



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **52251** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
A61K 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) РЕЧОВИНА З ЦИТОТОКСИЧНОЮ ДІЄЮ

1

2

(21) u200913441

(22) 23.12.2009

(24) 25.08.2010

(46) 25.08.2010, Бюл.№ 16, 2010 р.

(72) ДІДЕНКО ГЕННАДІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, RU,
ШПАК ЄВГЕН ГРИГОРОВИЧ, ЄВТУШЕНКО ОЛЕГ
ІВАНОВИЧ, ЛІСОВЕНКО ГАЛИНА СТЕПАНІВНА,
ДВОРЩЕНКО ОЛЕГ СТАНІСЛАВОВИЧ, ПОТЕБНЯ
ГРИГОРІЙ ПЛАТОНОВИЧ, ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕ-
ДОРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛО-
ГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬ-
КОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Речовина органічного походження, яка **відрі-
зняється** тим, що має цитотоксичну та протипух-
линну активність, одержана у вигляді білка з моле-
кулярною масою 18,5 кДа з фільтрату
культуральної рідини штаму *B.subtilis* B-7025 ме-
тодом висолювання сульфатом амонію, за умови
насичення розчину до 40 %.

Корисна модель відноситься до області меди-
цини, зокрема до експериментальної онкології і
може бути використана для покращання ефектив-
ності лікування злоякісних пухлин.

Для лікування злоякісних пухлин в експериме-
нтальній та клінічній онкології використовують ре-
човини хімічного чи біологічного походження.

Відомо багато речовин органічного походжен-
ня з цитотоксичною дією, які активно застосову-
ються для лікування злоякісних новоутворень. До
них відносять вінбластин та вінкрестин (алкалоїди
отримані із барвінка рожевого); група антрациклі-
нових антибіотиків - доксорубіцин (виділений із
культури *Actinomyces coeruleorubidus*), брунеомі-
цин та ідарубіцин (виділений із культури
Actinomyces albus), а також паклітаксел та доцетак-
сел - препарати рослинного походження із групи
таксенів та інші. Ці речовини мають цитотоксичну
дію на злоякісні новоутворення. Однак їх недо-
ліком є висока загальна токсичність, токсичний
вплив на печінку, нирки, кістковий мозок та інші
внутрішні органи, а також виражена імунодепресив-
на дія, що негативно відбивається на найближ-
чих, безпосередніх та віддалених результатах лі-
кування [1].

Відома речовина органічного походження, яка
позбавлена недоліків хіміопрепаратів, дія якої
спрямована на активацію або модуляцію реакцій
імунної системи, що створена на основі очищених
пухлиноасоційованих антигенів (ПАА) у Інституті
експериментальної патології, онкології і радіобіо-
логії імені Р.Є. Кавецького НАН України за мето-
дом Д.Г.Затули на основі продуктів життєдіяльнос-

ті мікроорганізму *B.subtilis* АБ-56. В експериментах
in vitro було показано, що продукти його метаболі-
зму володіють цитотоксичною дією по відношенню
до пухлинних клітин (ПК), які втрачають життєзда-
тність, але зберігають свої імуногенні властивості.
Продукти життєдіяльності *B.subtilis* АБ-56, мікробні
глікопротеїди, мають високу адсорбційну здат-
ність. Акумуляуючись на ПК, вони можуть змінюва-
ти характеристики їх мембран, в результаті чого
гомеостаз пухлини може бути порушений. Змінені
мембрани ПК стають мішенню для імунних клітин
[2].

Однак ця речовина має ряд недоліків, оскільки
слабо активує імунну систему і при її використанні
відбувається селекційне знищення ПК. Крім того, в
якості мішеней при використанні її можуть висту-
пати і нормальні тканини, які несуть подібні анти-
гени.

Низька імуногенність зазначеної речовини та
відсутність вибіркової дії на ПК, зумовила необхід-
ність пошуку шляхів підвищення ефективності
протипухлинних засобів.

Найближчим аналогом з протипухлинною ак-
тивністю є позаклітинний сіалоспецифічний лектин
сапрофітних бактерій [3], який ми беремо за про-
тотип. Прототип характеризується тим, що це глі-
копротеїн з молекулярною масою 19-26кДа з висо-
кою гемаглютинуючою активністю та ступенем
спорідненості до обох типів сіалових та уронових
кислот, а також до фруктозо-1,6-дифосфату. Він є
термостабільний, стійкий до дії рН в діапазоні 4,8-
9,1, відноситься до помірно й малотоксичних ре-
човин з протипухлинною активністю по відношен-

(19) **UA** (11) **52251** (13) **U**

ню до злоякісних пухлин різного гістогенезу, з гальмуванням росту пухлини від 9 до 57,8%. Його виділяють з культуральної рідини штаму-продуцента *B.subtilis* 668 IMB шляхом висолювання сульфатом амонію до 70% насичення.

Однак зазначений бактерійний лектин не забезпечує стовідсоткову протипухлинну цитотоксичну активність.

Значно ефективнішими виявились продукти метаболізму у фільтраті культуральної рідини (ФКР) мікробного походження мікроорганізму *B. subtilis* B-7025, для яких є характерним підвищений синтез цитотоксичних речовин та компоненти якого запускають каскад реакцій, які призводять до формування повноцінної імунної відповіді.

Задачею способу, що заявляється, є розширення арсеналу речовин органічного походження з цитотоксичною дією за рахунок виділеного з фільтрату культуральної рідини *Bacillus subtilis* 5-7025 окремого білкового компонента мікробного синтезу, який проявляє виражену цитотоксичну дію на ПК.

Вирішення поставленої задачі досягається тим, що речовина органічного походження, яка відрізняється тим, що має білкову природу, виділена з фільтрату культуральної рідини (ФКР) штаму *B.subtilis* B-7025 методом фракціонування білків методом висолювання сульфатом амонію до 40% насичення у вигляді білка з молекулярною масою 18,5кДа і має цитотоксичну та протипухлинну активність.

Речовину виділили наступним чином. Для поділу ФКР на окремі складові використано такі методи - етанольна преципітація (самостійна та з подальшою термообробкою); іонообмінна хроматографія з використанням ДЕАЕ-целюлози; колонкова хроматографія з TOYOPPEARL G10; фракціонування білків методом висолювання сульфатом амонію.

Білковий склад фракцій (Фр), оцінювали за допомогою SDS-електрофорезу. Відбір Фр здійснювали за проявом цитотоксичної дії на ПК та за зда-

тністю викликати якісні зміни на мембрані або в цитоплазмі останніх. Максимальний термін спостереження дії окремих Фр на ПК - 4 год. Протягом терміну інкубації ПК з досліджуваними Фр, кожні 30хв. робили цифрові знімки (під світловим мікроскопом) препаратів ПК, забарвлених розчином трипанового синього.

Для ідентифікації білкового компонента з найбільш вираженим цитотоксичним ефектом (ним виявився компонент 18,5кДа), досліджували його цитотоксичну дію. Цитотоксичну дію досліджували на клітинах асцитної форми S37. ПК інкубували з досліджуваним компонентом 18,5кДа протягом 2 год. З суспензії ПК, яку інкубували з компонентом 18кДа, кожні 15хв. готували фіксовані препарати. Отримані препарати забарвлювали за методом Романовського-Гімза, що дозволяло визначати клітини з морфологічними ознаками некрозу.

Компонент 18,5кДа виділений з культуральної рідини штаму мікроорганізму *B.subtilis*, депонований у колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером B-7025. Даний білок має високу цитотоксичну і протипухлинну активність по відношенню до пухлин різного гістогенезу. У дослідженнях *in vitro* при концентрації його 0,3мг/мл спостерігається 100% цитотоксична активність по відношенню до $1,0 \times 10^7$ пухлинних клітин, а при вивченні протипухлинної активності *in vivo* в експерименті спостерігається гальмування пухлинного росту та подовження тривалості життя тварин на 50% - 90%.

Цитотоксичну активність компонента 18,5кДа, що заявляється, по відношенню до ПК визначали *in vitro* в цитотоксичній реакції, а протипухлинну активність його визначали *in vivo* в дослідженнях на тваринах. Він проявляє цитотоксичну активність по відношенню до ПК різного гістогенезу.

Характеристика цитотоксичного компонента 18,5кДа з протипухлинною активністю представлена в таблицях 1 і 2.

Таблиця 1

Цитотоксична активність компонента 18,5кДа (*B.subtilis* B-7025) та лектину 668 по відношенню до клітин саркоми-37

Компонент 18,5кДа	Кількість пухлинних клітин в 1мл	Концентрація мг/мл	Цитотоксична активність, %
<i>B.subtilis</i> B-7025 (заявлений)	$1,0 \times 10^7$	0,3	100,0
<i>B.subtilis</i> 668 (прототип)	$1,0 \times 10^7$	0,7	25,0

З наведених в таблиці даних видно, що цитотоксична активність компонента 18,5кДа в 4 рази перевищує активність лектину 668.

Для того, щоб підтвердити протипухлинну активність компонента 18,5кДа були проведені експериментальні дослідження. Мишам лінії BALB/c прищеплювали підшкірне по $3,0 \times 10^6$ пухлинних клітин саркоми-37, лікування проводили триразове (на 1, 4, 9 добу) за допомогою компонента 18,5кДа

B-7025 та лектину *B.subtilis* 668 (прототипу), з розрахунку:

$1,0 \times 10^7$ пухлинних клітин + 0,15мг компонента 18,5кДа *B.subtilis* B-7025;

$1,0 \times 10^7$ пухлинних клітин + 1,0мг лектину *B.subtilis* 668.

Результати оцінювали по гальмуванню пухлинного росту в порівнянні з контрольною групою та середній тривалості життя (СТЖ) піддослідних тварин (табл.2.).

Таблиця 2

Порівняння ефективності компоненту 18,5кДа B.subtilis B-7025 та лектину B.subtilis 668

Компонент 18,5кДа	Концентрація в 1 мл вакцини	Гальмування пухлинного росту, %		СТЖ пухлиноносіїв, доба	
		на 15 добу	на 22 добу	X±m	t
B.subtilis B-7025 (заявлений)	0,15мг/мл	42,0±15,6*	38,6±15,3*	41,20±2,11	3,12*
B.subtilis 668 (прототип)	1,0мг/мл	2,8±5,5	4,7±7,1	30,41±3,09	0,14
Контроль (фізіологічний розчин NaCl)	-	0	0	30,5±2,48	

Примітка. * - різниця з контролем статистичне суттєва ($p < 0,05$).

Одержані дані свідчать про значну перевагу компоненту 18,5кДа, виділеного зі штаму B.subtilis B-7025.

Протипухлинна активність заявленого компоненту 18,5кДа, залежала від способу лікування та генезу пухлин. Профілактичну і терапевтичну ефективність зазначених вище компоненту 18,5кДа і лектину 668 оцінювали по гальмуванню пухлинного росту і метастазування та СТЖ експериментальних тварин.

Приклади використання речовини, що заявляється.

Імунізацію всіх піддослідних лінійних мишей здійснювали шляхом підшкірного введення компоненту 18,5кДа в дозі 0,3мг/мл, із розрахунку 0,3мг на курс/тварину.

1. Після закінчення імунізації дослідним тваринам прищеплювали різні дози клітин саркоми-37 та аденокарциноми Ерліха. При прищепленні $1,5 \times 10^5$; $3,0 \times 10^5$ ПК спостерігали 100%-ну резистентність імунізованих мишей, при збільшенні прищеплюваної дози до $5,0 \times 10^5$ ПК - 80-82% резистентність; СТЖ пухлиноносіїв дорівнювала відповідно $69,5 \pm 0,7$ та $68,5 \pm 1,1$ діб.

2. Мишам лінії C₅₇B1 прищеплювали $3,0 \times 10^5$ ПК меланоми B16. Після імунізації спостерігали 57,1-60,0% резистентних тварин, СТЖ досягала ($55,8 \pm 7,6$ - $75,1 \pm 5,63$) діб.

3. Мишам лінії C₅₇B1 прищеплювали в подушечку ступні $3,0 \times 10^5$ клітин карциноми легені Льюїс, на 14-ту добу проводили тотальне видалення

пухлини. При проведенні післяопераційної імунізації у 80,0% мишей не виявлено метастазів в легенях.

4. Лінійним мишам прищеплювали $3,0 \times 10^5$ клітин меланоми B16. Після імунізації спостерігали гальмування пухлинного росту на 63,7% та збільшення СТЖ до $57,0 \pm 7,55$ діб.

5. Лінійним мишам прищеплювали $5,0 \times 10^5$ клітин аденокарциноми Ерліха. Після імунізації спостерігали гальмування пухлинного росту на 37,5% та збільшення СТЖ до $46,8 \pm 4,1$.

Таким чином, одержана речовина (компонент 18,5кДа) має високу цитотоксичну і протипухлинну активність.

Медико-біологічні властивості одержаного компоненту 18,5кДа свідчать про перспективність його використання в арсеналі протипухлинних лікарських речовин.

Джерела інформації:

1. Чу Э., Де-Вита В. Химиотерапия злокачественных новообразований. - М.: Практика, 2008. - 448с.

2. Затула Д.Г. Микроорганизмы, рак и противоопухолевый иммунитет. К.: Наукова думка, 1985. - 213с.

3. Позаклітинні лектини бактерій роду Bacillus. Дис. ... д.б.н: 03.00.07 «Мікробіологія» Коваленко Е. О. Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. - К., 1999. - 292с.