



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86179

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/7105

A61K 39/00

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КСЕНОГЕННИХ РНК

1

(21) 20031212506
(22) 26.06.2002
(24) 10.04.2009
(86) PCT/EP02/07071, 26.06.2002
(31) 101 31 148.6
(32) 28.06.2001
(33) DE
(46) 10.04.2009, Бюл.№ 7, 2009 р.
(72) МАЙСРІМЛЕР БАРБАРА
(73) АЙ.ПІ.ЕЛЬ. ІНТЕРНЕТШЕНЛ ФАРМАС'ЮТИКС ЛТД.
(56) WO 99/18799 A1, 22.04.1999
Seymour I. Schlager et. al. "Complete and Apparently Specific Local Tumor Regression Using Syngeneic or Xenogeneic "Tumor-immune" RNA Extracts" Cancer Research 35, 1907-1914, August 1975
Glenn Steele et. al. "In Vivo Effect and Parallel in Vitro Lymphocyte-mediated Tumor Cytolysis after Phase I Xenogeneic Immune RNA Treatment of Patients with Widespread Melanoma or Metastatic Renal Cell Carcinoma" Cancer Research 40, 2377-2382, July 1980
Schirrmacher V. et. al. "Intra-pinna anti-tumor vaccination with self-replicating infectious RNA or with DNA encoding a model tumor antigen and a cytokine" Gene Therapy (2000) 7, 1137-1147
(57) 1. Спосіб виготовлення лікарського засобу для лікування злоякісних пухлин, за винятком злоякісних захворювань шкіри, який **відрізняється** тим, що для виготовлення лікарського засобу застосовують ксеногенні РНК із тканин тварин, рослин та/або одноклітинних організмів, які еволюційно найбільш віддалені від організму, що підлягатиме лікуванню, в формі, придатній для системного застосування.

2

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що застосовують ксеногенну РНК у формі її кон'югата із клітинами пухлини, яку лікуватимуть.
3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що ксеногенну РНК інкубують *in vitro* з клітинами пухлини, яку лікуватимуть, і одержаний після інкубування матеріал застосовують як діючу речовину.
4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що додають фізіологічно прийнятні носії, наповнювачі, розріджувачі та допоміжні речовини.
5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що ксеногенну РНК для діючої речовини одержують з клітин дріжджів.
6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що діюча речовина включає ксеногенну тРНК.
7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що діюча речовина включає ксеногенну РНК, яку одержують шляхом екстракції фенолом.
8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що виготовляють лікарську форму лікарського засобу для введення системним шляхом, яка містить 50-100мг тРНК.
9. Спосіб лікування злоякісних пухлин, за винятком злоякісних захворювань шкіри, який **відрізняється** тим, що в організм пацієнта, що потребує такого лікування, системним шляхом вводять ксеногенні РНК із тканин тварин, рослин та/або одноклітинних організмів, які еволюційно найбільш віддалені від організму, що підлягатиме лікуванню, в ефективній кількості 50-100мг тРНК.

Цей винахід стосується ксеногенних оліго- або/та полірибонуклеотидів як засобів для лікування злоякісних пухлин. Крім того, винахід стосується застосування цих ксеногенних оліго- або/та полірибонуклеотидів для виготовлення лікарських засобів для лікування злоякісних пухлин.

В кінці 60-х і на початку 70-х років в процесі дослідження трансплантації було з'ясовано, що тканини або слабкі антигени, попередньо оброблені ксеногенними гетерогенними нуклеїновими кислотами, виявляють значно підвищені антититри при різноманітних імунологічних методах випробу-

(19) UA (11) 86179 (13) C2

вання. Ці результати були додатково підтверджені численними дослідженнями різноманітних антигенів *in vitro* та *in vivo*. Проте в літературі немає вказівок, що нуклеїнові кислоти і, зокрема, оліго- або/та полірибонуклеотиди ксеногенного походження можуть бути придатними для лікування злоякісних пухлин.

В той же час були виконані, зокрема, в США, експерименти з деякими синтетичними полі- та олігонуклеотидами, особливо з рибонуклеотидами, які, однак, не були продовжені в зв'язку з високою токсичністю цих речовин *in vivo*.

Тому метою цього винаходу було виготовлення лікарського засобу, придатного для лікування злоякісних пухлин. Термін "злоякісні пухлини" у значенні, вживаному стосовно до цього винаходу, не охоплює злоякісні захворювання шкіри.

Згадана мета досягається, згідно з цим винаходом, способом виготовлення лікарського засобу, придатного для лікування злоякісних пухлин, який містить як активну речовину ксеногенні оліго- або/та полірибонуклеотиди, у варіанті, якому віддається перевага, у формі їхніх кон'югатів із клітинними пухлинами, яка підлягає лікуванню.

Стосовно до цього винаходу термін "ксеногенний" означає, що певна рибонуклеїнова кислота походить з іншого організму, ніж організм, який підлягає лікуванню цією рибонуклеїновою кислотою, тобто він стосується таких оліго- або/та полірибонуклеотидів, які не походять із того самого організму, в котрий слід вводити згаданий лікарський засіб. Серед ксеногенних оліго- або/та полірибонуклеотидів, які застосовуються згідно з винаходом, перевага віддається оліго- або/та полірибонуклеотидам із тканин тварин (наприклад, тканин великої рогатої худоби, тканин плода корови), рослин та одноклітинних організмів, у варіанті, якому віддається перевага, із дріжджових клітин (зокрема, *Saccharomyces cerevisiae*). Перевага віддається застосуванню оліго- або/та полірибонуклеотидів з організмів, які еволюційно найбільш віддалені від організму, котрий підлягає лікуванню. Таким чином, при виготовленні лікарських засобів для людей перевага віддається РНК із тканин тварин, а особлива перевага - РНК із рослин або одноклітинних організмів, таких як, наприклад, дріжджі.

Оліго- або/та полірибонуклеотиди, які застосовуються згідно з винаходом, є нетоксичними і самі по собі не є антигенними.

Ефективним може бути застосування препаратів сумарної РНК та її солей та сполук. Особлива перевага віддається тРНК (транспортній РНК). Серед способів добування РНК, придатних для застосування згідно з винаходом, особлива перевага віддається екстракції фенолом, зокрема, способом, описаним в цьому документі під назвами способів I та II.

Крім того, було виявлено, що ксеногенні рибонуклеїнові кислоти (РНК), зв'язані з пептидами, поліпептидами та протеїнами, підвищують антигенність останніх. На основі цих спостережень тканини пухлин уражених пацієнтів обробляли ксеногенними РНК як *in vitro*, так і *in vivo*. Перевага віддавалася обробленню клітин пухлинної тканини

пацієнта ксеногенною РНК, у варіанті, якому віддається перевага, тРНК, *in vitro*. Потім одержану суміш вводили пацієнту системним способом. При поверхневих злоякісних пухлинах згадану РНК можна застосовувати також місцевим способом у відповідній лікарській формі.

Окрім людини, лікуванню ксеногенними оліго- або/та полірибонуклеотидами згідно з цим винаходом можна піддавати також теплокровних тварин, наприклад, коней, велику рогату худобу, овець тощо.

Винахід пояснюється більш детально поданими нижче прикладами та результатами випробувань.

Приклади

Приклад 1

Одержання оліго- або/та полірибонуклеотидів, придатних для застосування згідно з винаходом

У відповідній літературі описані численні способи одержання нуклеїнових кислот, нуклеотидів та нуклеозидів, відомі кожному фахівцю у відповідній галузі. В цьому винаході перевага віддається двом способам, що ґрунтуються на фенолізації, з незначними відмінностями: Спосіб I для добування сумарної РНК [Георгієв та Мантиєва - G.P. Georgiev, V.L. Mantieva, *Biochim. Biophys. Acta* 61, 153 (1962)] та Спосіб II для одержання тРНК [Бауер та інші - S. Bauer et al., *Biotechnology and Bioengineering* 15, 1081 (1973)]. Обидва способи придатні для екстрагування порівняно великих кількостей продукту.

Спосіб I

15% суспензію пивних дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) в буфері (A) [буферний розчин 0,001M. етилендіамінтетраоцтової кислоти, 0,01M Трис-HCl, pH 5-6, 25% сахарози, 0,5% SDS (додецилсульфат натрію), 0,3% дезоксихолату натрію] гомогенізували протягом 3хв при температурі 10°C у змішувальному пристрої Waring Blendor при швидкості обертання 3000об/хв. Гомогенат змішували з таким самим об'ємом розчину (B) [80% перекристалізованого фенолу в буфері (A), 0,1% 8-гідроксихіноліну, 1,2% діетилпірокарбонату] і повільно перемішували при 60°C протягом 30 хв. Усі буферні розчини були виготовлені із застосуванням деіонізованої води, яку попередньо струшували з бентонітом. Потім фенолізований гомогенізатор при кімнатній температурі (приблизно 20°C) піддавали центрифугуванню протягом 15хв при 10000g. Водну фазу відділяли, фенольну та проміжну фази відкидали. До водної фази додавали такий самий об'єм суміші (1:1) розчину (B) та суміші хлороформу з ізоаміловим спиртом (96:4), і виконували екстракцію, як описано вище. Водну фазу тричі струшували з половинним об'ємом діетилового ефіру для видалення залишкового фенолу. Доводили розчин до концентрації ацетату натрію 2%, і осаджували РНК 2,5 об'ємами абсолютного етанолу.

Осаджену РНК відділяли центрифугуванням при температурі 0°C та швидкості 5000об/хв і розчиняли в охолодженому льодом розчині 1M Трис-HCl, pH 7,0, та 0,001M MgCl₂. Для розкладу ДНК, яка може бути присутньою, до одержаного розчину додавали електрофоретично чисту панкреатичну

ДНКазу (4мкг/мл), і інкубували розчин при 22°C протягом 3 год. Потім залишкові білки, ДНКазу та РНКазу ферментували з проназою (10мкг/мл) при 37°C протягом 3 год. За цей час відбувається також автоліз пронази. Розчин РНК піддавали екстракції розчином (В) при 60°C протягом 20хв при обережному перемішуванні, як описано вище, розділяли фази центрифугуванням, відбирали водну фазу і струшували з діетиловим ефіром. Після додавання ацетату натрію (до кінцевої концентрації 2%) РНК осаджували 2,5 об'ємами етанолу і відділяли центрифугуванням. Осад розчиняли в охолоджену 2% розчині ацетату натрію, осаджували 2,5 об'ємами етанолу і залишали стояти в суміші зі спиртом при -20°C протягом ночі. Потім осад відділяли центрифугуванням, промивали послідовно двічі 75% етанолом, двічі абсолютним етанолом і двічі діетиловим ефіром. Після висушування в сушильній шафі одержано РНК у вигляді сухої пухкої речовини, яку зберігали при кімнатній температурі в посудині з темного скла.

Спосіб II

Цей спосіб придатний також для екстрагування порівняно великої кількості дріжджів (порядку кілограмів).

Відважену кількість дріжджів гомогенізували в чотирикратній кількості буфера (А) (дивись Спосіб I) в холодній камері. До гомогенату додавали 40% (об'ємних) розчину фенолу (В) та 5% (маси на об'єм) подрібненого льоду, одержаного з деіонізованої води, і перемішували протягом 30хв. Надосадову рідину відбирали відсмоктуванням і фенолізували ще двічі, як описано в Спосіб I. Водні надосадові рідини збирали в один збірник, де знаходилася суспензія DEAE-целюлози (діетиламіноетилцелюлози) (приблизно 10% маси на об'єм, продукт DE-22 фірми Whatman) в кількості, що відповідає половині об'єму зібраної рідини. DEAE-целюлозу підтримували в суспендованому стані шляхом перемішування протягом 30хв. Потім давали DEAE-целюлозі осаджуватися протягом 1 год. Надосадову рідину відсмоктували. Одночасно проміжну фазу та фенольну фазу ще двічі перемішували з аліквотними кількостями розчину (С) (83% деіонізованої води, 15% (маси на об'єм) подрібненого льоду, 2% концентрату ацетату магнію (0,5М ацетату магнію в 0,25М меркаптоетанолу)) протягом 30хв і залишали на 70-80хв для розділення. Водні фази переносили в збірник з DEAE-целюлозою, знов суспендували і залишали для відстоювання. Надосадову рідину відсмоктували, і DEAE-целюлозу промивали спочатку, як описано вище, двічі розчином (С), а потім ще раз розчином (D) (2 об'єми концентрату ацетату магнію, 2 об'єми концентрату NaCl (3,75М NaCl у воді), 0,2 об'єми концентрату Трис-HCl (2,5М Трис-HCl, pH 7,5, у воді, 96 об'ємів води)).

Потім DEAE-целюлозу завантажували в колонку, закрити знизу. Усі подальші стадії виконували в холодній камері при 4°C. Вміст колонки промивали 12-кратною кількістю розчину (D) при швидкості потоку рідини 1,4л/год (протікання тільки під впливом сили тяжіння). Потім елюювали тРНК розчином Е (2 об'єми концентрату ацетату магнію, 0,2 об'єми концентрату Трис-HCl, 14 об'ємів кон-

центрату NaCl, 84 об'єми води, кінцева концентрація NaCl 0,525М) при витраті 3л/год. Фракції із вмістом понад 35 A₂₆₀nm, об'єднували і осаджували 1,5 об'ємами етанолу. Подальшу обробку виконували, як описано в Спосіб I.

За альтернативним варіантом, останній осад розчиняли у воді і ліофілізували.

Варіантом цього способу є звичайна фенолізація вихідного матеріалу: з верхньої фази осаджують неочищену тРНК ізопропанолом. Осад після центрифугування екстрагують натрій-ацетатним буфером і хроматографують на DEAE-целюлозі. Елюювання виконують у градієнтному режимі розчинами ацетату натрію та хлориду натрію за методикою, відомою біохімікам, що працюють у відповідній галузі. Придатні фракції (дивись вище) визначають вимірюванням відносного показника поглинання і об'єднують. Осаджують тРНК етанолом, осад відділяють, як описано вище, і у варіанті, якому віддається перевага, ліофілізують.

Для визначення чистоти та ідентифікації сумарної РНК та тРНК застосовували перелічені нижче методи випробувань:

Білки визначали за Лоури [O.H.Lowry et al., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)] та за значенням A₂₆₀/A₂₈₀≈2; ДНК за Діше [Dische, Mikrochemie 8, 4 (1930)]; сумарну РНК за Мейбаумом [Mejbaum, Physiol. Chem. 258, 117 (1939)]; кількісне визначення тРНК та вбудовування амінокислот за Шпринцлем та Штернбахом [Sprinzl, Sternbach, Methods in Enzymology 59, 182 (1979)]; токсичність за М. Нельднером [M. Noeldner, приватне повідомлення]; апірогенність in vitro за Фармакопеею Німеччини (DAB 1997, випробування LAL), а in vivo - за Європейською Фармакопеею та DAB 1997.

Результати випробувань:

(властивості сумарної РНК та тРНК, середні результати 10 вимірювань):

Поглинання

A₂₆₀/A₂₈₀≈1,94-2,0

Елементний аналіз на С, Н, N

С	32,67	32,42
Н	5,22	5,20
N	2,29	2,00

з відповідними значеннями для різних видів сумарної та тРНК.

УФ та ІЧ спектри

УФ та ІЧ спектри варіюють, вони є майже однаковими, але не ідентичними, залежно від біологічних речовин.

Молекулярна маса

Середнє значення для сумарної РНК та тРНК із дріжджів ≈22000-27000Да, варіює для різних препаратів.

Протеї- ДНК

ни (загальний вміст)

2,3%	яким нехтуємо	Сумарна РНК з <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1,9%	яким нехтуємо	тРНК з <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0,9%	яким нехтуємо	Сумарна РНК з тканини великої рогатої худоби

Продукти мають в середньому звичайний ступінь чистоти. Підвищена чистота при непропорцій-

но збільшених витратах не дала істотного покращення терапевтичного ефекту.

Вбудовування амінокислот у тРНК. середнє значення для 10 випробувань

Лізин	69-85пмоль на одиницю A ₂₆₀
Фенілаланін	41-55
Серин	39-50
Валін	77-90

Ці середні значення варіюють для дріжджів різних партій у вказаних межах.

Токсичність

Випробування на гостру токсичність для мишей:

Тварини:	миші лінії NMRI, самці, фірми Janvier, Франція
Введення:	внутрішньовенно, в хвостову вену

Тривалість

спостереження: 24год

Кількість n=10 при найвищій концент- випадкових проб: рації

Випробувана а) сумарна РНК з тканин великої рогатої худоби

речовина: б) т-РНК з пивних дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*)

Розчинник: 0,9% NaCl у воді для ін'єкцій

Результат:

У піддослідних тварин не спостерігалось жодних підозрілих явищ протягом періоду спостереження (24год) до максимальних доз 1г/кг в 10мл внутрішньовенно.

Апірогенність

А. Вміст пірогенів у сумарній РНК та в тРНК, що мають вищевказані характеристики, визначали за методикою випробування на ендотоксини *in vitro* згідно з DAB 1997 (випробування LAL), а також на кролях за Європейською Фармакопеєю та DAB 1997.

1. Сумарна РНК

Стандарт - ендотоксин ЕС 5

Лізат амебоцитів:

- номінальна чутливість 0,06EU/мл

- визначена чутливість 0,06EU/мл

Випробувальний розчин: 100мг РНК, розчинені в 20мл води з LAL (0,5%).

Результат:

Вміст ендотоксинів у випробувальному розчині 0,5%, розбавленому водою з LAL (1:5) <0,03 EU/мл.

2. тРНК

Стандарт - ендотоксин ЕС 5

Лізат амебоцитів:

- номінальна чутливість 0,06EU/мл

- визначена чутливість 0,06EU/мл

Випробувальний розчин: 100мг РНК, розчинені в 20мл води з LAL (0,5%).

Результат:

Вміст ендотоксинів у випробувальному розчині 0,5%, розбавленому водою з LAL (1:10) <0,03EU/мл.

В. Випробування на апірогенність *in vivo* за DAB/Європ. Фарм., видання 2000р.

1. Сумарна РНК

Випробувальний розчин: 1% випробуваної речовини в апірогенній воді для ін'єкцій

Доза: 1,0мл кожній тварині

Тварини: 3 кролі, які відповідають вимогам DAB/Європ. Фарм., видання 2000р.

Результат:

Сума різностей температури у трьох кролів становила 1,05°C. Таким чином, пірогенів не виявлено.

2. тРНК

Випробувальний розчин: 1% випробуваної речовини в апірогенній воді для ін'єкцій

Доза: 1,0мл кожній тварині

Тварини: 2 групи по 6 кролів, які відповідають вимогам DAB/Європ. Фарм., видання 2000р.

Результат:

а) Сума різностей температури у 6 кролів: 1,02°C

б) Сума різностей температури у 6 кролів: 1,06°C, пірогенів не виявлено

Приклад 2

Виявлення впливу речовин згідно з винаходом на пухлини

Десятьох пацієнтів, які страждали на різні форми раку, були прооперовані, уражені численними метастазами і більше не реагували на хіміотерапію, тривалість життя яких оцінювалася онкологами, які вели цих хворих, у кілька тижнів, протягом 14 днів системно лікували двічі на день кон'югатом тРНК з пухлинними клітинами, одержаним шляхом інкубації 6×10^6 пухлинних клітин із 50-100мг тРНК протягом 30хв.

До однієї з пацієнток після такого лікування застосували також підтримуюче лікування слабким хіміотерапевтичним агентом протягом кількох тижнів. Пацієнтка померла майже через 2 роки з причини, незалежної від основного захворювання.

Усі інші пацієнти, піддані лікуванню, прожили більше 1-2 років без хіміотерапії при добрій якості життя без побічних явищ.

Ці результати potwierджують доцільність застосування РНК для пацієнтів, особливо для таких, що при несприятливому прогнозі більше не піддаються хіміотерапії, і відсутність будь-яких побічних явищ або токсичних проявів протягом подовженого терміну життя.