



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59059 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

**(54) СУМІШ МАКРОМОЛЕКУЛ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ
ЯК НОСІЙ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧНИХ АГЕНТІВ**

1

2

(21) а201012092

(22) 12.10.2010

(24) 10.05.2011

(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.

(72) СОКИРКО ОЛЕГ СЕРГІЙОВИЧ

(73) СОКИРКО ОЛЕГ СЕРГІЙОВИЧ

(57) 1. Носій для терапевтичних агентів, що являє собою макромолекули природного походження, який **відрізняється** тим, що є сумішшю макромолекул дезоксирибонуклеїнової кислоти тваринного походження, в якій вміст білка не перевищує 10 %.

2. Носій за п. 1, який **відрізняється** тим, що його екстрагують із заморожених органів або тканин тварин.

3. Носій за п. 2, який **відрізняється** тим, що його екстрагують сумішшю хлороформу та ізоамілового спирту.

4. Носій за п. 2, який **відрізняється** тим, що з екстракту його осаджують подвійним об'ємом охолодженого до 0 ± 2 °C 96 % етилового спирту-ректифікату або спирту етилового перегнаного 80-90 %, або одним об'ємом спирту ізопропілового.

Корисна модель належить до виробництва фармацевтичних препаратів, до носіїв терапевтичних агентів природного походження, зокрема до суміші макромолекул дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) тваринного походження.

До першочергових завдань фармацевтичної технології слід віднести підвищення розчинності важкорозчинних лікарських речовин у воді та ліпідах, підвищення стабільності гомогенних та гетерогенних лікарських систем, подовження терміну дії лікарських препаратів, створення препаратів направленої дії з заданими фармакологічними властивостями.

Вдосконалення урегульованості і направленої дії біологічно активних речовин є основним напрямком в розвитку фармацевтичної технології. Розроблені лікарські системи з регульованим вивільненням діючих речовин дозволяють швидко досягти лікувального ефекту, тривалий час утримувати їх терапевтичні концентрації в організмі пацієнта. Як свідчить досвід, застосування таких лікарських систем дає можливість зменшити курсові дози, уникнути подразнюючої дії та передозування лікарських речовин, зменшити частоту проявів небажаних побічних ефектів.

В зв'язку з цим гостро стоїть питання пошуку нових носіїв для лікарських речовин, які б легко проходили клітинні мембрани, не викликали пригнічення імунної системи, не спричиняли побічні ефекти і за рахунок хімічної взаємодії з лікарською речовиною забезпечували тривале перебування

останньої в організмі пацієнта. Особливий інтерес становлять макромолекули природного походження через їх чудову біологічну сумісність. Прикладом таких молекул служать полімери дезоксирибонуклеїнової кислоти ДНК та рибонуклеїнової кислоти РНК, особливо з огляду на те, що вони містять функціональні групи, які дозволяють утворювати хімічні комплекси з різноманітними речовинами. Остання властивість є надзвичайно корисною для забезпечення тривалої дії лікарських речовин та їх адресної доставки.

ДНК може бути виділена з будь-якого типу тканин і клітин, які містять ядра. Етапи виділення ДНК включають швидкий лізис клітин, видалення фрагментів клітинних органел і мембран за допомогою центрифугування, ферментативне руйнування білків протеїназами та екстрагування ДНК з розчину за допомогою фенолу і хлороформу. Потім ДНК осаджують, як правило, етанолом, і після видалення надосадової рідини розчиняють в буферному розчині. Оцінку якості ДНК проводять на основі оптичної густини розчину ДНК в ділянці білкового та нуклеїнового спектрів поглинання, тобто, при 280 і 260 нм, відповідно. Для чистих зразків ДНК співвідношення оптичних густин, отриманих при 260/280 нм не повинно перевищувати 1,8. Молекули ДНК можуть мати довжину до 4 см, але в процесі виділення вони фрагментуються, оскільки є чутливими до механічної дії. Але такі фрагменти все ще залишаються занадто великими для того, щоб пройти через клітинні мембрани і доставити

(19) UA (11) 59059 (13) U

приєднаний терапевтичний агент. Тому для отримання фрагментів ДНК бажаного розміру їх додатково обробляють рестриктазами (ферменти, що розщеплюють ДНК) або рестрикційними ендонуклеазами, виділеними з бактеріальних клітин.

З рівня техніки відомо, що ДНК використовують для формування волокон електростатичним прядінням з метою їх використання в фармацевтичній промисловості [Fang et al., J. Macromol. Sci.-Phys., B36(2), 169-173 (1997)].

Фармацевтично прийнятний активний агент, такий як біологічний агент, вакцина або пептид, може бути інкорпорований в ДНК або РНК або в їх похідні, якщо тільки вони аморфні і являють собою електропрядене волокно, для одержання фармацевтичної композиції у формі твердої дисперсії. Такі дисперсії на основі волокон ДНК або РНК в подальшому можуть бути застосовані для виробництва фармацевтичних композицій з прийнятним носієм - рідиною, напівтвердим агентом, твердим агентом або аерозолем. Носії вибирають з водних, неводних суспензій або суспензій наночастинок, розчинів, кремів, мазей, гелів, сиропів, супозиторіїв і мікрокрапельних спреїв [RU 2 331 411 C2, 20.08.2008].

Особливої уваги в рівні техніки заслуговують терапевтичні системи для перорального і трансдермального застосування, номенклатура яких в багатьох країнах з кожним роком розширюються, які використовують природні макромолекули як носії для лікарських речовин. Однією з таких фармацевтичних композицій для місцевого застосування є бенгальський рожевий, її застосовують для фотодинамічного лікування тканин людей і тварин. Крім бенгальського рожевого як активного агента композиція додатково містить щонайменше один націлюючий радикал, приєднаний до активного агента. Таким націлюючим радикалом зокрема може бути ДНК або РНК [Діз Х. Крейг (US), Скотт Тімоті (US), Смолік Джон (US), Уочтер Ерік (US), Фішер Вальтер (US). Патентна заявка США № 2002106422 від 10.11.2003].

Найближчими аналогами корисної моделі, що заявляється, є патенти України № 60597 від 15.07.2005 та № 61543 від 15.08.2005, в яких розкриті протипухлинні препарати, де носієм є ДНК, що має природне походження і яка не містить ушкоджених генів та характеризується молекулярною масою 7-17 мДа. Вказана ДНК утворює комплекс з терапевтичним цитотоксичним агентом - платиною (II), який ефективно пригнічує ріст злоякісних клітин багатьох солідних пухлин.

Завдяки використанню ДНК або РНК як носіїв вказані комплекси платини з високою вибірковою здатністю поглинаються пухлинними клітинами, а після поглинання відщеплюються і взаємодіють з молекулами РНК, ДНК, АТФази і тубуліну, порушуючи їх структуру та функції, внаслідок чого клітини гинуть не тільки через апоптоз але й некроз. Такі препарати добре переносяться більшістю пацієнтів у випадку внутрішньосудинного та внутрішньопорожнинного введення, забезпечують клінічний ефект у випадку застосування в аплікаціях при лікуванні раку ротоглотки, щелепи та метастатичного ураження шкіри. Але існують і недоліки, зок-

рема вони полягають в тому, що джерелом для отримання ДНК або РНК є селезінка великої рогатої худоби, яка може бути джерелом шкочочинних білків, наприклад, пріонових.

Крім того, промислове поголів'я великої рогатої худоби на теренах України стрімко скорочується, що змушує шукати нові джерела для одержання бажаної суміші ДНК.

Тому, на сьогодні існує потреба в розширенні сировинної бази для отримання суміші ДНК, придатної як носій для терапевтичних агентів

Отже, перед авторами постало завдання отримати макромолекули ДНК тваринного походження, здатність яких викликати небажані побічні ефекти була б мінімізована. Це завдання вирішується тим, що був отриманий препарат ДНК, вміст сторонніх білків в якому не перевищував 10 %.

Можливість отримання препарату ДНК такої високої чистоти дозволяє використовувати більш широкий ряд тварин, їх органів та тканин як джерела для виділення ДНК. Причому ці нові джерела можуть значно здешевити отримуваний продукт, наприклад, молоки лососевих порід риб, які є відходами виробництва, що також є перевагою даної корисної моделі.

Отже, об'єктом корисної моделі, що заявляється, є носій для терапевтичних агентів, що являє собою макромолекули природного походження, який відрізняється тим, що є сумішшю макромолекул дезоксирибонуклеїнової кислоти ДНК тваринного походження, в якій вміст білка не перевищує 10 %.

Дана корисна модель може бути проілюстрована на прикладі отримання суміші ДНК з селезінки великої рогатої худоби або свиней.

Для одержання суміші макромолекул ДНК використовують заморожену селезінку (-10...-15 °C) ветеринарно засвідчених здорових тварин, запобігаючи розморожуванню. Селезінку (10 кг) рублять на невеликі шматки і подрібнюють на вовчку И-14 разом з 0,9 % розчином хлористого натрію, приготованого масово-об'ємним способом на воді очищеній. Потім її гомогенізують на роторно-пульсаційному апараті та відокремлюють клітинний осад, змішуючи гомогенат з охолодженим 0,9 % розчином хлористого натрію (40 л) та пропускаючи отриману суміш через сепаратор (наприклад, «ВЕСФАЛІЯ»). Відбирають клітинний осад та зважують його.

До клітинного осаду (2,4 кг) додають 13 л 0,9 % розчину натрію хлористого, охолодженого до $+4 \pm 2$ °C, ретельно перемішують і подають на роторно-пульсаційний апарат. В розчин для лізису (0,9 % хлорид натрію і цитрат натрію) при перемішуванні додають отриманий гомогенат і натрію додецилсульфат або ОП-7 у кількості 0,3 - 1 % від об'єму суміші. Суміш залишають на 30 хвилин.

До лізату клітинного осаду у пересувній ємності додають концентрований розчин хлориду натрію (2,590 кг хлористого натрію доводять до об'єму 8 л очищеної води з температурою $+6 \pm 2$ °C), перемішують і залишають суміш на 30 хвилин для депротоїнізації.

До отриманої суміші додають хлороформ та ізоаміловий спирт (при співвідношенні 7,5:4:0,3(л)).

Суміш у реакторах Р-20,21 перемішують протягом 1,5-2 год. і залишають на ніч при температурі $+4\pm 2^\circ\text{C}$. Візуально контролюють розділення фаз. Супернатант (верхній шар рідини) перевіряють на наявність високомолекулярної ДНК за допомогою переосадження двома об'ємами спирту етилового ректифікату або спирту етилового перегнаного 80-90 % - утворення желеподібного прозорого осаду - „медузи”. Супернатант центрифугують, надосадову рідину зливають і знову перевіряють на наявність високомолекулярної ДНК. Ще двічі повторюють процес депротоїнізації та центрифугування отриманих супернатантів. Вказану обробку припиняють, якщо оптична густина отриманого розчину А260/230 складає не менше 2,0, а А260/280 складає не менше 1,8, а вміст білків не перевищує 5 %.

Розчин ДНК і спирт етиловий ректифікований або спирт етиловий перегнаний 80-90 % або спирт ізопропіловий охолоджують до $0\pm 2^\circ\text{C}$ у морозильній (холодильній) камері. ДНК осаджують порціями, додаючи його розчин у подвійний об'єм 96 % етилового спирту ректифікату або спирту етилового перегнаного 80-90 %, або одним об'ємом спирту ізопропілового (при використанні спирту ізопропілового осадження відбувається значно гірше, з великими втратами ДНК, тому краще застосовувати спирт етиловий ректифікат або спирт етиловий 80-90 %). Отримані порції осаду переносять у 70-75% етиловий (на весь осад з 28-30 л лізату – 6 - 8л 70-75 % спирту). Промивання проводять протягом 15-20 хв., періодично обережно перевертаючи осад згідно. Потім осад обережно переносять у нову порцію 70-75 % етилового спирту і повторюють промивання. Після відмивання осади збирають у накопичувальну ємність з спиртом етиловим ректифікатом, закривають і зберігають в такому вигляді до початку процесу сушки.

Осад добре віджимають і переносять на перфоровану пластину з нержавіючої сталі або скло і сушать в потоці ламінарного повітря при температурі 37- 50 $^\circ\text{C}$ до висушування або в ламінарній шафі без підігріву протягом 12-20 год. Висушену ДНК відбирають на мікроб і логічний та загальний хімічний аналіз згідно з правилами відбору проб, після чого її фасують у прийнятну тару.

Внаслідок перелічених операцій одержують препарат дезоксирибонуклеїнової кислоти з молекулярною масою основної речовини від 4,2-106 до 10-106 Д у вигляді напівтвердої волокнистої речовини білого або жовтуватого-сірого кольору. Субстанція помірно розчинна у воді, практично нерозчинна у 96 % спирті і ефірі. Масова частка ДНК в перерахунку на суху речовину становить не менше 78 %, масова частка білку при визначенні за Лоурі не перевищує 10 % від вмісту ДНК. Вологість - не більше 15 %.

При дослідженні токсичності ДНК її вводили тваринам у вигляді 1 % і 0,14 % розчину нативної ДНК в розчині 0,1 SSC (0,015 М натрію хлориду і 0,0015 М натрію цитрату) підшкірно або внутрішньовенно однократно або п'ятикратно з інтервалом 24 години залежно від мети і завдання експерименту.

У дослідженні були використані самці мишей F (СВА х Сві). При підшкірному введенні розчину

нативної ДНК мишам F (СВА х 3 В1) - самцям масою 18-20 г були використані дози 250, 150 і 100 міліграм/кг (відповідно це склало об'єми 0,5, 0,3 і 0,2 мл 1 % розчину препарату на мишу в середньому). Вищі об'єми препарату ввести підшкірно неможливо, а вищі концентрації препарату не можуть бути використані у зв'язку з обмеженою розчинністю ДНК (1,0 г в 100 мл фізіологічного розчину або розчину 0,1 SSC).

Загибелі тварин не спостерігалось ні від яких доз препарату. Виявлено, що при підшкірному застосуванні препарат у всіх вивчених дозах не володів місцево-подразливою дією. Тварини добре переносили препарат, приріст у вазі не відрізнявся від контролю.

При внутрішньовенному введенні препарату ДНК мишам тієї ж лінії через високу в'язкість ДНК використані дози 200,0; 125; 35,0; 17,5 міліграм/кг (відповідно об'єми складали 0,5; 0,4; 0,35 і 0,25 мл на мишу).

Внутрішньовенно препарат ДНК вводили в хвостову вену.

Параметри спостереження ті ж, що і при підшкірному введенні.

Доза 200 міліграм/кг викликала загибель 2 мишей з 6 через 2 доби. Загибель 2 тварин в даному випадку можна пояснити тим, що розчин препарату є в цій концентрації достатньо в'язким і викликає гемодинамічні порушення в судинах головного мозку. Гострі - гемодинамічні порушення (смерть на голці) в головному мозку в даному випадку не виникали. Нижчі дози препарату загибелі тварин не викликали. Приріст маси тіла у тварин, що вижили, не відрізнявся від контролю.

При «струменевому» введенні препарату в дозі 42 міліграми/кг (0,5 мл 0,14 % розчину на мишу), величина якої наближена (> в 17 разів) до дози лікарської форми, спостерігали короточасний шок. Тварини приймали бічне положення, втрачали рухову активність, сповільнювалося дихання. Через 3-5 хвилин стан тварин нормалізувався. Загибель тварин не спостерігалася.

При повільному введенні препарату в цій же дозі (1 мл за 1 хвилину) патологічного стану у тварин відмічено не було.

Алергізуючу та імуноотоксичну дію ДНК перевіряли на морських свинках масою 250-300 грамів.

Проведені дослідження дозволяють свідчать про те, що ДНК не володіє анафілактогенними властивостями, не впливає на перебіг анафілактичної реакції, викликаній введенням СКРС, не викликає кон'юнктивіту, не володіє мітостатичною і вираженою лімфоцитотоксичною дією, не впливає на перебіг реакції гіперчутливості сповільненого типу і не викликає реакцій активної шкірної анафілаксії.

Таким чином, препарат ДНК не впливає на основні механізми гуморального і клітинного імунітету.

Виходячи з отриманих результатів досліджень, можна зробити висновок про те, що препарат є малотоксичною речовиною.

При підшкірному введенні лабораторним тваринам не вдалося досягти летальних доз.

Діапазон випробуваних доз препарату при підшкірному застосуванні в 100 разів перевищував дози, що рекомендувалися для клінічного випробування. Не дивлячись на це, препарат не викликав значних патологічних змін в організмі піддослідних тварин.

Патоморфологічні дослідження при хронічному застосуванні препарату показали, що зміни в органах і тканинах корелюють з величиною застосованої дози препарату і носять оборотний характер.

Препарат не впливає на основні механізми гуморального і клітинного імунітету, не володіє тератогенною і ембріотоксичною дією, не впливає на

морфологічний і біохімічний склад периферичної крові, не володіє гастроінтестинальною, кардіо-, гепато- і нефротоксичністю, не володіє місцево-подразливою дією.

Виявлені основні види токсичності препарату, які проявляються тільки при його застосуванні внутрішньовенно у високих дозах і концентраціях. За цих умов загибель тварин настає на тлі порушення гемодинаміки головного мозку.

Виходячи з вищевикладеного, можна рекомендувати препарат ДНК, що заявляється, для медичного застосування, зокрема як носія для терапевтичних агентів.