

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 випробування. 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 клітинами пухлини, 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 (А) [буферний розчин 0,001М. етилендіамінтетраоцтової кислоти, 0,01М Трис-НCl, рН 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 (В) [80% перекристалізованого фенолу в буфері (А), 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 струхували з бентонітом. Потім фенолізований гомогенізатор при кімнатній температурі (приблизно 20°C) піддавали центрифугуванню протягом 15хв при 10000gх. Водну фазу відділяли, фенольну та проміжну фази відкидали. До водної фази додавали такий самий об'єм суміші (1:1) розчину (В) та суміші хлороформу з ізоаміловим спиртом (96:4), і виконували екстракцію, як описано вище. Водну фазу тричі струхували 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 охолоджену льодом розчині 1М Трис-НCl, рН 7,0, та 0,001М 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, ДНКази та РНКази 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 Спосібі 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 відповідала 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, закриту 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 концентрату NaCl, 84 об'єми води, кінцева концентрація NaCl 0,525М) при витраті 3л/год. Фракції із вмістом понад 35 A_{260nm}, об'єднуювали і осаджували 1,5 об'ємами етанолу. Подальшу обробку виконували, як описано в Спосібі 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 Saccharomyces cerevisiae
1,9%	яким нехтуємо	тРНК з Saccharomyces cerevisiae
0,9%	яким нехтуємо	Сумарна РНК з тканини

великої рогатої худоби

Продукти мають в середньому звичайний ступінь чистоти. Підвищена чистота при непропорційно 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: 24 год

Кількість n=10 при найвищій

випадкових проб: концентрації

Випробувана а) сумарна РНК з тканин

речовина: великої рогатої худоби

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 (24 год) 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% випробовуваної 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% випробовуваної 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.