# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19)(11)

2 659 682<sup>(13)</sup> C1

တ

S

ဖ

ത

 $\infty$ 

(51) M<sub>П</sub>K A61K 35/616 (2015.01) A61K 36/03 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

### ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) CIIK

A61K 35/616 (2006.01); A61K 36/03 (2006.01); A61K 2121/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017129677, 21.08.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 21.08.2017

Дата регистрации: 03.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.08.2017

(45) Опубликовано: 03.07.2018 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, зав. патентным отделом Сталниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Артюков Александр Алексеевич (RU), Купера Елена Владимировна (RU), Руцкова Татьяна Анатольевна (RU), Маханьков Вячеслав Валентинович (RU), Глазунов Валерий Петрович (RU), Климович Анна Анатольевна (RU), Попов Александр Михайлович (RU), Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: JP 0010158156 A, 16.06.1998. RU 2554776 C1, 27.06.2015. CN 104855957 A, 26.08.2015.

(54) Средство на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающее канцерпревентивным действием и повышающее терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к средству на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающему канцерпревентивным действием и повышающему терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков. Средство, обладающее канцерпревентивным действием и повышающее терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков, представляет собой лецитиновую эмульсию, содержащую каротиноидный комплекс из бурых водорослей Laminaria japonica, Fucus evanescens, F. vesiculosus, включающий

фукоксантин, каротиноидный комплекс из морской звезды Patiria pectinifera, включающий астаксантин, лютеин и зеаксантин; концентрат спиртового экстракта плоских морских ежей Scaphechinus mirabilis, включающий эхинохром А, взятые в определенном соотношении. Вышеописанное средство обладает выраженным канцерпревентивным действием, способно усиливать противоопухолевое действие онкотерапии используемых В известных антибиотиков, таких как доксорубицин, при их совместном применении, а также расширяет арсенал подобных средств. 6 ил., 3 табл., 4 пр.

2

 $\infty$ တ S ဖ

A61P 35/00 (2006.01)

#### FEDERAL SERVICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY

# (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 35/616 (2006.01); A61K 36/03 (2006.01); A61K 2121/00 (2006.01)

(21)(22) Application: 2017129677, 21.08.2017

(24) Effective date for property rights:

21.08.2017

Registration date: 03.07.2018

Priority:

(22) Date of filing: 21.08.2017

(45) Date of publication: 03.07.2018 Bull. № 19

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku, 159, FGBUN Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii im. G.B. Elyakova DVO RAN, zav. patentnym otdelom Stadnichenko N.I.

(72) Inventor(s):

Artyukov Aleksandr Alekseevich (RU), Kupera Elena Vladimirovna (RU), Rutskova Tatyana Anatolevna (RU), Makhankov Vyacheslav Valentinovich (RU), Glazunov Valerij Petrovich (RU), Klimovich Anna Anatolevna (RU), Popov Aleksandr Mikhajlovich (RU), Kozlovskaya Emma Pavlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii im. G.B. Elyakova Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU)

# (54) MEANS BASED ON BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF MARINE HYDROBIONTS WITH CANCER PROTECTIVE ACTION AND INCREASING THE THERAPEUTIC ACTIVITY OF ANTITUMOR **ANTIBIOTICS**

(57) Abstract:

 $\infty$ 

9

တ

S

ဖ

2

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates the pharmaceutical industry, namely to a drug based on biologically active compounds of marine hydrobionts having a cancer-preventive effect and increasing the therapeutic activity of antitumor antibiotics. Agent possessing a cancer preventive action and increasing the therapeutic activity of antitumor antibiotics, is a lecithin emulsion containing a carotenoid complex of brown algae Laminaria japonica, Fucus evanescens, F. vesiculosus, including fucoxanthin, carotenoid complex of the starfish Patiria pectinifera, including astaxanthin, lutein and zeaxanthin; concentrate of alcohol extract of Scaphechinus mirabilis, including dollar echinochrome A, taken in a certain ratio.

EFFECT: above-described agent has a pronounced cancer protective effect, can enhance the antitumor effect of the known antibiotics used in oncotherapy such as doxorubicin, at their joint application, and also expands an arsenal of similar means.

1 cl, 6 dwg, 3 tbl, 4 ex

တ S 9 ത  $\infty$ 

N

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к средству на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающему канцерпревентивным действием и повышающему химиотерапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков.

Известны онкопрофилактические средства из водорослей, такие как «Кламин», содержащее концентрат ламинарии омыленный [RU 2034560 C1, 10.05.1995], «Фитолон» и «Фитолон-М», содержащие этиловый спирт, медные производные хлорофилла, пищевой ароматизатор и воду [RU 2031654 C1, 27.03.1995], «Фукус» содержащий экстракт фукусный, полученный из фукуса пузырчатого [RU 2116798 C1, 10.08.1998].

5

10

35

Однако ни одно из известных средств не проявляет усиленного канцерпревентивного действия.

В качестве прототипа выбрано противоопухолевое средство для профилактики и лечения рака печени, включающее фукоксантин из бурых водорослей Undaria pinnatifida, полученное путем экстракции, сухих водорослей, очистки и последующего выделения, в комплексе с другими фармацевтическими ингредиентами [JPH 10158156 A, 16.06.1987].

Однако это средство не обладает свойством повышать терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков.

Задача, решаемая изобретением, расширение арсенала средств на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающих канцерпревентивным действием и повышающих терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков.

Поставленная задача решается новым средством на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающим канцерпревентивным действием и повышающим терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков, представляющее собой лецитиновую эмульсию, содержащую каротиноидный комплекс из бурых водорослей Laminaria japonica, Fucus evanescens, F. vesiculosus, включающий фукоксантин; каротиноидный комплекс из морской звезды Patiria pectinifera, включающий астаксантин, лютеин и зеаксантин; концентрат спиртового экстракта плоских морских ежей Scaphechinus mirabilis, включающий эхинохром A, с содержанием биологически активных соединений, мас.%:

фукоксантин	1,0-1,5
астаксантин	1,0-1,5
лютеин	0,3-0,4
зеаксантин	0,2-0,4
эхинохром А	0,7-1,0

Из уровня техники не известно средство заявленного состава, обладающее канцерпревентивным действием, которое позволяет усилить канцерпревентивный эффект на модели кожного канцерогенеза in vivo. Кроме того, заявляемое средство повышает противоопухолевое действие используемых в химиотерапии известных противоопухолевых антибиотиков, таких как доксорубицин, при их совместном применении.

Заявляемое средство оказывает значительное модулирующее влияние на иммунологические процессы в организме таким способом, что стимулирует его онкопротекторные свойства; приводит к коррекции морфологических и биохимических параметров в сторону их нормализации при развитии кожного канцерогенеза; способствует снижению частоты появления новых опухолевых очагов, интенсивности роста, количества и размера опухолей у животных; улучшает клиническую картину проявления онкопатологии, увеличивая латентный период опухолевого роста.

Изобретение обеспечивает расширение арсенала средств на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающих канцерпревентивным действием и повышающих терапевтическую эффективность противоопухолевых антибиотиков.

Бурые морские водоросли Laminaria japonica, Fucus evanescens, F. vesicujosus служат богатым природным источником каротиноидов. Основная функция каротиноидов обусловлена их превращением в витамин А, который принимает активное участие в процессах внутриклеточного метаболизма, фоторецепции, регуляции пролиферации и дифференцировки. Помимо этого, каротиноиды являются фотопротекторами и антиоксидантами. Они поддерживают стабильность генома и резистентность организма к мутагенезу и канцерогенезу, проявляют адаптационно-приспособительные и антистрессорные свойства.

Фукоксантин - оксигенированный каротиноид, содержащийся преимущественно в бурых водорослях и составляющий более 10% всех природных каротиноидов. Содержание фукоксантина относительно общего количества каротиноидов в бурых водорослях составляет 51-73% для фукусовых и 78-83% для ламинариевых.

В организме фукоксантин, так же, как и его метаболиты, обладает целым рядом биологических активностей. Фукоксантин эффективен при кардиоваскулярных нарушениях, метаболическом синдроме, обладает антиоксидантными, фотопротекторными свойствами, противоопухолевой активностью [Orazio N.D., et al. // Mar. Drugs. 2012. V. 10. P. 604-616; Попов А.М. и др. // Биофармацевтический журнал. 2013. Т. 5. С. 13-30; US 2015065568 A1, 05.03.2015], оказывает противоспалительное действие [KR 20150075514 A, 06.07.2015; US 2015065568 A1, 05.03.2015].

Среди оксигенированных каротиноидов особое место занимает астаксантин. Он является сильным природным антиоксидантом. Природным источником астаксантина являются микроводоросли Наетасоссив. Ракообразные и другие морские гидробионты аккумулируют астаксантин в процессе питания. Астаксантин обладает солнцезащитными, противовоспалительными свойствами, проявляет иммуномодулирующую активность, ингибирует развитие некоторых опухолей [Попов А.М. и др. // Биофармацевтический журнал. 2013. Т. 5. С. 13-30], проявляет нейропротекторные [RU 2569743 C2, 20.10.2013] и кардиопротекторные свойства [RU 2603583 C2, 27.06.2016].

Другим распространенным каротиноидом является лютеин, который широко применяют в синергических комбинациях в качестве активного ингредиента в терапевтической противовоспалительной композиции с полифенолами и в сочетании с ликопеном в композиции для лечения гипертонии [RU 2563991 C2, 27.09.2015, RU 2459617 C2, 27.08.2012].

Еще одним широко применяемым каротиноидом является зеаксантин. Его применяют в качестве антиоксиданта [EP 1806411 A1, 11.07.2007], в составе пищевой добавки для лечения дегенерации желтого пятна сетчатки глаза [RU 2197958 C2, 10.02.2003]. Лютеин и зеаксантин нашли комплексное применение в составе специализированного липидного модуля, предназначенного для регулирования уровня липидов в крови, снижения риска развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [RU 2603583 C2, 27.06.2016], в составе антиоксидантного комплекса [RU2261631 C1, 10.10.2006], и при лечении возрастных дегенеративных патологий [GB 2503608 A, 01.01.2014].

Известен и широко применяется природный антиоксидант - эхинохром A - полигидроксинафтохинон из морских ежей вида Scaphechinus mirabilis [RU 2283298 C1, 10.09.2006]. Препараты на основе эхинохрома A применяют для лечения острого

инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, а также для лечения воспалительных заболеваний сетчатки и роговицы глаз. Экстракт морских ежей, содержащий эхинохром A, входит в состав биологически активных добавок «Тимарин» и «Хитохром С», предназначеных для профилактики атеросклероза, коронарной болезни сердца, улучшения липидного статуса крови, обеспечения антиоксидантной защиты организма

[RU 2340216 C1, 10.12.2008, RU 2360683 C1, 10.07.2009].

Раннее авторами было отмечено, что эхинохром А является стабилизатором жиров

Раннее авторами было отмечено, что эхинохром А является стабилизатором жиров и масел к окислению, участвует в предотвращении перекисного окисления липидов и жирных кислот [RU 2340216 C1, 10.12.2008].

Поскольку каротиноиды по своей природе являются нестойкими соединениями и могут быстро разлагаться под воздействием экзогенных факторов - солнечного света, кислорода воздуха, высоких температур, то эхинохром A в заявляемом средстве дополнительно используется и в качестве стабилизатора липидных составляющих.

Для получения заявляемого средства необходимо приготовить исходные компоненты. Приготовление исходных компонентов.

Получение каротиноидов из бурых водорослей.

Водоросли видов Laminaria japonica, Fucus evanescens, F. vesiculosus свежевыловленные, замороженные или высушенные, промывают питьевой водой для удаления морских солей и посторонних примесей. Воду сливают, сырье подсушивают на воздухе, измельчают и гомогенизируют. Гомогенат экстрагируют 96% этиловым спиртом при соотношении сырье : экстрагент  $1:3\rightarrow 1:5$  при комнатной температуре в течение суток. Экстракт отделяют фильтрованием или центрифугированием, разбавляют дистиллированной водой до 20-30% содержания этилового спирта и хроматографируют на ионообменном сорбенте (DEAE, TEAE, NH<sub>2</sub>-целлюлозе), уравновешенном 25%

25 этиловым спиртом.

10

15

Фракцию, содержащую каротиноиды, элюируют градиентом этилового спирта  $40\rightarrow60\%$ . Спирт отгоняют, а водный концентрат хроматографируют на гидрофобном сорбенте полихром-1, уравновешенном водой. Каротиноидный комплекс, содержащий фукоксантин, элюируют 96% этиловым спиртом. Спирт отгоняют. Полученный целевой продукт представляет собой маслянистый препарат, содержащий 80-85% фукоксантина.

На фиг. 1 представлены спектры поглощения спиртовых растворов фукоксантина с чистотой не менее 95% фирмы «Sigma» (1a) и полученного вышеописанным способом фукоксантина (1b). В спектрах присутствует полоса поглощения около 448 нм, характерная для фукоксантина.

Получение каротиноидного комплекса из морской звезды Patiria pectinifera.

Каротиноидный комплекс из морской звезды Patiria pectinifera получают согласно процедуре, описанной заявителем в патенте [RU 2469732 C1, 20.12.2012]. Целевой продукт содержит 30-50% астаксантина. Кроме того, в комплексе определено наличие лютеина в количестве 3-5% и зеаксантина в количестве 2-4%.

40 На фиг. 2 представлена ВЭЖ хроматограмма каротиноидного комплекса из морской звезды Patiria pectinifera (A), содержащего астаксантин в качестве основного компонента (1), зеаксантин (2), лютеин (3) и образца астаксантина фипмы «Sigma» (В). По оси X - время удерживания вещества, мин; Y - интенсивность поглощения (А) при 475 нм.

Получение экстракта морских ежей.

45 Концентрат экстракта морских ежей Scaphechinus mirabilis, содержащий эхинохром A, получают согласно процедуре, описанной заявителем в патенте [RU 2340216 C1, 10.12.2008]. Полученный концентрат упаривают в вакууме до полного удаления спирта и воды. Целевой продукт содержит 10-20% эхинохрома A.

Способ получение заявляемого средства.

Для получения заявляемого средства каждый полученный ингредиент необходимо перевести в растворимое состояние. В качестве растворителя используют лецитин, относящийся к эссенциальным фосфолипидам, и широко используемый в составе лекарственных препаратов, биологически активных добавок к пище, в пищевой промышленности.

Готовят растворимые формы каждого активного ингредиента в лецитине в концентрации от 20 до 45 мг/мл. Затем полученные лецитиновые эмульсии, взятые в равных массовых долях, объединяют и перемешивают в закрытой емкости с мешалкой или гомогенизаторе при комнатной температуре до получения однородного препарата, который содержит 1,0-1,5% фукоксантина, 1,0-1,5% астаксантина, 0,3-0,4% лютеина, 0,2-0,4% зеаксантина, 0,7-1,0% эхинохром A.

Готовый продукт капсулируют в желатиновые капсулы, исходя из рекомендуемой суточной дозы 4-6 мг активных компонентов на прием.

Состав продукта подтвержден методом ВЭЖХ.

На фиг. 3 представлена ВЭЖ хроматограмма заявляемого средства, содержащего эхинохром (1), фукоксантин (2), астаксантин (3), зеаксантин (4) и лютеин (5). По оси X - время удерживания вещества, мин; Y - интенсивность поглощения (A) при 475 нм.

Экспериментально установлено, что заявляемое средство обладает высокой биологической активностью, а именно: в результате его применения наблюдается выраженная нормализация патологических процессов, индуцированных введением канцерогенного агента - 7,12-диметил-5,6-бензантрацен (ДМБА) при экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза. Канцерпревентивное действие заявляемого средства сравнимо с активностью розмариновой кислоты (РК), взятой в качестве вещества сравнения на данной модели [Sharmila R., Manoharan S. // Indian J. Exp.Biol. 2012. V. 50(3). P. 187-194].

При экспериментальном моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха установлено, что применение заявляемого средства совместно с противоопухолевым антибиотиком доксорубицином, увеличивает противоопухолевый эффект доксорубицина, повышая продолжительность жизни экспериментальных животных.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения. Пример 1. Токсикологические исследования.

Опыты по определению острой токсичности исследуемого средства и расчет LD50 проводили по методу Кербера. Лабораторные животные были рандомно разделены на 4 группы: 1-250 мг/кг, 2-125 мг/кг, 3-50 мг/кг, 4-25 мг/кг, по пять мышей в каждой. Средство, в указанных дозах, вводили животным однократно внутрижелудочно в виде водной суспензии в объеме 0,2 мл. После введения исследуемого средства за каждым животным велось наблюдение через 1, 2, 6, 24 часа и далее ежедневно, в общей сложности на протяжении 10 дней. В ходе наблюдения учитывали изменение поведенческих реакций, внешнего вида, состояния шерстяного покрова, частоты дыхания, аппетита, моторики. После окончания эксперимента все животные подвергались общему вскрытию с дальнейшей визуальной оценкой патологических изменений внутренних органов.

В данном опыте ни в одной группе не было зафиксированно гибели животных, из за чего не представлялось возможным рассчитать ЛД50. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 Результаты тестирования токсических свойств заявляемого средства

Группы	Доза, мг/кг.	Животные		
		Количество животных, шт.	выжило	погибло
1	250	5	5	0
2	125	5	5	0
3	50	5	5	0
4	25	5	5	0

Также в период наблюдения не было отмечено никаких объективных признаков острой интоксикации.

Результаты проведенных работ и подробного клинического осмотра экспериментальных животных говорят об отсутствии у заявляемого средства токсических для организма свойств.

Пример 2. Фармакологические исследования канцерпревентивной активности заявляемого средства на модели кожного канцерогенеза.

Для оценки канцерпревентивной активности заявляемого средства в качестве экспериментальной модели был использован метод химического канцерогенеза, индуцируемого у животных сильным канцерогенным веществом ДМБА, согласно [Farnoush A., Mackenzie I.C.// J. Oral Pathology & Medicine. 1983. V. 12. P. 300-306].

Исследования проводили на мышах-самках линии CD-1. Животные были подразделены на четыре группы по 10-12 голов в каждой:  $K_{(II)}$  - интактные, K(-) - канцерогенные (отрицательный контроль), C - канцерогенные, получавшие заявляемое средство, PK - канцерогенные, получавшие розмариновую кислоту (положительный контроль). ДМБА использовали в дозе 10 мкг на мышь. Исследуемые препараты вводили перорально в дозе 10 мг/кг в объеме 0,2 мл одновременно с аппликацией канцерогена.

Морфологические исследования канцерпревентивной активности на экспериментальной модели кожного канцерогенеза, индуцированного ДМБА.

При моделировании in vivo кожного канцерогенеза после появления первых папиллом еженедельно оценивали следующие параметры: количество животных с опухолью, количество папиллом в каждой группе, размер папиллом и латентный период (период между появлением первых признаков развития опухоли до появления 50% животных с опухолью в группе), который рассчитывали по формуле

 $\Pi\Pi=\Sigma FX/N$ ,

где F - количество опухолей, появившихся за неделю;

Х - количество недель, на момент учета;

N - суммарное количество опухолей.

Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели канцерпревентивного потенциала заявляемого средства при моделировании кожного канцерогенеза, индуцированного ДМБА

45

40

5

№	Исследованные группы	Количество животных с опухолью, %	Общее количество опухолей на группу, шт.	Средний размер опухоли, (диаметр в мм)	Средний латентный период, недели
1	K(-)	100	27	$4,4 \pm 1,6$	$4,2 \pm 2,9$
2	PK	70	15	$3,5 \pm 0,9$	4,6 ± 1,1
3	С	60	13	3,0 ± 1,01	5,1 ± 2,7

Примечание: морфологические показатели в исследованных экспериментальных группах зафиксированы на 15 неделе эксперимента.

5

На фиг. 4 представлены данные по изменению количества животных с опухолью (4A) и размеры опухоли у экспериментальных животных (4 B) с момента появления первых изменений на участке кожи животных, подвергнутой обработке ДМБА (спустя 5 недель после первой аппликации канцерогена). Исследованные группы: К(-) - отрицательный контроль, РК - розмариновая кислота, С - заявляемое средство.

При моделировании in vivo кожного канцерогенеза было показано, что профилактическое применение заявляемого средства способствовало снижению интенсивности развития патологических процессов, индуцированных аппликацией ДМБА на кожу экспериментальных животных. Установлено, что первые полноценные опухолевые очаги были зафиксированы через 7 недель после первой аппликации канцерогена: в группе К(-) у 30% животных, а в группах, прошедших курс лечения розмариновой кислотой РК и заявляемым средством, только у 20% (фиг. 4A). Следует отметить, что если в группе К(-) на 8 неделе эксперимента количество мышей с размером папиллом около 3 мм достигло 50%, то в опытных группах количество животных с опухолью достигло 50% только к 10 неделе эксперимента, а размер папиллом не превышал 2,5 мм (фиг. 4B).

До 13 недели количество животных с опухолью продолжало интенсивно увеличиваться, достигая в группе K(-) - 100%, а в группах РК и С - 60% (фиг. 4A). К данному сроку в группе K(-) размеры папиллом составляли в среднем 4 мм, а в группах РК и С - менее 3 мм (фиг. 4 В). Установлено, что в группе, прошедшей профилактическое лечение заявляемым средством, к 11 неделе образование новых опухолевых очагов практически полностью прекращалось.

Таким образом, в группах экспериментальный животных, прошедших курс лечения заявляемым средством и розмариновой кислотой, наблюдался выраженный канцерпревентивный эффект. Применение заявляемого средства замедляет частоту появления новых опухолевых очагов и интенсивность роста новообразований. Как видно из данных, приведенных в таблице 2, в группе животных, пролеченных заявляемым средством, количество и размер папиллом были более чем в 1,5 раза ниже, чем в группе К(-). Более того, лечение данным препаратом способствовало небольшому увеличению латентного периода опухолевого роста.

Пример 3. Биохимические исследования канцерпревентивной активности на экспериментальной модели кожного канцерогенеза, индуцированного ДМБА.

Опухолевый рост приводит к угнетению иммунной системы вследствие онкозависимой иммунносупрессии на стадии прогрессивного роста опухоли, что затрудняет противоопухолевый иммунный ответ со стороны защитных систем организма [Talero E., Garcia-Maurino S., Avila-Roman J., et al. // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 6152-6209].

Для оценки функционального состояния иммунной системы в каждой группе экспериментальных животных проводили анализ продукции провоспалительных и

противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и гомогенате кожи методом иммуноферментного анализа сэндвич-типа с помощью диагностических наборов BD Bioscience OptEIA US..

На фиг. 5 приведены данные по определению уровня провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 - интерлейкин-1, ИЛ-17 - интерлейкин-17, ИФН- $\gamma$  - интерферон-гамма, ФНО- $\alpha$  - фактор некроза опухоли и противовоспалительных цитокинов: ИЛ-4 -интерлейкин-4, ИЛ-10 - интерлейкин-10, в гомогенате кожи (5A) и сыворотке крови (5B) животных, при экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза. По оси ординат обозначена концентрация цитокинов в 1 мл биообразца. К - интактный контроль; К(-) - отрицательный контроль, РК - розмариновая кислота, С - заявляемое средство.

Забор образцов тканей для биохимических исследований проводили на 15 неделе эксперимента.

Сравнительный анализ уровня цитокинов в сыворотке крови и гомогенатах кожи показал, что в группе К(-) в гомогенатах кожи, обработанной канцерогеном, наблюдалось существенное снижение уровня как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов по сравнению с интактными животными. Однако в сыворотке крови мышей изменение уровня исследуемых цитокинов было незначительным.

Прием заявляемого средства, так же как и РК, значительно повышало уровень всех исследуемых цитокинов в гомогенатах кожи экспериментальных животных по сравнению с группой К(-), за исключением ИЛ-4. Полученные данные свидетельствуют о способности препарата модулировать иммунологические реакции при поражениях кожи, вызванных ДМБА.

Липидная пероксидация в результате окислительного стресса вовлечена во все стадии роста и развития опухоли. Состояние антиоксидантной системы защиты у экспериментальных животных определяли по накоплению вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), количество которых выражали в виде концентрации малонового деальдегида (МДА) на единицу веса белка [Медицинские лабораторные технологии: Справочник/ Под ред. Карпищенко А.И. СПб.: Интермедика, 1999].

На фиг. 6 представлены данные по содержанию МДА (ось ординат) в сыворотке крови животных, при экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза. К (интактный) - интактный контроль, K(-) - отрицательный контроль, PK - розмариновая кислота, C - заявляемое средство.

Анализ данных по содержанию МДА в сыворотке крови животных показал, что в группе К(-) уровень МДА возрастает примерно в 1,5 раза по сравнению с группой интактных животных. В группе, прошедшей курс лечения заявляемым средством, наблюдается снижение данного биохимического показателя до нормальных значений.

35

Таким образом, можно заключить, что заявляемое средство обладает выраженным защитным действием при экспериментальном кожном канцерогенезе, вызванном ДМБА.

Пример 4. Оценка сочетанной противоопухолевой активности заявляемого средства с доксорубицином.

Противоопухолевую активность заявляемого средства при его сочетанной терапии с известным противоопухолевым препаратом доксорубицином исследовали на экспериментальной моделе асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха по продолжительности жизни лабораторных животных разных экспериментальных групп: K(-) - отрицательный контроль; C - заявляемое средство; ДР - доксорубицин; ДР + С - доксорубицин, применяемый совместно с заявляемым средством.

Для инокуляции опухоли внутрибрюшинно вводили по 3 млн. клеток на мышь. Доксорубицин вводили в дозе 0,25 мг/кг внутрибрюшинно, а заявляемое средство использовали в дозе 10 мг/кг в водном растворе перорально. Курс лечения препаратами составлял пять дней. Спустя неделю после курса лечения препаратами, вели еженедельное наблюдение за экспериментальными животными в течение 70 суток. По окончании периода наблюдения производили расчет средней продолжительности жизни и выживаемости (количество выживших животных) каждой группы животных.

В результате исследования было показано, что лечение ДР повышало среднюю продолжительность жизни мышей опухоленосителей примерно в 3 раза относительно группы К(-). Заявляемое средство самостоятельно не проявляет заметного противоопухолевого действия и не влияет на рост опухоли. Однако применение ДР в сочетании с заявляемым средством усиливало противоопухолевое действие препарата, увеличивая среднюю продолжительность жизни экспериментальных животных относительно группы животных, проходивших монотерапию ДР. Кроме того, по истечении 70 суток было зафиксировано, что в группе ДР + С выживаемость животных была в 1,5 раза больше, чем в группе ДР. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 Выживаемость животных (в % от общего количества животных в группе) и средняя продолжительность жизни животных опухоленосителей в разных экспериментальных группах

20

25

30

35

45

N	Группа	Средняя продолжительность жизни, сутки	Выживаемость, %
1	К(-)	21± 1,3	0
2	ДР	58,1±2,9	44
3	С	21,6± 1,7	0
4	ДР + С	63,2± 3,1	60

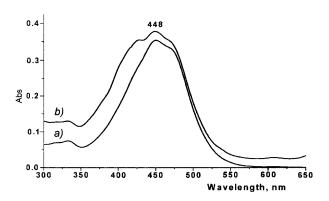
Таким образом, заявляемое средство является перспективным дополнительным средством для лечения онкологических заболеваний при его комбинированной терапии с известными противоопухолевыми антибиотиками, такими, как доксорубицин.

# (57) Формула изобретения

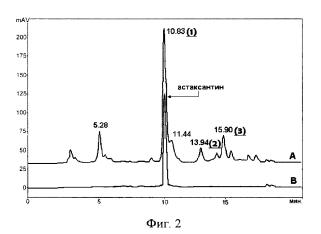
Средство на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающее канцерпревентивным действием и повышающее терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков, представляющее собой лецитиновую эмульсию, содержащую каротиноидный комплекс из бурых водорослей Laminaria japonica, Fucus evanescens, F. vesiculosus, включающий фукоксантин; каротиноидный комплекс из морской звезды Patiria pectinifera, включающий астаксантин, лютеин и зеаксантин; концентрат спиртового экстракта плоских морских ежей Scaphechinus mirabilis, включающий эхинохром A, с содержанием биологически активных соединений, мас.%:

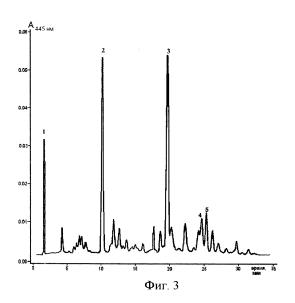
фукоксантин	1,0-1,5
астаксантин	1,0-1,5
лютеин	0,3-0,4
зеаксантин	0,2-0,4
эхинохром А	0,7-1,0

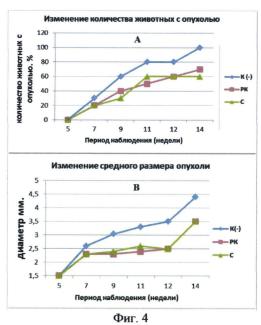
1



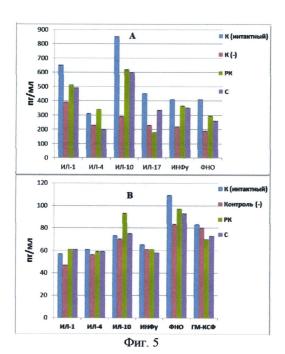
 $\Phi$ иг. 1



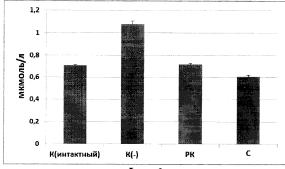








3



Фиг. 6