



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80202** (13) **U**
(51) МПК
A61B 8/08 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	а 2012 09627	(72) Винахідник(и):	Желдак Людмила Дмитрівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	08.08.2012	(73) Власник(и):	Знак Валерій Михайлович,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	27.05.2013		вул. Ф. Пушиної, 2, кв. 105, м. Київ, 03115 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.05.2013, Бюл.№ 10		

(54) ПРОТИПУХЛИННИЙ ЗАСІБ "АЙЛІВ"

(57) Реферат:

Протипухлинний засіб Айлів, що містить продукт культивування *Bacillus subtilis*, крім того як продукт культивування *Bacillus subtilis* містить екстракт штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7321, депонований в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України, білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів, полівініловий спирт та допоміжні агенти, при наступному співвідношенні складових, мас. %:

екстракт штаму <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7321	0,1-99,9
полівініловий спирт	0,1-99,9
білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів	0,1-99,9
ізотонічний агент	0,5-1,5
буферувальний агент	0,01-0,3
вода для ін'єкції	решта.

UA 80202 U

Корисна модель стосується нового ефективного протипухлинного засобу "Айлів" для потреб медицини, який може бути широко застосований при лікуванні злоякісних новоутворень.

Доведено, що штами *Bacillus subtilis* зовсім не шкідливі для людини та тварин.

Відсутність патогенності у штамів *Bacillus subtilis* дало підставу для присвоєння їм
 5 Управлінням за контролем якості продовольчих і лікувальних засобів США статусу GRAS (generally regarded as safe) - безпечних організмів (Харвуд К., Бацилли генетика и биотехнология: Пер. с англ / К. Харвуд. - М.: Мир, 1992).

Розмножуючись, бактерії роду *Bacillus subtilis* виробляють ферменти протеази, які активно лізують усі непритаманні організму ссавців білки, денатуровані білки і нуклеопротейди. При
 10 цьому знищуються бактерійні токсини, елементи пухлинних утворень та інші дефектні клітини (Смирнов В.В., Резник С.Р., Волинець А.К., Вьюницкая В.А. Влияние перорального введения бактерий рода *Bacillus* на фагоцитарную активность лейкоцитов крови кролика // Микробиологический журнал- 1982. - Т.44. - № 4. - с. 51-54.)

Лікувальний ефект визначається комплексом факторів, до яких відносять: продукування
 15 культурами *Bacillus subtilis* бактеріоцинів, що пригнічують ріст патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів; утворення високоактивних ферментів: протеаз, рибонуклеаз, трансаміназ та інших; продукування субстанцій, що нейтралізують бактеріальні токсини (Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С, Резник СР. Ферментативная активность бацилл, перспективных для включения в состав биопрепаратов // Микробиологический журнал- 1990. - Т. 52. - № 2. - с. 9-14.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.Н., Сорокулова И.Б. Современные представления о механизме лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* II
 20 Микробиол. Журнал - 1993. - т. 55. - №4. - с. 91-111.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Слабоспицкая А.Т. Некоторые биологические свойства бактерий рода *Bacillus*, выделенных из организма людей // Микробиологический журнал - 1985. - Т. 47. - № 3. - с. 53-59.; Смирнов В.В., Белявская В.А., Сорокулова И.Б. Штамм *Bacillus subtilis* -антивирусный и антимикробный агент // Патент РФ 1839459, заявка 4767350/13/129532).

Наприклад, відомий штам бактерій *Bacillus subtilis* IMB В-7025, що є продуцентом протипухлинних цитотоксичних речовин (патент України UA56348, опуб. 15.05.2003, C12N 1/20).

Недоліком використовуваних в дослідженнях екстрактів, одержуваних з штаму бактерій
 30 *Bacillus subtilis* IMB В-7025, є їх недостатня активність та непридатність до промислового використання.

Відомий протипухлинний агент для лікування гастроінтестинального раку, що містить, зокрема, CSF (фактор компетенції і споруючії) секретований *Bacillus subtilis* і складається з 5 амінокислотних залишків як активний інгредієнт (WO2009/093447, опуб. 30.07.2009, A61K 38/00).

Недоліком відомого протипухлинного агента є обмежена застосовуваність та недостатня
 35 стійкість активного агента.

Тому в основу корисної моделі було поставлену задачу одержати малотоксичний препарат на основі *Bacillus subtilis* з високою антинеопластичною активністю та з імуностимулюючими властивостями, що не втрачав би своєї активності тривалий час та знайшов би застосування в
 40 медицині. З метою підвищення ефективності ферментних властивостей активних речовин з культур *Bacillus subtilis* за рахунок виключно високої активності, було запропоновано стабілізувати активні речовини шляхом іммобілізації біологічно активних пептидів і протеїнів *Bacillus subtilis* на білкових носіях - інактивованих білкових компонентах спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней чи кролів та полівінілового спирті.

Поставлена задача була вирішена за рахунок використання в препараті екстракту спеціально обробленої культури *Bacillus subtilis*, штам IMB В-7321, що депонований в
 45 Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України, та інактивованого білкового компонента спеціально обробленої крові великої рогатої худоби (ВРХ), коней чи кролів, та полівінілового спирту, що забезпечують підсилення активності активних речовин екстракту
 50 культури *Bacillus subtilis*, штам IMB В-7321, та збільшують термін дії цього засобу.

Розроблений препарат отримав назву "Айлів".

Тому, об'єктом корисної моделі є протипухлинний засіб "Айлів", що містить продукт культивування *Bacillus subtilis*, який як продукт культивування *Bacillus subtilis* містить екстракт штаму *Bacillus subtilis* IMB В-7321, депонований в Депозитарій Інституту мікробіології і
 55 вірусології НАН України, білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів, полівініловий спирт та допоміжні агенти, при наступному співвідношенні складових, мас. %:

екстракт штаму <i>Bacillus subtilis</i> IMB В-7321	0,1-99,9
полівініловий спирт	0,1-99,9
білковий компонент крові	0,1-99,9

великої рогатої худоби, коней
чи кролів

ізотонічний агент 0,5-1,5

буферувальний агент 0,01-0,3

вода для ін'єкції решта.

В переважному втіленні корисної моделі протипухлинний засіб "Айлів" як ізотонічний агент містить хлорид натрію.

В іншому переважному втіленні корисної моделі протипухлинний засіб "Айлів" як буферувальний агент містить суміш гідрофосфату натрію і дигідрофосфату калію.

5 В найбільш переважному втіленні протипухлинний засіб "Айлів" має наступне співвідношення складових, мас. %:

екстракт штаму *Bacillus*

subtilis IMB B-7321 1

полівініловий спирт 5

білковий компонент крові

великої рогатої худоби, коней 5

чи кролів

хлорид натрію 0,9

гідрофосфат натрію 0,08

дигідрофосфат калію 0,015

вода для ін'єкції решта.

При застосуванні засіб "Айлів" має суттєву протипухлинну дію, обумовлену гальмуванням росту пухлин та розвитку метастазів.

Перелік креслень

10 Фіг. 1 - об'єм первинної пухлини у мишей лінії C57Bl/6 з карциною легені Льюїс, що отримували терапію препаратом "Айлів".

Фіг. 2 - СТЖ мишей лінії C57Bl/6 з карциною легені Льюїс, що отримували терапію препаратом "Айлів".

15 Фіг. 3 - кількість метастазів та об'єм метастазів (ОМ) в легенях мишей лінії C57Bl/6 з карциною легені Льюїс, що отримували терапію препаратом "Айлів".

При розробці препарату "Айлів" використовували біологічно активні сполуки, які отримували за оригінальними методиками екстрагування із культури *Bacillus subtilis*, штам IMB B-7321, що депонований в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України в оригінальному поєднанні з полівініловим спиртом та спеціально обробленою кров'ю великої рогатої худоби, коней, кролів.

20 3 метою підвищення ефективності ферментних і антибіотичних властивостей стерильних екстрактів із культури *Bacillus subtilis* за рахунок виключно високої активності, нами розроблено метод стабілізації компонентів препарату шляхом іммобілізації біологічно активних пептидів і протеїнів *Bacillus subtilis* на синтетичному водорозчинному полімері - полівініловому спирті та білковому носії - інактивованих компонентах спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней, кролів.

25 Для іммобілізації і стабілізації терапевтичних ферментів - протеаз, пептидних антибіотиків - субтіліну та інших біологічно активних протеїнів (БАП), що отримані із *Bacillus subtilis*, нами вперше був застосований полівініловий спирт та інактивована кров великої рогатої худоби, коней чи кролів після спеціальної її обробки.

30 У світовій практиці використовують різні носії для транспортування активних лікарських засобів до місця локалізації вражених органів чи тканин.

Суть корисної моделі пояснюється тим, що при проведенні порівняльного аналізу дії нативних БАП *Bacillus subtilis* і БАП *Bacillus subtilis*, стабілізованих та іммобілізованих з полівініловим спиртом і білковими носіями - інактивованими компонентами спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней чи кролів було доведено, що лікувальний ефект значно вищий з використанням БАП з полівініловим спиртом і білковими носіями в експериментах на тваринах та *in vitro*.

40 Вдосконалено і запропоновано методику кон'югації молекул лікарських препаратів, які забезпечують одну або декілька необхідних лікувальних властивостей. Препарати, що отримані шляхом зв'язування ферменту - протеази, пептидних антибіотиків - субтілінів та деяких інших біологічно активних речовин із *Bacillus subtilis* з білковим носієм інактивованими компонентами спеціально обробленої крові великої рогатої худоби та полівініловим спиртом, мають значно довший час напівжиття *in vivo* і *in vitro*, ніж без такого, а також мають ще більш покращені

властивості відносно здатності до утворення гомогенних молекул, мають покращену стійкість до протеолізу та підвищену біологічну доступність.

Таким чином, кон'югати даної корисної моделі являють собою низку переваг, а саме: довший проміжок часу між ін'єкціями або іншими формами введення та слабшу побічну дію.

5 Імобілізація біологічно активних протеїнів стерильної культуральної рідини *Bacillus subtilis* на білкових компонентах (носіях) - інактивованої спеціально обробленої крові великої рогатої худоби та полівінілового спирті дозволяє отримувати більш стабільні, активні і безпечні терапевтичні препарати.

10 Оригінальні методи, що відпрацьовані нами при імобілізації біологічно активних протеїнів з екстракту стерильної культуральної рідини *Bacillus subtilis* з білковими носіями із спеціально обробленої крові та полівінілового спирту, використані при розробці і виробництві нового оригінального ефективного протипухлинного засобу "Айлів" для потреб медицини і можуть бути застосовані для лікування і профілактики неопластичних захворювань.

15 Протипухлинна активність препарату "Айлів" відповідає рівню засобів, які можуть бути рекомендовані до введення в онкологічну практику як модифікатори протипухлинного ефекту.

Суть корисної моделі пояснюється наступними прикладами:

Спосіб отримання препарату "Айлів" включає наступні технологічні стадії:

Стадія 1. Одержання екстракту *Bacillus subtilis* IMB B-7321

20 - культивування штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7321 на поживному середовищі, що включає в своєму складі моногідрат глюкози, дріжджовий екстракт, сухе поживне середовища "Tryptone water" та воду для ін'єкцій у відповідному співвідношенні;

- температурно-проточно-ультразвукова обробка бактеріальної культури, з отриманням унікальних за складом біологічно активних сполук, що мають максимально ефективні лікувальні властивості;

25 - тангенційна (розділова на фракції ультрафільтраційна обробка та фінішна стерилізуюча фільтрація (0,22 нм) бактеріальної культури *Bacillus Subtilis*.

Стадія 2. Одержання стерильного фільтрату білкового компонента спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней чи кролів.

30 З цією метою проводять осадження еритроцитарної маси (відокремлення плазми з лейкоцитарним шаром); позбавлення специфічних властивостей альбуміну і деяких інших білків крові за допомогою температурного впливу нагріванням за допомогою водяної бані до 50 °C протягом 30 хвилин на плазму з подальшою її інактивацією УФ-випромінюванням; виділення лейкоцитарних клітин та їх дезінтеграція ультразвуком і поєднання отриманих білкових сполук у відповідному співвідношенні.

35 Стадія 3. Приготування розчину полівінілового спирту (ПВС) в забуферному ізотонічному розчині хлориду натрію.

Стадія 4. Синтез сполук препарату з заданою біологічною активністю:

- експозиція білкового компонента з розчином полівінілового спирту

- експозиція екстракту культури *Bacillus Subtilis* з комплексом білковий компонент - ПВС

40 Доклінічними дослідженнями на моделі карциноми легень Льюїс було встановлено ефективність протипухлинного засобу "Айлів" у широкому діапазоні доз при різних режимах введення з метою встановлення найбільш ефективного режиму застосування препарату.

45 За результатами досліджень встановлено, що препарат має суттєву протипухлинну дію. Як видно з представлених даних (ФІГ. 1), препарат суттєво гальмує ріст первинного пухлинного вузла. Практично у всіх тварин дослідних груп відмічено відсутність росту первинної пухлини на фоні лікування препаратом "Айлів" та у віддалені терміни після його відміни. У тварин, що одержували препарат, коефіцієнт гальмування росту пухлини D склав 91,5 % відразу по закінченні лікування та 87,3 % через 7 діб після останнього введення препарату ($p < 0,05$).

50 Препарат "Айлів" суттєво вплинув і на середню тривалість життя (СТЖ) тварин (ФІГ.2). Так, СТЖ тварин, що одержували препарат, склала (70,4 \pm 5,73) діб проти (50,3 \pm 3,35) діб в контролі ($p < 0,05$).

55 У значної частини мишей з карциномою Льюїс після терапії препаратом "Айлів" не відмічено ознак розвитку первинної пухлини. Так, при застосуванні препарату було виліковано 67 % мишей. Таким чином, препарат "Айлів" має значний протипухлинний ефект по відношенню до карциноми легень Льюїс, оскільки під його впливом зареєстровано гальмування росту пухлини більше ніж на 90 %, збільшення тривалості життя більше ніж на 40 % та вилікування більше ніж 60 % мишей.

60 Як відомо, метастазування злоякісних пухлин є однією з основних причин смертності пухлиноносіїв. Тому, нами досліджено вплив препарату "Айлів" на процес метастазування у мишей з карциномою легені Льюїс. Як показали дослідження, препарат має здатність

гальмувати розвиток метастазів карциноми Льюїс в легені мишей. Застосування препарату сприяло зменшенню кількості метастазів, $p < 0,05$ (ФІГ. 3). Максимальний індекс гальмування метастазів (ІГМ) при застосуванні препарату був - 86 %.

5 Під дією препарату "Айлів" відбувалося зменшення кількості та об'єму метастазів як в аваскулярній ($< 1 \text{ мм}^3$), так і у васкулярній фазах росту ($> 1 \text{ мм}^3$).

Таким чином, можна зазначити, що препарат "Айлів" має здатність суттєво гальмувати ріст та розвиток метастазів карциноми Льюїс у легенях мишей.

10 Загальновідомо, що фагоцитуючі клітини є регуляторними та ефекторними компонентами системи протипухлинної резистентності, вони безпосередньо або опосередковано, за допомогою інших ефекторних молекулярно-клітинних механізмів, беруть участь у руйнуванні пухлинних клітин і є одним з основних компонентів клітинної реакції організму в зоні росту пухлини.

15 Особливе значення має функціональний стан НК-клітин, які являють собою основу природної протипухлинної резистентності організму. Вони здатні видаляти пухлинні клітини різних типів, особливо клітини, які мають знижений рівень експресії молекул головного комплексу гістосумісності (МНС I) та можуть уникнути лізису, опосередкованого цитотоксичними Т-лімфоцитами.

20 Під впливом лікування препаратом "Айлів" відбувалося суттєве посилення цитотоксичної активності НК-клітин на 40-44 %. Функціональна активність цих клітин підвищувалася до рівня, що навіть дещо перевищував такий у інтактних тварин. Таким чином, встановлено, що застосування препарату "Айлів" має виражений вплив на імунну систему піддослідних тварин - пухлиноносіїв. Нами доведено, що у тварин, які отримували лікування препаратом, значно посилювалася функціональна активність НК-клітин та фагоцитів селезінки, що може свідчити про підвищення рівня протипухлинної резистентності.

25 Таким чином, препарат "Айлів" має суттєву протипухлинну дію по відношенню до карциноми легень Льюїс ($D > 90 \%$; ЗТЖ = 36-40 %; вилікування 50-67 % тварин); препарат "Айлів" має здатність суттєво гальмувати ріст та розвиток метастазів карциноми легень Льюїс в легені. ІГМ склав 86 %.

30 Протипухлинна та антиметастатична дія препарату "Айлів" реалізується за рахунок здатності опосередковано індукувати апоптоз в пухлинних клітинах та пригнічувати їхній проліферативний потенціал, а також асоційована з активацією функцій клітин, що складають одну з найбільш важливих ланок протипухлинного клітинного неспецифічного імунного захисту - НК-клітини та макрофаги.

35 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Протипухлинний засіб, що містить продукт культивування *Bacillus subtilis*, який **відрізняється** тим, що як продукт культивування *Bacillus subtilis* містить екстракт штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7321, депонований в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України, білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів, полівініловий спирт та допоміжні агенти, при наступному співвідношенні складових, мас. %:

екстракт штаму <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7321	0,1-99,9
полівініловий спирт	0,1-99,9
білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів	0,1-99,9
ізотонічний агент	0,5-1,5
буферувальний агент	0,01-0,3
вода для ін'єкції	решта.

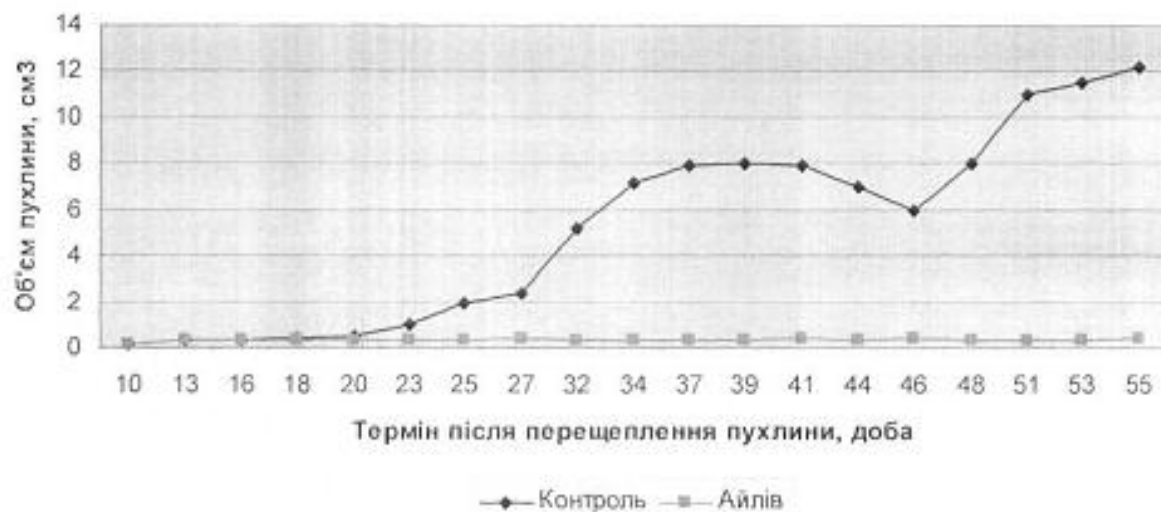
2. Протипухлинний засіб за пунктом 1, який **відрізняється** тим, що як ізотонічний агент містить хлорид натрію.

3. Протипухлинний засіб за пунктом 1, який **відрізняється** тим, що як буферувальний агент містить суміш гідрофосфату натрію і дигідрофосфату калію.

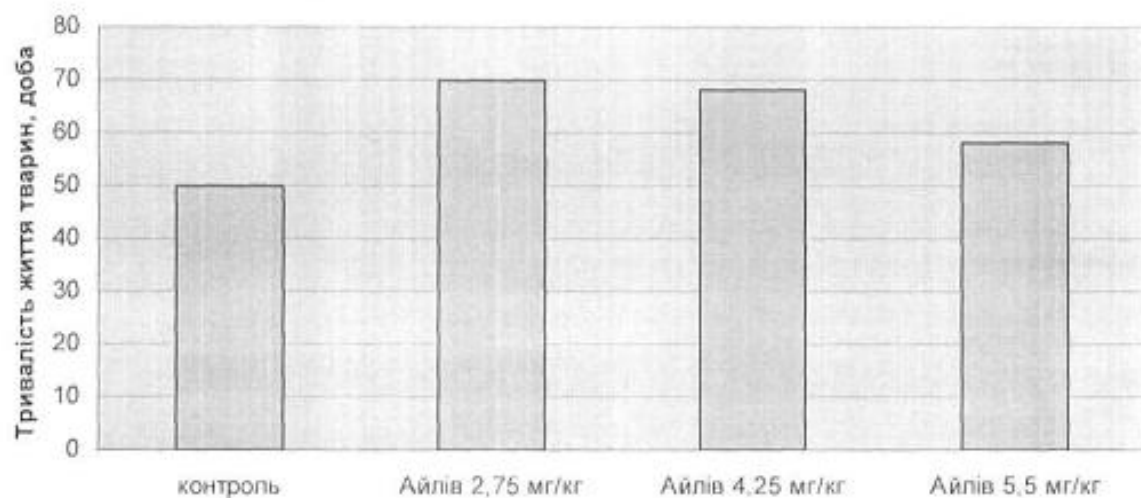
4. Протипухлинний засіб за пунктами 1, 2, 3, який **відрізняється** тим, що має наступне співвідношення складових, мас. %:

екстракт штаму <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7321	1
полівініловий спирт	5
білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів	5

хлорид натрію	0,9
гідрофосфат натрію	0,08
дигідрофосфат калію	0,015
вода для ін'єкції	решта.



Фіг. 1



(* - $p < 0,05$ у порівнянні з показником в контролі)

Фіг. 2

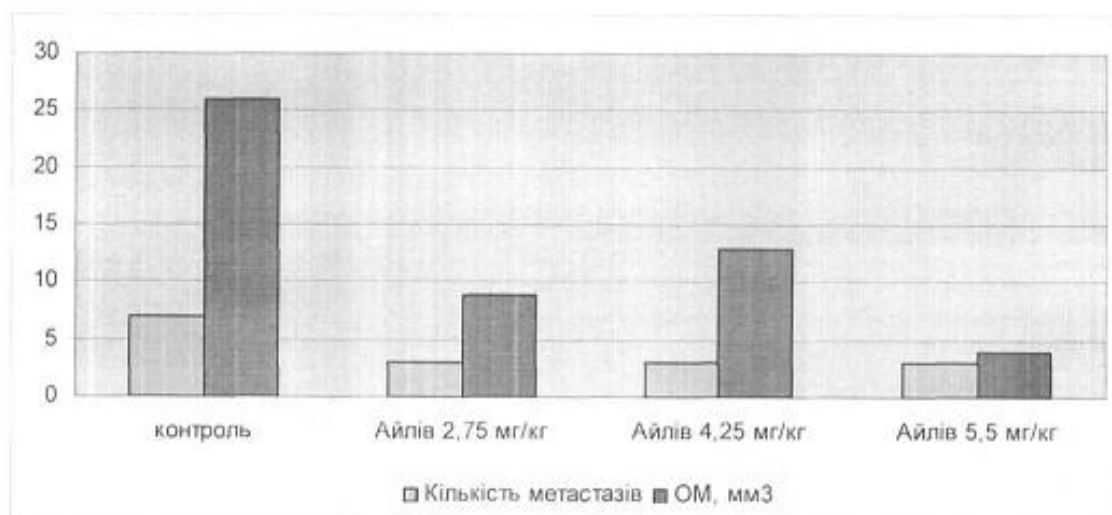


Fig. 3

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601