

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
25 января 2024 (25.01.2024)



(10) Номер международной публикации
WO 2024/019642 A1

(51) Международная патентная классификация:

C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/19* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

водская, д. 23а, к. 2, этаж 7, помещ. 709 Москва, 115280,
Moscow (RU).

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2023/050176

(22) Дата международной подачи:
21 июля 2023 (21.07.2023)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

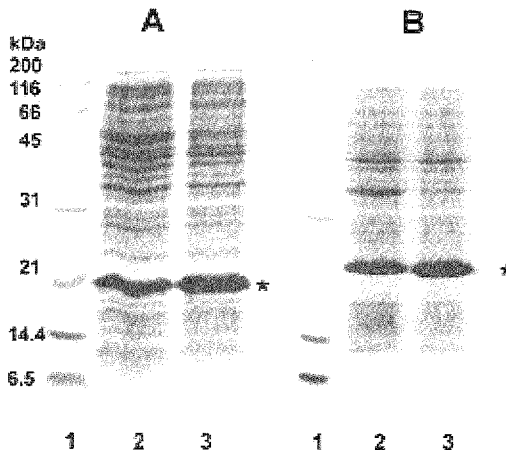
(30) Данные о приоритете:
2022120069 21 июля 2022 (21.07.2022) RU

(71) Заявитель: **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "МАНЕБИО" (LIMITED
LIABILITY COMPANY "MANEBIO")** [RU/RU]; вн.
тер. г. муниципальный округ Даниловский, ул. Автоза-

(72) Изобретатели: **ГАСПАРЯН, Марине Эдуардовна
(GASPARIAN, Marine Eduardovna)**; ул. Академика
Анохина, дом 4, корпус. 3, квартира 159 Москва,
119602, Moscow (RU). **ЯГОЛОВИЧ, Анна Валерьевна
(IAGOLOVICH, Anna Valerievna)**; ул. Енисейская,
д. 2, к. 2, кв.190-191 Москва, 129344, Moscow (RU). **АР-
ТЫКОВ, Артем Александрович (ARTYKOV, Artem
Alexandrovich)**; обл. Смоленская, мкр. 4, дом 16, кв.
41 Десногорск, 216400, Desnogorsk (RU). **ИСАКОВА,
Алина Алексеевна (ISAKOVA, Alina Alekseevna)**; ул.
Октябрьская, дом 70, квартира 18 Калининград, Кали-
нинградская область, , 236039, Kaliningrad (RU). **ДОЛ-
ГИХ, Дмитрий Александрович (DOLGIKH, Dmitry
Alexandrovich)**; ул. Люсиновская, дом 37, квартира 105
Москва, 115093, Moscow (RU). **КИРПИЧНИКОВ, Ми-**

(54) Title: HYBRID PROTEIN STRUCTURE BASED ON A RECEPTOR-SPECIFIC VARIANT OF TRAIL WITH AN INTEGRIN $\alpha V\beta 3$ -SPECIFIC PEPTIDE

(54) Название изобретения: ГИБРИДНАЯ БЕЛКОВАЯ КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ РЕЦЕПТОР-СПЕЦИФИЧНОГО ВАРИАНТА TRAIL С ПЕПТИДОМ, СПЕЦИФИЧНЫМ К $\alpha V\beta 3$ -ИНТЕГРИНУ



Фиг. 1

(57) Abstract: The invention relates to biotechnology and medicine, and more particularly to oncology, and can be used for treating tumours. Proposed is a hybrid protein structure containing at the N-terminus of a polypeptide chain a receptor-specific variant of the cytokine TRAIL, which binds specifically to the death receptor DR5, and containing at the C-terminus a peptide which binds specifically to integrin $\alpha V\beta 3$, providing increased accumulation in tumours. Said structure is used as an active agent in pharmaceutical compositions intended for treating oncological diseases characterized by expression of the DR5 receptor and integrin $\alpha V\beta 3$ on the tumour cell surface, such as, inter alia, glioblastoma and pancreatic adenocarcinoma. As a result of its bispecificity, the invention provides for faster accumulation in tumour structures and greater efficacy by comparison with a DR5-specific mutant variant of the anti-tumour cytokine TRAIL.

(57) Реферат: Изобретение относится к биотехнологии и медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано для



WO 2024/019642 A1

хаил Петрович (KIRPICHNIKOV, Mikhail Petrovich);
Трехгорный вал, д. 12, стр. 2, кв. 10 Москва, 123022,
Moscow (RU).

(74) Агент: **КОТЛОВ, Дмитрий Владимирович**
(KOTLOV, Dmitry Vladimirovich); ул. Луговая, д. 4,
корп. 2 Москва, 121205, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS,
ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, CV,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- с перечнем последовательностей в соответствии с
Правилом 5.2(a)
- в черно-белом варианте; международная заявка в
поданном виде содержит цвет или оттенки серого и
доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

терапии опухолей. Предложена гибридная белковая конструкция, содержащая на N-конце полипептидной цепи рецептор-селективный вариант цитокина TRAIL, специфически связывающийся с рецептором смерти DR5, а на C-конце пептид, специфически связывающийся с интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$, что обеспечивает повышенное накопление в опухолях. Указанную конструкцию используют в качестве активного действующего вещества в фармацевтических композициях, предназначенных для лечения онкологических заболеваний, характеризующихся экспрессией рецептора DR5 и интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ на поверхности опухолевых клеток, таких как глиобластома, аденокарцинома поджелудочной железы и другие. За счет биспецифичности изобретение обеспечивает более быстрое накопление в опухолевых структурах и повышенный уровень эффективности по сравнению с DR5-специфичным мутантным вариантом противоопухолевого цитокина TRAIL.

**ГИБРИДНАЯ БЕЛКОВАЯ КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ РЕЦЕПТОР-
СПЕЦИФИЧНОГО ВАРИАНТА TRAIL С ПЕПТИДОМ, СПЕЦИФИЧНЫМ К
 α V β 3-ИНТЕГРИНУ**

Область техники

5 Данное изобретение относится к биотехнологии и медицине, в частности, к новым белковым конструкциям на основе рецептор-специфичного варианта цитокина TRAIL, специфически связывающегося с рецептором смерти DR5, и может использоваться для приготовления терапевтических препаратов для лечения DR5-позитивных солидных опухолей.

10 **Уровень техники**

 Цитокин TRAIL (TNF-related-apoptosis inducing ligand) является частью системы иммунологического надзора за модифицированными клетками в организме. TRAIL способен селективно вызывать гибель опухолевых клеток, не затрагивая нормальные клетки. TRAIL имеет пять рецепторов, два из которых, DR4 и DR5, способны передавать
15 сигнал апоптоза, в то время как рецепторы-«ловушки» DcR1, DcR2 и OPG блокируют TRAIL-индуцированный апоптоз (O'Leary L. et al. Oncogene. 2016. Vol. 35, pp. 1261-1270). Однако эффективность единственного препарата для таргетной терапии на основе цитокина TRAIL дикого типа, прошедшего 3 фазу клинических испытаний (Dulanermin®) оказалась ограниченной и в основном заключалась в частичных ответах или
20 стабилизации заболевания (Ouyang X. et al. Invest. New Drugs. 36 (2018) 315–322). Основные причины - конкурентное взаимодействие с рецепторами-«ловушками» и короткий период полувыведения из организма.

 DR5-опосредованная гибель клеток представляет особый научно-практический интерес, поскольку в большинстве опухолей TRAIL вызывает апоптоз при взаимодействии
25 с рецептором DR5 (Kelley, R.F., Totpal, K., Lindstrom, S.H., et al., J. Biol. Chem., 2010, vol. 280, pp. 2205-2212). Рецептор DR5 гиперэкспрессирован в большинстве опухолей; это открывает перспективу применения агонистов рецептора DR5 при широком спектре опухолевых заболеваний. Ранее был получен рецептор-специфичный вариант TRAIL с
30 заменами аминокислотных остатков Y189N/R191K/Q193R/H264R/I266L/D269H в белке TRAIL, который селективно связывается лишь с одним из пяти рецепторов TRAIL, рецептором смерти DR5 (Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV et al. Apoptosis, 2009, 14:778-787). Данный мутантный вариант TRAIL индуцирует апоптоз в
35 опухолевых клетках значительно эффективнее, чем TRAIL дикого типа *in vitro* и *in vivo* и преодолевает рецептор-зависимую резистентность опухолевых клеток к TRAIL (Gasparian M.E. et al. Biochemistry (Mosc). 2015;80(8):1080-1091; Yagolovich A.V. et al. Transl Oncol. 2020;13(4):100762; патент РФ № 2620165 от 23.05.2017 г.; патент РФ №2727059 от 26.04.2019 г). Благодаря высокой рецепторной специфичности и, следовательно, более
40 низкому связыванию с тканями, указанный препарат обладает улучшенными фармакокинетическими характеристиками: его период полураспада у мышей составляет 12,54 минуты, что в 3 раза дольше, чем у TRAIL (3,64 минуты). Тем не менее, эти показатели могут быть недостаточны для значительного клинического эффекта. В связи с этим существует потребность в разработке модифицированных вариантов агонистов рецептора DR5 с дополнительными свойствами, позволяющими улучшить потенциальный противоопухолевый эффект.

Близкими к заявляемому изобретению являются решения Wang X с соавторами, которые получили белковые конструкции RGD-TRAIL и TRAIL-NGR, содержащие на N-либо на C-конце полипептидной цепи TRAIL дикого типа пептиды RGD (ACDCRGDCFC) либо NGR (CNGRCVSGCAGRC) и соединенные линкерной последовательностью GGGGS (Wang X, Qiao X, Shang Y, et al. RGD and NGR modified TRAIL protein exhibited potent anti-metastasis effects on TRAIL-insensitive cancer cells in vitro and in vivo. *Amino Acids*. 2017;49(5):931-941. doi:10.1007/s00726-017-2395-4). Благодаря специфичности пептидов к к интегрину $\alpha\beta 3$ и CD13 указанные конструкции лучше связывались с эндотелиальными клетками опухолевых сосудов. Однако, в отличие от DR5-селективного варианта цитокина TRAIL, данные белковые конструкции не обладают специфичностью рецептору DR5, которая чрезвычайно важна, учитывая, что из всех рецепторов TRAIL, рецептор DR5 играет главную роль в проведении сигнала апоптоза в большинстве опухолей.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание противоопухолевой гибридной белковой конструкции на основе DR5-специфичного мутантного варианта цитокина TRAIL, обладающей повышенным противоопухолевым действием за счет добавления дополнительной валентности для связывания с опухоле-специфичным рецептором (интегрином альфа в бета 3 ($\alpha\beta 3$)), что приводит к более быстрому накоплению в опухолевых структурах. Также задачей настоящего изобретения является расширение спектра средств для подавления пролиферации и индукции гибели опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор DR5 и интегрин $\alpha\beta 3$ на поверхности.

Указанная задача решается путем создания гибридной белковой конструкции, содержащей на N-конце полипептидной цепи противоопухолевый DR5-селективный вариант цитокина TRAIL, а на C-конце - пептид CRGDKGPDC (SEQ ID NO: 4), при этом два домена соединены линкерной последовательностью. Ранее было показано, что пептид CRGDKGPDC способен аффинно связываться с интегрином $\alpha\beta 3$ (Sugahara KN, et al. *Cancer Cell* 2009; 16:510). Интегрин $\alpha\beta 3$ гиперэкспрессирован во многих опухолях. Поэтому указанная гибридная белковая конструкция является перспективным средством для индукции гибели опухолевых клеток, характеризующихся присутствием рецептора DR5 и интегрином $\alpha\beta 3$ на поверхности.

В предпочтительном варианте изобретения гибридная белковая конструкция представляет собой последовательность, охарактеризованную в SEQ ID NO: 1, и имеет общую формулу А-Х-В, где «А» имеет последовательность, охарактеризованную в SEQ ID: NO: 2, которая своим С-концом присоединена к «Х»; «Х» представляет собой последовательность, охарактеризованную в SEQ ID: NO 3, а «В» представляет собой пептид, охарактеризованный в SEQ ID: NO 4.

В других вариантах изобретения «А» представляет собой последовательность рецептор-специфичного варианта цитокина TRAIL, гомологичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% последовательности SEQ ID NO: 2, способного специфически связываться с рецептором DR5 и содержащий замены аминокислотных остатков, способствующие повышению специфичности связывания с рецептором DR5 по сравнению с TRAIL дикого типа.

В некоторых вариантах изобретения «Х» представляет собой химическую связь или подходящий линкер формулы $(X_1X_1X_1X_1X_2)_n(X_1X_1X_1X_1X_2)_m$, где X_1 представляет собой остаток глицина, X_2 представляет собой остаток серина, причем любой из X_1 и X_2 могут независимо отсутствовать; n и m имеют целое значение от 0 до 4, причем n+m имеет целое

значение от 1 до 4 (или, в некоторых вариантах изобретения «X» представляет собой химическую связь или подходящий линкер формулы $(X_1X_1X_1X_1X_2)_n$, при этом X_1 представляет собой остаток глицина или отсутствует, X_2 представляет собой остаток серина или отсутствует, а n имеет целое значение от 1 до 4).

5 В некоторых вариантах изобретения «В» представляет собой пептид, N-концом присоединенный к «X», гомологичный по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 88% последовательности SEQ ID NO: 4, и способный специфически связываться с интегрином $\alpha\beta 3$.

10 Указанная задача также решается путем создания молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такую белковую конструкцию.

В предпочтительном варианте изобретения такая молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых других вариантах изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая такую белковую конструкцию, имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, 15 по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 5.

При осуществлении изобретения достигаются следующие **технические результаты**:

- создана новая биспецифическая гибридная белковая конструкция (в предпочтительном варианте имеющая последовательность SEQ ID NO: 1), способная 20 связывать одновременно рецептор DR5 и интегрин $\alpha\beta 3$, что позволяет эффективнее чем исходный DR5-селективный вариант цитокина TRAIL (SEQ ID NO: 2) связываться с опухолевыми структурами и быстрее накапливаться в них;

- разработан новый эффективный способ уничтожения опухолевых клеток в организме субъекта, на поверхности которых находятся рецепторы DR5 и интегрин $\alpha\beta 3$.

25 **Краткое описание рисунков.**

Фиг. 1. Экспрессия (А) исходного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL (M = 19,61 кДа) и (В) гибридной белковой конструкции (M = 21,29 кДа), содержащей на N-конце полипептидной цепи противоопухолевый DR5-селективный вариант цитокина TRAIL, а на C-конце - пептид CRGDKGPDC, в штамме *E.coli* SHuffle B T7. Дорожки: 1 – 30 маркеры молекулярных масс; 2 – 3 – по 20 мкл ночных культур клеток, выращенных в колбах №1 и №2.

Фиг. 2. Анализ чистоты (А) исходного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL (M = 19,61 кДа) и (В) гибридной белковой конструкции (M=21,29 кДа) в 15% полиакриламидном геле. Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс; 2, 3 – пробы, 35 содержащие по 4 мкг белков.

Фиг. 3. Определение констант диссоциации (Kd) к рецептору смерти DR5 (А) исходного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL и (В) гибридной белковой конструкции.

Фиг. 4. Определение константы диссоциации (Kd) к интегину $\alpha\beta 3$ (А) исходного 40 DR5-селективного варианта цитокина TRAIL и (В) гибридной белковой конструкции.

Фиг. 5. Оценка жизнеспособности мультиклеточных 3D-сфероидов из линии глиобластомы U87MG под действием (А) исходного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL и (В) гибридной белковой конструкции.

Фиг. 6. Оценка накопления (А) исходного DR5-селективного варианта цитокина 45 TRAIL и (В) гибридной белковой конструкции в опухолевых структурах на основе мультиклеточных 3D-сфероидов из линии глиобластомы U87MG.

Фиг. 7. Экспрессия и очистка гибридной белковой конструкции состава А-Х-В, где А - противоопухолевый DR5-селективный варианта цитокина TRAIL (SEQ ID NO: 2), Х - линкер GGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 3), а В - пептид AGGCRGDRGPDC, на 75% гомологичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. Пробы, содержащие 10–15 мкг белка, анализируют в 15% полиакриламидном геле. Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – экспрессия белка в штамме *E.coli* SHuffle В; 3 – растворимая фракция цитоплазматических белков; 4 – фракция белков, не связанных с Ni-NTA агарозой; 5 – фракции белков, отмытые буфером, содержащим 20 мМ имидазола; 6 – белок, элюированный буфером, содержащим 250 мМ имидазола, 7 – белковая фракция после очистки на сорбенте SP сефароза; 8 – образец белка после ночного диализа. Расчетная масса мономерной гибридной белковой конструкции составляет 21375 Да.

Фиг. 8. Определение констант диссоциации (Kd) гибридной белковой конструкции с элементом конструкции В состава CRGDKGPDC либо AGGCRGDRGPDC к рецептору VEGFR2 с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Лиганды добавляют в лунки, предварительно покрытые рецептором VEGFR2, и выявляют связывание с помощью моноклональных антител против TRAIL. Значения Kd рассчитывают с помощью опции нелинейной регрессии в программном обеспечении GraphPad Prism 8.0.

Определения и термины

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены некоторые термины, использованные в настоящем описании изобретения.

В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из».

Рецептором DR5 в настоящем описании называется рецептор смерти, также именуемый TRAIL-R2 либо TNFRSF10B, обозначаемый как O14763-TR10B_HUMAN в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Интегрином $\alpha\beta3$ в настоящем описании называются рецепторы, содержащие по одной субъединице интегрин α , P06756 (ITAV_HUMAN), и по одной субъединице $\beta3$, P05106 (ITB3_HUMAN), способные узнавать RGD-мотив на различных лигандах.

Используемый здесь термин «процент гомологии двух последовательностей» эквивалентен термину «процент идентичности двух последовательностей». Процент идентичности двух последовательностей определяется числом положений идентичных аминокислот в этих двух последовательностях с учетом числа пробелов и длины каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального сопоставления двух последовательностей путем выравнивания. Процент идентичности равен числу идентичных аминокислот в данных положениях с учетом выравнивания последовательностей, разделенному на общее число положений и умноженному на 100. Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть определен, например, с помощью программы NCBI Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Подробное раскрытие изобретения

Описываемая в изобретении гибридная белковая конструкция может быть получена с использованием векторов для рекомбинантной экспрессии и экспрессирующих клеток-продуцентов, известных специалистам. Выбор промоторов и

других регуляторных элементов, а также клеток-продуцентов и экспрессионных штаммов может варьироваться. Возможный вариант воплощения изобретения путем экспрессии рекомбинантной гибридной белковой конструкции в клетках *E.coli* описан в патенте № RU2687435C1. Для создания гибридной белковой конструкции, сначала

5 методами генной инженерии конструируется нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность, содержащую DR5-специфичный вариант цитокина TRAIL на N-конце полипептидной цепи, линкерную последовательность, и пептид CRGDKGPDC на C-конце полипептидной цепи. Указанная нуклеотидная последовательность встраивается в подходящий

10 генетический вектор для экспрессии гибридной белковой конструкции в виде единой полипептидной цепи в клетках бактериальных штаммов либо эукариотических линий, предназначенных для экспрессии рекомбинантных белков. Очистка экспрессированного целевого белка осуществляется (но не ограничивается) с помощью стандартных методик, к примеру, металл-аффинной и ионообменной

15 хроматографии. Аффинность очищенной гибридной белковой конструкции к рецепторам DR5 и интегрину $\alpha\upsilon\beta 3$ определяется методами иммуноферментного анализа, поверхностного плазмонного резонанса, либо другими валидированными методами. Показана высокая аффинность связывания полученного гибридного белка с рецептором DR5 и интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$. Биологическая активность гибридной белковой

20 конструкции исследуется на моделях опухолей *in vitro* и *in vivo*, в частности на мультиклеточных 3D-моделях сфероидов, полученных из опухолевых клеточных линий. Повышенное противоопухолевое действие белковой конструкции DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC подтверждается результатами сравнительного исследования скорости накопления в мультиклеточных

25 сфероидов на основе клеточной линии глиобластомы U87MG, экспрессирующей рецептор DR5 и интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, а также результатами сравнительного исследования цитотоксической активности в отношении той же культуры мультиклеточных сфероидов. В частном случае реализации изобретения описывается способ индукции гибели опухолевых клеток U87MG с помощью полученного гибридного белка, имеющего повышенный

30 цитотоксический эффект по сравнению с исходным DR5-селективным вариантом цитокина TRAIL.

Нижеследующие **примеры** приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

35 **Пример 1.** Способ получения генетической конструкции, кодирующей аминокислотную последовательность гибридной белковой конструкции DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC.

Для получения генетической конструкции, последовательность, кодирующую линкер GGGGSGGGGSGG и пептид CRGDKGPDC, вносят на 3'-концевую

40 последовательность ДНК, кодирующей DR5-селективный вариант цитокина TRAIL в составе плазмидного вектора pET32a, с помощью синтетического олигонуклеотида ggtggaggtggctcaggaggtgggtgggagtggtggcgggtgtcgtggtgacaaggtcctgattgctaa (SEQ ID NO: 6) методом ПЦР. Для исключения случайных мутаций в векторе в ходе ПЦР гены гибридных белков переклонировывают в исходный вектор по сайтам рестрикции NdeI и XhoI. Последовательность

гена, кодирующего гибридную белковую конструкцию DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC, подтверждают секвенированием.

Пример 2. Способ экспрессии рекомбинантной белковой конструкции DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC.

5 Для экспрессии гибридного белка полученный плазмидный вектор pET32a, кодирующий аминокислотную последовательность белковой конструкции, трансформируют в компетентные клетки штамма *E. coli* SHuffle B. Экспрессию проводят в среде TB в присутствии 100 мкг/мл ампициллина. Максимальная экспрессия наблюдается при индукции с помощью 0.05 мМ ИПТГ при 28°C в течение 18-20 часов при ротации платформы инкубатора 180 об/мин. Клетки собирают центрифугированием при 5000 g в течение 10 минут при 4°C, отмывают буфером, содержащим 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ хлорида натрия (pH 8.0) и хранят при -80°C. Экспрессию белка в клеточном лизате оценивают с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в 15% геле с окрашиванием краской кумасси бриллиантовый синий R-250. В данном примере уровень экспрессии гибридного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC в 1 литре культуры клеток составляет 350-370 мг.

Пример 3. Способ очистки рекомбинантной белковой конструкции DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC.

Клетки ресуспендируют в лизис-буфере, содержащем 50 мМ фосфата натрия и 300 мМ хлорида натрия (pH 8.0), и разрушают с помощью установки «French press» (Spectronic Instruments, Inc., США) под давлением 1700 бар. Клеточный лизат центрифугируют при 75000 g при 4°C в течение 40 минут. В вышеописанном примере белок экспрессируется в растворимой форме, что позволяет проводить очистку из цитоплазматической фракции. На первом этапе очистку проводят путем металл-аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA агарозе. Затем белки диализуют и проводят дополнительную очистку на ионообменном сорбенте SP сефарозе. После очистки белок диализуют против раствора 150 мМ NaCl и стерилизуют через шприцевой фильтр с порами 0,22 мкм с мембраной PVDF. Чистоту полученного рекомбинантного белка анализируют с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в 15% геле с окрашиванием краской кумасси бриллиантовый синий R-250. Чистота препарата в данном примере составляет не менее 98%, Концентрацию белка в очищенном препарате определяют спектрофотометрически при длине волны 280 нм с учетом молярного коэффициента экстинкции $26025 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC, определенного по аминокислотной последовательности с помощью программы ProtParam на сервере ExPASy (www.exPASy.org). При очистке вышеописанным способом выход очищенного белка составляет 22-25 мг из 200 мл культуры клеток, при этом препарат проявляет высокую стабильность: при хранении белкового раствора в течение как минимум 6 месяцев не наблюдается ни деградации, ни потери биологической активности.

Пример 4. Анализ аффинности белковой конструкции DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC к рецептору DR5 и интегрину $\alpha\text{v}\beta\text{3}$.

Анализ аффинности гибридного белка к рецептору смерти DR5 проводят методом иммуноферментного анализа. Для этого коммерческий препарат рекомбинантного внеклеточного домена рецептора DR5 иммобилизуют в количестве 100 нг на лунку 96-

луночного планшета и определяют связывание гибридного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC в диапазоне концентраций от 0,1 до 50 нМ. В качестве контроля используют исходный DR5-селективный вариант цитокина TRAIL в тех же концентрациях. Связывание определяют с помощью первичных анти-TRAIL антител с последующей инкубацией с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После 15-минутной инкубации с колориметрическим субстратом OPD реакцию останавливают раствором 1N H₂SO₄. Оптическую плотность определяют спектрофотометрически при 450 нм. Значения константы диссоциации (K_d) рассчитывают с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8, используя опцию нелинейной регрессии в разделе XY-анализа. В результате оценки аффинности таким способом показывают, что аффинность гибридного белка к рецептору DR5 сопоставима с исходным DR5-селективным вариантом цитокина TRAIL (K_d 1,43 ± 0,31 нМ и 1,66 ± 0,41 нМ для исходного и гибридного белков, соответственно). Это доказывает, что внесение пептида CRGDKGPDC на C-конец DR5-селективного варианта цитокина TRAIL не влияет на сродство к рецептору смерти DR5.

Определение аффинности гибридного белка к интегринам αvβ3 проводят методом иммуноферментного анализа, иммобилизуя по 200 нг коммерческого препарата интегрин αvβ3 на лунку 96-луночного планшета. Связывание гибридного белка определяют в диапазоне концентраций от 0,1 до 400 нМ. В качестве контроля используют аналогичные концентрации исходного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL. Связывание гибридного белка с интегрином αvβ3 детектируют аналогичным образом, как описано выше для связывания с рецептором DR5. Исходный DR5-селективный вариант цитокина TRAIL практически не связывается с интегрином αvβ3, тогда как гибридный белок с пептидом CRGDKGPDC показывает высокую аффинность с константой диссоциации 1,89 ± 0,59 нМ, что сопоставимо с аффинностью самого пептида (K_d 10-20 нМ). Это доказывает, что пептид CRGDKGPDC в составе гибридного белка не теряет аффинности к интегринам αvβ3.

Пример 5. Анализ противоопухолевой активности гибридной белковой конструкции DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC.

Противоопухолевая активность гибридной белковой конструкции исследуется методом WST-1 теста на мультиклеточных 3D-сфероидах, полученных из линии опухолевых клеток глиобластомы U87MG. Клеточные сфероиды культивируют в питательной среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. Далее в культуральную среду добавляют по 10 мкл среды с разведениями исходного DR5-селективного варианта цитокина TRAIL и гибридного белка с пептидом CRGDKGPDC в диапазоне от 0,05 до 500 нМ. После 24 ч или 48 ч инкубации в каждую лунку добавляют по 10 мкл реагента WST-1 и планшеты выдерживают в течение 2 ч при 37°C. Оптическую плотность измеряют с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм с вычитанием фона при 655 нм. В результате получают значения IC₅₀ 273.1 нг/мл и 12.09 нг/мл для исходного и гибридного белков, соответственно, спустя 24 часа инкубации, и 5.5 нг/мл и 184.8 нг/мл, соответственно, спустя 48 часов инкубации, что свидетельствует о повышенной противоопухолевой активности гибридной белковой конструкции.

Пример 6. Сравнительный анализ скорости накопления белков в опухолевых 3D-структурах.

Чтобы оценить скорость накопления гибридной белковой конструкции DR5-селективного варианта цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC в опухолевых 3D-структурах, проводят анализ накопления методом сканирующей конфокальной микроскопии клеток в 3D-модели клеточной линии глиобластомы U87MG.

5 Мультиклеточные сфероиды на основе линии U87MG культивируют в питательной среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. Питательную среду в лунках заменяют средой без сыворотки, содержащей краситель Hoechst 33258 (10 мкг/мл). Затем клетки инкубируют в течение 15-20 мин в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37° C), после чего удаляют раствор красителя и промывают 2-3 раза 0,5 мл физ. раствора от несвязавшихся

10 молекул красителя. Далее к клеткам добавляют белки-лиганды в концентрации 1000 нг/мл. Для визуализации белки предварительно модифицируются аминокислотной заменой Val114Cys на N-конце полипептидной цепи, после чего конъюгируются с флуоресцентным красителем сульфо-цианин-3-малеимидом (Cy3) (Lumiprobe, Россия). После инкубирования клеток с белками-лигандами в течение временных периодов 15 мин и 1 ч,

15 проводится трехкратная отмывка клеток от несвязавшихся белков с помощью 0,5 мл физ. раствора. Сфероиды аккуратно переносят на покровные стекла, после чего фиксируют с помощью CC/Mount™. Образцы изучают на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 (Япония), снабженном конфокальной лазерной системой. Таким образом показывают, что гибридный DR5-селективный вариант цитокина TRAIL с пептидом CRGDKGPDC способен

20 быстрее накапливаться в опухолевых 3D-структурах по сравнению с исходным DR5-селективным вариантом цитокина TRAIL.

Пример 7. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция, имеющая последовательность, отличающуюся от охарактеризованной в SEQ ID NO: 1.

Конструируют плазмидный вектор для экспрессии гибридной белковой конструкции путем внесения нуклеотидных замен в последовательность ДНК, кодирующую элемент А конструкции, а именно рецептор-специфичный вариант цитокина TRAIL (SEQ ID NO: 2), таким образом, чтобы в аминокислотную последовательность были введены замены D267Q и H269D. Полученная аминокислотная последовательность на 98% гомологична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Указанные замены производят в

25 плазмидном векторе pET32a, кодирующем аминокислотную последовательность белковой конструкции, методом сайт-специфического мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров *ctgtaacaatgagcgccttgcctagacatggaccatgaagccag* (SEQ ID NO: 7) и *ctggcttcatggtccatgtctagcaagcgcctcatttgttacag* (SEQ ID NO: 8) с помощью полимеразной

30 цепной реакции. Полученным плазмидным вектором трансформируют бактериальный штамм *E.coli* SHuffle B, экспрессируют и очищают гибридную белковую конструкцию, как описано в примерах 2 и 3, соответственно. Показывают методом электрофореза в полиакриламидном геле, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом

35 конструкции А, содержащая замены D267Q и H269D, имеет молекулярную массу 21152 Да и стабильность, аналогичную гибридной белковой конструкции с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Показывают методом иммуноферментного анализа, как описано в примере 4, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом

40 конструкции А, содержащая замены D267Q и H269D, сохраняет специфичность к рецептору DR5 аналогично гибридной белковой конструкции с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Пример 8. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция, имеющая последовательность, отличающуюся от охарактеризованной в SEQ ID NO: 1.

Конструируют плазмидный вектор для экспрессии гибридной белковой конструкции путем замены последовательности ДНК *ggtggaggtggctcaggaggtggtgggagtggcgg* (SEQ ID NO: 9), кодирующей элемент X конструкции, а именно линкер с аминокислотной последовательностью GGGGSGGGSSGG (SEQ ID NO: 3), на последовательность *ggtggaggtagtggaggaggtagtgggtggtagt* (SEQ ID NO: 10), кодирующей линкер с аминокислотной последовательностью GGGSGGGSSGGGS (SEQ ID NO: 11). Указанную замену производят в плазмидном векторе pET32a, кодирующем аминокислотную последовательность белковой конструкции, методом сайт-специфического мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров *ggggccttttagtggcggtagtgaggtagtggaggaggtagtgggtggtagttgtcgtggtgac* (SEQ ID NO: 12) и *gtcaccacgacaactaccaccaccacttctccactaccctccaccgccaactaaaaaggcccc* (SEQ ID NO: 13) с помощью полимеразной цепной реакции. Полученным плазмидным вектором трансформируют бактериальный штамм *E.coli* SHuffle B, экспрессируют и очищают гибридную белковую конструкцию, как описано в примерах 2 и 3, соответственно. Показывают методом электрофореза в полиакриламидном геле, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом конструкции X состава GGGSGGGSSGGGS имеет молекулярную массу 21191 Да и стабильность, аналогичную гибридной белковой конструкции с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Показывают методом иммуноферментного анализа, как описано в примере 4, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом конструкции X состава GGGSGGGSSGGGS связывается с интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$ с той же аффинностью, что и гибридная белковая конструкция с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Пример 9. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция, имеющая последовательность, отличающуюся от охарактеризованной в SEQ ID NO: 1.

Конструируют плазмидный вектор для экспрессии гибридной белковой конструкции путем замены последовательности ДНК *ggtggaggtggctcaggaggtggtgggagtggcgg* (SEQ ID NO: 9), кодирующей элемент X конструкции, а именно линкер с аминокислотной последовательностью GGGGSGGGSSGG (SEQ ID NO: 3), на последовательность *ggtagtggaggtggaggaagtgggtggtagt* (SEQ ID NO: 14), кодирующей линкер с аминокислотной последовательностью GSGGGSSGGGS (SEQ ID NO: 15). Указанную замену производят в плазмидном векторе pET32a, кодирующем аминокислотную последовательность белковой конструкции, методом сайт-специфического мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров *ggggccttttagtggcggtagtgaggtggaggaagtgggtggtagttgtcgtggtgac* (SEQ ID NO: 16) и *gtcaccacgacaactaccaccaccacttctccactaccctccaccgccaactaaaaaggcccc* (SEQ ID NO: 17) с помощью полимеразной цепной реакции. Полученным плазмидным вектором трансформируют бактериальный штамм *E.coli* SHuffle B, экспрессируют и очищают гибридную белковую конструкцию, как описано в примерах 2 и 3, соответственно. Показывают методом электрофореза в полиакриламидном геле, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом конструкции X состава GSGGGSSGGGS имеет молекулярную массу 21191 Да и стабильность, аналогичную гибридной белковой конструкции с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Показывают методом иммуноферментного анализа, как описано в примере 4, что полученная гибридная белковая

конструкция с элементом конструкции X состава GSGGGGSGGGGS связывается с интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$ с той же аффинностью, что и гибридная белковая конструкция с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Пример 10. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция, имеющая последовательность, отличающуюся от охарактеризованной в SEQ ID NO: 1.

Конструируют плазмидный вектор для экспрессии гибридной белковой конструкции путем замены последовательности ДНК *tgctgtggtgacaaaggctctgattgc* (SEQ ID NO: 18), кодирующей элемент В конструкции, а именно пептид с аминокислотной последовательностью CRGDKGPDC (SEQ ID NO: 4), на последовательность *gcatgtctgtggtgacagaggtctctgattgc* (SEQ ID NO: 19), кодирующей пептид с аминокислотной последовательностью ACRGDRGPDC (SEQ ID NO: 20), который на 90% гомологичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. Указанную замену производят в плазмидном векторе рЕТ32а, кодирующем аминокислотную последовательность белковой конструкции, методом сайт-специфического мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров *ggtggtgggagtgggcgcatgtctgtggtgacagaggtctctgattgctaa* (SEQ ID NO: 21) и *ttagcaatcaggacctctgtcaccacgacatgcgccactcccaccacc* (SEQ ID NO: 22) с помощью полимеразной цепной реакции. Полученным плазмидным вектором трансформируют бактериальный штамм *E.coli* SHuffle В, экспрессируют и очищают гибридную белковую конструкцию, как описано в примерах 2 и 3, соответственно. Показывают методом электрофореза в полиакриламидном геле, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом конструкции В состава ACRGDRGPDC имеет молекулярную массу 21260 Да и стабильность, аналогичные гибридной белковой конструкции с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Показывают методом иммуноферментного анализа, как описано в примере 4, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом конструкции В состава ACRGDRGPDC связывается с интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$ с той же аффинностью, что и гибридная белковая конструкция с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Пример 11. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция, имеющая последовательность, отличающуюся от охарактеризованной в SEQ ID NO: 1.

Конструируют плазмидный вектор для экспрессии гибридного белка путем замены последовательности ДНК *tgctgtggtgacaaaggctctgattgc* (SEQ ID NO: 18), кодирующей элемент В конструкции, а именно пептид с аминокислотной последовательностью CRGDKGPDC (SEQ ID NO: 4), на последовательность *gcaggtgggtgtctgtggtgacagaggtctctgattgc* (SEQ ID NO: 23), кодирующей пептид с аминокислотной последовательностью AGGCRGDRGPDC (SEQ ID NO: 24), который на 75% гомологичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. Указанную замену производят в плазмидном векторе рЕТ32а, кодирующем аминокислотную последовательность белковой конструкции, методом сайт-специфического мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров *ggtggtgggagtgggcgaggtgggtgtctgtggtgacagaggtctctgattgctaa* (SEQ ID NO: 25) и *ttagcaatcaggacctctgtcaccacgacacccacctgcgccactcccaccacc* (SEQ ID NO: 26) с помощью полимеразной цепной реакции. Полученным плазмидным вектором трансформируют бактериальный штамм *E.coli* SHuffle В, экспрессируют и очищают гибридную белковую конструкцию, как описано в примерах 2 и 3, соответственно. Показывают методом электрофореза в полиакриламидном геле, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом конструкции В состава AGGCRGDRGPDC имеет молекулярную массу 21375

Да и стабильность, аналогичные гибридной белковой конструкции с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Показывают методом иммуноферментного анализа, как описано в примере 4, что полученная гибридная белковая конструкция с элементом конструкции В состава AGGCRGDRGPDC связывается с интегрином $\alpha\beta 3$ с той же аффинностью, что и гибридная белковая конструкция с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Пример 12. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция, имеющая последовательность, отличающуюся от охарактеризованной в SEQ ID NO: 1.

В плазмидный вектор pET32a, содержащий последовательность молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5, вносят кодирующие альтернативные кодоны нуклеотидные замены A126G, A129T, A132G, G135A, T138C, G141C, T144C, A147T, C150T, G153C с использованием праймеров *ggccgcaaaataaactcctgggagtcttcgagaagcggccactctttctcagcaacttgc* (SEQ ID NO: 27) и *gcaagttgctgagaaaaagagtggccgcttctcgaagactcccaggagttattttgcggcc* (SEQ ID NO: 28), и T381C, C384G, C387A, T390C, A393G, G396C, A399T, A402T, T405A, G408A, T411A с использованием праймеров *gcagaatatggactctactcgcataaccagggcgggtattttagaactaaaggaaaatgac* (SEQ ID NO: 29) и *gtcattttcctttagttcaaaaataccgccttggtatatcgagtagagtcacatattctgc* (SEQ ID NO: 30) с помощью полимеразной цепной реакции. Полученным плазмидным вектором трансформируют бактериальный штамм *E.coli* SHuffle B, экспрессируют и очищают гибридную белковую конструкцию, как описано в примерах 2 и 3, соответственно. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле показывают, что с полученной молекулы нуклеиновой кислоты, гомологичной на 95% последовательности SEQ ID NO: 5, экспрессируется белковая конструкция по п. 1.

Конкретные подробно описанные примеры экспериментов приведены для иллюстрации настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

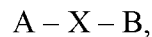
Белковую конструкцию по изобретению можно использовать в качестве активного действующего вещества в фармацевтических композициях, предназначенных для лечения солидных онкологических заболеваний, характеризующихся экспрессией рецептора DR5 и интегрин $\alpha\beta 3$ на поверхности опухолевых клеток, таких как, например, глиобластома, аденокарцинома поджелудочной железы и другие. Изобретение позволяет обеспечить повышенный уровень эффективности за счет двойной опухолеспецифичности и усиленному накоплению в опухолевых тканях по сравнению с DR5-специфичным мутантным вариантом противоопухолевого цитокина TRAIL.

40

45

Формула изобретения

1. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция общей формулы:



5 где A представляет собой последовательность рецептор-специфичного варианта цитокина TRAIL, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 2, при этом селективно связывается с рецептором DR5, которая своим С-концом присоединена к X;

X представляет собой химическую связь или линкер;

10 B представляет собой пептид, N-концом присоединенный к X, гомологичный по меньшей мере на 75% последовательности SEQ ID NO: 4 и способный специфически связываться с интегрином $\alpha v \beta 3$.

15 2. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция по п. 1, в которой X представляет собой линкер формулы $(X_1 X_1 X_1 X_1 X_2)_n (X_1 X_1 X_1 X_1 X_2)_m$, где X_1 представляет собой остаток глицина, X_2 представляет собой остаток серина, причем любой из X_1 и X_2 могут независимо отсутствовать; n и m имеют целое значение от 0 до 4, причем n+m имеет целое значение от 1 до 4.

3. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция по п. 1, в которой A имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% последовательности SEQ ID NO: 2.

20 4. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция по п. 1, в которой A имеет последовательность, охарактеризованную в SEQ ID NO: 2.

5. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция по п. 1, в которой B имеет последовательность, гомологичную по меньшей на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 88% последовательности SEQ ID NO: 4.

25 6. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция по п. 1, в которой B представляет собой пептид, охарактеризованный в SEQ ID NO: 4.

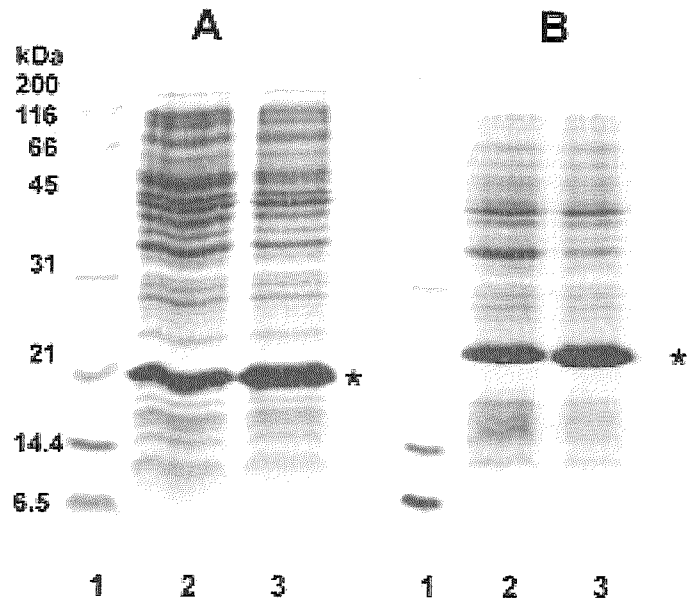
7. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция по п. 2, в которой линкер представляет собой последовательность, охарактеризованную в SEQ ID NO: 3.

30 8. Противоопухолевая гибридная белковая конструкция по п. 1, которая имеет последовательность, охарактеризованную в SEQ ID NO: 1.

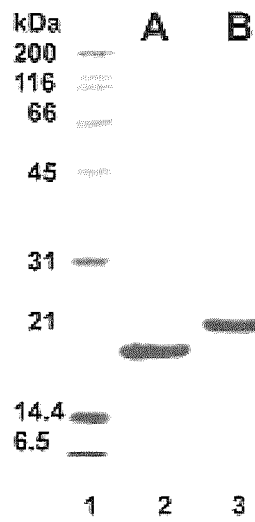
9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая противоопухолевую гибридную белковую конструкцию по любому из п.п.1-8.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по п.9, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 5.

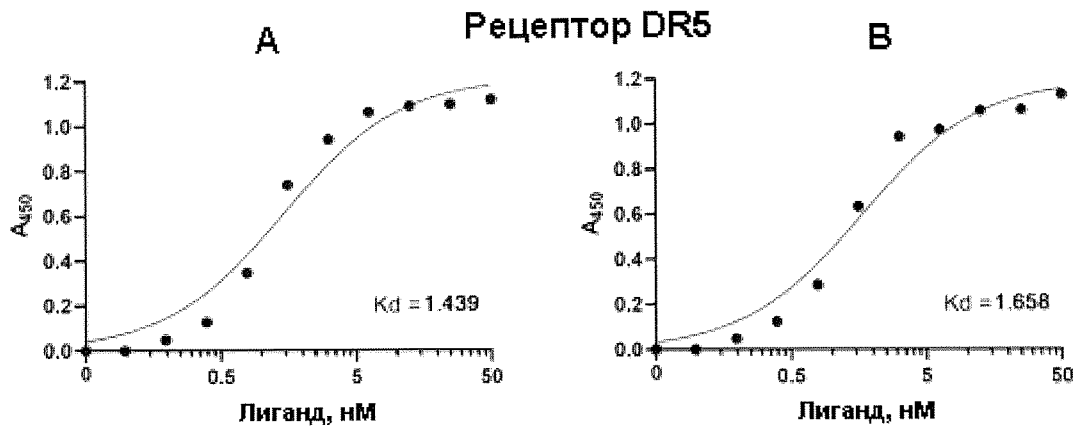
35 11. Молекула нуклеиновой кислоты по п.9, которая имеет последовательность, гомологичную по меньшей на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 5.



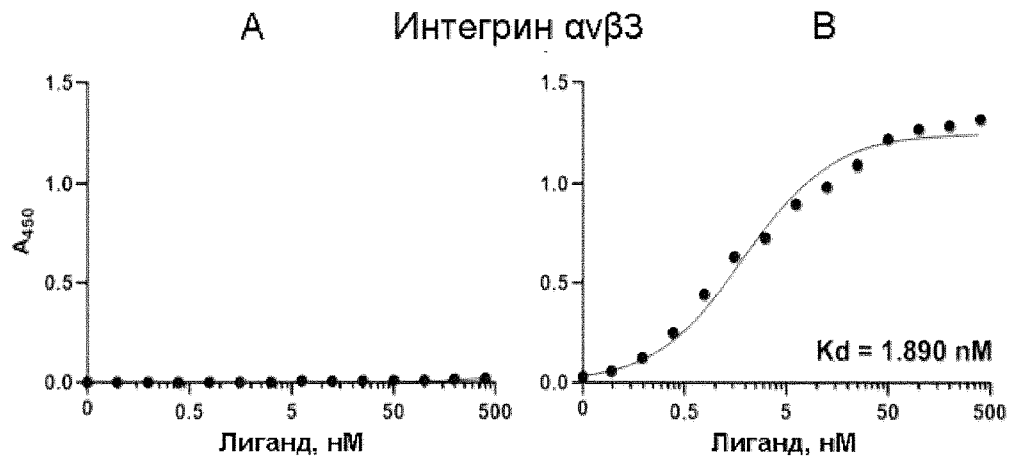
Фиг. 1



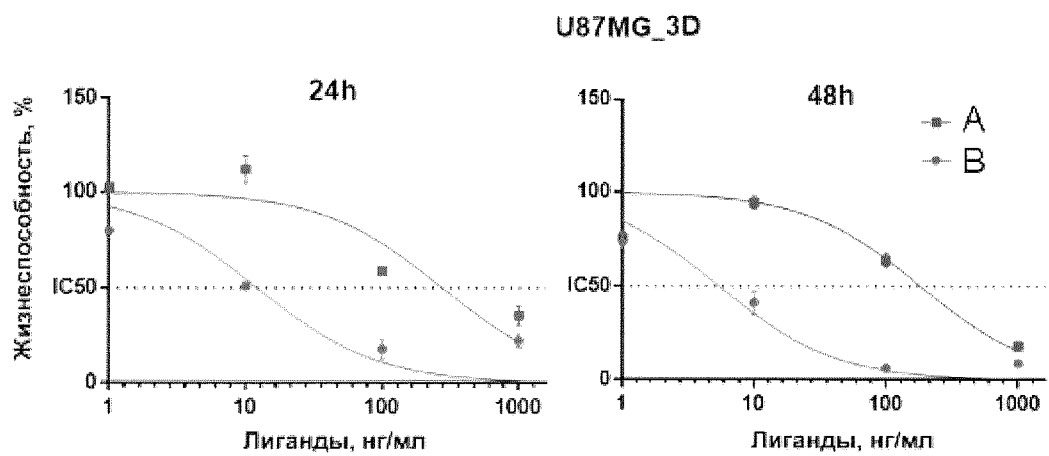
Фиг. 2



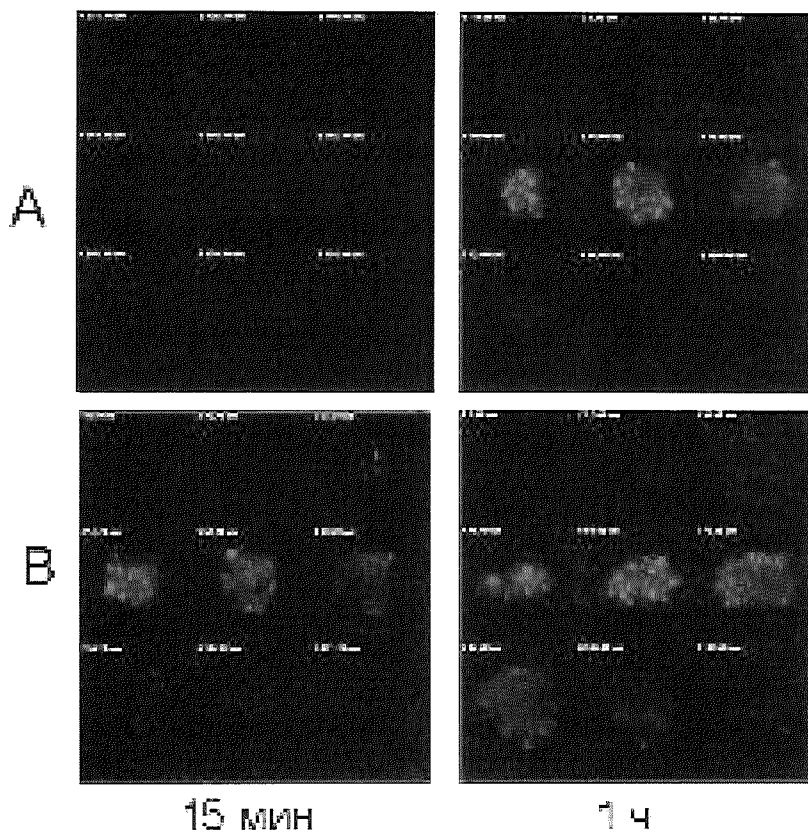
Фиг. 3



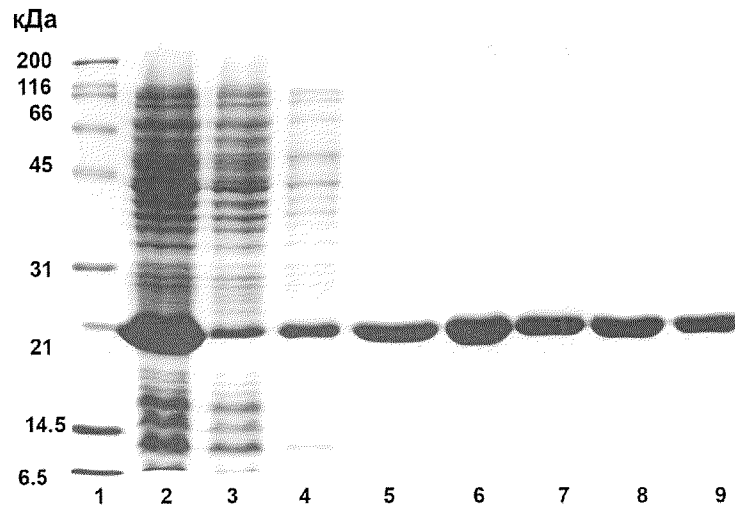
Фиг. 4



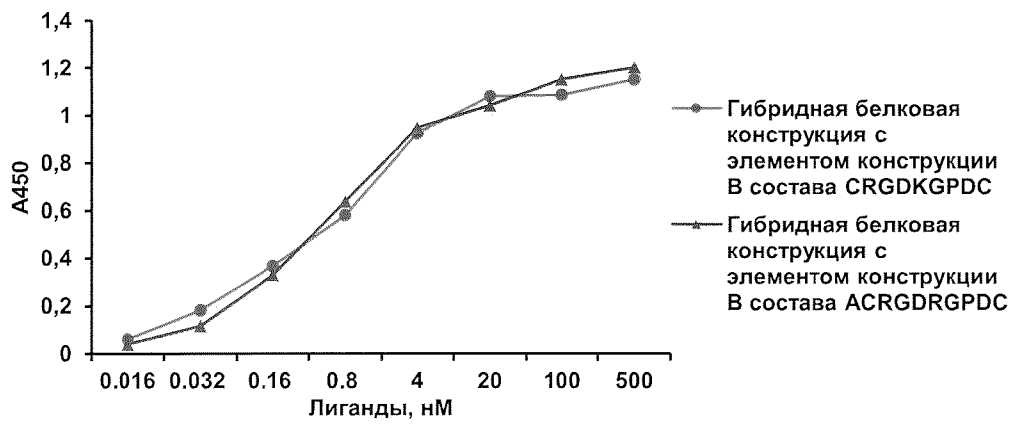
Фиг.5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2023/050176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 19/00 (2006.01); C12N 15/11 (2006.01); A61K 38/19 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, C12N, A61K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAGOLOVICH A.V. et al. Novy effektivny sposob polucheniya rekombinantnogo protivopukholevogo tsitokina TRAIL i ego retseptor selektivnogo varianta DR5-B. Biokhimiya, 2019, t. 84, N. 6, ss. 808-818, osobenno, p. 809, left col., par. 3	1-11
A	GAPIZOV S.S. et all. Fusion with an albumin-binding domain improves pharmacokinetics of an $\alpha\beta 3$ -integrin binding fibronectin scaffold protein, Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, vol. 66, N. 4, pp. 617-625, the abstract, section "Discussion" on p. 624	1-11
A	GUIMARAES P.P.G. et al. Nanoparticles for Immune Cytokine TRAIL-Based Cancer Therapy. ACS Nano, 2018, vol. 12, N. 2, pp. 912-931, the abstract	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 October 2023 (03.10.2023)		Date of mailing of the international search report 09 November 2023 (09.11.2023)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2023/050176

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p><i>C07K 19/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>A61K 38/19</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>													
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p>C07K, C12N, A61K, A61P</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p>													
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>ЯГОЛОВИЧ А.В. и др. Новый эффективный способ получения рекомбинантного противоопухолевого цитокина TRAIL и его рецептор селективного варианта DR5-В. Биохимия, 2019, т. 84, N. 6, сс. 808-818, особенно, с. 809, левая колонка, абзац 3</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GAPIZOV S.S. et al. Fusion with an albumin-binding domain improves pharmacokinetics of an $\alpha\upsilon\beta 3$-integrin binding fibronectin scaffold protein, Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, vol. 66, N. 4, pp. 617-625, реферат, раздел "Discussion" на с. 624</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GUIMARAES P.P.G. et al. Nanoparticles for Immune Cytokine TRAIL-Based Cancer Therapy. ACS Nano, 2018, vol. 12, N. 2, pp. 912-931, реферат</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>		Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	ЯГОЛОВИЧ А.В. и др. Новый эффективный способ получения рекомбинантного противоопухолевого цитокина TRAIL и его рецептор селективного варианта DR5-В. Биохимия, 2019, т. 84, N. 6, сс. 808-818, особенно, с. 809, левая колонка, абзац 3	1-11	A	GAPIZOV S.S. et al. Fusion with an albumin-binding domain improves pharmacokinetics of an $\alpha\upsilon\beta 3$ -integrin binding fibronectin scaffold protein, Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, vol. 66, N. 4, pp. 617-625, реферат, раздел "Discussion" на с. 624	1-11	A	GUIMARAES P.P.G. et al. Nanoparticles for Immune Cytokine TRAIL-Based Cancer Therapy. ACS Nano, 2018, vol. 12, N. 2, pp. 912-931, реферат	1-11
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №											
A	ЯГОЛОВИЧ А.В. и др. Новый эффективный способ получения рекомбинантного противоопухолевого цитокина TRAIL и его рецептор селективного варианта DR5-В. Биохимия, 2019, т. 84, N. 6, сс. 808-818, особенно, с. 809, левая колонка, абзац 3	1-11											
A	GAPIZOV S.S. et al. Fusion with an albumin-binding domain improves pharmacokinetics of an $\alpha\upsilon\beta 3$ -integrin binding fibronectin scaffold protein, Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, vol. 66, N. 4, pp. 617-625, реферат, раздел "Discussion" на с. 624	1-11											
A	GUIMARAES P.P.G. et al. Nanoparticles for Immune Cytokine TRAIL-Based Cancer Therapy. ACS Nano, 2018, vol. 12, N. 2, pp. 912-931, реферат	1-11											
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>													
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"D" документ, цитируемый заявителем в международной заявке</p> <p>"E" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> <p>"T" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>"&" документ, являющийся патентом-аналогом</p>													
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p>03 октября 2023 (03.10.2023)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p>09 ноября 2023 (09.11.2023)</p>												
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18</p>	<p>Уполномоченное лицо: Шевченко С.А. Телефон № (8-499) 240-25-91</p>												