



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 93275

(13) C2

(51) МПК (2011.01)

A61K 38/17

A61K 39/07

A61P 35/00

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

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ

1

2

(21) а200902360

(22) 16.03.2009

(24) 25.01.2011

(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 2011 р.

(72) ПОТЕБНЯ ГРИГОРІЙ ПЛАТОНОВИЧ, ТАНАСІЄНКО ОЛЬГА АНДРІЇВНА, ТІТОВА ГАЛИНА ПАНТЕЛІЇВНА, РУДИК МАРІЯ ПЕТРІВНА, ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕДОРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(56) UA 59483 C2 17.02.2003

Потебня Г.П., Танасієнко О.А., Лісовенко Г.С., Савцова З.Д. Використання цитотоксичних лектинів бактеріального походження в імунотерапії експериментальних пухлин. В монографії "Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів". К., 2003, 235-304

UA 57270 A 16.06.2003

(57) 1. Спосіб підвищення протиопухлинної резистентності організму тварин шляхом введення лектину, який **відрізняється** тим, що бактеріальнийлектин, виділений з культуральної рідини штаму мікроорганізму *Bacillus subtilis* B-7025, вводять тваринам до прищеплення пухлинних клітин різного ґенезу.2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що бактеріальний лектин з *Bacillus subtilis* B-7025 вводять мишам, яким прищеплюють пухлинні клітини різного ґенезу.3. Спосіб підвищення протиопухлинної резистентності організму тварин шляхом введення лектину, який **відрізняється** тим, що бактеріальний лектин з культуральної рідини штаму мікроорганізму *Bacillus subtilis* B-7025 вводять за 1-3 доби до операційного видалення пухлини.4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що бактеріальний лектин з *Bacillus subtilis* B-7025 вводять мишам, у яких операційно видаляють пухлини різного ґенезу.5. Спосіб за п.1 або п. 3, який **відрізняється** тим, що бактеріальний лектин з *Bacillus subtilis* B-7025 вводять мишам кожний день або через день 3-4 рази в дозі 0,2-0,02 мг на мишу.

Винахід відноситься до медицини, зокрема онкофармакології, і стосується способу підвищення протиопухлинної резистентності організму тварин за допомогою бактеріального лектину, одержаного з культуральної рідини штаму мікроорганізму *Bacillus subtilis* B-7025.

Відомо, що лектини, які синтезуються сапрофітними бактеріями, приймають участь у процесах вуглевод-білкового розпізнавання, забезпечують внутрішні та міжклітинні взаємодії в організмі. На основі бактеріальних цитотоксичних лектинів можливе створення ефективних протиопухлинних препаратів та унікальних імунomodulatorів спрямованої дії, які здатні стабілізувати пухлинний процес, протидіяти виникненню і поширенню метастатичного процесу після хірургічного видалення пухлин, що може сприяти ефективності лікування та покращенню якості життя онкологічних хворих.

Відомі лектини, виділені з грибів *Tricholoma mongolicum* та *Ganoderma sarcense*, які гальмують ріст перещеплюваної саркоми 180 та асцитних

пухлин мишей [1-2]. Обидва лектина активують макрофаги і підвищують їх цитотоксичну активність. Відомий також лектин з істівного гриба *Agrocybe aegerita*, який гальмує ріст пухлинних клітин людини ліній Hella, SW480, SGC-7901, MGC-803, HL-60, а також S-180 у мишей. Протиопухлинний ефект цього лектину реалізується за рахунок індукованого апоптоза та ДНКазної активності [3]. Однак вищезазначені лектини мають низький терапевтичний ефект і доволі високу токсичність при системному введенні. В той же час будь-яких результатів з профілактичного застосування цих лектинів нами не знайдено.

Відомий лектин [4], виділений з культуральної рідини штаму мікроорганізму *Bacillus subtilis*, депонованого у колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України за номером B-7025, який має високу цитотоксичну активність по відношенню до пухлин різного ґенезу. Він аглютинує, частково лізує і девіталізує пухлинні клітини, підсилюючи при цьому їх імуногенність. Ця властивість цитото-

(13) C2

(11) 93275

(19) UA

кисичного лектину була покладена в основу приготування протипухлинної вакцини, яка використовується при активній специфічній імунотерапії в онкології [5, 6].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб підвищення протипухлинної резистентності мишей за допомогою препарату рослинного походження за назвою алоктин, отриманий з м'якоті листя Aloe vera [7, 8]. Профілактичне застосування лектину, введеного мишам до імплантації асцитних клітин рака Ерліха, призводило до зменшення розмірів пухлини. Недоліком цього лектину-прототипу є те, що активність очищеного препарату була меншою за активність екстракту, що свідчить про кооперативний ефект складових частин екстракту. Одержаний препарат лектину не забезпечує профілактичну і терапевтичну ефективність: середня тривалість життя дослідних мишей була практично на рівні контролю.

В основі винаходу, що заявляється, поставлено завдання розробки способу підвищення протипухлинної резистентності організму тварин за допомогою використання позаклітинного лектину, одержаного з культуральної рідини штаму мікроорганізму *Bacillus subtilis* B-7025, для гальмування пухлинного, росту та запобігання виникнення або гальмування розвитку метастазів після оперативного видалення пухлини, що призводить до збільшення тривалості та покращення якості життя тварин.

Встановлена задача вирішується таким чином: мишам до прищеплення пухлинних клітин або за кілька днів до видалення пухлини вводять кожен день або через день 4-5 разів підшкірно або внутрішньовенно бактеріальний лектин з *Bacillus subtilis* B-7025 у концентрації 2,5-5,0 мг/кг ваги. Це дозволяє підвищити протипухлинну резистентність організму мишей, результатом чого є гальмування росту пухлин різного генезу та запобігання/гальмування розвитку метастазів після оперативного видалення пухлини при відсутності токсичного ефекту лектину.

Суть заявленого способу пояснюють приклади конкретного виконання.

Приклад 1

Сингенним мишам лінії Balb/c 3-4 рази через 1-2 доби підшкірно вводили бактеріальний лектин (БЛ), одержаний з *B. subtilis* B-7025. Через добу після останнього введення лектину мишам прищеплювали 0,5 млн пухлинних клітин (ПК) саркоми 37. Оцінку протипухлинної резистентності мишей визначали за такими показниками: відсоток гальмування пухлинного росту, середня тривалість життя (СТЖ) дослідних мишей в порівнянні з контрольними, яким вводили фізіологічний розчин (ФР).

Проведені нами дослідження подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив лектину, одержаного з культуральної рідини *B. subtilis* B-7025, на середню тривалість життя мишей з прищепленою саркомою 37

Група мишей	Кількість мишей в групі	Доза лектину, мг/мишу	Гальмування пухлинного росту, %	СТЖ, М±m	t	P
БЛ→ПК→ФР	10	0,05	58	65,7±3,1	5,2	<0,001
Контроль	10	-	-	42,8±3,0	-	-
БЛ→ПК→ФР	6	0,2	40	73,0±5,7	2,4	<0,05
Контроль	10	-	-	58,8±1,7	-	-

t - критерій Ст'юдента; P - вірогідність події.

Як видно з таблиці, ріст солідної саркоми 37 у мишей гальмувався на 60% по відношенню до контролю. СТЖ мишей при обох застосованих концентраціях лектину була достовірно вищою від контролю. Однак ступінь достовірності у дослідних мишей була набагато вищою при введенні інтактним тваринам меншої концентрації (0,05 мг) лектину (t=5,2 проти 2,4).

Приклад 2

Сингенним мишам лінії Balb/c 3-4 рази через 1-2 доби підшкірно вводили бактеріальний лектин, одержаний з *B. subtilis* B-7025, в дозі 0,02мг/мишу. Через добу після останнього введення лектину мишам прищеплювали 0,5 млн пухлинних клітин раку Ерліха. Визначали відсоток гальмування пухлинного росту тварин та СТЖ дослідних мишей в порівнянні з контрольними.

Таблиця 2

Вплив лектину, одержаного з культуральної рідини *B. subtilis* B-7025, на середню тривалість життя мишей з прищепленим раком Ерліха

Група мишей	Кількість мишей в групі	Доза лектину, мг/мишу	Гальмування пухлинного росту, %	СТЖ, М±m	t	P
БЛ→ПК→ФР	7	0,02	36,8	54,3±1,7	2,9	<0,02
Контроль	6	-	-	43,0±3,5	-	-

В даному випадку гальмування пухлинного росту солідного раку Ерліха по відношенню до контролю складає 36,8%. СТЖ дослідних мишей також була достовірно вищою від контрольних тварин ($P < 0,02$).

Для оцінки ефективності імунотерапевтичної дії лектину нами використана експериментальна модель карциноми легені Льюїс, яка найбільш адекватно відображає особливості метастазування природного пухлинного процесу і вважається найбільш наближеною до клінічної практики, коли після видалення первинної пухлини, подальший розвиток процесу зв'язаний з формуванням та ростом метастатичних вузлів.

Приклад 3

Досліди проводили на мишах-самках лінії С57В16 2-2,5-місячного віку масою 18-20г. Для індукції метастазуючої карциноми легені Льюїс суспензію $3,5 \times 10^3$ клітин на мишу вводили в поду-

шечку стопи. За декілька діб до операційного видалення пухлини (ОП), а саме через 15-20 діб після прищеплення, коли діаметр первинної пухлини становив 0,8-1,0см, мишам підшкірно 3-4 рази вводили бактеріальний лектин, одержаний з культуральної рідини *B.subtilis* В-7025 в дозі 0,05мг/мишу. Через добу після останнього введення лектину кінцівку з пухлиною видаляли в області колінного суглоба під гексеналовим наркозом в стерильних умовах. Мишей забивали при розвинутому метастатичному процесі, приблизно через 21-24 доби після операції.

Ефективність бактеріального лектину оцінювали по кількості мишей, у яких метастази ("М") в легенях не були виявлені, по кількості та об'єму метастазів на одну мишу та індексу гальмування метастазування (ІГМ). Дослідження ефективності заявленого лектину подані в таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив бактеріального лектину на середню тривалість життя мишей з метастазуючою карциномою легені Льюїс

Група	К-ть мишей	Доза ПК	% мишей без "М"	К-ть "М"	t	P	Об'єм "М"	t	P
БЛ→ПК→ФР	8	0,35млн	25,0	10,2±3,8	2,6	<0,05	231,9±116,0	3,3	<0,01
Контроль	6		0	25,5±4,6	-	-	936,1±178,8	-	-

З даних таблиці 3 видно, що введення бактеріального лектину проявляє виражений антиметастатичний ефект: у 25% мишей метастазів в легенях не виявлено, а у останніх - кількість метастазів у 2,5 рази, а їх об'єм у 4,0 рази були менші в порівнянні з контролем. Індекс гальмування метастазування в дослідній групі в порівнянні з контролем становив 75%.

Приклад 4

Досліди проводили на мишах-самках лінії С57В16 2-2,5-місячного віку масою 18-20г. Тваринам в подушечку стопи прищеплювали 0,5млн живих пухлинних клітин карциноми Льюїс. За 3 доби до операційного видалення пухлини мишам в черевну порожнину щодня 3 рази вводили бактеріальний лектин в дозі 0,05мг/мишу.

Таблиця 4

Вплив бактеріального лектину на середню тривалість життя мишей з метастазуючою карциномою легені Льюїс

Група	К-ть мишей	Доза ПК	% мишей без "М"	К-ть "М"	t	P	Об'єм "М"	t	P
БЛ→ПК→ФР	7	0,5млн	42,8	3,4±2,2	2,3	<0,05	101,6±42,2	2,23	<0,05
Контроль	6		0	10,2±2,8	-	-	267,6±61,3	-	-

Як видно з таблиці 4, при введенні 0,5 млн пухлинних клітин карциноми Льюїс кількість метастазів у 3,0 рази, а їх об'єм у 2,6 рази були менші в порівнянні з контролем. Індекс гальмування метастазування в цій групі дорівнював 62% в порівнянні з контролем.

Таким чином, запропонований спосіб підвищення протипухлинної резистентності дозволяє гальмувати розвиток пухлинного процесу та метастазування і сприяє подовженню середньої тривалості життя тварин. Важливо відмітити, що позаклітинний бактеріальний лектин, одержаний з штаму *B.subtilis* В-7025, не чинить на організм тва-

рин токсичної дії. Внутрішньовенне, внутрішньочеревне та підшкірне введення лектину у концентрації 0,2-0,05 мг/кг вага не призводило до зниження ваги мишей, до будь-яких побічних ефектів та неадекватної поведінки тварин. Висока ефективність і нешкідливість позаклітинного бактеріального лектину створює експериментальне обґрунтування для рекомендації впровадження цього засобу в клінічну практику.

Література:

1. Ngai P.N.K., Ng T.B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on

splenocytes and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 314: 988-993.

2. Wang H.X., Yiu W.K., Ng T.B., Obi V.E., Chang S.T. The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Immunopharmacology*, 1996, 31: 205-211.

3. Zhao C, Sun H., Tong X., Q.I. An antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, *Biochem. J.* 2003, 374: 321-327.

4. Потебня Г.П., Танасієнко О.А., Лисовенко Г.С., Черемшенко Н.Л., Чехун В.Ф. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю. Патент України, №59483, 15.09.2003р., Бюл. №9.

5. Потебня Г.П., Танасієнко О.А., Лисовенко Г.С., Титова Г.П. Опыт применения противоопухолевых вакцин, приготовленных на основе цито-

токсических лектинов В.Subtilis В-7025. *Онкология*, 2003, т.5, №2, 163-164.

6. Потебня Г.П., Танасієнко О.А., Лисовенко Г.С., Савцова З.Д. Використання цитотоксичних лектинів бактеріального походження в імунотерапії експериментальних пухлин. В монографії "Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів". К., 2003, 235-304.

7. Akev N, Turkay G, Can A, Gurel A, Yildiz F, Yardibi H, Ekiz EE, Üzun H. Tumour preventive effect of Aloe vera luff pulp lectin (Aloctin 1) on Ehrlich ascites tumours in mice. *Phytother. Res.* 2007; (11): 1070-5.

8. Gorelik E., Segal S., Shapiro J. Interaction between the local tumor and its metastases. *Cancer Met Rev* 1982; 1: 95-100.