

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490379** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.06.07

(51) Int. Cl. **C07K 14/37** (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.09.30

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГЛИКАНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **202121044592**

(32) **2021.10.01**

(33) **IN**

(86) **PCT/IB2022/059341**

(87) **WO 2023/053083 2023.04.06**

(71) Заявитель:
**ЮНИЧЕМ ЛАБОРАТОРИЕС
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:
**Сазе Джананжей, Ияппан
Сараванакумар, Бакши Гаутам,
Патил Ганеш (IN)**

(74) Представитель:
Сагитов В.Р. (RU)

(57) Настоящее изобретение представляет модифицированную белковую последовательность, т.е. рекомбинантно экспрессируемый гликансвязывающий белок. Указанный гликансвязывающий белок представляет собой вариант лектина *Sclerotium Rolfsii* и модифицирован с целью включения таких свойств, как повышенная стабильность молекулы, уменьшение примесей N-концевого метионина и помощь в конъюгации белка с другим биологическим и химическим агентом(ами).

A1

202490379

202490379

A1

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГЛИКАНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, в частности, к рекомбинантным гликан-связывающим белкам, которые могут использоваться для выявления и лечения злокачественных опухолей. Изобретение также относится к экспрессии, очистке и получению терапевтического состава с использованием указанного лектина.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ:

Лектины — это гликан-связывающие белки, которые встречаются в различных живых организмах, таких как микроорганизмы, растения и животные, и могут быть получены из них. Лектины проявляют высокую гликан-углеводную специфичность и известны способностью агглютинировать эритроциты своей некаталитической частью, которая обратимо связывается к конкретными моносахаридами или олигосахаридами. Известно, что они обладают специфичностью связывания в отношении углеводных компонентов на поверхности клеток без изменения свойств углеводов. Такой принцип действия находит много применений в методах диагностики и анализа как способ выявления биомаркеров, очистки гликопротеинов и гликолипидов и в процессах клеточного отбора.

Помимо применения в диагностике, лектины изучали на предмет их использования в качестве средств лечения злокачественных опухолей. В последнее время многочисленные лектины изучают на предмет их способности селективно связывать опухолевые антигены вызывать различные физиологические эффекты, такие как апоптоз, цитотоксичность, пролиферативное/антипролиферативное действие, метастаз, ингибирование адгезии клеток и т. д., так как злокачественные клетки проявляют различные изменения в структурах углеводов на поверхности клеток.

Хотя лектины из различных источников проявляют высокую углеводную специфичность, они различаются по физико-химическим свойствам, таким как размер молекулы и специфичность к сахарам. Немногочисленные растительные лектины, такие как лектины омелы (ML), получают из различных видов омелы белой *Viscum album L.*, и все они широко используются как сильнодействующие противоопухолевые средства в профилактике и лечении различных злокачественных

опухолей. Лектин омелы I (ML-I) среди всех ML хорошо изучен на предмет антипролиферативного действия, обусловленного его цитотоксическими и иммуномодулирующими действиями. Тем не менее, использование лектина растительного происхождения имеет свои недостатки, такие как отсутствие селективности, непостоянное качество и трудности с производством в промышленных масштабах.

В патенте США № 9500650 раскрыта применимость лектинов в обнаружении маркера отсутствия дифференциации в углеводной цепи «сэндвич»-методом (лектин-лектин), позволяющего определять присутствие или отсутствие дифференцированных клеток. Лектины, раскрытые в указанном патенте, включают в себя лектины, получаемые из *Sclerotium rolfsii*, *Coprinopsis cinerea*, *Agaricus bisporus*, *Xerocomus chrysenteron*, *Aleuria aurantia* и т. д. методом рекомбинантной ДНК. Указанный патент не раскрывает каких-либо терапевтических свойств лектинов.

Установлено, что опухоль-ассоциированные углеводные структуры, такие как дисахарид Томсена-Фриденрайха (TF) (Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr) и моносахарид N-ацетилгалактозамин (TN) (GalNAc) экспрессируются на 90% злокачественных клеток. Лектин *Sclerotium rolfsii* (SRL) проявляет специфичность в отношении TF- и TN-антигенов и получается очисткой из склеротических телец фитопатогенного гриба. В индийской заявке на патент № 1265/MUM/2004 раскрыта специфичность связывания SRL с панелью клеточных линий человека, представляющей разные типы злокачественных опухолей, которые изучались методом проточной цитометрии. Тем не менее, для SRL-лектина из природных источников характерно влияние на выход и сложности с очисткой, что делает процесс очень затратным для массового производства указанного лектина. Кроме того, у лектина, получаемого из природных источников, имеются проблемы с растворимостью и стабильностью, которые дополнительно мешают применять такие лектины в диагностике и лечении.

Далее, синтез белка инициируется либо метионином у эукариотов, либо формилметионином (N-концевым метионином) у прокариотов. Во время экспрессии рекомбинантных белков N-концевой метионин отщепляется эндогенной метионин-аминопептидазой (MAP). Указанный способ расщепления неэффективен, потому что количество экспрессируемого рекомбинантного белка превышает способность ограниченного количества MAP расщеплять N-концевой метионин, в результате чего существенное количество экспрессируемого белка содержит метионин в качестве

первой аминокислоты, которая не является частью зрелого белка. Далее, белки с N-концевым метионином склонны к окислению во время производства и хранения, и за этим окислением необходимо внимательно следить. Окисление остатков метионина в белках может приводить к образованию метионинсульфооксида или метионинсульфона, что может далее стать причиной повышенной иммуногенности, неактивности и агрегации; это ограничивает клиническую эффективность, стабильность и вероятность регистрации терапевтического продукта в регуляторных органах.

Биологические продукты, содержащие примеси с N-концевым метионином, могут отличаться по структуре от белка в организме человека; в связи с этим при введении пациенту может возникать неожиданный иммунный ответ, приводящий к неэффективному терапевтическому действию. Поэтому важно перед приготовлением препарата удалить метиониновую примесь из биологического продукта или минимизировать ее содержание.

Выданный индийский патент № 277986 (заявка № 350/MUM/2009) раскрывает модифицированный, рекомбинантно экспрессированный лектин, получаемый из нативного лектина *Sclerotium rolfsii*. В указанном патенте далее раскрыт метод получения рекомбинантного лектина, экспрессируемого в клетке-хозяине, такой как *E. coli* или дрожжи. Далее, метод включает в себя синтез гена лектина на основе последовательности аминокислот, полученной методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с тандемной масс-спектрометрией (MALDI MS/MS) из лектина *Sclerotium rolfsii* — обитающего в почве гриба, и его клонирование в клетке-хозяине. Лектин, как упоминается в указанном патенте, обычно состоит из смеси лектина с N-концевым метионином и без него, что может затягивать процесс регистрации препарата в регуляторных органах. Лектиновый белок также имеет тенденцию к образованию мультимеров, особенно димеров, ввиду наличия остатков цистеина в аминокислотной последовательности.

В патенте WO2020044296 было раскрыто, что повышенная растворимость экспрессируемого белка в клетке-хозяине может менять или снижать специфичность белка по свойству аффинности связывания антигена. Поэтому важно, чтобы рекомбинантные белки обладали достаточной стабильностью и растворимостью при сохранении аффинности связывания в отношении специфического антигена.

В патенте WO2020074977 был раскрыт метод получения рекомбинантного лектинового белка, в котором содержится менее 20% рекомбинантного лектина с инициатором метионином. В указанном патенте применяется как восходящая, так и нисходящая стратегия снижения экспрессии лектина с вариантом/примесью N-концевого метионина.

Кроме того, в последнее время разрабатываются новые терапевтические концепции, такие как терапия таргетными препаратами — конъюгатами белок-лекарственное вещество (PDC), в которых антитело или белок конъюгированы с молекулой сильнодействующего лекарственного вещества, обладающего цитотоксической активностью, иногда через химический линкер.

Идеальный PDC обладает высокой специфичностью в отношении антигена, отсутствующего в нормальной (здоровой) клетке; содержит мощный цитотоксический агент (обычно представляющее собой низкомолекулярное лекарственное вещество с высокой системной токсичностью), способное вызывать смерть клетки-мишени после проникновения внутрь клетки опухоли; а также может содержать химический линкер, который стабилен в кровотоке, но высвобождает цитотоксический агент в клетках-мишенях. Тем не менее, использование химического линкера делает необходимым дополнительные химические процессы и последующую очистку. Кроме того, большинство антител обладают способностью связывать антигены, специфически экспрессируемые на злокачественных клетках конкретного типа. На сегодняшний день не поступало сообщений об антителах, обладающих специфичностью в отношении универсального антигена, представленного на большинстве злокачественных клеток. В связи с этим белки, обладающие высокой специфичностью к универсальному антигену, представленному на большинстве злокачественных клеток, являются предметом исследований. Такой белок, будучи конъюгированным сильнодействующими молекулами лекарственных веществ, может открыть путь к универсальной терапии для эффективного лечения многочисленных типов злокачественных опухолей.

В прошлом для получения конъюгатов белок-лекарственное вещество использовались различные химические способы конъюгации. К описанным химическим способам конъюгации относятся лизиновый способ конъюгации, конъюгация через реакцию с белком малеимида и т. д. Для получения конъюгатов антитело-лекарственное вещество одним из наиболее предпочтительных процессов является процесс

конъюгации на основе лизина ввиду его универсальности и простых технологических требований, а также возможности проведения реакций с несколькими веществами цитотоксического действия (особенно на антителах). Однако в случае белков, в которых аминокислотные остатки в лизине присутствуют в нескольких местах, указанный процесс может приводить к образованию гетерогенной молекулы. К тому же гетерогенная молекула требует трудозатратной очистки и описания характеристик, что осложняет процесс регистрации препарата в регуляторных органах.

Для получения биофармацевтических препаратов, способных доставлять конъюгированное вещество к мишени, т. е. к злокачественной клетке, желательно иметь стабильный и растворимый белок, который будет легко конъюгироваться с образованием конъюгата белок-лекарственное вещество и обладать повышенной гомогенностью.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ:

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантно экспрессируемый гликан-связывающий белок. Гликан-связывающий белок представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfisii* (SRL), который модифицирован с целью придания ему новых свойств, таких как повышенная стабильность молекулы, пониженное содержание метиониновых примесей и удобство конъюгации с другими биологическими и химическими молекулами/веществами; обеспечивает стабильность белка за счет исключения димеризации «цистеин-цистеин»; и содействует эффективному удалению N-концевого метионина. В одном варианте осуществления белок, в сравнении с SRL дикого типа, имеет дополнительный цистеин на карбоксильном конце и сохраняет аффинность связывания в отношении одного или нескольких антигенов, выбираемых из антигена Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (T-антигена), Core2, 'α2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-T-антигена), 'α2,6/6-сиалил Core2' и модифицированных форм TF- и T-антигенов.

РИСУНКИ

ФИГ. 1. Анализ растворимости экспрессируемого белка SEQ ID NO: 3

ФИГ. 2. Анализ растворимости экспрессируемого белка SEQ ID NO: 4

ФИГ. 3. Анализ растворимости экспрессируемого белка SEQ ID NO: 3 на стадии ферментации

ФИГ. 4. Анализ растворимости экспрессируемого белка SEQ ID NO: 4 на стадии ферментации

ФИГ. 5. Изучение колокализации SEQ ID NO: 2

ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

В настоящем документе под термином «аминокислота» понимают природные и синтетические аминокислоты, а также аналоги и миметики аминокислот, выполняющие функции, аналогичные природным аминокислотам. Природные аминокислоты кодируются генетическим кодом, и к ним относятся протеиногенные аминокислоты. К природным аминокислотам также относятся аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках. К синтетическим аминокислотам относятся неканонические аминокислоты, в частности, селеноцистеин и пирролизин. Как правило, синтетические аминокислоты не относятся к протеиногенным аминокислотам.

В настоящем документе под термином «белок» понимают полимер аминокислотных остатков.

Термин «рекомбинантный» означает, что нуклеиновая кислота или полипептид подверглись искусственному или синтетическому (то есть не природному) изменению в результате вмешательства человека. Альтерацию можно выполнять на материале, как находящемся в естественных условиях или состоянии, так и вне таковых. Например, «рекомбинантная нуклеиновая кислота» — это кислота, получаемая в результате рекомбинации нуклеиновых кислот, например во время клонирования, перестановки в ДНК или других известных молекулярно-биологических процедур. «Рекомбинантная молекула ДНК» состоит из сегментов ДНК, соединенных посредством таких молекулярно-биологических методов.

В настоящем документе под термином «рекомбинантный белок» или «рекомбинантный полипептид» понимают полипептидную молекулу, экспрессируемую по методу рекомбинантных ДНК. Рекомбинантный белок может экспрессироваться методом сайт-направленного мутагенеза. Сайт-направленный мутагенез (SDM) — это метод для создания специфических, целенаправленных изменений в двухцепочечной плазмидной ДНК. Эти специфические альтерации, вставки, удаления и замещения используются для изменения или модификации структуры белка или его действия.

Методы сайт-направленного мутагенеза после первичного описания этой концепции получили быстрое развитие. Smith, M., *Ann. Rev. Genet.* 19, 423-462 (1985). Общей чертой имеющихся методов является использование синтетических олигонуклеотидов, обеспечивающих желаемые изменения в нуклеотидной последовательности в месте мутагенеза. Этот «мутантный» олигонуклеотид встраивается в нужную последовательность посредством замены нормальных последовательностей на сконструированный нуклеотид. Это осуществляется путем ферментативного синтеза ДНК *in vitro*. Модифицированную ДНК трансформируют в соответствующую систему хозяина для экспрессии закодированного белка (белков).

В настоящем документе под термином «лектин» или «лектиновый белок» понимают гликан/углевод-связывающий белок *Sclerotium rolfsii* (обитающего в почве патогенного гриба индийского происхождения), которому Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) присвоил учетный номер Z0FC_A, если контекст не указывает на иное.

Термин «вариант» в настоящем документе означает полимер из аминокислотных остатков, который задает набор в высокой степени одинаковых белков, происходящих от одного гена или семейства генов и являющихся результатом генетических различий. Обычно они имеют схожую структуру и функциональность. Вариант обычно содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сравнении с нативным белком.

Термин «замещение» в настоящем документе означает замену аминокислоты в конкретном положении в аминокислотной последовательности на другую подходящую аминокислоту.

Под термином «цитотоксический агент» понимают вещество, ингибирующее клетки или ингибирующее функцию клеток и/или вызывающее разрушение клеток. К этому термину относятся химиотерапевтические агенты, токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативноактивные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их синтетические аналоги и производные.

В настоящем документе под термином «конъюгаты» понимают препараты, составляющие предмет настоящего изобретения. Применительно к настоящему изобретению конъюгат может включать в себя вещество, присоединенное к белку с

помощью линкера или без него либо вещество, непосредственно присоединенное к белку.

Термины «злокачественная опухоль» и «злокачественный» означают или описывают физиологическое состояние или нарушение у млекопитающих, обычно характеризующее нерегулируемым ростом клеток.

Термины «лечить» или «лечение», если контекст не указывает на иное, означают терапевтическое лечение или профилактические меры с целью недопущения рецидива, направленные на ингибирование или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как развитие или распространение злокачественной опухоли. Применительно к настоящему изобретению к полезным или желательным клиническим результатам относятся, помимо прочего, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизация (то есть отсутствие ухудшения) заболевания, приостановка или замедление прогрессирования заболевания, смягчение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссия (частичная или полная), которые могут как поддаваться, так и не поддаваться выявлению. Термин «лечение» также может означать продление выживаемости в сравнении с ожидаемой выживаемостью без лечения. К нуждающимся в лечении относятся как те, у кого уже имеется заболевание или нарушение, так и те, кто предрасположен к заболеванию или нарушению.

Под термином «вспомогательное вещество» в данном документе понимают неактивные или обычно инертные вещества, добавляемые в препарат и служащие носителем или средой для активной фармацевтической субстанции, но не влияющие на терапевтическое действие активной фармацевтической субстанции. Его можно использовать для придания нужной консистенции, улучшения стабильности и/или регулирования осмоляльности препарата. Применительно к настоящему изобретению к используемым вспомогательным веществам относятся, помимо прочего, стабилизирующие белки агенты, буферы, полимеры, солюбилизаторы, криопротекторы, разбавители и их смеси.

Термин «лекарственный препарат» в настоящем документе означает фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое активное соединение. Физические состояния лекарственного препарата

могут быть представлены в виде, помимо прочего, жидкости, твердых лекарственных форм, мягких лекарственных форм, суспензий, порошков, паст, гелей и тому подобного, а также их сочетаний.

Термин «идентичность последовательности» в настоящем документе означает наличие в точности одинаковых нуклеотидов или аминокислот в одном и том же положении совмещенных последовательностей.

Термины «препарат», «фармацевтический состав» и «фармацевтическая композиция» употребляются наравне и означают препараты в форме, позволяющей обеспечить эффективную биологическую активность активных фармацевтических субстанций, и поэтому могут быть введены субъекту в терапевтических целях, причем субъектом предпочтительно является человек, если контекст не указывает на иное.

Термин «направленная доставка» относится к системе, выделяющей агента, который проявит свою активность непосредственно в нужной части организма (на органном, клеточном или субклеточном уровне конкретной ткани). Это делается с целью преодолеть неспецифичное и нежелательное влияние агента и тем самым уменьшить его количество, необходимое для требуемой эффективности.

Термин «тиол-малеимидная реакция» означает простую и быструю реакцию между тиолом и малеимидом с образованием тиосукцинимидного продукта, которая используется для сайт-селективной модификации остатков цистеина в методе биоконъюгации. Тиол-малеимидную реакцию используют для присоединения химических меток к биомолекулам посредством конъюгации тиола, таких как флуоресцирующие красители, ПЭГ, радиоизотопные метки и низкомолекулярные вещества.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ:

В одном из аспектов настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий белок представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленного SEQ ID NO.1, вставленный и экспрессируемый в подходящей клетке-хозяине.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность упомянутого варианта с последовательностью, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO.1. В более частном варианте осуществления изобретения идентичность последовательности варианта составляет по меньшей

мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в сравнении с лектином *Sclerotium rolfisii* (SRL), представленным SEQ ID NO.1.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий лектин представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfisii* (SRL), представленный SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления упомянутый вариант сохраняет аффинность связывания в сравнении с лектином *Sclerotium rolfisii* (SRL) дикого типа, представленным SEQ ID NO.1. Указанная аффинность связывания, предположительно, относится к одному или нескольким антигенам, выбираемым из группы, содержащей антиген Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (T-антиген), Core2, 'α2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-T-антиген), 'α2,6/6-сиалил Core2' и модифицированные формы TF- и T-антигенов, такие как экспрессия разветвленных и фукозилированных N- и O-гликанов после альтерации, включая изменения в антигенах Льюиса (SLe^x и SLe^a), которые экспрессируются в более чем 90% злокачественных опухолей у человека. Помимо альтераций в коровых гликанах, каждый из этих углеводов может дополнительно модифицироваться таким образом, чтобы он генерировал уникальные терминальные гликановые мотивы, которые также могут подвергаться специфичным изменениям после неопластической трансформации. Например, высокофукозилированные гликаны, такие как антигены Льюиса [Льюис^{a/b} (Le^{a/b}) и Льюис^{x/y} (Le^{x/y})], могут обогащаться на поверхности клеток после неопластической трансформации. Аналогично, сиалилирование, распространенная терминальная модификация гликанов, также может подвергаться значительным изменениям во время опухолевой прогрессии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения варианты или модифицированные формы TF-антигена (или T-антигена) включают [3OSO3]Gal β 1-3GalNAc α ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3 [6OSO3] GalNAc α ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α ; GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α ; Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6) GalNAc α ; Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc α ; Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α ; Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α ; Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3) GalNAc α ; Gal β 1-3GalNAc α (TF-антиген); Neu5Ac α 2-6 (Gal β 1-3)GalNAc α ; Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc α ; Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α ; GlcNAc β 1-6 (Gal β 1-3) GalNAc α ; Gal β 1-3 (Neu5Ac β 2-6)GalNAc α ; Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α ; Neu5Ac β 2-6 (Gal β 1-3)GalNAc α ; GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α .

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий белок представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfsii* L (SRL), представленный SEQ ID NO.1, имеющий альтерацию белка в виде вставки, удаления или замещения аминокислоты в SEQ ID NO:1, при этом такие альтерации не меняют структурную или функциональную активность белка, например, белок/вариант сохраняет аффинность связывания в отношении одного или нескольких антигенов, выбираемых из антигена Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (Т-антиген), Core2, ' α 2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-Т-антиген), ' α 2,6/6-сиалил Core2' и модифицированных форм TF- и Т-антигенов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий белок представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленного SEQ ID NO.1, в котором, в отличие от SRL дикого типа, отсутствует аминокислота цистеин (С) в аминокислотных положениях между 1 и 141 в SEQ ID NO:1. Упомянутый вариант получают посредством вставки, удаления или замещения аминокислоты в SEQ ID NO.1, при этом такие альтерации не меняют структурную или функциональную активность белка, например, белок/вариант сохраняет аффинность связывания в отношении одного или нескольких антигенов, выбираемых из антигена Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (Т-антиген), Core2, ' α 2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-Т-антиген), ' α 2,6/6-сиалил Core2' и модифицированных форм TF- и Т-антигенов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий лектин представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленный SEQ ID NO: 1, имеющий, в отличие от SRL дикого типа, дополнительный цистеин на карбоксильном конце. Добавление цистеина на карбоксильном конце выполняется таким образом, чтобы оно не приводило к альтерации структурной или функциональной активности белка, например, белок/вариант сохраняет аффинность связывания в отношении одного или нескольких антигенов, выбираемых из антигена Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (Т-антиген), Core2, ' α 2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-Т-антиген), ' α 2,6/6-сиалил Core2' и модифицированных форм TF- и Т-антигенов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий белок SEQ ID NO: 2 представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfii* (SRL), вставленный и экспрессируемый в клетке-хозяине. Указанный рекомбинантный гликан-связывающий белок SEQ ID NO: 2 раскрыт в индийской заявке на патент 350/MUM/2009. Белок SEQ ID NO:2 имеет два углевод-связывающих сайта (первичный и вторичный) с аффинностью в отношении гликанов GalNAc и GlcNAc; а в одном варианте осуществления белок SEQ ID NO.2 имеет высокую аффинность связывания в отношении онкоэмбрионального антигена Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T) и его производных, которые экспрессируются в более чем 90% злокачественных опухолей у человека. Онкоэмбриональный антиген Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T) и его производные включают в себя O-GalNAc Core1 (T-антиген); и расширенные коровые структуры, включающие в себя Core2, α 2,3/6-сиалил Core1 (сиалил-T-антиген), α 2,6/6-сиалил Core2 и модифицированные формы TF- и T-антигенов.

Рекомбинантный гликан-связывающий белок SEQ ID NO.2, когда экспрессируется в подходящем хозяине, таком как *E. coli*, имеет в своем составе ~10–30% примесей N-концевого метионина. Указанные белки с N-концевым метионином склонны к окислению во время производства и хранения. Окисление метионина может ограничить клиническую эффективность, стабильность и вероятность регистрации терапевтического продукта в регуляторных органах. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для решения вышеупомянутого вопроса аминокислота в положении 1 может замещаться подходящей аминокислотой, способствующей эффективному удалению N-концевого метионина с помощью эндогенной системы клетки-хозяина. Специалистам в данной области техники очень хорошо известно, что замещение может выполняться таким образом, что оно не повлияет на структуру или функцию указанного белка. В частном варианте осуществления изобретения треонин (T) в положении 1 SEQ ID NO: 2 может замещаться подходящей аминокислотой, которая способствует эффективному удалению N-концевого метионина с помощью механизма обработки клетки-хозяина. В более частном варианте осуществления изобретения треонин (T) в первом положении SEQ ID NO: 2 может замещаться аминокислотой серином (S), способствующим эффективному удалению N-концевого метионина в нулевом положении. Указанное замещение выполняется таким образом, что функциональная

стабильность белка и его аффинность связывания в отношении TF- и TN-антигена остаются неизменными.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения варианты лектина *Sclerotium rolfisii* (SRL), представленные SEQ ID NO.1, получают в соответствии с упомянутыми выше вариантами осуществления, и предполагается их дальнейшая конъюгация с веществом. Указанный агент выбирается из группы, состоящей из терапевтического агента, цитотоксического агента, радиоактивного агента, противоопухолевого агента, диагностического агента и их комбинаций.

Для получения конъюгатов могут проводить реакцию агента с белком с помощью любого подходящего химического способа конъюгации, известного специалистам. Использование произвольного способа конъюгации может приводить к образованию гетерогенных молекул конъюгата. Указанная гетерогенность может далее приводить к проблемам описания характеристик, эффективности и безопасности для пациентов. Чтобы избежать таких проблем, может предпочтительно применяться или быть разработан способ сайт-специфичной конъюгации. В одном из вариантов осуществления рекомбинантный гликан-связывающий белок SEQ ID NO.2 может быть преобразован с целью реализовать явление сайт-специфичной конъюгации веществ. В более частном варианте осуществления изобретения в качестве химического способа сайт-специфичной конъюгации используют тиол-малеимидную реакцию, т. е. сайт-специфичная конъюгация на основе цистеина. Чтобы воспользоваться преимуществами сайт-специфичной конъюгации на основе цистеина, SEQ ID NO.2 можно преобразовать таким образом, чтобы присутствовал цистеин (C) на карбоксильном конце SEQ ID NO: 2, т. е. в положении 142, однако цистеин (C) в положении 142 может образовывать дисульфидную связь с цистеином (C) в положении 76, что приводит к изменениям в структуре белка вследствие запутывания, которые могут стать причиной трудностей в очистке/последующей обработке. Кроме того, изменения в структуре белка могут приводить к структурным и функциональным изменениям в биологической активности. Указанные проблемы можно решить замещением аминокислоты цистеина (C) (в положении 76 SEQ ID NO.2) любой другой подходящей аминокислотой. Указанное замещение можно выполнить таким образом, чтобы функциональная стабильность и аффинность связывания в отношении антигена Томсена-Фриденрайха Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (Т-антиген), Core2, 'α2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-Т-антиген),

' α 2,6/6-сиалил Core2' и модифицированных форм TF- и T-антигенов не изменились. В частном варианте осуществления изобретения аминокислота цистеин (C) в положении 76 SEQ ID NO.2 замещается глицином (G).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий белок SEQ ID NO.2 преобразуют таким образом, чтобы в нем были модификации в положениях 1, 76 и 142. Указанная модификация содержит серин в положении 1 вместо треонина; глицин в положении 76 вместо цистеина; и присоединенный цистеин на карбоксильном конце SEQ ID NO.2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения преобразованный рекомбинантный гликан-связывающий белок представляет собой белок SEQ ID NO.3.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный гликан-связывающий белок SEQ ID NO.2 преобразуют таким образом, чтобы в нем были модификации в положениях 1, 76 и 142–143. Указанная модификация содержит серин в положении 1 вместо треонина; глицин в положении 76 вместо цистеина; и присоединенный серин в положении 142; и цистеин в положении 143, т. е. на карбоксильном конце SEQ ID NO.2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения преобразованный рекомбинантный гликан-связывающий белок представляет собой белок SEQ ID NO.4. Присоединение серина в положении 142 может способствовать обеспечению пространства и гибкости между С-концевым цистеином и белком, обеспечивая дополнительную гибкость конъюгированному препарату и предотвращая проблемы с растворимостью конъюгата белка.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения белок SEQ ID NO.3 или SEQ ID NO.4 может далее использоваться для получения конъюгатов белка, в частности, с помощью тиол-малеимидной реакции с получением гомогенной смеси конъюгатов. Указанные гомогенные конъюгаты имеют контролируемое отношение лекарственного средства к антителу (DAR), что дополнительно повышает терапевтический индекс получаемых конъюгатов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO.5 и SEQ ID NO.6 можно использовать для экспрессии рекомбинантного гликан-связывающего белка SEQ ID NO.3 и SEQ ID NO.4 соответственно.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения варианты лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленные SEQ ID NO.1, и полученные с использованием указанных вариантов конъюгаты предполагается использовать в получении лекарственного препарата для лечения злокачественной опухоли.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения варианты лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленные SEQ ID NO.1, и полученные с использованием указанных вариантов конъюгаты предполагается использовать для диагностики или терапевтического воздействия на злокачественную опухоль.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения получают фармацевтическую композицию, состоящую из вариантов лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленных SEQ ID NO.1, или конъюгатов, полученных с помощью этих вариантов, в присутствии одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества можно подбирать таким образом, чтобы обеспечить или улучшить стабильность, биологическую доступность или приемлемость для пациента. Указанная фармацевтическая композиция может быть представлена в фармацевтически приемлемой форме, такой как жидкость (например, в виде водного раствора или суспензии или в виде раствора или суспензии на масляной основе), твердая форма (например, в виде капсул или таблеток), лиофилизированный порошок, спрей, крем, лосьон или гель, везикулярные системы доставки лекарственного средства, такие как, среди прочего, билосомы, липосомы, ниосомы, трансферсомы, этосомы, сфингосомы, фармакосомы, многослойные везикулы, микросферы и тому подобное.

Различные аспекты настоящего изобретения далее раскрываются посредством приведенных ниже примеров. Примеры хорошо известны, и специалисты хорошо знают и информированы об их очевидных вариациях. Поэтому примеры никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ:

Пример 1. Процесс производства рекомбинантных белков

Экспрессия рекомбинантного гликан-связывающего белка SEQ ID NO.3 и SEQ ID NO.4 Нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO: 5), кодирующую рекомбинантный гликан-связывающий белок SEQ ID NO.3, клонировали в вектор pET27b с помощью NdeI и BamHI с образованием конструкции pET27b. Далее конструкцию pET27b

трансформировали в хозяина для распространения компетентных клеток Top10 *E. coli*. Плазмиду изолировали из трансформированных клеток, подтверждали целостность вставок с помощью анализа расщепления рестриктазами и подтверждали последовательность генов методом секвенирования ДНК. Верифицированную плазмиду pET27b далее трансформировали в хозяина для экспрессии BL21 DE3 (Gold) *E. coli*. Трансформированные клоны тестировали на экспрессию рекомбинантного белка, и клоны, показывающие высокую экспрессию, верифицировали методом секвенирования ДНК и далее использовали для приготовления банка клеток. Банк клеток с установленными характеристиками используется в процессе ферментации.

Для ферментации посевную культуру готовили путем инокуляции культуры из раствора глицерина в среде, содержащей дрожжевой экстракт (10 г/л), калия дигидрофосфат (3 г/л), калия гидроортофосфат (12,54 г/л), аммония сульфат (5 г/л), натрия хлорид (0,5 г/л), декстрозу (12 г/л), магния сульфата гептагидрат (1 г/л), канамицина сульфат (20 мг/л) и раствор микропримеси металла (1 мл/л). Ферментацию начинали при температуре 30 °С, а затем температуру постепенно понижали до 18 °С. Уровень РК поддерживали равным 60%, а pH поддерживали равным $6,80 \pm 0,05$ с помощью щелочного раствора, за исключением стадии перехода на другой источник углерода. Применялся процесс ферментации с периодическим добавлением субстрата с использованием глицерина (50%) и дрожжевого экстракта (40%) в качестве, соответственно, источника углерода и азота в питательной среде. Индукцию выполняли с помощью 0,15 мМ ИПТГ при оптической плотности (ОП) при длине волны 600 нм около 60. Общее время обработки серии составляло от 48 до 72 часов, при этом максимальную ОП 600 достигали в диапазоне 107 через 52 часа логарифмического роста. Экспрессия рекомбинантного белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3 составляла около 6,3 г/л. Ферментативный бульон собирали из ферментатора. Затем его центрифугировали на скорости 9000 об/мин в течение 10–15 минут при температуре 10 °С и получали компактный осадок клеток. Полученный осадок затем суспендировали в пропорции 1:10 (масс/об) в лизирующем буфере, содержащем 25 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТК, pH 8,5, и суспензию перемешивали в течение 1–2 часов механической мешалкой с поддержанием температуры 10 ± 4 °С. Лизис выполняли с помощью гомогенизатора высокого давления при давлении 1100 ± 200 бар за 1–2 прохода. Достигалась эффективность

лизиса клеток >90–95% (при определении при ОП 600), и лизат собирали при низкой температуре.

Лизат клеток осветляли на колонке с использованием тонкопленочного фильтра с размером пор 0,1 мкм, и собирали пермеат. Чтобы извлечь максимальное количество белка, ретентат промывали 4–6 раз буфером 25 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТК, рН 8,0, в ступенчатом режиме до тех пор, пока поглощение белка при длине волны 280 нм не падало до уровня ниже 4–6. Затем раствор осветляли через систему мембранной фильтрации с размером пор 0,1 мкм при трансмембранном давлении 2–10 фунтов/кв. дюйм. Промывочные растворы, содержащие белок, объединяли с основным пермеатом. Температуру поддерживали ниже 25 °С во время всего процесса осветления.

Белок SEQ ID NO.3 очищали с помощью трехстадийной хроматографии. На первой стадии лизат клеток загружали в смолу Cellufine Max Q-r, предварительно уравновешенную 25 мМ трис-буфером, содержащим 1 мМ ЭДТК, рН 8,0±0,5, и промывали 25 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТК, 50 мМ NaCl при рН 8,0. Белок элюировали 25 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТКА, 200 мМ NaCl при рН 8,0. Весь пик собирали одной фракцией. На второй стадии белок SEQ ID NO.3, элюированный на первой стадии, связывали с колонкой CM Sepharose, предварительно уравновешенной уравнивающим буфером при емкости связывания 20 мг/мл. После полной загрузки колонку промывали уравнивающим буфером 25 мМ натрия ацетата, 5 мМ β-меркаптоэтанола, рН 5,1, чтобы удалить несвязанный белок. Элюирование проводили с линейным градиентом 0–50% 25 мМ натрия ацетата, 1,0 М раствора NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанола, рН 5,1, за 15 объемов колонки с последующим промыванием 100% буфером 25 мМ натрия ацетата, 1,0 М раствора NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанола, рН 5,1. Затем с помощью трис-буфера доводили рН полученного из колонки CM Sepharose элюата до 8,0 и заменяли буфер на 25 мМ трис, 5 мМ бета-меркаптоэтанол, рН 8,0, до получения электропроводности менее 2,0 мСм/см с помощью мембраны 5 кДа. Белок SEQ ID NO.3 загружали в третью колонку Source 30Q, предварительно уравновешенную уравнивающим буфером: 25 мМ трис, 5 мМ бета-меркаптоэтанол, рН 8,0. Белок SEQ ID NO.3 затем элюировали элюирующим буфером 25 мМ трис, 5 мМ бета-меркаптоэтанола, 500 мМ NaCl, рН 8,0. Получали рекомбинантный белок SEQ ID NO.3 с чистотой выше 95%.

Аналогично, получали белок SEQ ID NO.4 с чистотой выше 95%.

Молекулярная масса и изоэлектрическая точка очищенного белка SEQ ID NO.3 и SEQ ID NO.4 оказались равными указанным ниже.

| Белок | Молекулярная масса | Изоэлектрическая точка |
|-------------|--------------------|------------------------|
| SEQ ID NO.3 | 16086,75 | 6,49 |
| SEQ ID NO.4 | 16173,83 | 6,49 |

Пример 2. Анализ цитотоксичности (MTS-PMS) экспрессируемых белков.

Биологическую активность белка SEQ ID NO.3 и SEQ ID NO.4 оценивали методом биологического анализа MTS-PMS. Изучали влияние указанных белков на клеточную линию злокачественной опухоли яичника PA-1, клеточную линию злокачественной опухоли мочевого пузыря MOLT-3, клеточную линию злокачественной опухоли крови Jurkat E6 и клеточную линию злокачественной опухоли молочной железы MDA-MB 231.

Для анализа использовали 5000 клеток/лунка.

В качестве эталона для проверки пригодности системы (SST) использовали фармацевтическую субстанцию доксорубицин.

Получили следующие результаты анализа цитотоксичности:

| Таблица № 1. Биологический анализ MTS-PMS | | | | | |
|--|--------------|---|------|--------|-----------|
| Фармацевтическая субстанция | | Цитотоксичность для клеточных линий (%) | | | |
| Испытуемый образец | Концентрация | MDA-MB 231 | PA-1 | MOLT-3 | Jurkat E6 |
| Доксорубицин | 100 мкМ | 45% | - | - | - |
| SEQ ID NO.2 | 80 мкг/мл | 71% | 81% | 46% | 61% |
| SEQ ID NO.3 | 80 мкг/мл | 56% | 82% | 43% | 68% |
| SEQ ID NO.4 (восстанавливающие условия) | 80 мкг/мл | 53% | 77% | 46% | 62% |

| | | | | | |
|--|-----------|-----|-----|-----|-----|
| SEQ ID NO.4 (невосстанавливающие условия) | 80 мкг/мл | 56% | 72% | 45% | 55% |
|--|-----------|-----|-----|-----|-----|

Заключение:

- Белки SEQ ID NO.2, 3 и 4 показали лучшие результаты цитотоксичности в сравнении с доксорубицином на клетках MDA-MB-231.
- Белки SEQ ID NO.2, 3 и 4 показали лучшие результаты цитотоксичности в сравнении с доксорубицином на других клеточных линиях — PA-1, MOLT-3 и Jurkat E6.
- Белки показали схожую биологическую активность, и поэтому можно предположить, что у них схожая функциональность.

Пример 3. Изучение связывания гликанов и изучение колокализации

- а. Изучение связывания гликанов проводилось с целью понять аффинность связывания и специфичность лектина с SEQ ID NO 2 в отношении гликанов, экспрессируемых на клетках злокачественной опухоли.**

Лектин с SEQ ID NO 2 анализировали с использованием следующих массивов гликанов с целью определения специфичных связывающих мотивов:

- массив O-гликанов, содержащий 94 гликана; и
- массив N-гликанов, содержащий 100 гликанов

Наблюдения:

- Лектин с SEQ ID NO: 2 показал специфичное связывание с N-гликанами, содержащими GlcNAc на невосстанавливаемом конце; расчетное значение Kd с терминальными мотивами N-гликана GlcNAc было в диапазоне от 0,238 до 0,460 Kd (мкг/мл).
- Лектин с Seq ID No 2 показал сильный и широкий профиль связывания с O-гликанами, а именно с T-антигеном и его расширенными коровыми структурами. Было установлено, что основными связывающими мотивами являются O-GalNAc Core1 (T-антиген); расширенные структуры Core1; Core2; α 2,3/6-сиалил Core1 и α 2,6/6-сиалил Core2. Расчетное

значение Kd для Т-антигена равно 0,319, для сиалильного Т-антигена — от 0,670 до 1,756, а для Core2 — 0,212 Kd (мкг/мл).

в. Изучение колокализации SEQ ID NO 2

Изучение проводилось с целью проанализировать локализацию SEQ ID NO 2 (исследуемого образца) в клеточных органеллах методом конфокальной микроскопии.

Исследуемый образец в виде водного раствора помечали ФИТЦ-меткой с концентрацией белка 1 мг/мл.

Исходный раствор исследуемого образца доводили в бессывороточной среде до одной концентрации — 100 мкг/мл.

Клетки высевали на покровное стекло с плотностью посева $0,1 \times 10^6$ клеток/лунка. После завершения адгезии клеток на покровном стекле клетки обрабатывали 100 мкг/мл ФИТЦ-меченного рекомбинантного лектина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 в течение 2 часов при температуре 37 °С.

После инкубации клетки промывали ФСБ (3 промывки) и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 минут при комнатной температуре. После фиксации клетки выполняли пермеабиллизацию с помощью 0,5% IGEPAL в течение 10 минут при комнатной температуре (пермеабиллизация не выполнялась для клеток, окрашенных Pan-Cadherin). После пермеабиллизации клетки блокировали 5% нормальной козьей сывороткой в течение 1 часа при комнатной температуре. После блокировки клетки обрабатывали специфическими маркерами органелл в течение 1,5 часов при комнатной температуре, а затем — вторичным антителом в течение 2 часов при комнатной температуре.

Для разных органелл использовались следующие антитела:

Таблица 3. Антитела, использовавшиеся для органелл

| Органелла | Специфический маркер органелл | Разведение | Вторичное антитело | Разведение |
|------------------|--------------------------------------|-------------------|--|-------------------|
| Митохондрия | MTCO2 | 1: 50 | Козье антитело к IgG мыши, конъюгированное с Texas Red | 1:500 |

| | | | | |
|------------------------------|--------------|-------|--|-------|
| Эндоплазматический ретикулум | Калнексин | 1: 50 | Антитело к IgG мыши, конъюгированное с Texas Red | 1:500 |
| Аппарат Гольджи | GM130 | 1: 50 | Антитело к IgG мыши, конъюгированное с Texas Red | 1:500 |
| Оболочка ядра | Ламин | 1: 50 | Антитело к IgG мыши, конъюгированное с Texas Red | 1:500 |
| Плазматическая мембрана | Pan Cadherin | 1: 50 | Антитела anti-rabbit, меченные Alexa Fluor красным | 1:500 |

После инкубации клетки промывали ФСБ-Т (3 промывки) и ФСБ (3 промывки) и окрашивали ДАФИ (ядерный краситель) в течение 3 минут при комнатной температуре.

Клетки промывали (3 промывки) и помещали на предметное стекло с помощью среды для заключения, препятствующей выгоранию флуоресценции Prolong Glass. Получали изображения на конфокальном флуоресцентном микроскопе (производитель: Olympus FV1000). Изображения получали с помощью программного обеспечения FluoView.

Для определения колокализации рекомбинантного лектина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 (рекомбинантного белка) клетки злокачественной опухоли мочевого пузыря (T24) инкубировали с рекомбинантным лектином с последовательностью аминокислот SEQ ID NO:2, меченным ФИТЦ, в течение 2 ч. Затем следовало окрашивание специфическими маркерами органелл МТСО2 (митохондрия), калнексином (эндоплазматический ретикулум), GM130 (аппарат Гольджи), Pan Cadherin (плазматическая мембрана) и ламином А/С (ядерная мембрана). Визуализация клеток выполнялась с помощью конфокального микроскопа.

Результаты продемонстрировали, что рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 (рекомбинантный белок) колокализовался в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и плазматической мембране (красная флуоресценция) [см. фиг. 5].

Пример 4. Сравнение экспрессируемого белка в отношении N-концевого метионина

Содержание N-концевого метионина в белке SEQ ID NO.2, 3 и 4 измеряли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

| Испытуемый образец | Чистота (%) | N-концевой метионин (%) |
|--------------------|-------------|-------------------------|
| SEQ ID NO.2 | 86,29 % | 13,18 % |
| SEQ ID NO.3 | 98,21 | 1,07 % |
| SEQ ID NO.4 | 95,72 % | 1,25 % |

Заключение: Белок SEQ ID NO:3 и 4 показал менее 2% примеси N-концевого метионина, в то время как белок SEQ ID NO:2 показал более 13% N-концевого метионина.

Пример 5. Сравнение экспрессируемого белка по стабильности

Стабильность экспрессируемого белка, т. е. SEQ ID NO.3, оценивали в течение 2 недель с помощью 10 мМ буфера TBS с pH 7,8 при температуре 2–8 °С.

| Временные точки | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|-------------------|------------|---------------------------------|-------------------|------------|---------------------------------|-------------------|
| 0-я неделя | | | 1-я неделя | | | 2-я неделя | | |
| Чистота, % | Единичная наибольшая примесь, % | Сумма примесей, % | Чистота, % | Единичная наибольшая примесь, % | Сумма примесей, % | Чистота, % | Единичная наибольшая примесь, % | Сумма примесей, % |
| 98,05 | 1,31 | 1,95 | 97,34 | 0,98 | 2,66 | 97,09 | 0,86 | 2,91 |

Заключение: Экспрессируемый белок, т. е. SEQ ID NO.3, оказался стабильным в 10 мМ буфере TBS, pH 7,8, при температуре 2–8 °С.

Пример 6. Сравнение экспрессируемого белка по растворимости

Растворимость экспрессируемого белка SEQ ID NO.3 и 4 в производственной среде (индуцированной при температуре 18 °С с помощью 0,25 мМ ИПТГ) оценивали методом ДСН-ПААГ.

Результаты представлены на фигуре 1 и фигуре 2.

| Фигура 1. Растворимость экспрессируемого белка SEQ ID NO.3 | | |
|--|--------------------------|-----------|
| Полоса | Образцы | Полоса, % |
| 1 | маркер | - |
| 2 | серия 1 – 0 ч | - |
| 3 | серия 1 – в течение ночи | 56,0 |
| 4 | серия 1 – осадок | 49,6 |

| | | |
|---|--------------------------|------|
| 5 | серия 1 – супернатант | 47,2 |
| 6 | серия 2 – 0 ч | - |
| 7 | серия 2 – в течение ночи | 52,5 |
| 8 | серия 2 – осадок | 51,1 |
| 9 | серия 2 – супернатант | 55,4 |

Фигура 2. Растворимость экспрессируемого белка SEQ ID NO.4

| Полоса | Образцы | Полоса, % |
|--------|--------------------------|-----------|
| 1 | маркер | - |
| 2 | серия 1 – в течение ночи | 15,64 |
| 3 | серия 1 – осадок | 18,14 |
| 4 | серия 1 – супернатант | 20,41 |
| 5 | серия 2 – в течение ночи | 19,72 |
| 6 | серия 2 – осадок | 16,40 |
| 7 | серия 2 – супернатант | 18,49 |
| 8 | серия 3 – в течение ночи | 16,57 |
| 9 | серия 3 – осадок | 10,44 |
| 10 | серия 3 – супернатант | 14,55 |

Заключение: Растворимость экспрессируемых белков SEQ ID NO.3 и 4 в производственной среде была подтверждена.

Пример 7. Анализ экспрессии растворимых белков, т. е. SEQ ID NO.3 и 4, в разных временных точках на стадии ферментации.

Клетки выращивали в ферментационной среде в контролируемых условиях и индуцировали подходящим индуктором. Сбор выполняли в различных временных точках и анализировали методом ДСН-ПААГ на предмет экспрессии растворимых белков.

Растворимость экспрессируемого белка SEQ ID NO.3

| Полоса | Образцы | Абс. колич. (мкг/10 мкл) | Относительный % |
|--------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 | Маркер | - | - |
| 2 | Log 45 ч осадок | 0,33 | 6,6 |
| 3 | Log 45 ч супернатант | 4,66 | 93,4 |
| 4 | Log 48 ч осадок | 1,52 | 29 |
| 5 | Log 48 ч супернатант | 3,71 | 71 |
| 6 | Log 51 ч осадок | 0,40 | 8,5 |
| 7 | Log 51 ч супернатант | 4,29 | 91,5 |
| 8 | Log 54 ч осадок | 1,30 | 23 |
| 9 | Log 54 ч супернатант | 4,32 | 77 |

| | | | |
|----|----------------------|------|----|
| 10 | Log 57 ч осадок | 1,73 | 26 |
| 11 | Log 57 ч супернатант | 4,87 | 74 |
| 12 | Log 60 ч осадок | 1,84 | 24 |
| 13 | Log 60 ч супернатант | 5,81 | 76 |

| Растворимость экспрессируемого белка SEQ ID NO.4 | | | |
|---|----------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Полоса | Образцы | Абс. колич. (мкг/10 мкл) | Относительный % |
| 1 | Log 45 ч осадок | 0,34 | 8,8 |
| 2 | Log 45 ч супернатант | 3,51 | 91,2 |
| 3 | Log 48 ч осадок | 0,22 | 5,7 |
| 4 | Log 48 ч супернатант | 3,58 | 94,2 |
| 5 | Log 51 ч осадок | 0,19 | 3,9 |
| 6 | Log 51 ч супернатант | 4,63 | 96,0 |
| 7 | Log 54 ч осадок | 1,31 | 23,2 |
| 8 | Log 54 ч супернатант | 4,33 | 76,8 |
| 9 | Маркер | - | - |

Заключение: Растворимость экспрессируемых белков SEQ ID NO.3 и 4 в производственной среде на стадии ферментации в разных временных точках была подтверждена. См. ФИГ. 3 и 4.

Пример 8. Получение конъюгата белок-лекарственное вещество

Белок SEQ ID NO.3 конъюгировали с цитотоксическим лекарственным средством MMAE по следующей процедуре:

30 мг белка SEQ ID NO.3 в 1X ФСБ (7,0 мг/мл) доводили до конечной концентрации 2,5 мг/мл с помощью 1X ФСБ с 10 мМ ЭДТК, ДМА и 3,0 экв. 10 мМ MC-Val-Cit-PAB-MMAE в ДМА, что давало конечную концентрацию ДМА 20% (об/об). Через 2 часа реакция была не завершена, и добавляли еще 3,0 экв. MC-Val-Cit-PAB-MMAE и инкубировали в течение 2 ч.

Затем конъюгат белок-лекарственное вещество анализировали методом ЖХМС, чтобы определить значение DAR. Полученный продукт обрабатывали методом эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке GE10-300 Superdex 75 с заменой буфера на 50 мМ трис, 150 мМ NaCl и доводили pH до 8,0 с помощью TBS.

После очистки методом SEC определяли значение DAR конъюгата белок-лекарственное вещество, которое оказалось равным 1,0.

Заключение: Было установлено, что конъюгат белок-лекарственное вещество, полученный с использованием белка SEQ ID NO.3, имеет значение DAR, равное 1, что свидетельствует о гомогенности образующегося конъюгата.

Пример 9. Биологический анализ – цитотоксическое действие конъюгата

Биологический анализ: анализировали цитотоксическое действие конъюгата из примера 8 на клеточную линию злокачественной опухоли яичника (PA-1) и клеточную линию злокачественной опухоли мочевого пузыря человека (T-24).

Высевали 5000 клеток на лунку и инкубировали при температуре 37 °С в течение ночи.

В соответствующей среде готовили разведения растворов конъюгатов и контрольного растворителя и добавляли их к клеткам. Добавляемый объем: 50 мкл в каждую лунку. Начальная концентрация препарата составляла 1 мкМ для конъюгата из примера 8 и только контроля в виде SEQ ID NO: 3 и 10% для контрольного растворителя (1X ФСБ с 20% ДМА), затем выполняли 10-кратное разведение с получением в общей сложности 11 разведений препарата. Каждую концентрацию анализировали в трех повторностях. Лунки только со средой использовали в качестве контрольных для расчета процента выживаемости. В каждую лунку добавляли реактив CellTiter-Glo (объем: 50 мкл), планшет встряхивали в течение 5 минут, и записывали люминесценцию. Продолжительность обработки лекарственным средством: 72 часа. Процент выживаемости рассчитывали путем деления сигнала люминесценции, получаемого в каждой обработанной лунке, на таковой в необработанной лунке (контроль только со средой) и умножения на 100.

Затем данные преобразовывали по формуле $X = \text{Log}(x)$ и анализировали методом нелинейной регрессии (подгонкой кривой), ингибирование дозозависимого ответа – log (ингибитор) как функцию ответа (3 параметра) с помощью программного обеспечения PRISM, чтобы определить значение IC50.

Были получены следующие результаты:

| Соединение | Значения IC₅₀ | |
|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | Клеточная линия PA-1 | Клеточная линия T-24 |
| Конъюгат из примера 8 | 17,7 нМ | 325,4 нМ |
| SEQ ID NO: 3 | 16 мкг/мл | - |

Заключение: Конъюгированные молекулы показали очень сильную активность в сравнении с SEQ ID No.3 в отношении клеточной линии PA-1 и T-24. Значения IC50 находятся в диапазоне 15–25 мкМ для SEQ ID NO.3, тогда как для конъюгата из примера 8 значения IC50 находятся в наномолярном диапазоне.

Формула изобретения:

- 1.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок, включающий в себя вариант лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленный SEQ ID NO:1, в котором, в сравнении с SRL дикого типа, вариант имеет в своем составе дополнительный цистеин на карбоксильном конце; и сохраняет аффинность связывания в отношении одного или нескольких антигенов, выбираемых из антигена Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (Т-антигена), Core2, ' α 2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-Т-антигена), ' α 2,6/6-сиалил Core2' и модифицированных форм TF- и Т-антигенов.
- 2.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором аминокислотная последовательность указанного варианта на 70%—99,99% идентична SEQ ID NO:1.
- 3.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором вариант не имеет цистеина (C) в положениях аминокислот между 1 и 141 в SEQ ID NO:1.
- 4.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором вариант включает в себя замену треонина (T) на серин (S) в положении 1.
- 5.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором вариант включает в себя замену цистеина (C) на глицин (G) в положении 76.
- 6.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором вариант включает в себя присоединение цистеина (C) в положении 142.
- 7.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором вариант включает в себя присоединение серина и цистеина (C) в положении 142 и 143 соответственно.
- 8.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором белок представлен SEQ ID NO.3 или SEQ ID NO.4.
- 9.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором указанный белок конъюгирован с агентом.
- 10.** Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 9, в котором агент выбирают из группы, состоящей из терапевтического агента, цитотоксического

агента, радиоактивного агента, противоопухолевого агента, диагностического агента и их комбинаций.

11. Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 9, в котором белок используется для направленной доставки агента.

12. Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором белок используется для получения лекарственного препарата для лечения злокачественных опухолей.

13. Рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1, в котором белок используется для диагностики или лечения злокачественных опухолей.

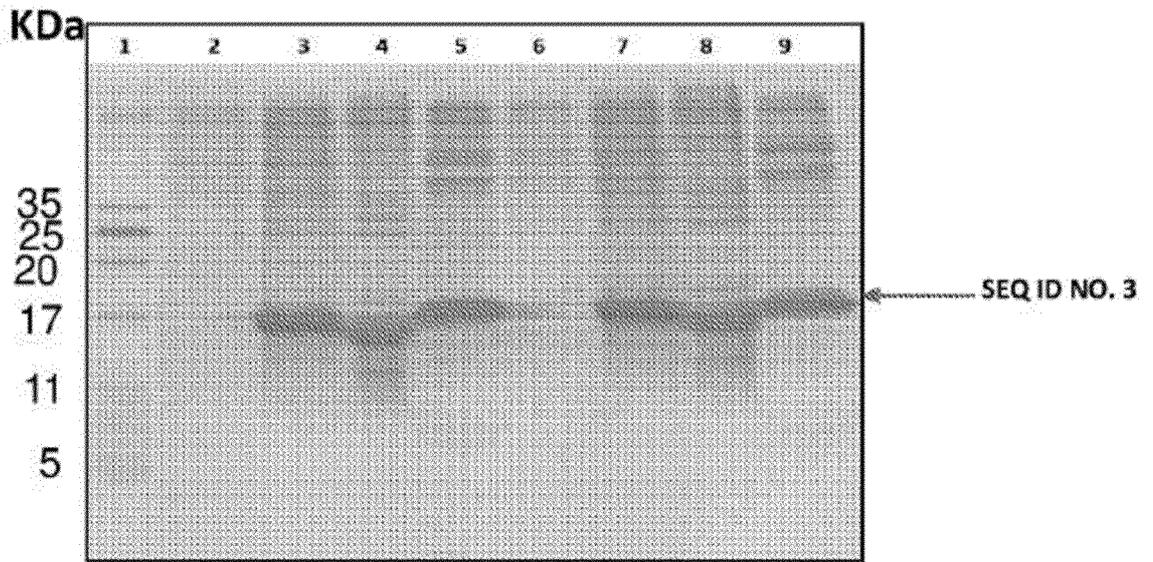
14. Фармацевтическая композиция, содержащая:

рекомбинантный гликан-связывающий белок по пункту 1; и

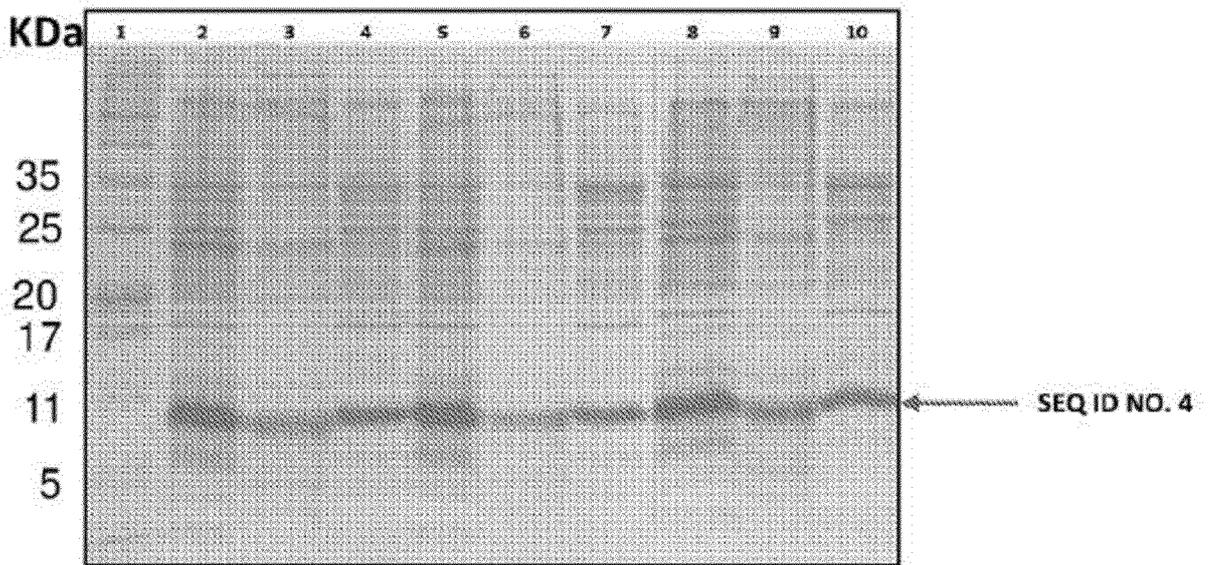
одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

15. Рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий белок по пункту 1.

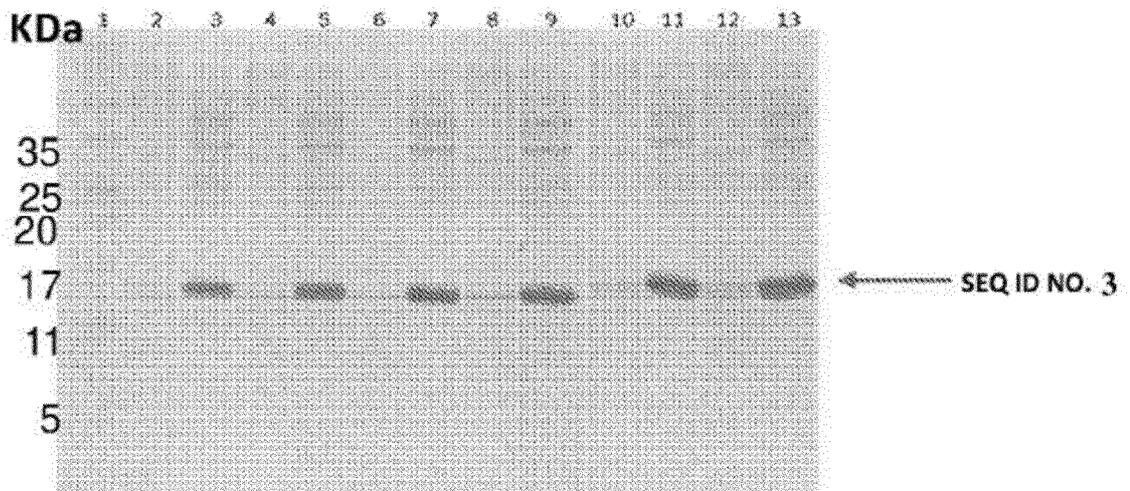
16. Клетка, трансфицированная рекомбинантным полинуклеотидом по пункту 15.



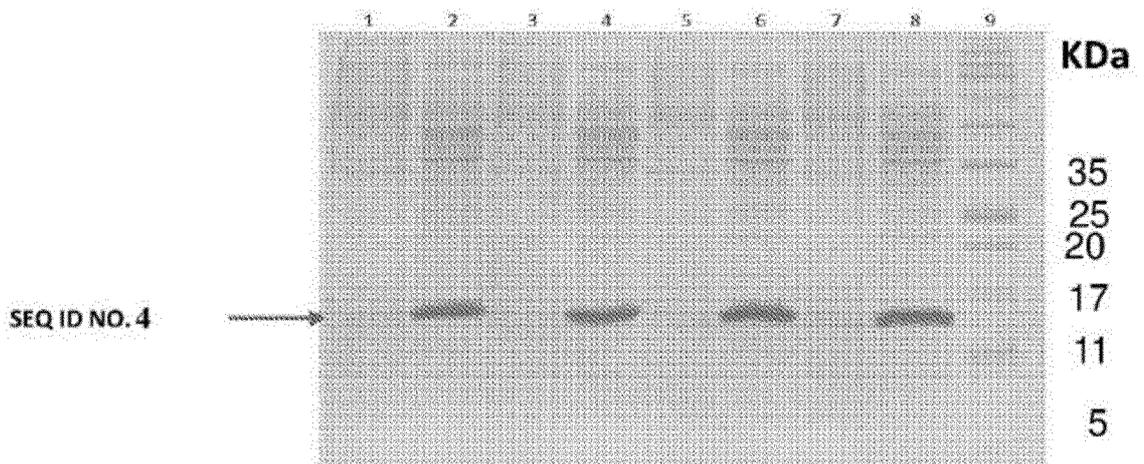
Фиг. 1



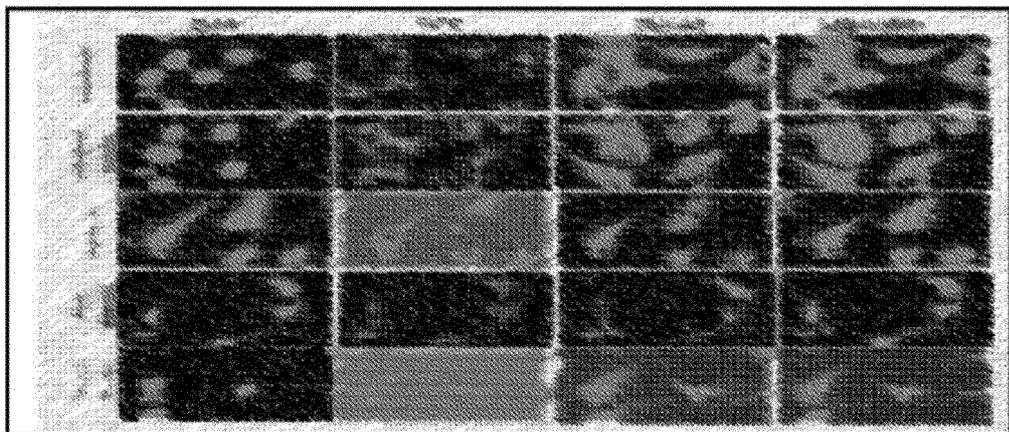
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5