

**Аннотация проекта (ПНИЭР), выполняемого в рамках ФЦП
«Исследования и разработки по приоритетным направлениям
развития научно-технологического комплекса России на 2014 -
2020 годы»**

**Номер Соглашения о предоставлении субсидии/государственного
контракта:** 14.607.21.0063

Название проекта: Создание адресных бифункциональных агентов на основе цитотоксического белка лактапина и опухоль-адресованных пептидов для направленной элиминации раковых клеток.

Основное приоритетное направление: Науки о жизни

Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Руководитель проекта: Рихтер Владимир Александрович

Должность: заместитель директора

E-mail: vrichter@ngs.ru

Ключевые слова: *лактапин, опухоль-адресованные пептиды, комбинаторная пептидная библиотека, фаговый дисплей, метод аффинной селекции, апоптоз, опухоль молочной железы, противораковая терапия, таргетная доставка лекарств, иммунодефицитные мыши*

Цель проекта

1. На сегодняшний день онкологические заболевания являются одной из главных причин смертности как в России, так и за рубежом. По прогнозам ВОЗ смертность от рака будет продолжать расти, и в 2030 году ожидается до 13 миллионов случаев смерти от онкологических заболеваний.

Несмотря на высокую противоопухолевую активность традиционных химиотерапевтических средств и их широкое применение при лечении онкологических больных как в монотерапии, так и в комбинационной терапии с другими противоопухолевыми средствами, такой важный показатель эффективности лечения как продолжительность жизни пациентов увеличивается незначительно. Кроме того, высокая общая токсичность большинства используемых противоопухолевых средств значительно ограничивает возможности их применения.

На сегодняшний день главными требованиями к вновь создаваемым противораковым препаратам являются:

- минимальная токсичность по отношению к здоровым клеткам организма и максимальная эффективность по отношению к онкотрансформированным клеткам

- адресная доставка лекарственного средства к опухоли.

Таким образом, создание опухоль-адресованных противоопухолевых препаратов на основе природных белков и пептидов, способных вызывать апоптотическую гибель раковых клеток и не повреждающих здоровые клетки организма, является одним из активно развивающихся и очень актуальных направлений поиска новых противораковых лекарственных средств.

Настоящий проект направлен на создание малотоксичного и высокоспецифичного противоопухолевого лекарственного средства, состоящего из апоптоз-индуцирующего белка лактапина (фрагмента каппа-казеина молока человека) и опухоль-адресованного пептида, обеспечивающего доставку лактапина в опухоль.

2. Цель проекта: Разработка и получение бифункциональных агентов

белковой природы для направленной элиминации раковых клеток - рекомбинантных слитых белков, состоящих из апоптоз-индуцирующего белка лактапина и опухоль-адресованных пептидов, обеспечивающих доставку лактапина к опухоли.

Основные планируемые результаты проекта

1. В ходе выполнения ПНИ будут получены следующие результаты:

Разработанные методики:

1.1 Методика отбора опухоль-адресованных пептидов из фаговой пептидной библиотеки методом аффинной селекции.

1.2 Методика получения генетических конструкций со встроенными генами лактапина и опухоль-адресованных пептидов, обеспечивающих продукцию рекомбинантных слитых белков клетками штаммов-продуцентов *E. coli*.

1.3 Методика выделения и очистки рекомбинантных слитых белков.

1.4 Методика оценки количественных параметров, характеризующих специфическую активность рекомбинантных слитых белков.

Экспериментальные результаты:

1.5 Опухоль-адресованные пептиды, отобранные из пептидной фаговой библиотеки на культурах раковых клеток и опухолевых моделях

1.6 Генетические конструкции со встроенными генами лактапина и опухоль-адресованных пептидов, обеспечивающие продукцию рекомбинантных слитых белков клетками штаммов-продуцентов *E. coli*.

1.7 Штаммы-продуценты *E. coli*, обеспечивающие наработку рекомбинантных слитых белков.

1.8 Экспериментальные образцы рекомбинантных слитых белков.

Разработанные документы:

1.9 Промежуточные и заключительный отчеты о ПНИ.

1.10 Отчеты о патентных исследованиях и о дополнительных патентных исследованиях.

1.11 Лабораторный технологический регламент наработки и очистки рекомбинантных слитых белков с наибольшим терапевтическим потенциалом.

1.12 Программа и методики испытаний экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков с наибольшим терапевтическим потенциалом.

1.13 Протоколы исследований и испытаний экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков

1.14 Технические требования и предложения по разработке, производству и эксплуатации продукции с учетом технологических возможностей и особенностей индустриального партнера - организации реального сектора экономики.

1.15 Проект технического задания на проведение ОТП по теме: «Создание опытно-промышленной технологии получения противоопухолевой субстанции на основе рекомбинантных слитых белков «адресный пептид-лактапин».

2. Характеристики разработанных методик:

Разработанные в ходе выполнения ПНИ методики получения рекомбинантных слитых белков должны обеспечить:

- масштабирование в лабораторном и промышленном производстве;
- перенос технологических процессов для получения аналогичных препаратов, отличающихся элементами адресной доставки и/или цитотоксичности.

Характеристики экспериментальных результатов:

1. Рекомбинантные слитые белки должны содержать:

- а) пептидный модуль, обеспечивающий специфичное взаимодействие с поверхностными маркерами раковых клеток - опухоль-адресованный пептид;
- б) белковый или пептидный модуль, способствующий элиминации раковых клеток - апоптоз-индуцирующий белок лактаптин;

2. Генетические конструкции со встройкой генов лактаптина и опухоль-адресованных пептидов должны обеспечивать продукцию рекомбинантных слитых белков клетками штаммов-продуцентов, и иметь следующие характеристики:

- гены адресного пептида и лактаптина должны считываться единой трансляционной рамкой;
- ген рекомбинантного слитого белка должен быть сконструирован таким образом, что при синтезе слитого белка адресный пептид оказывается на N-конце слитого белка.

3. Штаммы-продуценты *E. coli*, обеспечивающие наработку рекомбинантных слитых белков, должны отвечать следующим требованиям:

- продуктивность штамма-продуцента должна быть не менее 25 мг белка с 1 л биомассы;
- продуктивность штамма-продуцента должна сохраняться в течение не менее чем 20 пассажей.

4. Экспериментальные образцы рекомбинантных слитых белков должны удовлетворять следующим требованиям:

4.1 Структура и чистота экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков должны быть подтверждены современными методами генетического и биохимического анализа.

4.2 Степень очистки экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков должна быть не менее 95% по данным гель-электрофоретического и хроматографического анализов.

4.3 Экспериментальные образцы рекомбинантных слитых белков должны подавлять жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и/или MDA-MB 231 в культуре - ИК50 (концентрация препарата, вызывающая торможение роста клеток на 50%) должна составлять не более 0,4 мг/мл.

4.4 Экспериментальные образцы рекомбинантных слитых белков должны не менее чем в 5 раз превосходить тропность лактаптина к опухоли.

4.5 Экспериментальные образцы рекомбинантных слитых белков должны обеспечивать торможение роста опухоли в модели алло- и ксенографтов не менее чем на 25%.

4.6 Экспериментальные образцы рекомбинантных слитых белков должны быть нетоксичными для белых беспородных мышей в дозе не менее 0,5

мг/мышь при внутривенном введении.

Характеристики разрабатываемых документов:

Документы, разрабатываемые при выполнении работ по проекту, должны быть оформлены согласно соответствующим нормативным документам.

Краткая характеристика создаваемой/созданной научной (научно-технической, инновационной) продукции

1. Конечным продуктом, создаваемым с использованием результатов, планируемых при выполнении проекта, будет являться кандидатное лекарственное средство, одновременно обладающее противоопухолевыми свойствами - за счет апоптотического действия лактапина, и высокой тропностью к опухоли - за счет адресного пептида. Адресный пептид будет обеспечивать направленную доставку лекарства, что позволит значительно повысить эффективность противоопухолевого действия лактапина. Преимуществами предлагаемых к разработке рекомбинантных слитых белков будут являться: низкая токсичность; высокие коэффициенты проникновения в опухоль, обусловленные, в том числе, небольшими размерами слитых белков (около 15 кДа); способность действовать на более широкий спектр опухолей за счет «адресации» к неизвестным или к не охарактеризованным на настоящий момент антигенам опухолевых клеток; меньшие финансовые затраты на разработку целевых продуктов.

2. В настоящем проекте для усиления противоопухолевого эффекта лактапина впервые использованы опухоль-адресованные пептиды, отобранные с помощью пептидной фаговой библиотеки и обеспечивающие доставку противоопухолевого средства в опухоль.

Авторы проекта предлагают создание генетических конструкций, в которых генетическая последовательность адресного пептида и лактапина будут считываться единой трансляционной рамкой, что обеспечит синтез слитого белка «адресный пептид-лактапин». Такой подход обеспечит стабильную наработку рекомбинантного белка в реципиентных клетках *E. coli.*, минуя стадии наработки, выделения и очистки каждого компонента (лактапина и адресного пептида) в отдельности, а также финальную стадию конъюгации двух белковых молекул.

Использование опухолеспецифической адресной доставки позволит снизить дозу лактапина, необходимую для получения терапевтического эффекта, минимизировать возможные побочные эффекты от его применения и увеличить эффективность противоопухолевой терапии. Снижение доз препарата позволит уменьшить стоимость курса лечения при проведении "таргетной" терапии.

Таким образом, в результате выполнения проекта будут получены результаты, способные к правовой охране, а именно: последовательности опухоль-адресованных пептидов, генетические конструкции, обеспечивающие синтез слитых белков «адресный пептид-лактапин», штаммы-продуценты слитых белков и сами рекомбинантные слитые белки с цитотоксической и противоопухолевой активностью.

3. В настоящее время создание противоопухолевых препаратов на основе природных белков и пептидов, способных вызывать апоптотическую гибель раковых клеток и селективно подавлять рост опухоли является одним из активно развивающихся направлений поиска новых противораковых лекарственных средств. Такие проапоптотические соединения белковой природы как цитокины семейства фактора некроза опухоли, интерфероны, интерлейкины, некоторые вирусные белки (апоптин, белок NS1 парвовируса грызунов, белок E4orf4 человека), рибонуклеазы (онконаза, биназа, барназа), кротамин, белки и пептиды молока являются основой противораковых лекарств, которые уже используются в клинической практике или проходят различные этапы доклинических и клинических испытаний [Dimberg L.Y., 2012; Argiris K., 2011; Fang E.F., 2011; Hayashi M.A., 2012; Barbana C., 2011; Koval O.A., 2014]

Перспективным направлением реализации адресного подхода является использование опухоль-адресованных пептидов небольшого размера (до 50 аминокислотных остатков) для направленной доставки лекарственных средств к клеткам опухоли. Поиск и получение таких органо- и тканеспецифических пептидов проводят с использованием комбинаторных пептидных библиотек, в частности с помощью фаговых пептидных библиотек. Ключевым моментом этой технологии отбора является способность получать высокоспецифичные к определенной мишени пептиды при отсутствии информации об этой мишени. Предлагаемый подход позволяет проводить селекцию опухоль-адресованных пептидов как *in vitro* на культурах раковых клеток (отбор на специфические рецепторные структуры опухолевых клеток), так и *in vivo* на опухолевых моделях (отбор и на клеточные рецепторы, и на рецепторы сосудов опухоли) [Vábíčková J, et al., 2013; Zhi J.L., 2012].

Такие пептиды обладают высокими коэффициентами проникновения в опухоль (их концентрация внутри опухоли может превышать таковую в других органах и тканях в десятки раз), низкой иммуногенностью, высокой аффинностью к мишени, относительной стабильностью и являются удобными объектами для конъюгирования с другими противоопухолевыми агентами, в том числе и белковой природы [Sugahara K.N, et al., 2009].

В настоящее время такие органо- и тканеспецифические пептиды используют для поиска маркеров различных заболеваний, изучения рецепторов и их лигандов, детектирование биологических процессов *in vivo*, доставки цитотоксических лекарств, проапоптотических и апоптотических пептидов [Bakhshinejad B., 2014; Hamzeh-Mivehroud M., 2013].

4. В ходе выполнения проекта предполагается решить следующие задачи:

4.1 Разработать технологический процесс получения рекомбинантных слитых белков «адресный пептид-лактаптин», обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью и состоящих из апоптоз-индуцирующего белка лактаптина и опухоль-адресованных пептидов, отобранных из комбинаторной пептидной библиотеки и обеспечивающих доставку противоопухолевого средства в опухоль.

4.1.1 Отбор опухоль-адресованных пептидов с помощью фаговой пептидной

библиотеки в системе *in vitro* на культурах раковых клеток и *in vivo* на опухолевых моделях алло- и ксенографтов.

4.1.2 Создание генетических конструкций со встройкой генов лактапина и опухоль-адресованного пептида, обеспечивающих экспрессию рекомбинантных слитых белков «адресный пептид-лактапин» в клетках-продуцентах *E. coli*.

4.1.3 Получение рекомбинантных штаммов *E. coli* - продуцентов слитых белков «адресный пептид-лактапин».

4.1.4 Нарботка, очистка и характеристика слитых белков «адресный пептид-лактапин».

4.1.5 Разработка лабораторного технологического регламента получения слитых белков «адресный пептид-лактапин» с наибольшим терапевтическим потенциалом.

4.2 Провести испытания цитотоксической активности слитых белков «адресный пептид-лактапин» на культурах раковых и нормальных клеток мыши и человека *in vitro*.

4.2.1 Подбор и постановка культивирования культур раковых и нормальных клеток мыши (гепатома, аденокарцинома легких) и человека (эстроген-зависимая и эстроген-независимая аденокарцинома молочной железы, карцинома легких) для сравнительного анализа.

4.2.2 Оценка цитотоксической активности рекомбинантных слитых белков на культурах раковых клеток мыши и человека путем определения 50%-ной цитотоксической дозы (ИК50) с использованием реагента МТТ (3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум бромид).

4.2.3 Сравнительный анализ ИК50 рекомбинантных слитых белков для раковых и нормальных клеток мыши и человека, отбор наиболее чувствительных линий раковых клеток.

4.3 Провести испытания адресных свойств полученных слитых белков «адресный пептид-лактапин» на лабораторных животных с трансплантированными опухолями.

4.3.1 Подбор и/или закупка экспериментальных животных. Разработка метода прививки клеток опухоли линейным и иммунодефицитным мышам для получения алло-(гепатома и/или аденокарцинома легких) и ксенотрансплантатов (аденокарцинома молочной железы человека).

4.3.2 Введение экспериментальным животным с опухолью флуоресцентно меченых слитых белков «адресный пептид-лактапин» и анализ накопления слитых белков в опухолевой ткани (тропности к опухоли) методами флуоресцентной микроскопии.

Сравнительный анализ накопления в опухолевой ткани флуоресцентно меченых слитых белков и лактапина, отбор слитых белков с наибольшей тропностью к опухолевым тканям.

4.4 Провести испытания противоопухолевой активности полученных слитых белков «адресный пептид-лактапин» на моделях алло- и ксенотрансплантатов *in vivo*.

4.4.1 Подбор и/или закупка экспериментальных животных. Прививка клеток опухоли линейным и иммунодефицитным мышам для получения алло- (гепатома и/или аденокарцинома легких) и ксенотрансплантатов (аденокарцинома молочной железы человека). Оценка динамики роста опухолей и формирование экспериментальных групп.

4.4.2 Подбор оптимальной схемы введения рекомбинантных слитых белков (эффективная доза, временной режим) Измерение размера опухоли при разных условиях введения препарата.

4.4.3 Сравнительный анализ торможение роста опухоли (ТРО) при введении рекомбинантных слитых белков и лактапина. Отбор слитых белков «адресный пептид-лактапин» с наибольшим терапевтическим потенциалом.

4.5 Провести испытания острой токсичности слитых белков «адресный пептид-лактапин» с наибольшим терапевтическим потенциалом на лабораторных животных согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств».

Ограничения и риски

1. В результате изменения структуры противоопухолевого агента ИК50 рекомбинантных слитых белков по отношению к опухолевым клеткам может быть выше, чем у исходного апоптоз-индуцирующего пептида лактапина.

2. Адресные свойства пептидов, отобранных из фаговой пептидной библиотеки в составе фаговых частиц, могут быть ослаблены при получении слитых белков.

Назначение и область применения, эффекты от внедрения результатов проекта

1. Полученные в результате выполнения проекта научно-технические результаты могут быть использованы в фундаментальных и прикладных исследованиях, а также при производстве лекарственных средств и в практическом здравоохранении:

- методика конструирования генетических конструкций, обеспечивающие экспрессию слитых белков «адресный пептид - лактапин», и методика получения рекомбинантных штаммов-продуцентов слитых белков «адресный пептид-лактапин» могут быть использованы при создании рекомбинантных вариантов слитых белков с заданными свойствами.

- полученные малотоксичные рекомбинантные слитые белки, одновременно обладающие противоопухолевыми свойствами и специфичные к опухолевым клеткам, могут являться основой для создания фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм.

Результаты исследований, безусловно, будут являться патентоспособными:

- малотоксичные и высоко специфичные адресные бифункциональные агенты, созданные на основе природного апоптоз-индуцирующего белка лактапина и опухоль-адресующих пептидов, обеспечивающих направленное воздействие на опухоль, будут являться основой патентоспособных фармацевтических

противоопухолевых субстанций;

- способы (схемы) терапии злокачественных новообразований молочной железы человека разработанными адресными бифункциональными агентами, состоящими из малотоксичного противоопухолевого средства лактаптина и опухоль-адресованного пептида, также будут являться объектом патентования.

Результаты проекта будут востребованы исследовательскими организациями, биотехнологическими компаниями, разрабатывающими новые противоопухолевые препараты, фармацевтическими компаниями, которые занимаются производством противоопухолевых терапевтических средств, и организациями практического здравоохранения для терапии злокачественных новообразований и улучшения качества жизни онкологических больных.

2. Основным потребителем результатов проекта будет являться Индустриальный партнер проекта Общество с ограниченной ответственностью «ИРВИН 2» (ООО «ИРВИН 2»), обеспечивающий 100% внебюджетного финансирования работ по проекту.

ООО «ИРВИН 2» - российская высокотехнологичная компания отрасли здравоохранения, основанная в 2001 году и входящая в фармацевтический холдинг «ФармЭко» (<http://www.pharmeko.ru/>).

В настоящее время ООО «ИРВИН 2» занимается производством и поставкой диагностического оборудования и комплексов лабораторной диагностики, научно-исследовательской деятельностью в области создания адресных систем доставки лекарственных средств на основе нанотехнологий, разработкой инновационных лекарственных средств, строительством и оснащением медицинских центров.

В 2013 г компания «ИРВИН 2» совместно с исполнителем проекта ИХБФМ СО РАН, в соответствии с ФЗ-217, создали совместное предприятие по организации опытного производства противоопухолевых препаратов на основе прошедшего доклинических испытания препарата Лактаптин - ООО «Фабрика биополимеров». ИХБФМ СО РАН передал «Фабрике биополимеров» право пользования патентом на инновационный противоопухолевый препарат Лактаптин. ООО «Фабрика биополимеров» имеет опытный участок для производства биотехнологических лекарственных препаратов, спроектированный и оснащенный согласно стандартам GMP. Внебюджетное финансирование проекта будет осуществляться ООО «ИРВИН 2» путем инвестирования ООО «Фабрика биополимеров».

Исполнители проекта будут проводить разработку и апробацию Лабораторной методики и Лабораторного технологического регламента получения адресных бифункциональных агентов с противоопухолевой активностью, состоящих из цитотоксического белка лактаптина и опухоль-адресованных пептидов, обеспечивающих доставку лекарственного средства в опухоль, на опытном участке ООО «Фабрика биополимеров». На этом же участке планируется производство разработанного лекарственного средства для проведения доклинических и клинических исследований.

3. Результаты проекта будут востребованы исследовательскими

организациями, биотехнологическими компаниями, разрабатывающими новые противоопухолевые препараты, фармацевтическими компаниями, которые занимаются производством противоопухолевых терапевтических средств, и организациями практического здравоохранения для терапии злокачественных новообразований и улучшения качества жизни онкологических больных.

4. Создание новых противоопухолевых лекарственных средств, обладающих направленным воздействием на опухолевые клетки и не оказывающих токсического действия на здоровые клетки организма, является в настоящее время приоритетным направлением фундаментальных и прикладных исследований во всем мире. Результаты проекта - малотоксичные и высокоспецифичные адресные бифункциональные агенты, созданные на основе природного апоптоз-индуцирующего белка лактапина и опухоль-адресующих пептидов, обеспечивающих направленное воздействие на опухоль, будут востребованы международным научным сообществом, в том числе при представлении на международных конференциях, и могут являться основой для международных фундаментальных исследований и прикладных проектов.

Текущие результаты проекта

Результаты первого этапа (2014 г):

1. Проведен аналитический обзор информационных источников, затрагивающих научно-техническую проблему, исследуемую в рамках ПНИ, и обоснование направления исследования.
2. Проведены патентные исследования.
3. Разработана методика отбора опухоль-адресованных пептидов в системах *in vitro* и *in vivo*, позволяющая отбирать из пептидной фаговой библиотеки пептиды, специфически распознающие рецепторные структуры мышинных опухолей *in vivo* и раковых клеток *in vitro*.
4. Проведен отбор опухоль-адресованных пептидов в системе *in vitro* на культурах раковых клеток мыши. Отобраны два фаговых клона, несущих пептиды GLHTSATNLYLH и SGVYKVAYDWQH, которые специфически связываются с рецепторными структурами раковых клеток.
5. Проведен отбор опухоль-адресованных пептидов *in vivo* на мышинной опухолевой модели. Отобраны два фаговых клона, несущие пептиды GLHTSATNLYLH и SGVYKVAYDWQH. Эти же клоны были отобраны при селекции *in vitro* на раковых клетках.
6. Разработана методика получения генетических конструкций, обеспечивающих продукцию рекомбинантных слитых белков «адресный пептид-лактапин».

Результаты второго этапа (январь - июнь 2015 г):

1. Проведен отбор опухоль-адресованных пептидов в системе *in vitro* на культурах раковых клеток человека: аденокарциноме молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231 и аденокарциноме легких A 549. Сравнительный анализ

специфичности отобранных пептидов, экспонированных бактериофагами, показал достоверное связывание пептидов YTYDPWLIFPAN, FIPFDPMSMRWE и SLPVYAPALTSR с раковыми клетками линии MDA-MB-231 и пептида FIPFDPMSMRWE с раковыми клетками линии MCF-7 по сравнению с бактериофагом дикого типа. Последовательности пептидов YTYDPWLIFPAN и FIPFDPMSMRWE выбраны для создания генетических конструкций, обеспечивающих синтез слитых белков.

2. Проведен отбор опухоль-адресованных пептидов в системе *in vivo* в модели ксенографтов на мышах линии SCID с трансплантированной опухолью человека MDA-MB-231. При селекции фаговой пептидной библиотеки отобраны фаговых клоны, несущие пептиды SLPVYAPALTSR, GREPAASLLSHF, GTGLVTLPRLTV и DSQFNKYSIATV (частоты встречаемости 19,4%, 16,6%, 13,8%, 13,8%, соответственно). Бактериофаги, несущие пептиды SLPVYAPALTSR и GTGLVTLPRLTV, выбраны для сравнительного анализа специфичности связывания по сравнению с бактериофагом дикого типа.

3. Получены рекомбинантные плазмиды pET-15b_T3_RL2 (6057 п.н.) и pET-15b_T4_RL2 (6057 п.н.), кодирующие рекомбинантные слитые белки, состоящие из отобранных пептидов YTYDPWLIFPAN и FIPFDPMSMRWE и лактапина. Получены рекомбинантные плазмиды pET-15b_RL_RGD_H (6048 п.н.) и pET-15b_RL_H_RGD (6045 п.н.), кодирующие рекомбинантные слитые белки, состоящие из iRGD-пептида и лактапина. Правильность встройки гена слитого белка подтверждена методами ПЦР, рестрикционного анализа и определения нуклеотидной последовательности встройки.

4. Получены четыре рекомбинантных штамма *E. coli* BL21(DE3)/pET-15b_T3_RL, BL21(DE3)/pET-15b_T4_RL, BL21(DE3)/pET-15b_RL_RGD_H и BL21(DE3)/pET-15b_RL_H_RGD, продуцирующие слитые белки «адресный пептид-лактапин». Рекомбинантные штаммы *E. coli* получены на основе реципиентного штамма *E. coli* BL21(DE3) методом временной доминантной селекции с использованием в качестве маркера гена устойчивости к ампициллину. Продуктивность штаммов-продуцентов составляет не менее 25 мг белка с 1 л биомассы и сохраняется в течение не менее чем 20 пассажей.

5. Оформлены паспорта и проведено депонирование генетических конструкций и штаммов-продуцентов рекомбинантных слитых белков, полученных на первом и втором этапе выполнения проекта. Генетических конструкции и штаммы-продуценты задепонированы в коллекции Межинститутского Центра коллективного пользования СО РАН "Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур" (ЭМТК).

Результаты третьего этапа (июль - декабрь 2015 г):

1. Проведены дополнительные патентные исследования. Получены достоверные данные об уровне техники и тенденциях развития исследуемого объекта, выявлены технические решения, близкие по сущности и достигаемому результату к собственным разработкам, выявлены компании, оперирующие на рынке биотехнологии и микробиологии, обоснована целесообразность правовой охраны созданного РИД и проведена экспертиза на патентную чистоту созданного изобретения в отношении России. Подана заявка на патент «Опухоль-специфический пептид для адресной

химиотерапии опухолей молочной железы человека». Заявка № 2015132522 с приоритетом от 04.08.2015.

2. Проведена отработка методов выделения и очистки рекомбинантных слитых белков. Выделение и очистка целевых белков включает следующие стадии:

- Аффинная хроматография на IMAC Sepharose 6 Fast Flow;
- Гель-фильтрация на DEAE Sephadex A-25;
- Катионообменная хроматография (1) на SP Sepharose Fast Flow;
- Катионообменная хроматография (2) на SP Sepharose Fast Flow (концентрирование белка);
- Анионообменная хроматография на сорбенте Q Sepharose Fast Flow.

3. Проведена отработка методов контроля качества рекомбинантных слитых белков. Контроль качества слитых белков проводили следующими методами:

- Секвенирование ДНК генетических конструкций со встроенными генами опухоль-адресованного пептида и лактапина для подтверждения правильности нуклеотидных последовательностей, кодирующих рекомбинантные белки.
- Электрофорез в ПААГ для оценки чистоты препаратов рекомбинантных белков (отсутствие примесных белков);
- Вестерн-блот анализ рекомбинантных слитых белков с антителами к лактапину для подтверждения подлинности полученных белков;
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) для анализа чистоты слитых белков (степень очистки экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков составляет не менее 95%);
- MALDI TOF масс-спектрометрия для подтверждения первичной структуры слитых белков;
- ЛАЛ-тест для оценки содержания бактериальных эндотоксинов в экспериментальных образцах рекомбинантных белков (содержание бактериальных эндотоксинов составляет менее 10 ЕЭ на 1 мг белка).

4. Разработана методика получения рекомбинантных слитых белков, включающая наработку биомассы клеток-продуцентов слитых белков, выделение целевых рекомбинантных белков из биомассы клеток-продуцентов, очистку целевых белков и анализ качества полученных экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков.

5. Проведена наработка пяти экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков T1-RL, T2-RL, T3-RL, RL_RGD_H и RL_H_RGD, содержащих опухоль-адресованный пептид, обеспечивающий специфичное взаимодействие с поверхностными маркерами раковых клеток, и апоптоз-индуцирующий белок лактапин, способствующий элиминации раковых клеток.

Качество полученных экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков подтверждены современными методами генетического и биохимического анализа.

6. Разработана Программа и методики испытаний экспериментальных образцов рекомбинантных слитых белков, включающие разработку спецификации на экспериментальные образцы с обоснованием используемых при испытаниях методов контроля и определением нормативных показателей качества испытуемых препаратов.

7. Разработана методика оценки количественных параметров, характеризующих специфическую активность рекомбинантных слитых белков, включающая:

- оценку цитотоксической активности (ИК50) слитых белков методом МТТ-теста на культурах раковых клеток мыши (ГА-1, АЛ) и человека (MDA-MB-231, MCF-7, A549);
- оценку адресности слитых белков путем определения тропности к опухоли;
- оценку противоопухолевой активности рекомбинантных слитых белков путем определения индекса торможения роста опухоли *in vivo* на моделях алло- (гепатома, аденокарцинома легких) и ксенотрансплантантов (рак молочной железы);
- оценку аномальной токсичности рекомбинантных слитых белков при внутривенном введении экспериментальных образцов белым беспородным мышам.

Полученные результаты соответствуют требованиям ТЗ и ПГ.

Информация о проекте размещена на официальном сайте ИХБФМ СО РАН в сети интернет по адресу

http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/science/grants/gk/2014_14.607.21.0063.

В 2015 г. за счет внебюджетных средств (средства промышленного партнера проекта ООО "ИРВИН 2") была проведена закупка материалов и оборудования для ферментации (для наработки биомассы штаммов-продуцентов рекомбинантных слитых белков) и для очистки и анализа качества рекомбинантных слитых белков.