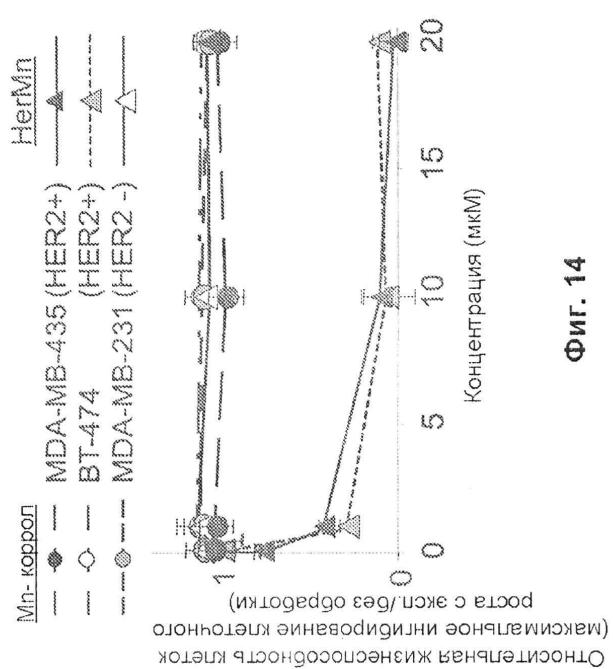
15/22



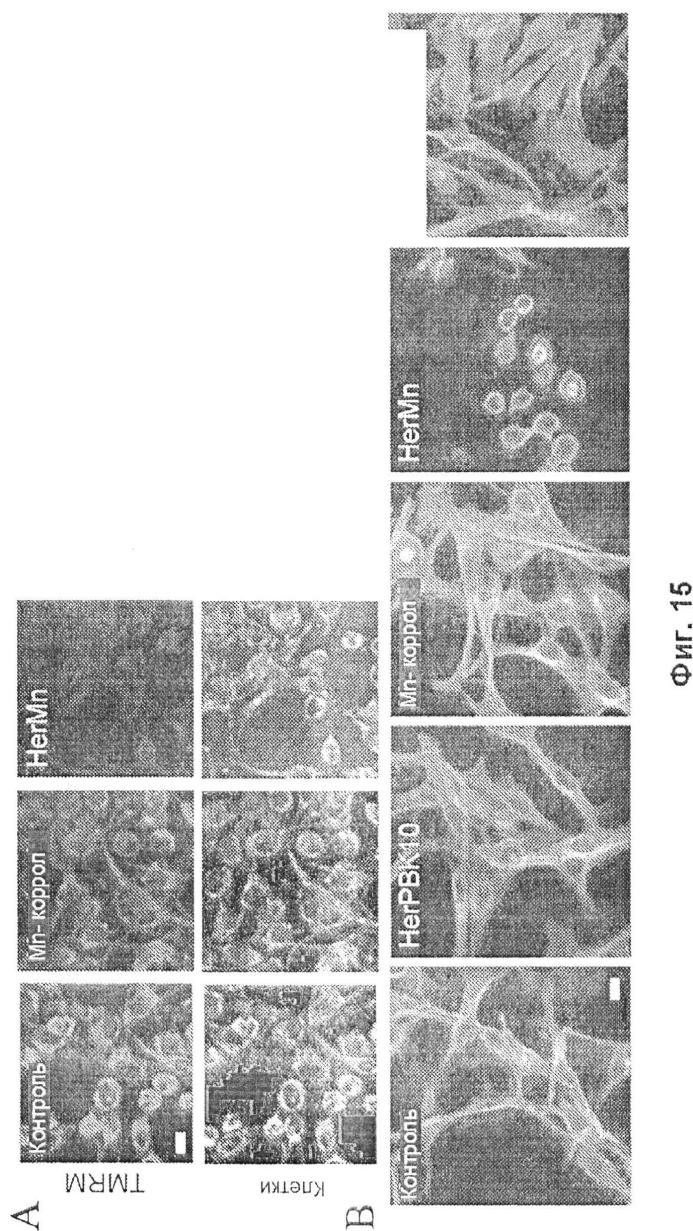
ФИГ. 11



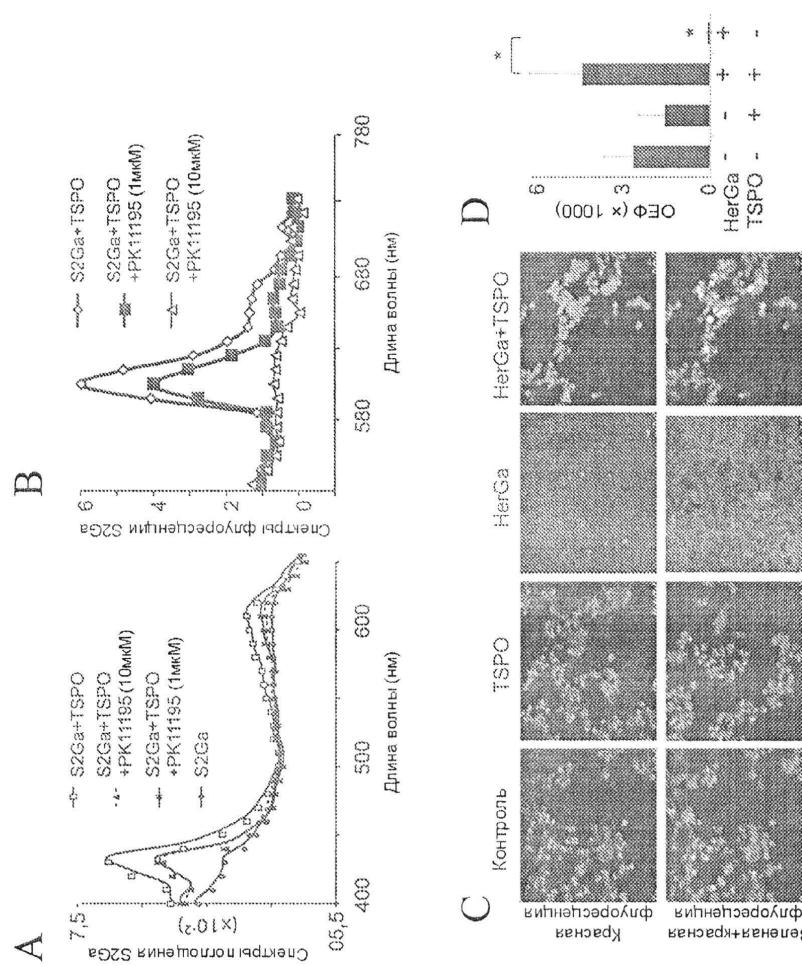
17/22



Фиг. 14

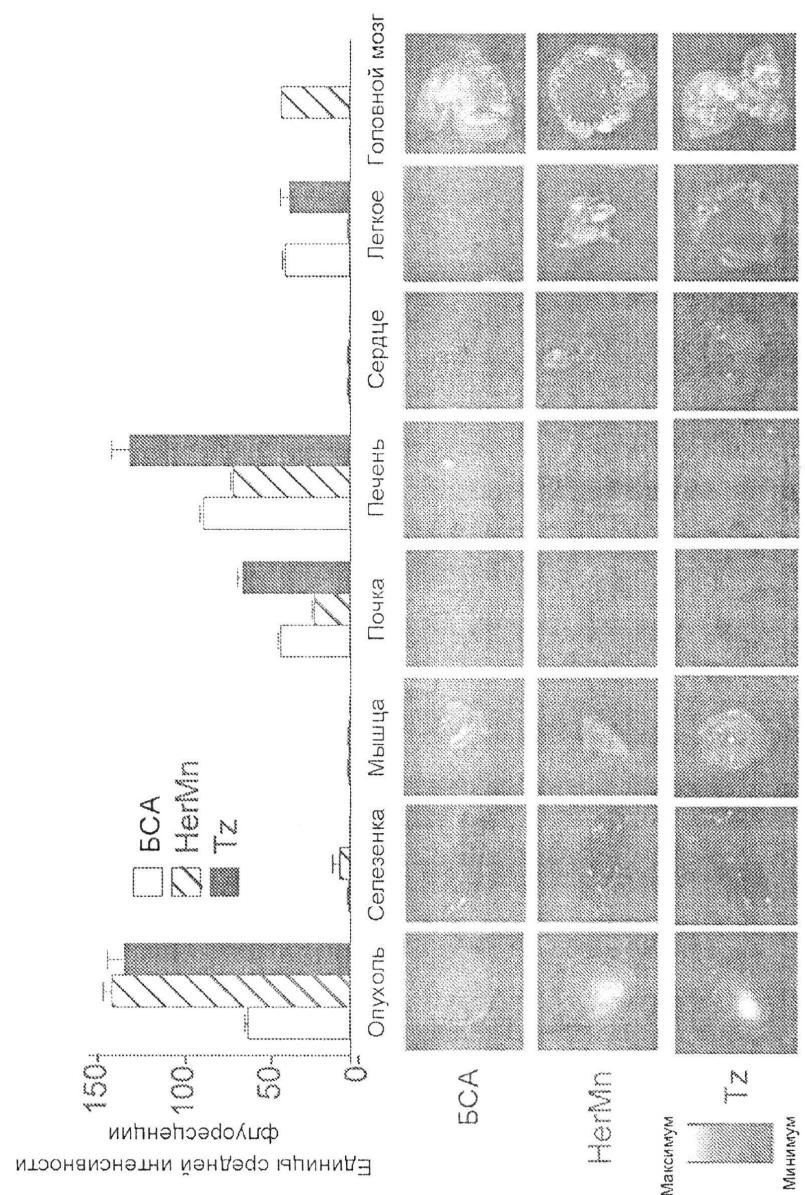


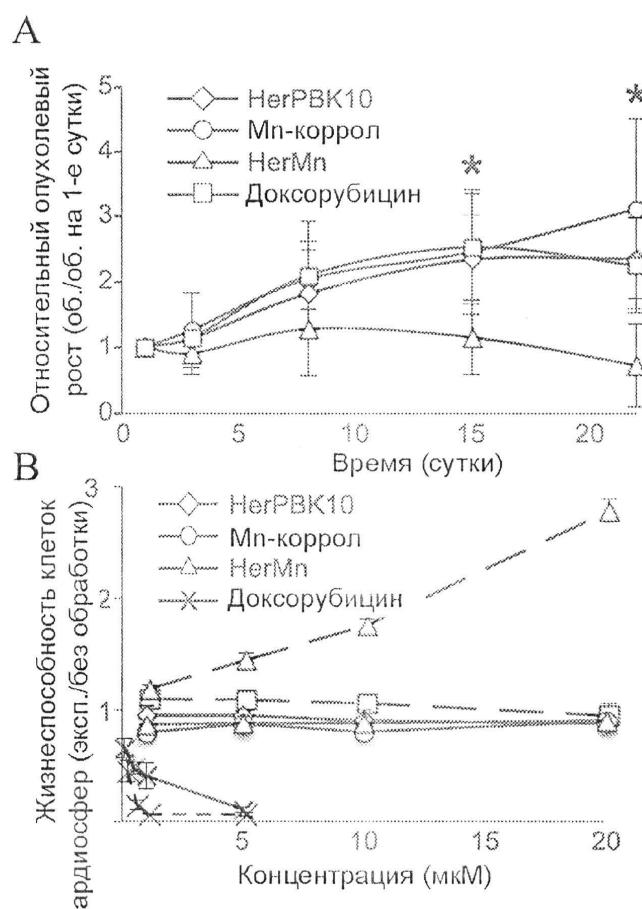
ФИГ. 15



Фиг. 16

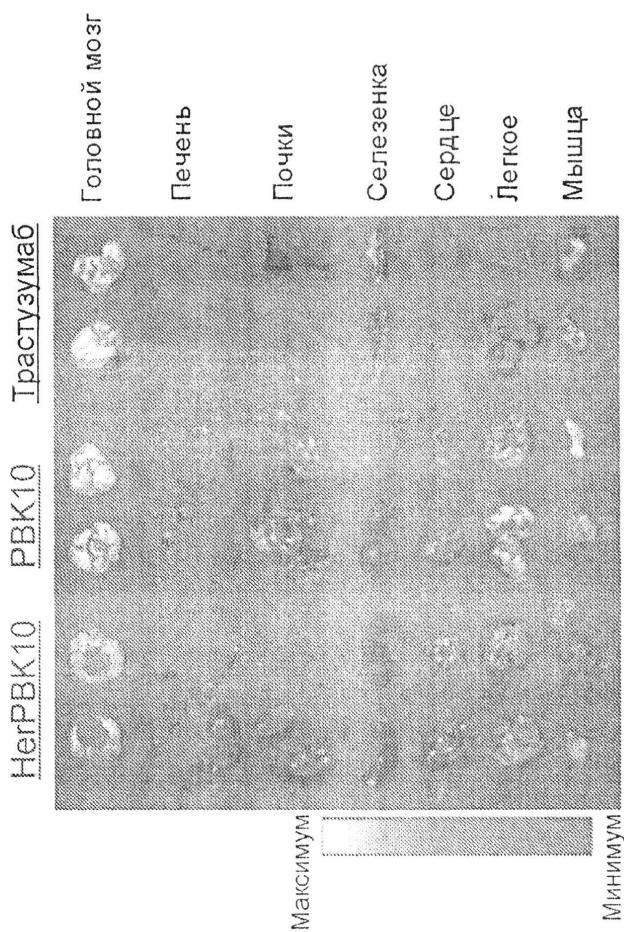
20/22





Фиг. 18

22/22



Фиг. 19