РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 714 140**(13) **C2**

(51) МПК
A61K 36/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 36/06 (2019.08); A61P 35/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: **2017123202, 29.06.2017**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2017

Дата регистрации:
12.02.2020

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **29.06.2017**

(43) Дата публикации заявки: **29.12.2018** Бюл. № 1

(45) Опубликовано: **12.02.2020** Бюл. № 5

Адрес для переписки:
610000, г. Киров, Октябрьский пр-кт, 119, Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения "48 Центральный научно-исследовательский институт" Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров)

(72) Автор(ы):
Туманов Александр Сергеевич (RU),
Бакулин Михаил Константинович (RU),
Печенкин Денис Валериевич (RU),
Бакулин Владимир Михайлович (RU),
Дармова Елена Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство обороны Российской Федерации (RU),
Федеральное государственное бюджетное учреждение "48 Центральный научно-исследовательский институт" Министерство обороны Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 4233291 A,11.11.1980.**
МИРОНОВА О.А. "Морфофункциональные особенности иммунной и сердечно-сосудистой систем у свиней при микотоксикозах". Автореферат дис. к.б.н., 2009, найдено 29.07.2019 в Интернете: (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и касается потенцирования активности цитостатического препарата. В дополнение к цитостатическому препарату цисплатину вводят микотоксин Т-2 в субтоксических дозах. Такое сочетанное введение в условиях эксперимента обеспечивает торможение роста опухоли и снижение метастазирования за счет синергетического действия указанных препаратов. 2 пр., 1 таб.

(56) (продолжение):
file:///C:/Users/otd1452/Downloads/autoref-morfofunktsionalnye-osobennosti-immunnoi-i-serdechno-sosudistoi-sistem-u-svinei-pri-mikotoks%20(1).pdf. MOREL-CHANY E. et al. "Cytotoxic and cytostatic effect of T2-toxin on epithelial cell lines derived from rat liver". Toxicol. Eur. Res. 1981 May;3(3):125-9, реферат, найдено 29.07.2019 из PubMed PMID:7281164. CUI JL. et al. "Antitumor and antivicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of Aquilaria sinensis". J Zhejiang Univ Sci B. 2011 May;12(5):385-92, реферат, найдено 29.07.2019 из PubMed PMID:21528493.

RU 2714140 C2

RU 2714140 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 714 140**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 36/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 36/06 (2019.08); A61P 35/00 (2019.08)

(21)(22) Application: **2017123202, 29.06.2017**

(24) Effective date for property rights:
29.06.2017

Registration date:
12.02.2020

Priority:
(22) Date of filing: **29.06.2017**

(43) Application published: **29.12.2018** Bull. № 1

(45) Date of publication: **12.02.2020** Bull. № 5

Mail address:
610000, g. Kirov, Oktyabrskij pr-kt, 119, Filial Federalnogo gosudarstvennogo byudzhetnogo uchrezhdeniya "48 Tsentralnyj nauchno-issledovatelskij institut" Ministerstva oborony Rossijskoj Federatsii (g. Kirov)

(72) Inventor(s):
Tumanov Aleksandr Sergeevich (RU),
Bakulin Mikhail Konstantinovich (RU),
Pechenkin Denis Valerievich (RU),
Bakulin Vladimir Mikhajlovich (RU),
Darmova Elena Mikhajlovna (RU)

(73) Proprietor(s):
Rossijskaya Federatsiya, ot imeni kotoroj vystupaet Ministerstvo oborony Rossijskoj Federatsii (RU),
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "48 Tsentralnyj nauchno-issledovatelskij institut" Ministerstvo oborony Rossijskoj Federatsii (RU)

(54) METHOD FOR POTENTIATING ACTIVITY OF ANTI-TUMOUR CYTOTOXIC PREPARATIONS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention refers to medicine, namely to oncology, and concerns potentiating cytostatic agent activity. In addition to the cytostatic preparation cisplatin, mycotoxin T-2 is administered in sub-toxic doses.

EFFECT: such combined introduction under experimental conditions provides tumour growth inhibition and reduced metastasis due to synergetic action of said preparations.

1 cl, 2 ex, 1 tbl

RU 2714140 C2

RU 2714140 C2

Предлагаемое изобретение относится к области медицинской микро-биологии и фармакологии и может быть использовано для сочетанной терапии злокачественных новообразований. Смертность от злокачественных новообразований занимает одно из первых мест в причинах смертности населения, как в РФ, так и за рубежом. В мире ежегодно регистрируют приблизительно 10 млн. случаев злокачественных новообразований, из них на развитые страны приходится около 48%, в связи с этим разработка новых противоопухолевых препаратов является актуальной задачей [Соухами Р., Тобайас Дж. Рак и его лечение //Пер. с англ. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 437 с.].

Одним из вариантов увеличения эффективности терапии злокачественных новообразований является сочетанное применение различных препаратов, обладающих противоопухолевым действием (цитостатиков). В настоящее время список цитостатиков обширен и включает в себя несколько классов веществ с различным механизмом действия. Все имеющиеся на сегодняшний день протоколы комбинированной противоопухолевой терапии имеют свои ограничения и недостатки, связанные с токсичностью применяемых препаратов, возможностью возникновения опухолевой резистентности и др., поэтому разработка новых вариантов и схем совместного применения противоопухолевых препаратов также актуальна.

Среди биотехнологических препаратов, обладающих противоопухолевым действием, особое место занимает микотоксин Т-2. Микотоксин Т-2 в очищенном виде представляет собой бесцветные (белые или серые в зависимости от уровня очистки) кристаллы [Тутелян В.А. Микотоксины. Медицинские и биологические аспекты //АМН СССР. - М.: Медицина, 1985. - 320 с.].

Относится к низкомолекулярным соединениям - сесквитерпенам, исключительно устойчивым в физическом и химическом плане. Молекулярная масса Т-2 токсина равна 466 (химическая формула $C_{24}H_{34}O_9$), точка плавления 151°С. Хорошо хранится при комнатной температуре в течение нескольких лет, выдерживает воздействие температуры до 600°С, длительное УФ-облучение и действие других факторов внешней среды. Т-2 токсин хорошо растворяется в умеренно полярных растворителях (хлороформ, этилацетат), несколько меньше в более полярных растворителях (этанол), еще меньше - в воде.

Уровни токсических доз в зависимости от вида млекопитающего и места аппликации находятся в диапазоне 1,0-10,0 мг·кг$^{-1}$ массы тела. Он проникает в организм через неповрежденные кожные покровы, слизистые, желудочно-кишечный тракт, органы дыхания (пути проникновения указаны в порядке снижения токсической дозы).

Исследования тонких механизмов действия Т-2 показали множественность мишеней его приложения на молекулярном, клеточном, органном, системном и организменном уровнях [Зайченко А.М. Макроциклические трихотеценовые микотоксины: биологическая активность // Современные проблемы токсикологии. - 2006. - №3. - С. 59-66]. Даже в наноколичествах он способен нарушать функции клеточных мембран, митохондрий, ингибировать синтез белка, ферментов, нуклеиновых кислот, оказывать заметное цитостатическое действие на быстроделящиеся клетки. Т-2 токсин является уникальным веществом, способным в субтоксичных дозах (1/10 $ЛД_{50}$ и менее) потенцировать действие химических (разные токсиканты-цитостатики) и физических (ионизирующая радиация) факторов на организм и отдельные ткани животных, при этом сочетанное взаимодействие идет по выраженному синергидному типу, когда комбинированное действие двух веществ существенно превосходит простое

суммирование действия каждого из факторов по отдельности [Кадиков И.Р. Сочетанное действие диоксидина и Т-2 токсина на организм животных и оценка эффективности лекарственных средств: дисс. канд. биол. наук. - Казань, 2008. - 108 с.].

Противоопухолевый эффект микотоксина Т-2 был отмечен еще в конце прошлого столетия, однако, ввиду высокой токсичности, данный препарат не нашел своего клинического применения. Попытки использовать микотоксин Т-2 в качестве противоопухолевого средства привели к созданию опытного целевого препарата на основе моноклональных антител и микотоксина. Такой конъюгат оказался токсичен в отношении клеток тимомы EL-4 [Anti-tumor activity of T-2 toxin-conjugated monoclonal antibody to murine thymoma / Ohtani K., Murakami H., Shibuya O. et al //Jpn. J. Exp. Med. - 1990. - Vol. 60, №2. - P. 57-65; Ohtani K., Ueno Y. Selective antitumor activity of T-2 toxin-antibody conjugates // Microbial Toxins in Foods and Feeds. - 1990. - P. 403-409].

На основании этого предлагается использовать известные противоопухолевые эффекты микотоксина Т-2 в комбинации с иными противоопухолевыми химиотерапевтическими препаратами, например цисплатином, что позволило бы за счет их синергидного действия повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Противоопухолевое действие микотоксина Т-2 изучали на перевиваемой опухоли мышей меланомы В16, входящей в число обязательных моделей опухолей животных, которые используются при отборе новых противоопухолевых веществ [Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ / Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. //Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - 2-изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2005. - С. 637-651]. Опухолевый штамм был приобретен в Учреждении Российской академии медицинских наук «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН» г. Москва. В качестве эталонного цитостатика использовали цисплатин - препарат алкилирующего ряда, действие которого основано на алкилировании цепей ДНК в пролиферирующих опухолевых клетках.

При получении микотоксина Т-2 использовали общепринятые методические подходы [Chemical interconversion of T-2 and HT-2 toxins and related com-pounds / Wei R.D., Strong F.M., Smalley E.B. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1971. - Vol. 45. - P. 396-4018; Smalley E.B., Caldwell R.W. New process for T-2 toxin production // Appl. Environ. Microbiol. - 1982. - Vol. 44, №2. - P. 371-375]. В опыте использовали мышей линии C57BL/6 обоего пола, массой 20-25 г. Животные были приобретены в питомнике лабораторных животных Учреждения Российской академии наук «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» (ИБХ РАН), г. Пущине Опухоль трансплантировали путем подкожного введения в область передней конечности ближе к позвоночнику в объеме 0,2 мл (200 тыс. клеток) на мышь. Для оценки специфического противоопухолевого эффекта препарат микотоксина Т-2 вводили в двух дозировках трехкратно двумя курсами: 5 (1/10 $ЛД_{50}$) мкг (группа 1) и 10 мкг (1/5 $ЛД_{50}$) на одно животное (группа 2), трехкратно (через сутки), подкожно, через 48 часов после имплантации опухолевых клеток. Повторный курс введения препарата микотоксина Т-2 по той же схеме проводили через 14 суток.

Изучалась также возможность комбинированного применения микотоксина Т-2 и цисплатина. Препарат микотоксина Т-2 вводили по схеме, аналогичной монотерапии, в дозе 10 мкг (группа 3) и 5 мкг на одно животное (группа 4). Противоопухолевый препарат цисплатин вводили внутрибрюшинно однократно двумя курсами: через 48 часов и 14 суток после имплантации опухолевых клеток. У лабораторных животных в

группе 3 препарат цисплатин использовали в дозе 50 мкг, в группе 4-25 мкг на одно животное.

Кроме того, противоопухолевый препарат цисплатин исследовался в качестве монотерапии (группа 5). Животным данной группы препарат вводился также двумя курсами (через 48 часов и 14 суток после имплантации опухолевых клеток), внутрибрюшинно однократно в дозе 50 мкг на мышь. В качестве контрольной группы (группа 6) использовали мышей той же линии без введения исследуемых препаратов.

Противоопухолевый эффект оценивали по следующим общепринятым показателям: торможению роста опухоли (ТРО), увеличению продолжительности жизни (УПЖ) и уровню метастазирования.

Расчет индекса торможения роста опухоли проводили следующим образом. Начиная с 12-14 суток с момента имплантации опухоли, проводили 3 измерения опухолевых узлов - через каждые 5-7 дней (в зависимости от интенсивности опухолевого роста). Для этого с помощью штангенциркуля определяли два размера (длину и ширину) опухолевых узлов. Объем (V, $мм^3$) вычисляли по формуле (1):

$$V = (a \cdot b^2) : 2 \qquad (1);$$

где:

a - длина опухолевого узла, мм,

b - ширина опухолевого узла, мм.

Индекс торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле (2):

$$ТРО = (V_{контроля} - V_{опыта}) : V_{контроля} \cdot 100\ \% \qquad (2);$$

где:

ТРО - индекс торможения роста опухоли, %;

$V_{контроля}$ - средний объем опухоли в контрольной группе, $мм^3$;

$V_{опыта}$ - средний объем опухоли в опытной группе, $мм^3$.

Примечание: эффект считали значимым при значении ТРО≥70%, УПЖ≥25%.

Индекс увеличения продолжительности жизни (УПЖ) рассчитывали по формуле (3):

$$УПЖ = (СПЖ_{опыта} - СПЖ_{контроля}) : СПЖ_{контроля} \cdot 100\ \% \qquad (3);$$

где:

$СПЖ_{опыта}$ - средняя продолжительность жизни животных в опытной группе, дни;

$СПЖ_{контроля}$ - средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе, дни.

Изучение влияния на метастатическую активность опухоли осуществляли путем оценки доли животных с метастазами в каждой группе. Результаты эксперимента приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Оценка противоопухолевого действия микотоксина Т-2 при монотерапии, а также в комбинации, на примере опухолевой модели меланомы В16, $X_{ср} \pm I_{95}$

Группа	Характеристика группы	Количество животных,	Размеры опухоли на … сутки после имплантации						Средняя продолжительность жизни, сутки	Индекс УПЖ, процент	Доля животных с метастазами, процент
			…18		…23		…28				
			Объем опухоли, мм^3	Индекс ТРО, процент	Объем опухоли, мм^3	Индекс ТРО, процент	Объем опухоли, мм^3	Индекс ТРО, процент			
1	Монотерапия микотоксином Т2	5	2109,5 ± 581,2	**51,1**	3067,3 ± 1198,8	**67,1**	3208,8 ± 1615,5	**65,6**	31,2±2,9	**34,7**	**50**
2	Монотерапия микотоксином Т2	5	1201,5 ± 551,4	**72,1**	2291,6 ± 650,2	**75,5**	1556,8 ± 371,8	**83,3**	26,8±3,3	**15,5**	**40**
3	Комбинированная терапия	5	620,9 ± 278,6	**85,6**	1200,5 ± 693,1	**87,1**	1172,2 ± 451,1	**87,4**	30,4±2,4	**31,0**	**20**
4	Комбинированная терапия	5	752,8 ± 581,1	**82,5**	1758,8 ± 1093,0	**81,2**	2029,3 ± 2112,2	**78,2**	29,8±4,3	**28,4**	**20**
5	Монотерапия цисплатином	5	2276,8 ± 1658,7	**47,2**	5808,0 ± 1342,6	**37,8**	5566,0 ± 1832,3	**40,3**	21,4±4,3	**-7,8**	**40**
6	Контроль	5	4312,1 ± 820,9	-	9335,8 ± 4048,8	-	9321,8 ± 1733,1	-	23,2±1,2	-	**100**

Примечания: 1. ТРО – торможение роста опухоли;
2. СПЖ – средняя продолжительность жизни;
3. УПЖ – увеличение продолжительности жизни.

Как следует из представленных в таблице данных, во всех экспериментальных группах на все сроки наблюдения отмечается существенное торможение роста опухоли. Монотерапия цисплатином приводит к сокращению размеров опухолевого узла порядка 40%, в то время как в группе животных с монотерапией микотоксином Т-2 индекс ТРО находится в районе 50-70%. С учетом того, что применение микотоксина позволяет добиться увеличения продолжительности жизни лабораторных животных и снижает долю животных с метастазами, необходимо отметить, что эффективность монотерапии препаратом микотоксина Т-2 не только не уступает эффективности монотерапии цисплатином, но и превосходит ее.

Наибольшие значения индекса ТРО наблюдаются в группах сочетанного применения цисплатина и микотоксина Т-2: в зависимости от срока наблюдения он составляет от 78,2% до 87,4%. В данных группах также отмечены наибольшие показатели продолжительности жизни лабораторных животных и наименьшие показатели метастазирования.

Таким образом, применение микотоксина Т-2 как в монотерапии, так и в сочетании с цитостатиком цисплатином ведет к развитию клинически значимого эффекта в отношении опухолевых графтов меланомы В16, что выражается в уменьшении размеров опухолевых узлов, увеличении продолжительности жизни лабораторных животных и снижении метастазирования. Все это позволяет рассматривать микотоксин Т-2 в качестве противоопухолевого препарата и средства для потенцирования противоопухолевого эффекта цисплатина.

Пример 1. Взвесь клеток меланомы В16 в количестве 200 тыс. клеток была введена мыши С57BL/6 в объеме 0,2 мл физиологического раствора хлорида натрия в область правой лопатки. На 18 сутки после перевивки объем опухоли составил 4630 мм^2, на 23 сутки - 9800 мм^2, на 28 сутки мышь пала. При вскрытии обнаружены метастазы в легких в количестве 9 узлов.

Пример 2. Взвесь клеток меланомы В16 в количестве 200 тыс.клеток была введена мыши С57BL/6 в объеме 0,2 мл физиологического раствора хлорида натрия в область

правой лопатки. Через 48 часов после перевивки опухоли мыши ввели 50 мкг цисплатина внутрибрюшинно. В течение 3 суток животное получало по 10 мкг препарата микотоксина Т-2, через 14 дней проведен повторный курс введения микотоксина. На 18 сутки после перевивки объем опухоли составил 792 мм^2, на 23 сутки - 1014 мм^2, на 28 сутки - 1098 мм^2, при вскрытии на 25 сутки в легких обнаружены 3 метастатических узла.

(57) Формула изобретения

Способ подавления опухолевого роста путем введения цисплатина, отличающийся тем, что дополнительно для потенцирования цитостатического эффекта вводят микотоксин Т-2 в субтоксических дозах.