



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64374 (13) U

(51) МПК (2011.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 33/44 (2006.01)

A61N 5/06 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) НАНОКОМПОЗИТНИЙ ПРОТИПУХЛИННИЙ ПРЕПАРАТ

1

2

(21) u201103202

(22) 18.03.2011

(24) 10.11.2011

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) КОРНЕЛЮК ОЛЕКСАНДР ІВАНОВИЧ, БАБЕНКО ЛЕСЯ АНАТОЛІЙВНА, КОЗЛОВ ОЛЕКСАНДР ВАДИМОВИЧ, РЕЗНІКОВ ОЛЕКСАНДР ГРИГОРОВИЧ, ЧАЙКОВСЬКА ЛЮДМИЛА В'ЯЧЕСЛАВІВНА, ПОЛЯКОВА ЛЮБОВ ІВАНІВНА

(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Наноккомпозитний протипухлинний препарат, що містить ЕМАР II, буфер у вигляді: 50 мМ NaP, рН 8,0; 150 мМ NaCl та декстран-70 у такому співвідношенні компонентів в продукті, об. %:

- ЕМАР II - 0,4-0,5;

- декстран-70 - 1,5±0,1;

- буфер: 50 мМ NaP, рН 8,0; 150 мМ NaCl - решта.

Пропонована корисна модель відноситься до медицини та фармакології, а саме до нанобіотехнології і може бути використана як лікарський засіб для терапії пухлин, а більш конкретно - до наноккомпозитного протипухлинного препарату.

Розробка новітніх нанотехнологій для виробництва нових лікарських препаратів з підвищеною ефективністю на основі біосумісних полімерів має важливе значення для розробки персоналізованої терапії при лікуванні онкохворих.

Відомий спосіб лікування злоякісних новоутворень комбінацією C₆₀ фулереновмісного наноккомпозиту і циклофосфаміду, який полягає в тому, що як терапевтичний агент використовують фотозбуджені наноккомпозити, вибрані з фулерен-амінопропілаеросилу або фулерен-антраценальамінопропілаеросилу, у комбінації з циклофосфамідом (Патент України № 91797, МПК (2006) A61K47/48, A61K33/44, A61N5/06, A61P35/00 опубл. 25.08.2010, бюл. № 16/2010). Відповідно до якого, радикальні форми кисню (РФК), які генеруються фулеренами C₆₀ у складі наноккомпозиту, спричинюють незворотні окисні пошкодження клітин пухлини.

Недоліком даного препарату є те, що при його використанні необхідно здійснювати опромінення в діапазоні довжин хвиль (320-580), що може викликати ряд побічних ускладнень, а також має протипоказання при наявності супутніх хронічних захворювань.

Відоме застосування цитокіноподібного поліпептиду ЕМАР II як засобу, який проявляє протипухлинну дію на ріст карциноми передміхурової залози (Патент України № 33215, МПК (2006) A61K38/00, Опубліков. 10.06.2008, бюл. № 11/2008).

Недоліком даного засобу є необхідність застосування більш високих концентрацій доз ЕМАР II порівняно з пропонованим наноккомпозитним препаратом для досягнення позитивного результату. Протипухлинний ефект цитокіноподібного поліпептиду ЕМАР II проявляється при застосуванні його в дозі 100 мкг/кг і забезпечує при цьому 70 % гальмування прогресу росту пухлини передміхурової залози.

Авторами під час проведення патентно-інформаційних досліджень і підготовки заявки не виявлено наноккомпозитного протипухлинного препарату, що містить цитокін ЕМАР II та декстран-70.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий наноккомпозитний протипухлинний препарат, який би дозволив створити умови для контрольованої доставки препарату до пухлинних клітин, знизивши цим самим ефективні дози ЕМАР II для досягнення позитивного результату та підвищити активність та стабільність терапевтичного білка ЕМАР II.

Поставлена задача вирішується запропонованим наноккомпозитним протипухлинним препаратом, що містить ЕМАР II, буфер у вигляді: 50 мМ

(13) U
(11) 64374
(19) UA

NaP, pH 8,0; 150 mM NaCl та декстран-70 у такому співвідношенні компонентів в продукті, об. %:

- ЕМАР II - 0,4-0,5 %; (цільовий білок)
- декстран-70-1,5 % \pm 0,1 %;
- буфер: 50 mM NaP, pH 8,0; 150 mM NaCl - решта.

Авторами методом біоінформативного аналізу були підібрані поєднання компонентів та їх співвідношення.

Створені біонаносистеми будуть використані для доставки антиангіогенного цитокіна ЕМАР II до ендотеліальних клітин при нанотерапії злоякісних пухлин.

Рекомбінантний білок ЕМАР II одержано в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. ЕМАР II: рекомбінантний ендотеліальний та моноцитарно-активуючий поліпептид II - цитокін, який викликає ефект апоптозу, функціонує як інгібітор ангіогенезу і приводить до інгібування росту пухлин.

Стабілізатор - полімерна матриця: декстран-70
Латинська назва речовини Декстран: Dextran

Хімічна назва: полісахарид, який складається із розгалужених одиниць α -D-глюкопіранозилу, що синтезуються із сахарози бактеріями *Leuconostoc mesenteroides*. Фармакологічна група речовини Декстран: замінники плазми та інших компонентів крові.

За рахунок введення до складу препарату ЕМАР II досягається протипухлинний ефект на ріст карциноми передміхурової залози. ЕМАР II активує моноцити, викликає ефект апоптозу, гальмує ангіогенез.

Властивості декстрану. Різні білки, в тому числі антитіла, зв'язуються з поверхнями чужорідних тіл, прискорюючи їх захоплення. Для уникнення опсонізації у ролі біосумісного покриття застосовують декстран - полісахаридний полімер, який складається із розгалужених одиниць α -D-глюкопіранозилу. Декстран часто служить полімерним покриттям через його високу біосумісність (Lee K. M. et al., 2002; Gamarra L. F. et al., 2005).

Властивості поверхневого покриття нанопрепарату можуть впливати на захоплення їх клітинами-мішенями, наприклад злоякісними клітинами. При цьому позитивно заряджене покриття з декстрану приводить до кращого накопичення наночастинок у клітинах HeLa порівняно із негативно зарядженим (Villanueva A. et al., 2009).

В лінійній частині молекули декстрану залишки глюкози з'єднані зв'язками між 1 та 6-м атомами вуглецю; розгалуження зумовлене зв'язками між 1 та 4-м, 1 та 3-м, 1 та 2-м атомами.

Авторами експериментально встановлено наступне:

Декстран-70 у складі нанокомполітного препарату в кількості 1,5 % \pm 0,1 % служить полімерним покриттям, кріопротектором та наповнювачем, зменшує пошкоджуючий ефект ліофілізації в якості стабілізуючого компоненту в нанокомполітному протипухлинному препараті, а також забезпечує контрольовану доставку препарату в пухлинні клітини, підвищуючи цим самим активність препарату. Збільшення ж кількості декстрану-70 у складі пропонованого препарату призведе до того, що в

препараті буде зайва кількість не зв'язаного з ЕМАР II декстрану, а зменшення його кількості суттєво знижує протипухлинну дію препарату.

Буфер, що містить 50 mM NaP, pH 8,0; 150 mM NaCl використовували для виділення цільового білка ЕМАР II. При цьому забезпечується ізотонічність розчину нанокомполітного протипухлинного препарату, що відповідає тілу людини.

Склад препарату в перерахунку на одну дозу:

Цільовий білок 0,1 мг, буфер: 50 mM NaP, pH 8,0; 150 mM NaCl, 15 мг \pm 0,1 % декстрану-70.

Кількість білка в препараті по 100 мкг в ампулі.

Препарат зберігають при температурі +4 °C.

Отриманий препарат являє собою ліофільний порошок білого кольору, що добре розчиняється у дистильованій воді та фізіологічному розчині протягом декількох секунд з утворенням прозорого розчину.

Поєднання всіх компонентів з визначеним співвідношенням інгредієнтів дозволило отримати нанокомполітний препарат ЕМАР II з декстраном-70, що проявляє протипухлинний ефект в дозі 10 мкг/кг і забезпечує при цьому 77 % гальмування прогресу росту пухлини передміхурової залози. Даний ефект досягається завдяки технології отримання нових наноконструкцій з підвищеною активністю та стабільністю терапевтичного білка ЕМАР II. Перевагами нанокомполітного препарату є низька токсичність, підвищена стабільність білка як терапевтичного агента, можливість контрольованого вивільнення активного лікарського компонента з полімерної матриці, пролонговані терапевтичні характеристики препарату.

Лікарські препарати, у яких в якості активного інгредієнту виступають білки, в основному використовуються у вигляді ліофілізату. Процес заморожування-висушування може призвести до пошкодження структурної цілісності білкової молекули. Для зниження пошкоджуючого ефекту в якості стабілізуючого компоненту нанокомполітису, кріопротектора та наповнювача автори використали відомий полісахарид - декстран-70 - полісахарид, який складається із залишків α -D-глюкопіранози і є біосумісним полімером.

Одержання нанокомполітного препарату протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном-70 включає виготовлення рекомбінантного білка ЕМАР II шляхом експресії в клітинах *E. coli* штаму BL21(DE3)pLysE, трансформованим введенням плазмиди pET30a, що кодує синтез вказаного білка в рідкому поживному середовищі з наступним виділенням та очисткою білка. Культивування проводять в рідкому поживному середовищі Luria-Bertani (LB), яке містить 30 мкг/мл антибіотика канаміцину при 37 °C та інтенсивній аерації (180 об/хв.). При цьому використовують свіжоотримані трансформанти. Індукцію експресії рекомбінантного білка здійснювали шляхом додавання після 2 годин культивування бактеріальної культури в середовищі LB ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду в концентрації 1,25 mM та додатково культивували 4,5 год. Рекомбінантний білок виділяли в нативних умовах, осад бактеріальних клітин ресуспендували у буфері, що містив 50 mM натрій-фосфатного буферу, pH 8,0; 500 mM NaCl, 10 mM імідазолу, 5

мМ β-меркаптоетанолу, 50 мг/мл лізоциму, клітини руйнували ультразвуком, отриманий лізат центрифугували при 13000 g протягом 30 хвилин при температурі +4 °С, надосадову рідину наносили на хроматографічну колонку з Ni-NTA агарозою (Qiagen, США), колонку промивали 10 об'ємами буфера для нанесення (50 мМ натрій-фосфатного буферу, рН 8,0; 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу, 5 мМ β-меркаптоетанолу), а потім послідовно 5 об'ємами буфера для промивки (50 мМ натрій-фосфатного буферу, рН 8,0; 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазолу, 5 мМ β-меркаптоетанолу), рекомбінантний білок елюювали ступінчастим градієнтом концентрацій імідазолу від 30 до 200 мМ, буфер для елюції містив 50 мМ натрій-фосфатного буферу, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 30-200 мМ імідазолу, 5 мМ β-меркаптоетанолу, при цьому чистоту препарату білка контролювали методом денатуруючого SDS-гель-електрофорезу, з подальшим забарвленням Куммасі синім. Колонку з Ni-NTA агарозою промили 5 об'ємами буфера для змиву (50 мМ натрій-фосфатного буферу рН 8,0, 1М NaCl, 500 мМ імідазолу). Фракції, у яких було виявлено білок, об'єднали і поставили на діаліз (активний) проти 300 мл буфера для діалізу (50 мМ натрій-фосфатного буферу рН 8,0, 150 мМ NaCl) впродовж 20 год. при +4 °С. Далі провели відщеплення константної частини рекомбінантного білка ентерокіназою за стандартною методикою виробника (New England Biolabs) та додатково очистили на колонці з Ni-NTA агарозою та діалізували описаними вище методами.

Очищений препарат після цього стерилізували методом холодної фільтрації через мембрани з розміром пор 0,22 мкм. і використовували для приготування сухого стабільного препарату.

Аналіз бактеріальних білків проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах, використовуючи для їх розділення 15 %-й поліакриламідний гель із 0,1 % додецилсульфату натрію, використовуючи суміш маркерних білків фірми Fermentas (Литва).

Попередньо методами спектрофотометричного, флуориметричного та біоінформатичного аналізу автори встановили, що комплекс ЕМАР II з декстраном-70 утворюється при додаванні останнього в концентрації 1,5 %. Тому для створення наноконкомпозитного комплексу до розчину препарату рекомбінантного білка ЕМАР II додали 1,5 % декстрану-70, порошок (субстанція) у подвійних поліетиленових мішках для виробництва стерильних лікарських форм (Біотика АТ, Республіка Словаччина). По 1 мл розчину препарату ЕМАР II стерильно розливали в ампули у ламінарному боксі. Ампули з препаратом ЕМАР II заморозили при -80 °С протягом 96 год. та ліофілізували.

Режим ліофільного висушування комплексу ЕМАР II/Декстран-70:

1. Заморожування препарату до температури -20 °С.
2. Встановлення на плиту (попередньо охолоджена) в приладі для ліофільної сушки.
3. Охолодження до -30 °С у вакуумі.
4. Охолодження до -70 °С. Швидкість охолодження 10°С/год. Вакуум 100 mTorr.

5. Інкубація в зазначених умовах 1 год.

6. Зниження температури до -20 °С, а потім до -10 °С. Кожна стадія по 10 годин.

7. Нагрівання до температури +5 °С. Тривалість - 10 годин.

8. Запаювання ампул в атмосфері азоту. Тиск 760 ± 50 mbar.

Склад препарату в перерахунку на одну дозу:

Цільовий білок, буфер: 50 мМ NaP, рН 8,0; 150 мМ NaCl, 1,5 % \pm 0,1 % декстрану-70.

Кількість білка в препараті по 100 мкг в ампулі.

Зберігати при +4 °С.

Отриманий препарат представляє собою ліофільний порошок білого кольору, добре розчиняється у дистильованій воді та фізіологічному розчині протягом декількох секунд з утворенням прозорого розчину.

Вперше, спільно з Інститутом ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України проведено дослідження наноконкомпозитних препаратів ЕМАР II на моделі трансплантованих фрагментів аденокарциноми простати людини та виявлено їх антипухлинний ефект.

Новий біонаноконкомпозитний препарат ЕМАР II має ряд переваг перед існуючими протипухлинними препаратами, а саме: низьку токсичність, підвищену стабільність білка як терапевтичного агента, можливість контрольованого вивільнення активного лікарського компонента з полімерної матриці, пролонговані терапевтичні характеристики препарату.

Тестування протипухлинної активності ЕМАР II проводили на мишах лінії СВА (маса тіла 18-22 г) нефро-субкапсулярним методом (підкапсулярний тест Богдена), що полягає у гетеротрансплантації ксенографтів злоякісної пухлини, в даному випадку аденокарциноми людини, під капсулу нирки мишей лінії СВА.

Зразки малігнізованих тканин були взяті у хворих під час радикальної простатектомії пухлин простати, що виконувалася в Київському обласному онкологічному центрі. Хворі не отримували неoad'ювантну терапію. Тканини пухлин відносились до помірно диференційованих (6 балів за шкалою Гліссона).

Видалену під час простатектомії пухлинну тканину доставляли в лабораторію в охолодженому середовищі MEM (Serva), що містить сольову суміш Хенкса і буфер HEPES. Пухлину нарізали на шматочки масою 1 мг і трансплантували під капсулу однієї з нирок мишей (по 2 ксенографти). Після триденного періоду вільного росту пухлини мишам вводили підшкірно в об'ємі близько 0,2 мл розчин нанопрепарату ЕМАР II в мікродозах 1-10 мкг/кг маси тіла, в ізотонічному розчині натрію хлориду, а контрольним тваринам - розчинник впродовж подальших трьох днів. Через 24 г після останньої ін'єкції мишей знеживлювали діетиловим ефіром. Вилучені трансплантати зважували, фіксували в 4 %-ному параформальдегіді для гістологічного або в розчині Буена для гістохімічного дослідження, заливали в парафінові блоки та готували серійні зрізи, які фарбували гематоксиліном та еозином або гематоксиліном та реактивом Шиффа. Протипухлинний ефект оцінювали за ступенем гальму-

вання зростання ксенографтів, порівнюючи величини приросту їх маси в дослідній і контрольній групах. Істотним вважали зменшення приросту маси ксенографта в групі мінімум на 25 %. Достовірність різниці ($P < 0,05$) оцінювали за критерієм t Стьюдента.

У 55 % контрольної групи спостерігали суттєвий приріст маси ксенографтів (більше 50 % від початкової маси). При дослідженні протипухлинної активності нанокompозиту ЕМАР II в дозі 10 мкг/кг встановлено, що приріст маси ксенографтів в середньому складав 17,7 %, тобто нанокompозит забезпечував 77 % гальмування прогресу росту пухлини. У 58 % ксенографтів спостерігали повний регрес пухлини (приріст пухлини від -0,25 до +0,2 мг). Вплив нанокompозиту ЕМАР II на аденокарци-

ному простати можна оцінювати як зупинку пухлинного росту.

Аналіз результатів досліджень показав, що пропонувані нанокompозитний препарат проти-пухлинного цитокіна ЕМАР II може бути використаний як повноцінний лікарський препарат, який не має вітчизняних та світових аналогів і є стабільним та терапевтично ефективним в застосуванні при карциномі передміхурової залози.

Результатом використання нового нанокompозитного протипухлинного препарату є гальмування проліферації та стимуляція апоптозу пухлинних клітин без застосування додаткового опромінення, а також активність препарату при досить низьких концентраціях - 1-10 мкг/кг, що сприяє підвищенню ефективності терапії та зменшенню побічної дії.