



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
A61K 36/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009144616/15, 01.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.12.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.12.2009

(45) Опубликовано: 27.03.2011 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: Фазлул Х., Саркар и Ивей Ли.

Использование хемопревентивных агентов в
целях повышения эффективности терапии
рака // Cancer Res., 2006; 66: (7), April 1,
review. RU 2104027 C1, 10.02.1998. RU 2175237
C2, 27.10.2001. RU 2342944 C1, 10.01.2009. RU
2188031 C1, 27.08.2002.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Федореев Сергей Александрович (RU),
Кулеш Надежда Ивановна (RU),
Мищенко Наталья Петровна (RU),
Ермакова Светлана Павловна (RU),
Звягинцева Татьяна Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии наук
Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения РАН
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-
фармацевтической промышленности, а именно
к созданию средства, обладающего
противоопухолевой активностью. В качестве
средства, обладающего противоопухолевой
активностью в отношении клеток рака

кишечника HT-29 и DLD-1, применяют сухой
экстракт ядровой древесины маакии амурской.
Средство расширяет арсенал
противоопухолевых средств, активных в
отношении клеток рака кишечника HT-29
и DLD-1. 3 ил.

RU 2 414 920 C1

RU 2 414 920 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 36/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009144616/15, 01.12.2009**

(24) Effective date for property rights:
01.12.2009

Priority:

(22) Date of filing: **01.12.2009**

(45) Date of publication: **27.03.2011 Bull. 9**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Fedoreev Sergej Aleksandrovich (RU),
Kulesh Nadezhda Ivanovna (RU),
Mishchenko Natal'ja Petrovna (RU),
Ermakova Svetlana Pavlovna (RU),
Zvjagintseva Tat'jana Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN (TIBOKh
DVO RAN) (RU)**

(54) ANTICANCER DRUG

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to chemical-pharmaceutical industry, namely to development of an anticancer drug. The anticancer drug exhibiting HT-29 and DLD-1 bowel cancer cell activity is

presented by a dry extract of Amur maackia heartwood.

EFFECT: drug extends the range of anticancer agents active in relation to HT-29 and DLD-1 bowel cancer cells.

3 dwg, 2 ex

R U 2 4 1 4 9 2 0 C 1

R U 2 4 1 4 9 2 0 C 1

Изобретение относится к медицине, конкретно к фармакологии, и касается противоопухолевых средств.

Известен биологически активный стильбен, выделенный из винограда - резвератрол, который ингибирует иницирование, развитие и прогрессию канцерогенного процесса [Kim S., Min S.Y., Lee S.K., Cho W.-J. (2003) Chem. Pharm. Bull. V.51 N.5. P.16-521]. Экспериментально доказано, что резвератрол вызывает апоптоз у трудноизлечиваемых раковых клеток простаты (PC-3 и DU145) [Gill C. et. al. (2007) The Prostate. V.67. I.15. P.1641-1653]. Считается, что использование резвератрола может быть одним из самых эффективных способов, с помощью которого можно увеличить чувствительность опухолевых клеток простаты к химиотерапии, поскольку он не токсичен и эффективен даже при низких концентрациях, что было подтверждено экспериментально на животных. Резвератрол детоксифицирует канцерогенные вещества и стимулирует генетические механизмы, включающие апоптоз раковых клеток.

Известны изофлавоноиды, выделенные из сои, такие как даидзеин и генистеин, проявляющие противоопухолевые свойства [Jian L. (2009) Mol Nutr Food Res. V.53. P.217-226]. Экспериментально был подтвержден ингибирующий эффект генистеина на рост клеток рака молочной железы, таких как MDA-MB-231, MDA-MB-435, МКФ 7 и раковых клеток простаты PC3 и LNCaP. Он также эффективен против раковых клеток легкого H460 и H322 и некоторых видов лейкоза [Sarkar F.H., Li Y. (2003) Cancer Investigation. V.21. N.5. P.744-757; Sarkar F.H., Li Y. (2002) Cancer Metastas. Rev. V.21, N.3. P.265-280; Tominaga Y., Wang A., Wang R.-H., Wang X., Cao L., Deng C.-X. (2007) Cell Death Differ. V.14. N.3. P.472-479; Chen W.-F, Huang M.-H, Tzang C.-H, Yang M, Wong M.-S. (2003) Biochim. Biophys. Acta. V.1638. N.2. P.187-196].

Прототипом заявляемого средства является растительный компонент - изофлавоноид генистеин, который в сочетании с 5-фтороурацилом способствует индуцированию клеточного апоптоза клеток рака толстой кишки HT-29 [Фазлул Х., Саркар и Ивей Ли, Cancer Res., 2006; 66: (7), April 1, review].

Задачей изобретения является расширение арсенала противоопухолевых средств.

Поставленная задача достигается применением сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской в качестве противоопухолевого средства в отношении клеток рака кишечника HT-29 и DLD-1.

Средство представляет собой высушенный под вакуумом спиртовой экстракт, полученный из измельченной ядровой древесины этого растения, и состоит из растительных полифенолов, обладающих гепатозащитным действием [RU Патент №2104027 C1, 10.02.1998].

Сухой экстракт ядровой древесины маакии амурской зарегистрирован в качестве субстанции (Р №003309/01 от 12.04.2004 г.) для приготовления лекарственного средства «Максар® таблетки, покрытые оболочкой, 60 мг» (Р №003294/01 от 12.04.2004 г.), применяемого для лечения хронических гепатитов [RU 2175237 C2, 27.10.2001].

Известно применение препарата маакии амурской экстракт сухой в качестве гемореологического и антитромбоцитарного средства [RU 2342944 C1, 10.01.2009].

Использование сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской в качестве противоопухолевого средства в отношении клеток рака кишечника в доступной патентной и другой научно-технической литературе не описано. Это новое свойство известного препарата явным образом не вытекает из уровня техники. Сухой экстракт ядровой древесины маакии амурской может выпускаться в лекарственной форме и в виде биологически активных добавок для лечения и профилактики заболеваний рака

кишечника.

Новые свойства сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской были найдены экспериментальным путем.

Изобретение иллюстрируется следующими чертежами.

5 Фиг.1. Жизнеспособность DLD-1 и HT-29 клеток, обработанных сухим экстрактом ядровой древесины маакии амурской.

Фиг.2. Ингибирующее действие сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской на рост колоний клеток рака кишечника человека HT-29 (А) и DLD-1 (Б).

10 Колонии клеток рака кишечника человека были оценены с использованием обратимого микроскопа и Motic Image Plus программы. Графические данные, представленные на фигурах, проиллюстрированы имиджами.

15 Применение сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской в качестве средства, обладающего противоопухолевым действием в отношении клеток рака кишечника, иллюстрируется экспериментом.

В эксперименте использовали клеточные линии JB6 C141 (нормальные клетки кожи мышей, ATCC # CRL-2010), HT-29 (клетки рака кишечника человека, ATCC # HTB-38), DLD-1 (клетки рака кишечника человека, ATCC # CCL-221) и RPMI-7951 (клетки меланомы кожи человека, ATCC # HTB-66) из американской коллекции культур (ATCC, США) и питательные среды McCoу, RPMI 1640, MEM, VME.

20 Культивирование клеток. Нормальные клетки кожи мышей JB6 C141 культивировали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в среде MEM с добавлением 5% FBS. Клетки рака кишечника человека HT-29 и DLD-1 культивировали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в среде McCoу с добавлением 10% FBS и RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, соответственно. Клетки рака кишечника человека RPMI 7951 культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в среде MEM с добавлением 10% FBS. Все среды содержали 2 мМ L-глутамин, 100 ед/л пенициллина и 100 мкг/л стрептомицина.

30 Статистическая обработка данных проведена с использованием t-критерия Стьюдента в условиях заданной доверительной вероятности, равной 95% [программа SigmaPlot 2000, версия 6, (SPSS Inc., USA)].

Пример 1. Определение цитотоксичности заявляемого средства.

35 Для оценки цитотоксичности были использованы нормальные клетки кожи мышей JB6 C141, опухолевые клетки HT-19, DLD-1 (рак кишечника человека), RPMI-7951 (меланома человека) и применен MTS-метод. Клетки (1×10⁴/мл) рассеивали в 96-луночные планшеты и культивировали в 200 мкл соответствующей среды в инкубаторе при температуре 37°C в течение 24 часов. Затем клетки обрабатывали 40 веществами различной концентрации и инкубировали в течение 24 часов. После инкубации в лунки добавляли по 15 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолия (MTS-реагент) и помещали в инкубатор (37°C) на 4 часа. MTS-метод основан на свойстве живых клеток 45 трансформировать MTS-реагент в формазан. Количество образовавшегося формазана пропорционально количеству оставшихся в живых клеток после воздействия вещества и определяется спектрофотометрически при 492 нм. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Bio-Tek Instruments» (США).

50 Концентрации, при которых заявляемое средство проявило цитотоксичность, были следующие: 28 мкг/мл, 52 мкг/мл и 73 мкг/мл для клеток JB6 C141, DLD-1 и HT-19, соответственно. Оно не проявило цитотоксичность для клеток RPMI-7951 в концентрации до 100 мкг/мл.

Пример 2. Определение способности заявляемого средства ингибировать рост

колоний клеток рака кишечника человека и меланомы человека (метод мягкого агара).

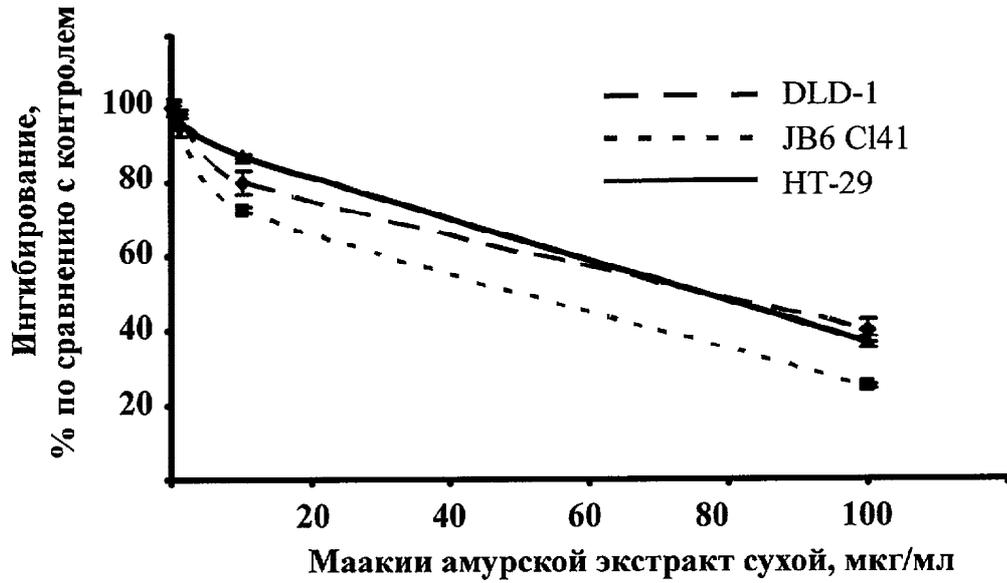
Метод мягкого агара основан на том, что раковые клетки, находящиеся в неприкрепленном состоянии в толще мягкого агара дают рост клеточных колоний, тогда как вещества, обладающие антиопухолевым действием, ингибируют рост клеточных колоний. Эксперимент был выполнен на клетках рака кишечника HT-29, DLD-1, как описано Colburn с некоторыми модификациями [Colburn, N.H. et. al. (1981) Proc Natl Acad Sci USA V.78. I.11. P.6912-6916]. Все вещества были растворены в диметилсульфоксиде (ДМСО), в качестве контроля для обработки клеток использовали ДМСО. Клетки рака кишечника человека HT-29, DLD-1 и меланомы кожи человека RPMI-7951 ($2,4 \times 10^4$ клеток/мл) были обработаны экстрактами веществ в концентрации до 7 мкг/мл в 1 мл 0,33% ВМЕ агара поверх 3,5 мл 0,5% ВМЕ агара, содержащего экстракты веществ в концентрации до 7 мкг/мл. Клетки были культивированы при 37°C, 5% CO₂ в течение 30 дней. Колонии клеток были оценены с использованием обратимого микроскопа (Motic AE 20, China) и Motic Image Plus программы (China). Для каждого вещества были выполнены два независимых эксперимента с тремя образцами для каждой концентрации.

Для определения действия заявляемого средства на рост колоний клеток рака кишечника человека и меланомы кожи человека в мягком агаре были выбраны концентрации до 7 мкг/мл, поскольку средство при концентрации 14 мкг/мл ингибировало рост колоний клеток HT-29 и DLD-1 практически на 90%. Следует отметить, что при исследованных концентрациях (до 7 мкг/мл) не наблюдалось ингибирование роста колоний клеток меланомы кожи человека RPMI-7951, что указывает на избирательное действие сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской по отношению к клеткам рака кишечника человека.

Результаты показывают, что под действием заявляемого средства в исследованном интервале концентрации происходит ингибирование роста колоний клеток рака кишечника человека DLD-1 и HT-29 по сравнению с контролем. Ингибирование роста колоний на 50% для клеток DLD-1 и HT-29 происходит при концентрациях 4,1 и 8,8 мкг/мл соответственно. Ингибирование роста колоний клеток рака кишечника человека HT-29 под действием генистеина и сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской при концентрации 14 мкг/мл составляет 48% и 87%, соответственно. Эти результаты указывают на то, что заявляемое средство обладает более сильным противоопухолевым действием по отношению к клеткам рака кишечника человека по сравнению с генистеином.

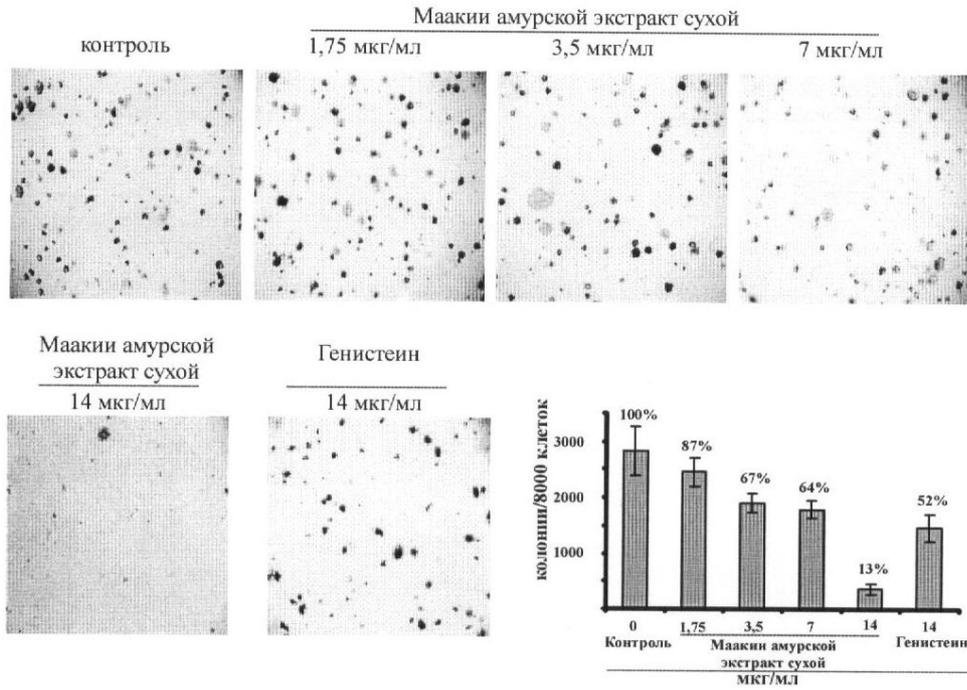
Формула изобретения

Применение сухого экстракта ядровой древесины маакии амурской в качестве противоопухолевого средства в отношении клеток рака кишечника HT-29 и DLD-1.

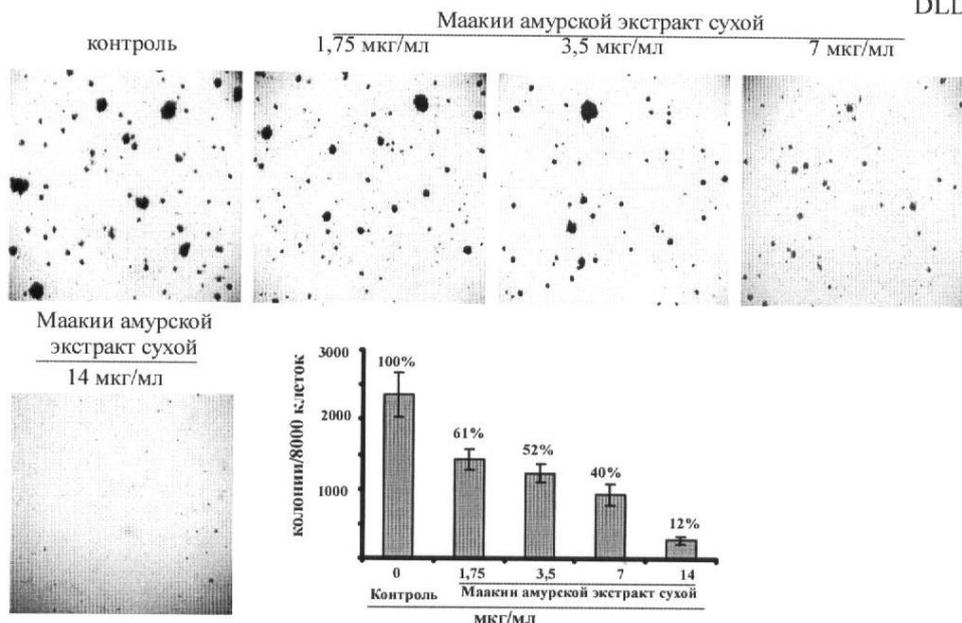


Фиг. 1

HT-29



Фиг. 2 (A)



Фиг. 2 (Б)