

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047252**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | | |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>A61K 9/08</i> (2006.01) |
| 2024.06.25 | | <i>A61K 9/19</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки | | <i>A61K 47/02</i> (2006.01) |
| 202192838 | | <i>A61K 47/18</i> (2017.01) |
| (22) Дата подачи заявки | | <i>A61K 47/26</i> (2006.01) |
| 2020.07.07 | | |

(54) **СТАБИЛЬНЫЕ СОСТАВЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ**

- | | |
|---|-----------------------|
| (31) 201921027358 | (56) WO-A1-2020104911 |
| (32) 2019.07.09 | WO-A2-2020044296 |
| (33) IN | US-A1-2018169260 |
| (43) 2022.04.20 | US-B2-9981007 |
| (86) PCT/IB2020/056361 | |
| (87) WO 2021/005500 2021.01.14 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИЧЕМ ЛАБОРАТОРИС ЛТД (IN) | |
| (72) Изобретатель:
Сат Дхананджай, Падхи Биджай,
Мишра Вивек, Джейн Анупам (IN) | |
| (74) Представитель:
Сагитов В.Р. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к стабильным составам рекомбинантных белков. В частности, изобретение относится к составам рекомбинантных лектинов, происходящих из лектина *Sclerotium rolfsii*. Состав содержит рекомбинантный лектин, происходящий из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Изобретение также относится к стабильным жидким и/или лиофилизированным составам, содержащим рекомбинантные лектины, происходящие из лектина *Sclerotium rolfsii*.

B1

047252

047252
B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным белкам, происходящим из почвенного гриба, и их терапевтически эффективным составам. В частности, настоящее изобретение относится к рекомбинантным лектинам, происходящим из лектина *Sclerotium rolfisii*, и их стабильным жидким и/или лиофилизированным составам.

Уровень техники

Разработка рекомбинантных белков стала важным прорывом в биомедицинской биотехнологии. Известно, что они являются сильнодействующими лекарственными средствами, не обладающими неспецифическими побочными эффектами, и используются для лечения таких заболеваний, как диабет, карликовость, инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, апоплексия головного мозга, рассеянный склероз, нейтропения, тромбоцитопения, анемия, гепатит, ревматоидный артрит, астма, болезнь Крона и рак. Рекомбинантные гормоны, интерфероны, интерлейкины, факторы роста и ферменты являются некоторыми из рекомбинантных белков, одобренных регулирующими органами и доступных в качестве лекарственных средств в настоящее время.

Лектины представляют собой белки, связывающие углеводы, макромолекулы, обладающие высокой специфичностью в отношении углеводных групп других молекул. Многие лектины применяют в качестве биомаркеров для раннего выявления роста злокачественных новообразований, или индукторов аутофагии, тогда как другие лектины также демонстрируют способность подавлять рост раковых новообразований посредством апоптоза. Лектины применяют в качестве агента для доставки лекарственных препаратов при лечении рака, поскольку они специфично связываются с клетками злокачественных опухолей. Кроме того, поскольку лектины также модулируют ассоциированные с раком сигнальные пути, возможно их применение в качестве диагностических и терапевтических агентов для лечения рака. В настоящее время большинство доступных для приобретения лектинов происходят из растений и других эукариот.

Лектин *Sclerotium rolfisii* (SRL) представляет собой лектин, выделенный из склероций почвенного фитопатогенного гриба *S. rolfisii*. SRL обладает специфичностью в отношении антигена Томсона-Фриденрайха (TF) и антигена Tn. Антиген TF представляет собой дисахарид (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc- α -Ser/Thr), сверхэкспрессирующийся на поверхности клеток различных видов рака человека. Антиген Tn представляет собой моносахарид (GalNAc- α -). Показано, что SRL благодаря своей специфичности в отношении антигенов TF и Tn связывается с клетками рака толстой кишки, рака яичников и лейкоза человека.

В WO 2010/095143 раскрыты варианты рекомбинантного лектина Rec-2 и Rec-3, происходящие от нативной последовательности SRL путем замены 3 и 5 аминокислот соответственно. Аналогичным образом, в WO 2014/203261 раскрыт вариант рекомбинантного лектина, происходящего от нативной последовательности SRL путем замены 12 аминокислот.

Несмотря на то, что в WO 2010/095143 и WO 2014/203261 продемонстрировано, что лектины, происходящие от SRL, характеризуются высокой эффективностью против нескольких видов рака, например клеток рака толстой кишки, рака яичников и лейкоза человека, указанные источники не раскрывают их терапевтические составы для эффективного лечения рака у человека.

Существуют источники, в которых раскрыты композиции, содержащие лектин (отличные от композиций, происходящих из SRL). В источниках WO 2003/010188, WO 2003/018617, WO 2003/090774 и CN 101485880 раскрыты композиции маннозо-связывающих лектинов, содержащие агенты для поддержания изотоничности, стабилизаторы, буферы и носители.

В JP 2011126907 раскрыта фармацевтическая композиция, индуцирующая апоптоз в клетках опухоли головного мозга и содержащая лектин, обладающий специфичностью связывания по отношению к N-связанной углеводной цепи A2G2F гликопротеина. WO 2014/027958 и US 9981007 относятся к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный лектин омелы, который является растительным лектином, тогда как RU 2644332 относится к композиции белка, выделенного из омелы, которая обладает противоопухолевым действием и стабильностью в течение двух с половиной лет.

Таким образом, сообщения о терапевтически эффективных составах лектинов грибов для эффективного лечения видов рака у человека отсутствуют. Кроме того, лектин является макромолекулой по сравнению с органическими соединениями (традиционными активными фармацевтическими ингредиентами), а разработка составов макромолекул является чрезвычайно сложной и проблемной задачей. Основными проблемами являются стабильность лектина в составе и сохранение конформационной целостности по меньшей мере основной аминокислотной последовательности в лектине. Стабильность является проблемным моментом из-за высокой подверженности таких крупных белков расщеплению, что может быть обусловлено химической нестабильностью (например, любой процесс, включающий модификацию белка путем образования связи или расщепления, приводит к образованию нового химического соединения) или физической нестабильностью (например, изменения структуры белка более высокого порядка). Химическая нестабильность может быть результатом дезамидирования, рацемизации, гидролиза, окисления, бета-элиминирования или дисульфидного обмена, а физическая нестабильность может быть обу-

словлена денатурацией, агрегацией, осаждением или адсорбцией. Состав белка, готовый к выходу на рынок, должен являться безопасным для введения и оставаться физически, химически и биологически стабильным в течение рекомендуемого срока хранения.

Существует срочная потребность в разработке стабильного и эффективного состава лектинов грибов, эффективных для лечения рака. Также необходимо разработать стабильный состав при сохранении растворимости и биологической активности лектина. Таким образом, целью настоящего изобретения является разработка стабильного состава лектина, происходящего из гриба. Кроме того, целью настоящего изобретения является разработка фармацевтически приемлемого, терапевтически эффективного состава лектина. В некоторых вариантах реализации целью является обеспечение состава лектина, подходящего для энтерального или парентерального введения. Дополнительной одной целью является обеспечение стабильного лиофилизированного состава лектина, простого в работе, хранении и при доставке.

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, предложена стабильная фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного белка лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL).

Согласно конкретному аспекту настоящего изобретения, предложена стабильная фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, происходящего из SRL, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из:

- a) SEQ ID NO: 1;
- b) SEQ ID NO: 2;
- c) SEQ ID NO: 3 или

d) аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичной SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Лектин *Sclerotium rolfsii*, или SRL, представляет собой белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 1-3 представляют собой примеры аминокислотных последовательностей, по меньшей мере на 60% гомологичных SEQ ID NO: 4. В частности, SEQ ID NO: 1, 2 и 3 на 97,9, 96,5 и 91,5% гомологичны SEQ ID NO: 4 соответственно (согласно определению с помощью EMBOSS Needle).

Согласно любому из предшествующих аспектов, рекомбинантный лектин представляет собой модифицированный белок лектина (т.е. рекомбинантный белок лектина, содержащий по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углевода), согласно определению в WO 2020/044296, включенном в настоящий документ посредством ссылки, в частности, в отношении определения лектина.

Согласно некоторым вариантам реализации, указанная стабильная фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

В еще одном варианте реализации фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество содержит один или более фармацевтически приемлемых стабилизаторов.

Согласно любому из предшествующих аспектов, фармацевтически приемлемый стабилизатор содержит по меньшей мере одно из следующего:

- a) одну или более аминокислот или их фармацевтически приемлемых солей;
- b) одно или более поверхностно-активных веществ;
- c) один или более углеводов или сахаров или
- d) смесь двух или более из а)-с).

В одном из вариантов реализации фармацевтически приемлемый стабилизатор содержит:

- a) одну или более аминокислот или их фармацевтически приемлемых солей;
- b) одно или более поверхностно-активных веществ и/или
- c) один или более углеводов,

причем отношение рекомбинантного лектина к:

- i) аминокислоте или ее фармацевтически приемлемой соли находится в диапазоне от приблизительно 1:0,1 до приблизительно 1:10;
- ii) поверхностно-активному веществу находится в диапазоне от приблизительно 1:0,0002 до приблизительно 1:10;
- iii) углеводу находится в диапазоне от приблизительно 1:0,1 до приблизительно 1:150.

Согласно любому из предшествующих аспектов, стабильную фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят местно, энтерально или парентерально.

Кроме того, согласно любому из предшествующих аспектов настоящего изобретения, стабильную фармацевтическую композицию применяют для лечения или профилактики рака.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения, предложен способ получения стабильной фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения, предложен компонент, стабилизирующий состав, содержащий по меньшей мере одно из следующих соединений:

- a) одну или более аминокислот или их фармацевтически приемлемых солей;
- b) одно или более поверхностно-активных веществ;
- c) один или более углеводов или сахаров или
- d) смесь двух или более из a)-c).

Согласно конкретному аспекту настоящего изобретения, предложена стабильная фармацевтическая композиция, содержащая:

- a) от приблизительно 0,0001 до приблизительно 10% (мас./об.) рекомбинантного белка лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*,
- b) от приблизительно 0,01 до приблизительно 10% (мас./об.) одной или более аминокислот или их фармацевтически приемлемых солей;
- c) от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1% (мас./об.) одного или более поверхностно-активных веществ или
- d) от приблизительно 0,1 до приблизительно 15% (мас./об.) одного или более углеводов или сахаров.

Проценты, используемые в настоящем описании, относятся к количеству (массе) компонента в объеме состава, готового к введению. Процент определяют способами, известными в данной области техники.

Краткое описание сопроводительных последовательностей (для настоящего изобретения)

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

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

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

SEQ ID NO: 4: представляет собой аминокислотную последовательность нативного лектина *S. rolfsii*.

Подробное описание изобретения

Определения.

В настоящем документе термин "лектин" относится к белку, связывающему углеводы, причем термин "белок" в настоящем документе относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков.

В настоящем документе "рекомбинантный" продукт относится к продукту, получаемому с помощью генной инженерии. Подразумевается, что генная инженерия представляет собой не происходящие в природе манипуляции с генами. Таким образом, рекомбинантный продукт представляет собой продукт, существующий или синтезированный в среде неприродного происхождения, например, в клетке-хозяине, в которой указанный продукт не присутствует в природе.

В настоящем документе термин "рекомбинантный белок", "рекомбинантный лектин", рекомбинантный белок-лектин или "рекомбинантный полипептид" относится к молекуле белка, экспрессируемой с использованием рекомбинантной молекулы ДНК. Рекомбинантный белок согласно настоящему изобретению представляет собой лектин, происходящий из лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL). SRL представляет собой лектин, выделенный из склероциев почвенного фитопатогенного гриба *S. rolfsii*. Белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 является примером рекомбинантного лектина.

В настоящем документе термин "рекомбинантный белок" включает любую фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, пролекарство или любое другое соединение, которое при введении пациенту может обеспечивать (прямо или косвенно) получение соединения, описанного в настоящей заявке. Соли, сольваты, гидраты и пролекарства можно получать способами, известными в данной области техники.

Термины "состав", "композиция", "фармацевтический состав" и "фармацевтическая композиция" используются взаимозаменяемо и относятся к препаратам, находящимся в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активных ингредиентов, которые, следовательно, можно вводить субъекту для терапевтического применения, где субъект предпочтительно является человеком.

Термин "активные ингредиенты" в настоящем документе относится к рекомбинантному лектину или рекомбинантному белку, обладающим желательной биологической или терапевтической активностью для устранения заболевания или симптомов заболевания или замедления или задержки прогрессирования заболевания у субъекта. Состав согласно настоящему изобретению получают в виде жидкого состава или твердого состава. Жидкий состав находится в форме растворов, эмульсий или суспензий, подходящих для перорального введения или инъекции. Специалист в данной области техники должен понимать, что жидкий состав находится в среде, например, в воде для инъекций (ВДИ), используемой в качестве жидкой среды-носителя. Твердый состав получают путем смешивания твердых ингредиентов либо путем выпаривания среды растворителя. Твердые составы также можно получать путем лиофили-

зации жидкого состава, причем в процессе лиофилизации материал, подлежащий сушке, сначала замораживают, а затем удаляют лед или замороженный растворитель путем сублимации в вакууме. По соображениям стабильности вспомогательные вещества можно добавлять в препарат до его лиофилизации. Во время лиофилизации может быть необходимо определить и использовать соответствующие температуры хранения, температуры продукта, уровни разрежения, параметры замораживания, первичной сушки и вторичной сушки, которые известны специалисту в данной области техники. Твердый состав также может быть назван лиофилизированным составом.

В настоящем документе термин "вспомогательное вещество" означает неактивные или обычно инертные вещества, которые добавляют в состав и которые не влияют на терапевтическое действие активного ингредиента, а служат носителем или средой для активного ингредиента. Его можно использовать для обеспечения желательной консистенции, для улучшения стабильности и/или для регулирования осмоляльности композиции. Для целей настоящего изобретения вспомогательные вещества могут быть выбраны из веществ, известных специалисту в данной области техники как вещества, применяемые в белковых составах. Примерами таких вспомогательных веществ являются буферы, белок-стабилизирующие агенты, полимеры, солиобилизаторы, криопротекторы, лиопротекторы, наполнители, разбавители или их смеси.

В настоящем документе термин "криопротектор" означает соединения, предотвращающие повреждение клеток или тканей или активного ингредиента в составе из-за замораживания или во время процесса замораживания.

В настоящем документе термин "лиопротектор" означает соединения, предотвращающие повреждение клеток или тканей или активного ингредиента в составе во время стадий сушки.

Криопротектор и лиопротектор также можно применять в качестве наполнителей. Наполнитель усиливает структуру полученного лиофилизированного осадка; наполнители известны специалистам в данной области техники.

В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для получения желательных клинических результатов (т.е. достижения терапевтической эффективности). Терапевтически эффективное количество можно ввести за одно или более введений. Для целей настоящего изобретения терапевтически эффективное количество рекомбинантного белка представляет собой количество, достаточное для смягчения, облегчения, стабилизации, купирования, предотвращения, замедления или задержки прогрессирования состояния заболевания.

В настоящем документе термины "гомология" или "гомологичный" обозначают два или более указанных объекта, по меньшей мере частично идентичные в заданной области или фрагменте. Области, фрагменты или домены гомологии или идентичности обозначают фрагменты двух или более указанных объектов, гомологичные или идентичные друг другу. Таким образом, если две последовательности идентичны по одному или более фрагментам последовательностей, они идентичны друг другу по этим фрагментам. Значительная степень гомологии относится к молекуле, являющейся структурно или функционально консервативной, так что ее структура или функция по меньшей мере частично совпадает или предположительно совпадает с одной или более структурами или функциями (например, биологической функцией или активностью) указанной молекулы или значимой/соответствующей области или фрагмента указанной молекулы, которым она гомологична.

Комнатная температура представляет собой температуру в диапазоне от 22 до 28°C.

В настоящем документе термины "стабильная композиция" и "стабильный состав" имеют одно и то же значение и относятся к композиции белка, в которой указанный белок по существу сохраняет свою физическую и химическую стабильность и целостность, а также терапевтическую эффективность при хранении. Белок в композиции не подвергается какой-либо модификации путем образования связи или расщепления, или модификации в основной структуре белка отсутствуют. Например, "стабильный" состав может представлять собой состав, в котором менее чем приблизительно 10% и предпочтительно менее чем приблизительно 5% белка присутствует в виде агрегата. Кроме того, стабильный состав может также обеспечивать защиту от агрегации или осаждения белков, растворенных в нем. Стабильность белкового состава также можно измерить с помощью анализа биологической активности (биологического анализа). Ожидается, что стабильная композиция не должна характеризоваться значительными изменениями значений, полученных путем анализа в течение срока хранения, по сравнению со свежеприготовленной композицией.

Например, в настоящем изобретении биологический анализ выполняли путем тестирования цитотоксичности состава по отношению к линии клеток рака яичников (линии клеток PA-1). Стандартная цитотоксичность SEQ ID NO: 1 в буфере по отношению к линии клеток PA-1 составляет от 31,58 до 58,05%. Ожидается, что композиция SEQ ID NO: 1 обладает аналогичным действием по отношению к линии клеток PA-1. Если действие композиции в нулевой месяц и через 6 месяцев на указанную линию клеток является одинаковым (от 31,58 до 58,05%), то композицию называют стабильной в течение 6 месяцев.

Стабильность композиции также можно проверить с использованием нескольких других параметров. Например, композиция считается стабильной в течение 6 месяцев, если она не изменяет свой внеш-

ний вид в течение 6 месяцев при наблюдении невооруженным глазом, либо композиция считается стабильной композицией, если примеси, образованные в течение периода стабильности, например через 1-6 месяцев после получения состава, находятся в допустимых пределах. Примеси могут включать высокомолекулярные примеси или другие неизвестные примеси.

Кроме того, можно сказать, что композиция является стабильной, если ее "анализ" дает одни и те же результаты или результаты, находящиеся в приемлемых пределах, в течение периода стабильности. В настоящем документе термин "анализ" обозначает аналитическую методику определения чистоты или эффективности активного вещества. Он представляет собой анализ процентного содержания активного ингредиента, присутствующего в композиции. Способ анализа белка может быть выбран из способов, известных в данной области техники, например хроматографических способов, или химического анализа, или титрования. Процентное содержание белка в составе должно быть одинаковым или меняющимся в определенных пределах при анализе после периода стабильности по сравнению с даты получения состава.

В настоящем документе термин "период стабильности" обозначает период времени, в течение которого состав и активные компоненты в составе сохраняют все свои свойства, например идентичность, эффективность, качество, чистоту и активность. Период стабильности рассчитывают с даты получения или производства состава, он может варьировать от нескольких дней, недель, месяцев до нескольких лет. Например, состав может демонстрировать стабильность в течение нескольких дней с момента получения или может оставаться стабильным в течение 3 лет с даты получения.

Термин "компонент, стабилизирующий состав" относится к веществу, которое снижает или предотвращает расщепление белка в водном растворе, во время стадии замораживания или во время лиофилизации. "Компонент, стабилизирующий состав" поддерживает конформацию белка в различных условиях. Различные компоненты состава, например буферные агенты, поверхностно-активные агенты, аминокислотные стабилизаторы, углеводные стабилизаторы и агенты для регулирования тоничности, применяют по отдельности или в комбинации для стабилизации белка и, следовательно, состава белка.

Термин "аминокислоты" как компонент или вспомогательное вещество состава представляет собой простое органическое соединение, содержащее как карбоксильную (-COOH), так и аминогруппу (-NH₂). Для целей настоящего изобретения аминокислоты применяют в качестве стабилизаторов белка по отдельности или в виде их смеси или в комбинации с другими стабилизирующими компонентами.

В настоящем документе термин "мас./об." относится к массовому проценту вспомогательного вещества в композиции и измеряется или рассчитывается в соответствии с пониманием специалиста в данной области техники.

В настоящем документе термины "рак" и "опухоль" можно использовать взаимозаменяемо, как понятие специалисту в данной области техники. Рак или опухоль возникают в результате аномального роста клеток. Они возникают, когда нормальные клетки разрастаются неконтролируемым образом и вытесняют друг друга. Образование опухолей часто нарушает нормальное функционирование ткани, органа или организма.

Рак может возникать в любой области организма и также может распространяться на другие части тела. Распространение раковых клеток называют метастазированием. Таким образом, термин "рак" охватывает как первичный, так и метастатический рак. В настоящем документе термин "рак" включает солидные опухоли, но не ограничивается ими.

Следует понимать, что термин "лечение" может по существу включать излечение рака, предотвращение или замедление прогрессирования или уменьшение тяжести заболевания, предотвращение или уменьшение метастазов, ингибирование роста опухоли, уменьшение массы опухоли или устранение опухолей и/или облегчение (временное или постоянное) симптомов, связанных с заболеванием. Следует понимать, что симптомы зависят от вида рака, но могут включать боль, снижение или потерю функции, тошноту и/или болезненное состояние, лихорадку, образование опухоли, иммуносупрессию и/или утомляемость. Термин "лечение" включает профилактические, терапевтические или предохранительные меры.

Термин "время растворения" представляет собой время, необходимое для полного растворения твердого состава, например лиофилизированного состава, в жидкости до осветленного раствора, не содержащего частиц. Специалист в данной области техники должен понимать, что короткий период времени, необходимый для растворения лиофилизированного состава, является фактором, способствующим определению стабильности состава.

Количество добавленной жидкости, которая обычно представляет собой воду для инъекций, зависит от конечной требуемой концентрации белка в составе перед введением состава субъекту.

Согласно первому конкретному аспекту настоящего изобретения, предложена стабильная фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного белка лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения, предложена стабильная фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, происходящего из SRL, причем указанный рекомбинантный лектин содержит или состоит из аминокислотной

последовательности, выбранной из:

- a) SEQ ID NO: 1;
- b) SEQ ID NO: 2;
- c) SEQ ID NO: 3 или

d) аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичной SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

В одном варианте реализации процент "гомологии" между двумя последовательностями определяют с помощью алгоритма BLASTP с параметрами по умолчанию (Altschul et al. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25(17):3389-402). В частности, алгоритм BLAST доступен в сети Интернет по адресу URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Согласно альтернативному варианту реализации, для глобального выравнивания последовательностей процент идентичности гомологии двух последовательностей определяют с использованием алгоритма EMBOSS Needle с параметрами по умолчанию. В частности, алгоритм EMBOSS Needle доступен в сети Интернет по адресу URL: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

Лектин Sclerotium rolfsii, или SRL, представляет собой белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 1-3 представляют собой примеры аминокислотных последовательностей, по меньшей мере на 60% гомологичных SEQ ID NO: 4. В частности, SEQ ID NO: 1, 2 и 3 на 97,9, 96,5 и 91,5% гомологичны SEQ ID NO: 4 соответственно (согласно определению с помощью EMBOSS Needle).

SEQ ID NO: 1 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SRL (описанный как Rec-2 в WO 2010/095143).

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

SEQ ID NO: 3: представляет собой вариант аминокислотной последовательности SRL (описанный в WO 2014/203261).

SEQ ID NO: 4: представляет собой аминокислотную последовательность нативного лектина S. rolfsii.

Согласно любому из предшествующих аспектов, рекомбинантный лектин представляет собой модифицированный белок лектина (т.е. рекомбинантный белок лектина, содержащий по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углевода), согласно определению в патенте WO 2020/044296, включенном в настоящий документ посредством ссылки, в частности, в отношении определения лектина. В конкретном аспекте рекомбинантный лектин содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углевода SEQ ID NO: 4 или аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 60% гомологией по отношению к SEQ ID NO: 4.

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

В еще одном конкретном аспекте первичный сайт связывания углевода содержит положение, выбранное из 1 или более из 27, 28, 47, 48, 70, 71, 72 и 105 в SEQ ID NO: 1 или в аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 60% гомологией по отношению к SEQ ID NO: 4.

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

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

В еще одном конкретном аспекте вторичный сайт связывания углевода содержит положение, выбранное из одного или более из 77, 78, 80, 101, 112 и 114 в SEQ ID NO: 4 или в аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 60% гомологией по отношению к SEQ ID NO: 4.

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

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

Еще в одном конкретном аспекте модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты, при которой заменяющая аминокислота замещает исходную аминокислоту.

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

i) в положении 27: консервативной, благоприятной или неблагоприятной аминокислоты, причем указанная консервативная аминокислота является неполярной или кислотной; благоприятная аминокислота является полярной или основной, а неблагоприятная аминокислота является неполярной;

- ii) в положении 28: консервативной, благоприятной, нейтральной или неблагоприятной аминокис-

лоты, где консервативная аминокислота является неполярной; благоприятная аминокислота является полярной, нейтральная аминокислота является кислой или основной, и неблагоприятная аминокислота является полярной;

iii) в положении 47: неблагоприятной аминокислоты, которая является основной или неполярной;

iv) в положении 48: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

v) в положении 70: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

vi) в положении 71: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

vii) в положении 72: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной; и/или

viii) в положении 105: консервативной, благоприятной, нейтральной или неблагоприятной аминокислоты, причем указанная консервативная аминокислота является основной или неполярной; благоприятная аминокислота является полярной, нейтральная аминокислота является кислой, основной или полярной, и/или неблагоприятная аминокислота является полярной, неполярной или кислой.

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

i) в положении 77: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

ii) в положении 78: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

iii) в положении 80: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

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

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

vi) в положении 114: неблагоприятной аминокислоты, которая является полярной.

В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок лектина содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце SEQ ID NO: 4 или аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 60% гомологией по отношению к SEQ ID NO: 4, причем указанный N-конец содержит положение, выбранное из: 1 и/или 2 в SEQ ID NO: 4 или соответствующего положения в последовательности, характеризующейся по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95, 97 или 99% гомологией по отношению к указанной последовательности.

В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты в положении 1, причем заменяющая аминокислота не представляет собой треонин или валин.

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

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

В еще одном конкретном аспекте отщепление иницирующего метионина повышено или уменьшено по сравнению с контролем.

В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты в положении 76 представляет собой замену аминокислоты на неполярную аминокислоту.

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

В еще одном конкретном аспекте модификация аминокислоты в положении 44 или 89 представляет собой замену аминокислоты на неполярную аминокислоту.

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

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

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

В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок лектина характеризуется процентом цитотоксичности, который составляет менее 10% от цитотоксичности контроля, или не обладает цитотоксичностью.

В еще одном конкретном аспекте модифицированный белок лектина характеризуется процентом цитотоксичности, который увеличен по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с цитотоксичностью контроля.

В еще одном конкретном аспекте длина модифицированного белка лектина равна 500, 400, 300, 250, 200 или 150 аминокислотам или менее.

Рекомбинантные белки, как описано выше, можно получать способами, описанными в WO 2020/044296, WO 2010/095143 и WO 2014/203261. Рекомбинантные белки согласно настоящему изобретению в одном из вариантов реализации очищают традиционными методиками, обычно традиционными хроматографическими способами.

В соответствии с еще одним основным аспектом, в настоящем изобретении предложена стабильная фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного

лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут представлять собой буфер, стабилизатор, полимеры, солюбилизатор, криопротекторы, лиопротекторы, наполнители, разбавители, эмульгаторы и консерванты.

Буфер, например, может быть выбран из фосфата натрия, дегидрата гидрофосфата натрия, дегидрата дигидрофосфата натрия, цитрата натрия, ацетата натрия, трис-хлорида натрия, фосфатного буфера, например, двухосновного фосфата калия, одноосновного фосфата калия или гистидина. Концентрация буфера может варьировать от 1 до 300 мМ. Как понятно специалисту в данной области техники, в буферной системе трис-хлорид натрия концентрация трис (трис-аминометана) составляет 1-200 мМ, а концентрация хлорида натрия (NaCl) составляет 1-300 мМ. Следует понимать, что буфер используют для поддержания pH состава. pH можно регулировать в диапазоне от 5 до 9, в частности pH состава находится в диапазоне от 7 до 9.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, стабилизатор может быть выбран из поверхностно-активных веществ, детергентов, аминокислот, фармацевтически приемлемой соли аминокислоты, углеводов или углеводных стабилизаторов, аминов, полиолов или их комбинации.

Согласно этому варианту реализации, неограничивающие примеры поверхностно-активных веществ представляют собой Tween® 20 (полисорбат 20), Tween® 40 (полисорбат 40), Tween® 60 (полисорбат 60), Tween® 80 (полисорбат 80), сорбитанмонолаурат, сорбитанмонопальмитат, сорбитанмоностеарат, сорбитантристеарат, сорбитанмоноолеат, Triton™ X-100, Pluronic® F-68, Pluronic® F-88, Pluronic® F-127 (полосамеры), сорбитанмонолаурат, сорбитанмоностерат, сорбитантристеарат, полосамер 188 и Brij 35 (полиоксиэтиленалкиловый простой эфир) или их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации концентрация поверхностно-активного вещества может находиться в диапазоне от 0,001 до 10 мг/мл или от 0,0001 до 1,0% (мас./об.).

В некоторых вариантах реализации стабильная композиция содержит рекомбинантный лектин, происходящий из лектина *Sclerotium rolfsii*, и одно или более из поверхностно-активных веществ, причем отношение белка к поверхностно-активному веществу составляет от 1:0,0002 до 1:10.

Кроме того, согласно одному варианту реализации, аминокислота может быть выбрана из глицина, аланина, серина, треонина, цистеина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, пролина, фенилаланина, тирозина, триптофана, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина или их комбинации. Аминокислота может представлять собой L-аминокислоту или D-аминокислоту, предпочтительно L-аминокислоту. Аминокислоту можно использовать как таковую или в виде ее соли. Соль может представлять собой щелочную соль или соль щелочноземельных металлов, соли аммония, соли органических аминов, например соль триэтиламина или соль триэтанолamina, соль аргинина, например соли основных аминокислот или кислые соли, например, гидрохлорид, гидробромид, сульфат, нитрат, фосфат, соли минеральных кислот, соль лимонной кислоты, оксалат, тартрат или любую другую соль аминокислоты, известную специалисту в данной области техники. В одном из вариантов реализации аминокислота выбрана из L-гистидина, L-аргинина, глутаминовой кислоты или метионина. В еще одном варианте реализации аминокислота представляет собой гидрохлоридную соль аминокислоты, выбранной из L-гистидина, L-аргинина, глутаминовой кислоты или метионина. В предпочтительном варианте реализации аминокислота выбрана из гидрохлоридной соли L-гистидина или L-аргинина.

В некоторых вариантах реализации концентрация аминокислоты или ее фармацевтически приемлемой соли составляет от 0,01 до 10% (мас./об.) или от 0,1 до 100 мг/мл.

В другом варианте реализации стабильная композиция содержит рекомбинантный лектин, происходящий из лектина *Sclerotium rolfsii*, и одну или более аминокислот или ее фармацевтически приемлемую соль. Отношение белка к аминокислоте или ее фармацевтически приемлемой соли составляет от 1:0,1 до 1:10.

В соответствии с еще одним вариантом реализации, углеводные или сахарные стабилизаторы могут быть выбраны из неограничивающих примеров сахарозы, трегалозы, сорбита, глицерина, маннита, лактозы, ксилита, арабита, эритрита, лактита, мальтита, глюкозы, раффинозы, мальтозы, декстрана, инозита или их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации, углевод представляет собой сахарозу или маннит. В еще одном варианте реализации концентрация углевода составляет от 0,1 до 15% (мас./об.) или от 1,0 до 150,0 мг/мл.

В еще одном варианте реализации стабильная композиция содержит рекомбинантный лектин, происходящий из лектина *Sclerotium rolfsii*, и один или более из углеводных или сахарных стабилизаторов, причем отношение белка к углеводу находится в диапазоне от 1:0,1 до 1:150.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, стабилизатор может быть дополнительно выбран из аминов, например, основных белков, например протамина или фармацевтически приемлемой соли протамина, или природных или синтетических полимеров, несущих аминные остатки, например полилизина. Протамин можно получить, например, из организма человека или рыбы. Стабилизатор так-

же может быть выбран из полиолов, например ПЭГ 400 - ПЭГ 20000, глицерина или ксилита.

В особенно предпочтительном варианте реализации стабилизатор представляет собой комбинацию одного или более из поверхностно-активных веществ, аминокислот, фармацевтически приемлемой соли аминокислоты и/или углеводов. Например, стабилизатор может представлять собой комбинацию поверхностно-активного вещества и аминокислоты или комбинацию аминокислоты или ее соли и углевода. В US 9981007 описана композиция, содержащая рекомбинантные лектины омелы для лечения метастатических опухолей, где, согласно примерам, композиция содержит комбинацию полисорбата и глутаминовой кислоты или полисорбата и трегалозы в качестве стабилизатора. Следует понимать, что в композициях белков одновременно используют несколько стабилизаторов в надежде решить различные проблемы со стабильностью с помощью различных механизмов и/или возможных синергетических эффектов. Однако простое использование нескольких стабилизаторов не всегда позволяет получить стабильный состав белка. Например, в настоящем изобретении состав, содержащий L-гистидин и различное количество полисорбата 80, не позволяет получить стабильного состава. Визуальный осмотр показал выпадение белого осадка через 1 месяц хранения при 25°C.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, вспомогательные вещества в композиции могут включать полимер, например полиэтиленгликоли (ПЭГ), декстран, гидроксипропилкрахмал (ГПК) или ПЭГ-4000 или их комбинацию; и белок, например альбумин сыворотки человека или желатин, или их комбинацию.

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно необязательно содержать консерванты, например бензиловый спирт, м-крезол, метилпарабен, фенол или их комбинацию; модификатор тоничности, например хлорид натрия, декстрозу, хлорид калия, хлорид кальция, сахарозу или их комбинацию; хелатирующий агент, например этилендиаминтетрауксусную кислоту; антиоксидант, например аскорбиновую кислоту, и/или криопротектор, например маннит, этиленгликоль, глицерин, сахарозу, трегалозу и/или декстрозу.

Следует понимать, что примеры вспомогательных веществ, упомянутые в настоящей заявке, приведены для ясности и понимания изобретения и не ограничивают изобретение каким бы то ни было образом. Кроме того, специалист в данной области техники также должен понимать, что различные вспомогательные вещества играют различную роль в составе. Например, полисорбат можно использовать в составе в качестве стабилизатора или солюбилизатора или эмульгатора. Составы согласно настоящему изобретению содержат вспомогательные вещества, обладающие различными функциями, и не должны ограничиваться функциями, указанными в настоящей заявке.

В некоторых вариантах реализации концентрация рекомбинантного лектина в композиции находится в диапазоне от 0,001 до 100 мг/мл. В некоторых вариантах реализации указанная концентрация составляет по меньшей мере 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 1,5 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 3,5 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл, по меньшей мере 4,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 6 мг/мл, по меньшей мере 6,5 мг/мл, по меньшей мере 7 мг/мл, по меньшей мере 7,5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 8,5 мг/мл, по меньшей мере 9 мг/мл, по меньшей мере 9,5 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл или по меньшей мере 20 мг/мл, по меньшей мере 30 мг/мл, по меньшей мере 40 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации концентрация рекомбинантного лектина в композиции составляет от 0,0001 до 10% (мас./об.).

Согласно еще одному основному аспекту настоящего изобретения, предложен компонент, стабилизирующий состав, содержащий по меньшей мере одно из следующих соединений:

- a) одну или более аминокислот или их фармацевтически приемлемых солей;
- b) одно или более поверхностно-активных веществ;
- c) один или более углеводов или сахаров или
- d) смесь двух или более из a)-c).

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, в составе белка предпочтительно используют "компонент, стабилизирующий состав".

В конкретном варианте реализации состав белка представляет собой состав, содержащий рекомбинантный лектин, происходящий из лектина *Sclerotium rolfsii*.

Согласно очень конкретному аспекту, стабильная фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит:

- a) от приблизительно 0,0001 до приблизительно 10% (мас./об.) рекомбинантного белка лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*;
- b) от приблизительно 0,01 до приблизительно 10% (мас./об.) одной или более аминокислот или их фармацевтически приемлемых солей;
- c) от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1% (мас./об.) одного или более поверхностно-активных веществ или
- d) от приблизительно 0,1 до приблизительно 15% (мас./об.) одного или более углеводов или

сахаров.

Композицию согласно настоящему изобретению можно составить в виде водной жидкости или твердого вещества. В некоторых вариантах реализации композиция может представлять собой жидкость, суспензию, порошок, стерильный порошок или являться лиофилизированной для составления раствора. Лиофилизированный состав можно разводить водой для инъекций (ВДИ) и/или любым подходящим фармацевтически приемлемым разбавителем или их смесью для получения требуемой концентрации, известной специалисту в данной области техники. Композиция подходит для введения в виде разовой или многократных доз. Специалисту в данной области техники известно, что тип дозы зависит от различных факторов, например роста и веса тела, площади поверхности тела, возраста, пола или общего состояния здоровья пациента, а также от препарата, подлежащего введению, в частности продолжительности и типа введения, и от других лекарственных средств, которые можно вводить параллельно.

Лектин может быть представлен в фармацевтически приемлемой форме, например в виде жидкости (например, в водном растворе или суспензии или в виде раствора или суспензии на масляной основе), твердого вещества (например, капсулы или таблетки), лиофилизированного порошка, спрея, крема, лосьона или геля, везикулярной системы доставки лекарственного средства, например билосом, липосом, ниосом, трансферосом, этосом, сфингосом, фармакосом, многослойных везикул, микросфер и т.п., но не ограничиваясь ими.

В настоящем документе "водный раствор" представляет собой раствор, полученный путем растворения твердого или лиофилизированного агента, например рекомбинантного лектина, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в воде или в воде, содержащей буфер. Водный раствор также образуется, когда агент, например рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, находящийся в жидкой форме, смешивают с водой или водой, содержащей буфер.

Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить индивиду в подходящей дозировке. Введение можно осуществлять местно, энтерально или парентерально, например, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно, местно, интраназально, внутрибронхиально или внутрикожно, или через катетер в артерии. В конкретном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению можно вводить парентерально.

В одном варианте реализации жидкий состав согласно настоящему изобретению стабилен при температуре холодильника (2-8°C) в течение по меньшей мере 2 лет или по меньшей мере 1 года. В еще одном варианте реализации жидкий состав стабилен при комнатной температуре в течение по меньшей мере шести месяцев, или по меньшей мере трех месяцев, или по меньшей мере двух месяцев, или по меньшей мере одного месяца.

В некоторых вариантах реализации лиофилизированный состав согласно настоящему изобретению стабилен при температуре холодильника (2-8°C) в течение по меньшей мере 2 лет или по меньшей мере 1 года. В еще одном варианте реализации лиофилизированный состав также стабилен при комнатной температуре в течение по меньшей мере шести месяцев, или по меньшей мере пяти месяцев, или по меньшей мере четырех месяцев, или по меньшей мере трех месяцев. Лиофилизированный состав также стабилен при повышенной температуре, например между 30 и 40°C, в течение по меньшей мере четырех месяцев, или по меньшей мере трех месяцев, или по меньшей мере двух месяцев, или по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере 15 дней или по меньшей мере 7 дней.

Согласно еще одному основному аспекту, композицию согласно настоящему изобретению применяют для лечения или профилактики рака.

Термин "рак" включает заболевания кожи, тканей, органов, костей, хрящей. Примеры рака, который можно лечить с помощью способов и композиций согласно настоящему изобретению, включают рак желчных протоков, мочевого пузыря, костей, головного мозга, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта (включая подвздошную кишку, толстую кишку, прямую кишку и/или анус), головы, почки, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, поджелудочной железы, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка, щитовидной железы, мочевыводящих путей, влагалища и матки, но не ограничиваются ими.

Рак может быть доброкачественным или злокачественным, а также находиться на любой стадии злокачественного процесса.

Рак может представлять собой рак эпителиальных тканей, неэпителиальных тканей, клеток, которые составляют кожу или ткань, выстилающую органы, клеток иммунной системы, соединительной ткани или клеток спинного мозга или головного мозга.

В некоторых вариантах реализации рак представляет собой солидную опухоль.

Рак может представлять собой карциному. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой аденокарциному. Аденокарцинома может быть аденокарциномой пищевода, поджелудочной железы, предстательной железы, шейки матки, молочной железы, толстой кишки или ободочной и прямой кишки, легкого, желчных протоков, влагалища, мочевыводящих путей или желудка.

В некоторых вариантах реализации рак представляет собой плоскоклеточную карциному. Плоскоклеточная карцинома может представлять собой плоскоклеточную карциному кожи, ротовой полости, легкого, щитовидной железы, пищевода, влагалища, шейки матки, яичников, головы и/или шеи, предста-

тельной железы или мочевого пузыря.

В некоторых конкретных вариантах реализации рак может представлять собой опухоль/рак головного мозга, который может включать глиобластому, менингиому, астроцитому, глиому и нейробластому.

Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения, предложена фармацевтически стабильная композиция лектина для применения при лечении или профилактике рака у субъекта, нуждающегося в этом.

Субъект может представлять собой субъекта - млекопитающее. Для удобства млекопитающее, подвергающееся такому "лечению", можно называть "субъектом". В некоторых вариантах реализации субъектом является человек. В частности, субъект может представлять собой человека, страдающего от рака или стремящегося к его профилактике или лечению. Специалисту в данной области техники понятно, что субъекта можно также называть "индивидом".

Согласно еще одному основному аспекту настоящего изобретения, предложен способ получения стабильной композиции, включающий объединение буферного раствора рекомбинантного лектина с буферным раствором одного или более стабилизаторов. Процесс можно проводить в подходящих условиях, согласно знаниям специалиста в данной области техники. Например, температура во время процесса может составлять от 0 до 35°C, от 5 до 30°C, от 10 до 25°C или от 20 до 25°C.

Стабильная композиция может являться жидкой или лиофилизированной композицией. В конкретном варианте реализации способ может включать:

- a) получение исходного раствора рекомбинантного лектина в буфере;
- b) получение раствора одного компонента стабилизатора;
- c) добавление необходимого количества раствора a) к необходимому количеству раствора b);
- d) необязательное разбавление смеси, полученной на этапе c), необходимым количеством ВДИ;
- e) необязательное добавление одного или более стабилизаторов отдельно к раствору, полученному на этапе c) или этапе d);
- f) добавление других вспомогательных веществ к раствору, полученному на этапе d);
- g) определение размера серии с использованием воды для инъекций (ВДИ) для получения жидкого состава;
- h) необязательно, лиофилизацию жидкого состава, полученного на этапе g), с получением лиофилизированного состава.

В соответствии с необходимостью и пониманием специалиста в данной области техники этапы способа, описанные выше, могут являться взаимозаменяемыми.

Значение pH состава поддерживают между 5 и 9, в частности между 7 и 9, с использованием 0,05н. соляной кислоты (HCl). Композицию составляют при температуре от 0 до 35°C, предпочтительно при комнатной температуре. Готовый жидкий состав можно асептически фильтровать через подходящий фильтр, например, 0,22 мкм поливинилиденфторидный или поливинилидендифторидный (ПВДФ) или полиэфирсульфоновый (ПЭС), или любой другой фильтр, известный специалисту в данной области техники.

Примеры

Для полного понимания изобретения приведены ссылки на следующие примеры. Они демонстрируют наилучший способ реализации изобретения и не ограничивают сущность изобретения каким бы то ни было образом.

Пример 1. Способ получения водных/жидких составов.

- a) Получали исходный раствор полисорбата 80 (10%, мас./об.) в ВДИ.
 - b) Получали исходный раствор белка с последовательностью SEQ ID NO: 1 в TBS (физиологическом растворе с трис-буфером) и отбирали в стеклянный стакан.
 - c) Необходимое количество раствора полисорбата-80, полученного на этапе a), переносили в стеклянный стакан, использованный на этапе b), при температуре 22-25°C и хорошо перемешивали, получая прозрачный бесцветный раствор.
 - d) В раствор, полученный на этапе c), добавляли необходимое количество гидрохлорида L-аргинина (L-аргинин-HCl) и хорошо перемешивали до однородного растворения.
 - e) В раствор, полученный на этапе d), добавляли необходимое количество сахарозы и хорошо перемешивали до однородного растворения.
 - f) pH раствора, полученного на этапе e), доводили до 7,4-8,0 (с использованием 0,05н. соляной кислоты).
 - g) Объем готовой серии получали с использованием ВДИ.
 - h) Готовую серию фильтровали через фильтр из ПВДФ с диаметром пор 0,22 мкм с последующим заполнением, укупоркой пробками и колпачками.
- Пример 2. Состав рекомбинантного белка, не содержащий стабилизаторов и солюбилизаторов.

Ингредиенты	мг/мл
SEQ ID NO. 1	5,0
Трис	3,03

NaCl	4,38
Соляная кислота	Достаточное количество (q.s.) до достижения pH
Вода для инъекций	q.s до объема 1 мл

Процедура получения:

- исходный раствор белка с последовательностью SEQ ID NO: 1 в TBS (физиологическом растворе с трис-буфером) отбирали в стеклянный стакан;
- значение pH раствора доводили до 7,4-8,0 (с использованием 0,05н. HCl);
- размер готовой серии доводили с использованием ВДИ;
- серию фильтровали через фильтр из ПВДФ с диаметром пор 0,22 мкм с последующим заполнением, укупоркой пробками и колпачками;
- заполненные флаконы хранили при температуре 2-8°C.

Результаты исследования стабильности: Значительное снижение результатов анализа наблюдали после 3 месяцев хранения при температуре 2-8°C.

Пример 3. Состав с L-гистидином.

Ингредиенты	мг/мл
SEQ ID NO. 1	7,5
Трис	4,4
NaCl	6,36
Полисорбат 80	1
L-гистидин	3,87
Соляная кислота	q.s. до достижения pH
Вода для инъекций	q.s до объема 1 мл

Вышеуказанный состав получали с помощью того же способа, что и в примере 1.

Результаты исследования стабильности:

Визуальный осмотр показал наличие белого осадка через один месяц после получения при хранении при 25°C/60% ОВ (относительной влажности).

Пример 4. Жидкий состав рекомбинантного белка.

Ингредиенты	мг/мл
SEQ ID NO. 1	5
Трис	2,93
NaCl	4,24
Полисорбат 80	1
L-аргинин HCl	5,27
Сахароза	10
Соляная кислота	q.s. до достижения pH
Вода для инъекций	q.s до объема 1 мл

Вышеуказанный состав получали с помощью того же способа, что и в примере 1.

Результаты исследования стабильности: Результаты исследования стабильности регистрировали через три месяца после получения при хранении при 25°C/60% ОВ и при 2-8°C.

Визуальный осмотр показал наличие прозрачного и бесцветного раствора по истечении трех месяцев после получения.

Результаты анализа были зарегистрированы как находящиеся в допустимых пределах (90-110%) без существенного снижения характеристик. Результаты биологического анализа зарегистрировали как находящиеся в пределах приемлемого диапазона 31,58 и 58,05% для линии клеток РА-1.

Пример 5. Жидкий состав рекомбинантного белка.

Ингредиенты	мг/мл
SEQ ID NO. 1	7,5
Трис	4,4
NaCl	6,36
Полисорбат 80	1
L-аргинин HCl	5,27
Сахароза	10
Соляная кислота	q.s. до достижения pH
Вода для инъекций	q.s до объема 1 мл

Вышеуказанный состав получали способом, описанным в примере 1.

Результаты исследования стабильности:

Визуальный осмотр показал наличие прозрачного бесцветного раствора через три месяца хранения при 25°C/60% ОВ и при 2-8°C.

Обнаружено, что результаты анализа находились в допустимых пределах (90-110%) без существенного падения характеристик. Результаты биологического анализа зарегистрировали как находящиеся в пределах приемлемого диапазона 31,58 и 58,05% для линии клеток РА-1.

Пример 6. Жидкий состав рекомбинантного белка.

Ингредиенты	мг/мл
SEQ ID NO. 1	7,5
Трис	4,4
NaCl	6,36
Полисорбат 80	1
L-аргинин HCl	3
Сахароза	10
Соляная кислота	q.s. до достижения pH
Вода для инъекций	q.s до объема 1 мл

Вышеуказанный состав получали с помощью того же способа, что и в примере 1.

Результаты исследования стабильности: Результаты исследования стабильности регистрировали через шесть месяцев при хранении при 25°C/60% ОВ и при 2-8°C.

Визуальный осмотр показал, что раствор оставался прозрачным и бесцветным в течение 6 месяцев.

Обнаружили, что результаты анализа находились в допустимых пределах в течение 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев и 6 месяцев, значительного присутствия высокомолекулярных примесей не отмечали.

Результаты биологического анализа находились в пределах 31,58 и 58,05% для линии клеток РА-1.

Пример 7. Лиофилизированный состав рекомбинантного белка.

Ингредиенты	мг/мл
SEQ ID NO. 1	1,25
Трис	0,73
NaCl	1,06
Полисорбат 80	0,5
L-аргинин HCl	1
Сахароза	6
Маннит	18

Вышеуказанный состав получали следующим способом:

- получали исходный раствор полисорбата 80 (10%, мас./об.) в ВДИ;
- получали исходный раствор белка с последовательностью SEQ ID NO: 1 в TBS (физиологическом растворе с трис-буфером) и переносили в стеклянный стакан;
- необходимое количество раствора полисорбата-80, полученного на этапе а), добавляли к раствору, полученному на этапе б), при температуре 22-25°C и хорошо перемешивали, получая прозрачный бесцветный раствор;
- в раствор, полученный на этапе с), добавляли необходимое количество 40% ВДИ;
- в раствор, полученный на этапе д), добавляли необходимое количество L-аргинина-HCl и хорошо перемешивали до однородного растворения;
- в раствор, полученный на этапе е), добавляли необходимое количество сахарозы и хорошо перемешивали до однородного растворения;
- в раствор, полученный на этапе ф), добавляли маннит и хорошо перемешивали до получения прозрачного бесцветного раствора;
- pH раствора, полученного на этапе г), доводили до 7,4-8,0 с использованием 0,05н. HCl;
- к раствору, полученному на этапе h), добавляли ВДИ для получения размера серии;
- серию разливали во флаконы и подвергали лиофилизации;
- лиофилизированные флаконы хранили при температуре 2-8°C.

Результаты исследования стабильности: Результаты исследования стабильности регистрировали через 12 месяцев при хранении при 25°C/60% ОВ и при 2-8°C.

Визуальный осмотр показал наличие белого лиофилизированного уплотненного материала через 12 месяцев, что указывало на желательную физическую стабильность.

Обнаружено, что результаты анализа находились в допустимых пределах без существенных изменений. Результаты биологического анализа находились в пределах 31,58 и 58,05% для линии клеток РА-1.

Пример 8. Лиофилизированный состав рекомбинантного белка.

Ингредиенты	Состав до лиофилизации (мг/мл)	Состав после растворения лиофилизированного продукта (мг/мл)
SEQ ID NO. 1	1,25 мг	2,50
Трис	0,656 мг	1,31
NaCl	0,950 мг	1,90
Полисорбат 80	0,50 мг	1
L-аргинин HCl	1,00 мг	2
Сахароза	12,00 мг	24
Маннит	36,00 мг	72
Соляная кислота	q.s. до достижения pH	q.s. до достижения pH

Вышеуказанный состав получали следующим способом:

- получали исходный раствор полисорбата 80 (10%, мас./об.) в ВДИ. Из этого исходного раствора отбирали требуемое количество полисорбата 80 и добавляли в ВДИ;
- получали исходный раствор белка с последовательностью SEQ ID NO: 1 в TBS (физиологиче-

ском растворе с трис-буфером) и переносили в стеклянный стакан;

с) к необходимому количеству раствора, полученного на этапе а), при температуре 22-25°C добавляли необходимое количество раствора белка с последовательностью SEQ ID NO: 1, полученного на этапе б), и хорошо перемешивали, получая прозрачный бесцветный раствор;

д) в раствор, полученный на этапе с), добавляли необходимое количество L-аргинина-HCl и хорошо перемешивали до однородного растворения;

е) в раствор, полученный на этапе д), добавляли необходимое количество сахарозы и хорошо перемешивали до однородного растворения;

ф) в раствор, полученный на этапе е), добавляли необходимое количество маннита и хорошо перемешивали до получения прозрачного бесцветного раствора;

г) объем серии доводили до 80% от размера серии с использованием ВДИ.

h) pH раствора, полученного на этапе г), доводили до 7,4-8,0 с использованием 0,05н. HCl;

и) к раствору, полученному на этапе h), добавляли ВДИ для получения размера серии;

ж) серию разливали во флаконы и подвергали лиофилизации;

к) лиофилизованные флаконы хранили при температуре 2-8°C.

Результаты исследования стабильности: Результаты исследования стабильности регистрировали через шесть месяцев при хранении при 25°C/60% ОВ и при 2-8°C.

Визуальный осмотр показал, что белый уплотненный материал не содержал видимых частиц в течение 6 месяцев. Обнаружили, что результаты анализа находились в допустимых пределах в течение 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев и 6 месяцев, соответственно, значительного присутствия высокомолекулярных примесей не отмечали. Результаты биологического анализа находились в пределах 31,58 и 58,05% для линии клеток РА-1.

Время растворения анализировали путем добавления ВДИ во флакон, содержащий лиофилизованный продукт.

Пример 9. Состав рекомбинантного белка с L-гистидином.

Ингредиенты	мг/мл
SEQ ID NO. 1	7,5
Трис	4,4
NaCl	6,36
Полисорбат 20	1
L-гистидин	3,87
Сахароза	10
Соляная кислота	q.s. до достижения pH
Вода для инъекций	q.s до объема 1 мл

Вышеуказанный состав получали способом, описанным в примере 1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильная фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного белка лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*, представляющего собой SEQ ID NO: 1, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, причем указанные вспомогательные вещества содержат фармацевтически приемлемые стабилизаторы, которые включают:

а) аргинин или его фармацевтически приемлемые соли;

б) одно или более поверхностно-активных веществ;

с) один или более углеводов или сахаров; причем указанные один или более углеводов или сахаров выбраны из сахарозы, сорбита, глицерина, маннита, ксилита, арабита, эритрита, лактита, мальтита, инозита или их комбинации.

2. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит рекомбинантный белок лектина в количестве от 0,001 до 100 мг/мл.

3. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная фармацевтически приемлемая соль аргинина выбрана из щелочной соли или солей щелочноземельных металлов, солей аммония, солей органических аминов, солей основных аминокислот или кислых солей.

4. Стабильная фармацевтическая композиция по п.3, отличающаяся тем, что указанная кислая соль выбрана из гидрохлорида, гидробромида, сульфата, нитрата, фосфата, солей минеральных кислот, цитрата, оксалата и/или тартрата.

5. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация указан-

ного аргинина или его фармацевтически приемлемой соли составляет от 0,1 до 100 мг/мл.

6. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что отношение указанного белка к аргинину или его фармацевтически приемлемой соли находится в диапазоне от 1:0,1 до 1:10.

7. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанное поверхностно-активное вещество выбрано из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80, Triton X-100, Pluronic F-68, Pluronic F-88, Pluronic F-127, сорбитанмонолаурата, сорбитанмоностерата, сорбитантристеарата и Brij 35 или их комбинации.

8. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация указанного поверхностно-активного вещества составляет от 0,001 до 10 мг/мл.

9. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что отношение указанного белка к поверхностно-активному веществу находится в диапазоне от 1:0,0002 до 1:10.

10. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация указанного углевода или сахара составляет от 1,0 до 150,0 мг/мл.

11. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что отношение указанного белка к углеводу находится в диапазоне от 1:0,1 до 1:150.

12. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанную композицию вводят местно, энтерально или парентерально.

13. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанную композицию применяют для лечения или профилактики рака.

14. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанное вспомогательное вещество дополнительно выбрано из буферов, полимеров, солюбилизаторов, криопротекторов, лиопротекторов, наполнителей, разбавителей, эмульгаторов и консервантов.

15. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что результаты биологического анализа указанной стабильной композиции не изменяются более чем на 5% в течение 6 месяцев.

16. Стабильная фармацевтическая композиция по п.1, содержащая;

а) от 0,0001 до 10% (мас./об.) рекомбинантного белка лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*; и

б) от 0,01 до 10% (мас./об.) одной или более аминокислот или их фармацевтически приемлемых солей;

с) от 0,0001 до 1% (мас./об.) одного или более поверхностно-активных веществ;

д) от 0,1 до 15% (мас./об.) одного или более углеводов или сахаров; причем указанные один или более углеводов или сахаров выбраны из сахарозы, трегалозы, сорбита, глицерина, маннита, лактозы, ксилита, арабита, эритрита, лактита, мальтита, глюкозы, раффинозы, мальтозы, декстрана, инозита или их комбинации.

17. Способ получения стабильной фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, происходящего из лектина *Sclerotium rolfsii*, представляющего собой SEQ ID NO: 1, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, содержащие фармацевтически приемлемые стабилизаторы согласно п.1, причем указанный способ включает объединение буферного раствора рекомбинантного лектина с буферным раствором указанных вспомогательных веществ.

