(19) **RU** (11) **2 139 083** (13) **C1**

(51) МПК[6] **A 61 K 38/00, 47/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: **98100518/14, 22.01.1998**

(24) Дата начала действия патента: **22.01.1998**

(46) Дата публикации: **10.10.1999**

(56) Ссылки: **RU 2026687 C1, 20.01.95. RU 2095084 C1, 10.11.97.**

(98) Адрес для переписки:
113461, Москва, Севастопольский пр-т, д.75, корп.1, кв.2, Сотниченко А.И.

(71) Заявитель:
**Сотниченко Александр Иванович,
Северин Евгений Сергеевич,
Северин Сергей Евгеньевич**

(72) Изобретатель: **Сотниченко А.И., Северин Е.С., Северин С.Е.**

(73) Патентообладатель:
**Сотниченко Александр Иванович,
Северин Евгений Сергеевич,
Северин Сергей Евгеньевич**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕКАРСТВА В РАКОВУЮ КЛЕТКУ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области химии белка и к медицине, в частности к онкологии, и может найти применение при химиотерапии онкологических пациентов.

Ретроплацентарную или абортивную сыворотку подвергают тестированию, замораживанию. Размораживают перед началом выделения альфа-фетопротеина и центрифугируют, к надосадочной жидкости добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до 30%-ного насыщения. Повторно центрифугируют, добавляют к надосадочной жидкости сухой сульфат аммония до 70%-ного насыщения, центрифугируют. Полученный осадок растворяют в 10 мМ раствора фосфата натрия с pH 7,3, диализуют, центрифугируют и очищают с помощью аффинной, ионообменной и гельпроникающей хроматографий с последующей концентрацией очищенного альфа-фетопротеина до 1,5-5,0 мг/мл. Проводят конъюгацию альфа-фетопротеина с концентрацией 1,5-2,0 мг/мл и 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксина, растворенного в диоксане с последующим добавлением маннита до 5%, лиофильным высушиванием, герметичной упаковкой и хранением при -70°C. Технический результат: повышение эффективности подавления роста раковых клеток гормон-зависимых органов и тканей.

RU 2139083 C1

RU 2139083 C1

(19) **RU** (11) **2 139 083** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **A 61 K 38/00, 47/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **98100518/14, 22.01.1998**

(24) Effective date for property rights: **22.01.1998**

(46) Date of publication: **10.10.1999**

(98) Mail address:
113461, Moskva, Sevastopol'skij pr-t, d.75, korp.1, kv.2, Sotnichenko A.I.

(71) Applicant:
Sotnichenko Aleksandr Ivanovich,
Severin Evgenij Sergeevich,
Severin Sergej Evgen'evich

(72) Inventor: **Sotnichenko A.I.,**
Severin E.S., Severin S.E.

(73) Proprietor:
Sotnichenko Aleksandr Ivanovich,
Severin Evgenij Sergeevich,
Severin Sergej Evgen'evich

(54) METHOD OF PREPARING PREPARATION FOR DIRECTED DELIVERY OF ANTITUMOR DRUG IN CANCER CELL

(57) Abstract:

FIELD: medicine, oncology, protein chemistry. SUBSTANCE: retroplacental or abortive serum is tested, frozen and frozen out before onset of alpha-fetoprotein isolation followed by centrifugation. Then ammonium sulfate saturated solution is added to supernatant up to 30% of saturation, centrifuged again, crystalline ammonium sulfate is added to supernatant up to 70% of saturation and centrifuged. Obtained precipitate is dissolved in 10 mM sodium phosphate solution, pH 7.3, dialyzed, centrifuged and purified by affinity, ion-exchange and gel-exclusive chromatography followed by concentrating the purified alpha-fetoprotein to 1.5-5.0 mg/ml. Then the conjugation of alpha-fetoprotein (concentration is 1.5-2.0 mg/ml) with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine dissolved in dioxane is carried out followed by addition of mannitol up to the concentration 5%, lyophilic drying, hermetic package under inert gas atmosphere and storage at -70 C. Invention can be used in chemotherapy of oncological patients. EFFECT: enhanced effectiveness of suppression of cancer cells proliferation of hormone-dependent organs and tissues. 1 cl, 1 ex

RU 2139083 C1

RU 2139083 C1

Изобретение относится к области химии белка и к медицине, в частности к онкологии и может найти применение при химиотерапии онкологических пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями гормон-чувствительных органов.

Гормон-зависимые опухоли занимают существенную долю по количеству случаев среди злокачественных новообразований человека. Наиболее распространенными формами среди них являются рак молочной железы, яичника, матки и предстательной железы. Реже в клинической практике встречаются рак печени и вилочковой железы. Лечение гормон-зависимых опухолей часто оперативное. Однако во многих случаях из-за поздней диагностики и распространенности опухолевого процесса помимо хирургического лечения показаны лучевая и химиотерапия.

Успех лекарственной терапии во многом зависит от избирательного цитостатического/цитотоксического воздействия противоопухолевых препаратов на раковые клетки. Онкофетальный белок сыворотки крови человека α-фетопротеина (АФП) используется для этих целей уже относительно давно. Известно свойство АФП избирательно проникать в опухолевые клетки, имеющие рецепторы к этому белку; при этом нормальные клетки взрослого организма практически неспособны поглощать АФП (1, 2). Впервые АФП был использован для адресной доставки цитостатика дауномицина доктором Дейчем (3). В России в Онкологическом научном центре им. Блохина (г. Москва) успешно заканчивается II фаза клинических испытаний противоопухолевого препарата на основе АФП человека (используется в качестве транспортного белка) и ковалентного комплекса доксорубицин-эстрон (используется в качестве цитостатика) (4).

Наиболее близким является получение препарата для направленной доставки противоопухолевых лекарств в раковую клетку (5), предусматривающий обработку фетального биологического материала путем его измельчения, экстракции бутиловым спиртом, диализа экстракта против 0,05 М раствора NaCl и концентрации экстракта до содержания альфа-фетопротеина 100 мкг/мл; после чего концентрат стерилизуют. Затем подвергают конъюгации противоопухолевого лекарства - доксорубицин с лигандом-эстроном. Проводят преинкубацию обработанного биологического материала с конъюгатом.

Техническим результатом предлагаемого способа является повышение эффективности подавления роста раковых клеток гормон-зависимых органов и тканей.

Для достижения указанного технического результата в способе получения препарата для направленной доставки противоопухолевого лекарства в раковую клетку путем обработки фетального биологического материала человека, содержащего альфа-фетопротеин, химической конъюгации с противоопухолевым лекарством и инкубации конъюгата, согласно изобретению, в качестве фетального биологического материала используют ретроплацентарную или абортивную сыворотку, подвергают ее тестированию, замораживанию и хранению до использования при температуре -70 °С, размораживают ее непосредственно перед началом выделения альфа-фетопротеина в течение 10-12 часов при +4°С, центрифугируют, к охлажденной надосадочной жидкости добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до 30%-ого насыщения с последующим выдерживанием при этой температуре до формирования осадка, повторно центрифугируют, полученный осадок растворяют в 10 мМ раствора фосфата натрия с pH 7,3, а раствор диализуют против 10 мМ фосфатного буфера, центрифугируют и очищают с помощью аффинной, ионообменной и гельпроникающей хроматографий с последующим концентрированием очищенного альфа-фетопротеина до 1,5-5,0 мг/мл, при этом в качестве противоопухолевого лекарства используют 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин, предварительно растворенный в диоксане до концентрации 0,8-0,9 мг/мл, причем конъюгацию альфа-фетопротеина с концентрацией 1,5-2,0 мг/мл, и 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин, растворенного в диоксане, проводят путем инкубирования в течение 1-6 часов при 20-35 °С при концентрации диоксана не более 5 объемных процентов с последующим добавлением маннита до 5% в качестве стабилизатора, лиофильным высушиванием, герметичной упаковкой в атмосфере инертного газа и хранением до использования при -70°С.

При необходимости альфа-фетопротеин лиофильно высушивают, герметично упаковывают в атмосфере инертного газа и хранят до использования при -70 °С.

Изобретение поясняется на следующем примере.

Пример. Для подавления роста раковых клеток гормон-зависимых органов и тканей, для избирательного воздействия на раковые клетки в качестве транспортного белка используют альфа-фетопротеин человека, а в качестве цитотоксического агента (противоопухолевого лекарства) - 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин (ТХДД).

ТХДД представляет собой одно из самых токсичных химических соединений, когда-либо созданных человеком (6-8). Относительно недавно открыто свойство ТХДД убивать клетки по апоптотическому механизму (запрограммированная гибель клетки, PCD) (9, 10). В наибольшей степени апоптотическое действие ТХДД проявляется на клетках из зависимых от гормонов органов и тканей. В первую очередь это относится к молочной железе, тимусу, яичникам, яичкам, предстательной железе (10-13). Обнаружено, что ТХДД обладает in vitro и in vivo ярко выраженной цитотоксической активностью по отношению к клеткам рака молочной железы и яичника человека (14-16). Однако до недавнего времени не были решены две главные проблемы, связанные с клиническим использованием ТХДД:

1) увеличения растворимости ТХДД в водных растворах (ТХДД является высоко гидрофобным соединением с растворимостью в воде - 19 нг/л, что делает невозможным его системное применение);

RU 2139083 C1

RU 2139083 C1

2) избирательного воздействия ТХДД на клетки-мишени (введение ТХДД в организм стандартным способом приводит на фоне выраженной противоопухолевой активности к возникновению множественных системных токсических реакций).

Нами было обнаружено, что АФП человека при определенных условиях способен эффективно связывать ТХДД. В результате образуется нековалентный конъюгат АФП-ТХДД (молярное отношение 1:2). Создание этого конъюгата позволило решить две главные задачи:

1) увеличить растворимость ТХДД в водных средах примерно в 5000 раз по сравнению со свободным ТХДД;

2) значительно повысить селективное воздействие ТХДД на клетки мишени за счет использования АФП в качестве транспортного белка.

АФП выделяли из ретроплацентарной или абортивной сыворотки по следующей оригинальной методике. Все работы с АФП (если не указано другое) проводили при 0-+4 °С.

Сыворотку получали после нормальных родов при сроках беременности от 32 до 40 недель или медицинского аборта на сроках от 8 до 12 недель и после проверки на наличие антигенов гепатита В, сифилиса и СПИДа, образцы сыворотки, отрицательные по этим тестам, замораживали и до использования хранили при -70°С.

Перед началом выделения АФП сыворотку размораживали (12 час при +4°С) и нерастворимые компоненты удаляли центрифугированием (центрифуга J2-21, ротор - JA-14 Beckman, USA; 30 мин, 10000 об/мин).

К надосадочной жидкости при равномерном перемешивании и охлаждении льдом добавляли холодный насыщенный раствор сульфата аммония до достижения 30%-ного насыщения. После добавления всего необходимого объема сульфата раствор оставляли без перемешивания на ночь в холодильнике при +4°С для формирования осадка. Осадок отделяли центрифугированием (40 мин, 10000 об/мин).

К надосадочной жидкости при равномерном перемешивании и охлаждении льдом медленно добавляли сухой сульфат аммония до 70%-ного насыщения. Суспензию оставляли на ночь в холодильнике при +4 °С для формирования осадка. Осадок отделяли центрифугированием (45 мин, 10 000 об/мин).

Полученный осадок растворяли в 10 мМ фосфате натрия, pH 7.3 (конечный объем обычно составлял 65-70% от исходного объема сыворотки) и для удаления сульфата аммония диализовали против 10 л 10 мМ фосфатного буфера в проточной волоконной ячейке для диализа типа "искусственная почка". Раствор после диализа центрифугировали (45 мин, 10000 об/мин и полученный осветленный раствор наносили на аффинную колонку с моноклональными антителами, специфичными к АФП.

Сульфат-аммонийную фракцию, содержащую АФП, после диализа наносили на аффинную колонку в течение 12-14 часов. Белок в элюате детектировали с помощью проточного фотометра при 280 нм. После нанесения образца колонку промывали 0.1 М трис-хлоридным буфером, pH 8.2 до горизонтальной базовой линии и целевой белок элюировали этим же буфером, содержащим 4 М мочевину.

Пик белка после аффинной колонки и коррекции pH (при необходимости) непосредственно наносили на ионообменную колонку (1.6x15 см) с DEAE-ToyoPearl M650 (Toyo Soda, Japan), уравновешенную 0.1 М трис-хлоридным буфером, pH 8.2. После нанесения всего объема образца колонку элюировали этим же буфером в режиме линейного возрастания концентрации хлористого калия (от 0 до 0.6 М).

Пик белка, содержащий очищенный АФП после ионообменной колонки, концентрировали в ультрафильтрационной ячейке с мембраной PM-10 (Amicon, Netherland) и наносили на колонку (2.6x150 см), заполненную матрицей Sephacryl S200 HR (LKB-Pharmacia, Sweden) и уравновешенную 20 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлоридом натрия (ФСБ) с 0.02% азида натрия. Этот же буфер использовали для элюции колонки. Белок отбирали в соответствии с фотометрическим профилем фракции, содержащие АФП в мономерной форме, объединяли, концентрировали на мембране PM-10 до концентрации белка 1,5-5,0 мг/мл, и при необходимости замораживали, лиофильно высушивали, флаконы герметично закрывали в атмосфере азота и до использования хранили при -70°С.

ТХДД (0,85 мг/мл) растворяли в диоксане и раствор хранили в атмосфере азота при +4°С.

К водному раствору АФП в стеклянном флаконе с концентрацией белка 1.5 - 2.0 мг/мл в ФСБ при встряхивании медленно добавляли раствор ТХДД в диоксане с таким расчетом, чтобы конечная концентрация диоксана не превышала 5% (об/об). Реакционную массу инкубировали от 1 до 6 час при 20 - 35°С. После окончания инкубации образовавшийся комплекс АФП:ТХДД отделяли от низкомолекулярных примесей на колонке с Sephadex G-25sf (Pharmacia, Sweden), уравновешенной ФСБ, содержащим 10% ацетонитрила (об/об). Фракции, содержащие целевой комплекс, объединяли и хранили при +4°С до проведения качественного и количественного анализа (обычно - не более суток).

Для длительного хранения к раствору комплекса добавляли сухой маннит (до 5%), раствор фильтровали в стерильных условиях через ультрафильтр (0.22 мкм), разливали в стеклянные ампулы, замораживали и лиофильно высушивали. После окончания сушки ампулы заполняли стерильным азотом или аргоном, запаивали на водородной горелке и хранили при -70°С.

Качественное и количественное определение ТХДД проводили в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе "GOLD" (Beckman, USA). Хроматографическая система состояла из двухголовочного градиентного насоса М-126 (Beckman, USA), петлевого инжектора М-7125 с петлей объемом 500 мкл; (Rheodyne, USA), колонки Ultrasphere Octyl, 3 μ, 0.46x7.5 cm и проточного спектрофотометрического детектора М-167 (Beckman, USA). Определение площадей хроматографических пиков и обработку результатов анализа проводили при использовании

RU 2139083 C1

RU 2139083 C1

хроматографической программы "GOLD Personal Chromatograph" (Beckman, USA).

Разделение проводили в системе: A = 0.1 М ацетат аммония, pH 6.0, 10% ацетонитрила (об/об);

B = 50:50 = ацетонитрил:изопропанол

Анализ проводили при скорости потока 1.5 мл/мин в режиме градиентной элюции от 65 до 85% компонента B при времени разделения 10 минут.

Для количественного определения на колонку наносили от 5 до 500 мкл раствора комплекса ТХДД: АФП. Определение проводили по методу внешнего стандарта с использованием раствора ТХДД в диоксане с концентрацией 0.1 мг/мл.

Среднее значение получали на основании трех параллельных определений концентрации в растворах как образца, так и стандарта. Ошибку рассчитывали по методу наименьших квадратов.

В результате создан препарат, обладающий выраженной цитотоксической активностью in vitro по отношению к клеткам Т-клеточной лимфомы человека CEM, клеткам рака молочной железы человека MCF-7 и клеткам гепатомы человека HepG2.

Испытание биологической активности in vitro.

Культивирование клеток

Для биологического тестирования ТХДД и его конъюгата с АФП были использованы Т-клеточная лимфома человека линии CEM, карцинома молочной железы человека линии MCF-7 и гепатома человека линии HepG2. Клетки линии CEM культивировали в пластиковых культуральных флаконах (Costar, USA) в среде RPMI 1640 (Sigma, USA), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, USA), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Клетки линии MCF-7 культивировали в тех же условиях, но с использованием среды DMEM (Sigma).

Определение цитотоксической активности.

Для оценки цитотоксичности ТХДД и его нековалентного комплекса с АФП клетки высевали в 96-луночные планшеты для микротитрования (Costar) по 15 тысяч клеток в лунку, добавляли исследуемые соединения в различных концентрациях и инкубировали в стандартных условиях для культивирования в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток определяли с помощью MTT-теста по методу Mosmann.

За 2 часа до окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора MTT-бромида 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия (Sigma, USA) в среде для культивирования клеток в концентрации 1 мг/мл. После развития окраски среду удаляли, выпавшие кристаллы формазана растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида и измеряли интенсивность окраски по поглощению при 540 нм на многоканальном спектрофотометре (Labsystem, Finland). Выживаемость клеток оценивали в процентах от соответствующего контроля.

Реализация способа подавления роста раковых клеток гормон-зависимых органов и тканей при помощи полученного комплекса ТХДД:АФП заключается во внутривенных инъекциях.

Список используемой литературы

1. Suzuki Y.H., Taga H., Ishizuki H. et al. Immunohistochemical study of AFP in rat embryos during ontogenesis, Ann. NY Acad. Sci, 417, 224-239 (1983).

2. Uriel J. , Laborda J., Naval J. et al. AFP receptors in malignant cells: an overview, CRC Press, "Biological Activities of AFP", 113-116, 1989, II.

3. Deutsch H.F., Tsukada Y., Sasaki T. et al. Cytotixic effects of daunomycin-fatty acid complex on rat hepatoma cells, Cancer Res., 43, 2668-2672 (1983).

4. Тихонов А. В. , Щербаков В.М., Володарский В.И. Способ лечения первичного рака печени и набор для лечения первичного рака печени, патент РФ N 2065307 от 20.08.1996.

5. Патент RU N 2026688, кл. A 61 K 38/00, 47/00, 1995. Способ получения препарата для направленной доставки противоопухолевых лекарств в раковую клетку - прототип.

6. Safe S. PCBs, PCDDs PCDFs, and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TFFs), Toxicology, 21, 51-88 (1990).

7. Poland A., Knutson J.C. TCDD action, Annu Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 251-277 (1970).

8. Poland A., Greenlee W.F., Kende A.S. Studies on the mechanism of the chlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds, New York Acad.Sci., 320, 214-230 (1979).

9. McConkey D. J. and Orrenius S. TCDD kills glucocoticoid-sesitive thymocytes in vivo, Biochem.Biophys.Res.Commun., 160, 1003- 1008 (1989).

10. McConkey D. J., Hartzell P., Duddy S.K. et al. TCDD kills immature thymocytes by C^{2+}-mediated endonuclease activation, Science, 242, 256-259 (1988).

11. Korach K. S. , Sarver P., Chae K et al. Estrogen receptor-binding activity of PCBs: conformationally restricted structural probes, Mol.Pharmacol., 33, 120-126 (1988).

12. Astroff B., and Safe S. TCDD as an antiestrogen: effect on rat uterine peroxidase activity, Biochem. Pharmacol., 39, 485-488 (1990).

13. Keeping H.S., and Lyttle C.R. Modulation of rat uterine progesterone receptor levels and peroxidase activity by tamoxifen citrate LY 117018 and estradiol, Endocrinology, III, 2046-2054 (1982).

14. Gierthy J. F. and Lincoln D.W. Inhibition of postconfluent focus production in cultures of MCF-7 breast cancer cells by TCDD, Breast Cancer Res., 12, 227-233 (1988).

15. Gierthy J. F. , Lincoln D.W., Gillespie M.B. et al. Suppression of estrogen-regulated extracellular tissue plasminogen activator activity of MCF-7 cells by TCDD, Cancer Res., 47, 6198-6203 (1987).

16. Rowlands C. , Krishnan V., Wang X. et al. Characterization of the aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon responsiveness in human ovarian carcinoma cell lines, Cancer Res., 53, 1802-1807 (1993).

Формула изобретения:

Способ получения препарата для направленной доставки противоопухолевого лекарства в раковую клетку путем обработки фетального биологического материала

RU 2139083 C1

RU 2139083 C1

человека, содержащего альфа-фетопротеин, химической конъюгации с противоопухолевым лекарством и инкубации конъюгата, отличающийся тем, что в качестве фетального биологического материала используют ретроплацентарную или абортивную сыворотку, подвергают ее тестированию, замораживанию и хранению до использования при температуре -70 °С, размораживают ее непосредственно перед началом выделения альфа-фетопротеина в течение 10 - 12 ч при +4°С, центрифугируют, к охлажденной надосадочной жидкости добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до 30%-ного насыщения с последующим выдерживанием при этой же температуре до формирования осадка, повторно центрифугируют, добавляют к надосадочной жидкости сухой сульфат аммония до 70%-ого насыщения при одновременном перемешивании и охлаждении до +4°С с последующим выдерживанием до получения осадка, еще раз центрифугируют, полученный осадок растворяют в 10 мм раствора фосфата натрия с pH 7,3, а раствор диализуют против 10 л 10 мм фосфатного буфера, центрифугируют и очищают с помощью аффинной, ионообменной и гельпроникающей хроматографией с последующей концентрацией очищенного альфа-фетопротеина до 1,5 - 5,0 мг/мл, при этом в качестве противоопухолевого лекарства используют 2,3,7,8-тетра-хлордибензо-р-диоксин, предварительно растворенный в диоксане до концентрации 0,8 - 0,9 мг/мл, причем конъюгацию альфафетопротеина с концентрацией 1,5 - 2,0 мг/мл и 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксина, растворенного в диоксане, проводят путем инкубирования в течение 1 - 6 ч при 20 - 35°С при концентрации диоксана не более 5 об.% с последующим добавлением маннита до 5% в качестве стабилизатора, лиофильным высушиванием, герметичной упаковкой в атмосфере инертного газа и хранением до использования при -70 °С.

RU 2139083 C1

RU 2139083 C1