

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037463**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.31

(21) Номер заявки
201590637

(22) Дата подачи заявки
2013.09.16

(51) Int. Cl. **A61K 35/74** (2015.01)
A61K 36/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ЭКСТРАКТОВ ГАЛОБАКТЕРИЙ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ РАЗМЕРОВ ОПУХОЛИ

(31) 222128; 61/708,655

(32) 2012.09.24; 2012.10.02

(33) IL; US

(43) 2015.08.31

(86) PCT/IL2013/050785

(87) WO 2014/045279 2014.03.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДР. НОНА ИНТЕРНЭШНЛ ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
Кучина Нона (IL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KUCHINA NONA. "DEAD SEA - THE SOURCE OF LIFE AND HEALTH". <http://drnona.com/files/editors/Doc/lenom6.pdf>. 23 Sep 2005 (2005/09/23) Pages 7-9, 11, 13
Gurevich, P.; Levdansky, L.; Gorodetsky, R.; Kuchina, N.; Vexler, A. "Effect of homogenate from Dead Sea Halobacterium on proliferation and survival of normal and tumor cells following the treatment with ionizing radiation or H₂O₂". Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost (2002), 47(6), pp. 15-20. http://www.rpcmr.org.ru/mrrp/mrrp02_6.htm (abstract) 31 Dec 2002 (2002/12/31)
The whole document
US-A-5536419
RU-C1-2109515
US-A-5948823

(57) В изобретении предлагаются композиция и способ лечения солидных опухолей у млекопитающего посредством усиления действия лучевой терапии. Композиция, представляющая собой экстракты галобактерий и экстракты водоросли *Dunaliella*, которые содержат антиоксиданты, включает: (a) по меньшей мере одну водорастворимую фракцию и (b) по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию, при этом вышеуказанные экстракты совместно в качестве композиции адаптированы для терапевтического лечения с целью уменьшения размеров солидных опухолей. Кроме того, композиция, включающая экстракт галобактерий и экстракт *Dunaliella*, адаптирована для усиления действия лучевой терапии солидной опухоли *in vitro* и *in vivo*.

B1

037463

037463 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение касается композиции для терапии опухолевых клеток с использованием комбинации экстрактов галобактерий и экстрактов водоросли *Dunaliella*. В частности, настоящее изобретение относится к композиции, включающей галобактерий и водоросли *Dunaliella*, которая предназначена для усиления воздействия лучевой терапии и одновременного уменьшения количества опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Уровень техники

Галобактерий известны как галофильные микроорганизмы. Данный тип архебактерий может служить хорошей моделью для некоторых аспектов биологии эукариот, таких как репликация, транскрипция и трансляция ДНК. Сравнение гена галофилов с другими прокариотами должно дать представление об адаптации микробов к экстремальным условиям.

Галобактерий являются чрезвычайно облигатными бактериями. Они требуют для своего роста очень высокие концентрации соли (от 10 до 30%), KCl, MgCl₂ и в особенности NaCl. Данные организмы выделяют из природных сред. Для поддержания их внутреннего осмотического давления, которое должно находиться в равновесии с концентрацией NaCl в среде, галобактерий аккумулируют в своей цитоплазме от 3 до 4M соли в виде KCl. Суспендирование галобактерий в среде, содержащей концентрацию 2M NaCl, вызывает полную потерю жесткости бактериальной оболочки, и затем бактерии принимают круглую форму. Уменьшение концентрации соли ниже 1M приводит к лизису бактерий.

Колонии галобактерий окрашены в красный цвет, поскольку их оболочки содержат окрашенные пигменты (бактериоруберины), которые защищают бактерии от интенсивного ультрафиолетового излучения, которому они подвергаются. Галобактерий содержат пигмент, галородопсин, который перекачивает ионы хлора в клетку в ответ на фотоны, создавая градиент напряжения и помогая в получении энергии из света. Тем не менее, указанный процесс не имеет отношения к другим формам фотосинтеза с участием транспорта электронов, и галобактерий не способны связывать углерод из углекислого газа. Обычной формой галобактерий в богатой солями среде являются продолговатые палочки от 4 до 10 мкм в длину и 0,7 мкм в диаметре. Данная бактерия имеет от 5 до 8 лоботрихальных жгутиков. Галобактерия *Halobacterium halobium* не способна использовать углеводы в качестве источника углерода и энергии.

Известно, что разнообразные экстракты галобактерий обладают полезными косметическими свойствами, в частности, для лечения рубцов от ожогов или различных типов язв, в качестве композиций для местного применения, таких как молочко, крем, лосьон, сыворотка, маска или гель.

Таким образом, остается неудовлетворенной давняя потребность в разработке средств и способов для облегчения лечения пролиферативных заболеваний.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей а) экстракт галобактерий, содержащий по меньшей мере, одну водорастворимую фракцию и по меньшей мере, одну маслорастворимую фракцию, и б) экстракт *Dunaliella*, для усиления действия лучевой терапии солидной опухоли.

Настоящее изобретение также относится к способу усиления действия лучевой терапии солидной опухоли у млекопитающего, включающий введение пероральной дозированной формы, содержащей а) экстракт галобактерий, содержащий по меньшей мере, одну водорастворимую фракцию и по меньшей мере, одну маслорастворимую фракцию, б) и дополнительно содержащей экстракт *Dunaliella*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный экстракт галобактерий присутствует в количестве от приблизительно 2,5% до приблизительно 10 мас.% и содержит терапевтическую дозу гомогената галобактерий DN-1 (гомогенат галофильных архебактерий).

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное усиление действия определяется как:

- а) по меньшей мере на 50% более высокая чувствительность раковых клеток к радиоактивному облучению при проведении лучевой терапии в отношении увеличения радиационного повреждения опухолевых клеток в условиях *in vitro*;
- б) более высокая радиочувствительность к лучевой терапии у пациентов в отношении более выраженной регрессии опухолей; и
- с) увеличение продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанную композицию вводят перорально в форме, выбранной из группы, состоящей из таблеток, капсул, твердых таблеток в форме капсул или любых подходящих пероральных форм.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный экстракт галобактерий содержит:

- а) DN-1(I) - гомогенат, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl, приводит к регрессии приблизительно 10% опухолевых клеток и к выживаемости менее чем 10% опухолевых клеток после облучения с дозой больше, чем 16 Гр;
- б) DN-1(II) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl, приводит к регрессии приблизительно 10% опухолевых клеток и к выживаемости менее чем 10% опухолевых клеток после облучения с дозой больше, чем 10 Гр; и
- с) DN-1(III) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl, приводит к регрессии приблизительно 10% опухолевых клеток и к выживаемости менее чем

10% опухолевых клеток после облучения с дозой больше, чем 10 Гр.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная композиция:

- a) оказывает модифицирующее действие на радиочувствительность к поглощенной дозе гамма-излучения, равной 5 и 10 Гр;
- b) воздействует на радиочувствительность опухолевых клеток, облученных в суспензии, и приводит к явно выраженной регрессии опухолевых клеток и к увеличению продолжительности жизни млекопитающих;
- c) увеличивает радиационное повреждение опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*;
- d) уменьшает пролиферацию опухолевых клеток; и
- e) вызывает эффект подавления роста злокачественных клеток, при этом указанный эффект возрастает пропорционально концентрации DN-1 и длительности лечения.

Краткое описание изобретения

Для того, чтобы облегчить понимание настоящего изобретения и выяснить, каким образом оно может быть осуществлено на практике, подготовлено несколько вариантов его выполнения, которые далее будут описаны в виде не ограничивающих настоящее изобретение примеров со ссылкой на прилагаемые чертежи, где

на фиг. 1 представлен график выживаемости клеток меланомы B-16, облученных в суспензии в условиях *in vitro*, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 2 представлен график динамики роста меланомы B-16 мышей после локальной поглощенной дозы 25 Гр гамма-облучения в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 3-4 представлены графики динамики роста солидной ELD карциномы после локальной поглощенной дозы 25 Гр гамма-облучения в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 5 представлен график выживаемости мышей с меланомой B-16 после локального гамма-облучения в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 6 представлен график выживаемости мышей с опухолью ELD после локального гамма-облучения в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 7 представлен график выживаемости клеток V-79, облученных в суспензии в условиях *in vitro*, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Следующее описание приведено с целью помочь любому специалисту в данной области техники использовать настоящее изобретение, и устанавливает лучшие режимы, предлагаемые авторами настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Тем не менее, различные модификации станут очевидны специалистам в данной области техники, поскольку общие принципы настоящего изобретения определены специально для археобактерий DN-1 и экстрактов, пригодных для усиления влияния лучевой терапии и параллельно для уменьшения количества опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Настоящее изобретение относится к препарату, который включает в себя экстракт археобактерий DN-1, содержащий сильные антиоксиданты, которые растворены в масле и в воде. Кроме того, препарат оказывает широкое действие на восстановление кожи. Экстракт археобактерий DN-1 назначается перорально.

Термин "галообактерий", "археобактерий", "галофильные архегалообактерий", используемый в данном описании, следует также понимать как археобактерию *Halobacterium halobium*.

Галообактерии считаются скорее археобактериями, а не бактериями. Название "галообактерий" было определено для этой группы организмов до того, как был обнаружен домен Archaea, и остается в силе в соответствии с таксономическими правилами. Помимо таксономического контекста, галофильные археи иногда также называют галообактериями, чтобы отличить их от галофильных бактерий.

Галообактерии уникальны тем, что они осуществляют фотосинтез без хлорофилла. Вместо этого их фотосинтетическими пигментами являются бактериородопсин и галородопсин. Указанные пигменты аналогичны сенсорному родопсину, пигменту, который используется у людей и других животных для зрения. Бактериородопсин и галородопсин встроены в клеточные мембраны галообактерий, и каждый пигмент состоит из ретиналя, производного витамина А, связанного с белком. Облучение указанных пигментов вызывает структурные изменения в их ретинале. Указанный процесс называют фотоизомеризацией.

Фотоизомеризация ретиналя приводит к синтезу АТФ. Галообактерии имеют два дополнительных родопсина, сенсорный родопсин-I и сенсорный родопсин-II. Указанные соединения регулируют фототаксис, направленное движение в ответ на свет.

Галообактерии являются чрезвычайно облигатными бактериями. Они, действительно, требуют для своего роста очень высокие концентрации соли (от 10 до 30%), KCl, MgCl₂ и в особенности NaCl. Указанные организмы выделяют из природных сред или искусственных сред (солеварни). Для поддержания их внутреннего осмотического давления, которое должно находиться в равновесии с концентрацией

NaCl в среде, галобактерий аккумулируют в своей цитоплазме от 3 до 4M соли в виде KCl. Суспендирование галобактерий в среде, содержащей концентрацию 2M NaCl, вызывает полную потерю жесткости бактериальной оболочки, и затем бактерии принимают круглую форму. Уменьшение концентрации соли ниже 1M приводит к лизису бактерий. Колонии галобактерий окрашены в красный цвет, поскольку их оболочки содержат окрашенные пигменты (бактериоруберины), которые защищают бактерии от интенсивного ультрафиолетового излучения, которому они подвергаются.

Препараты, которые содержат антиоксиданты, оказывают положительное влияние на больных, проходящих курс лучевой терапии, а также помогают пациентам в случае осложнений при лучевой терапии (воспаление слизистых оболочек).

DN-1 содержит две группы антиоксидантов - растворимые в воде и растворимые в масле, так что он представляет собой антиоксидант, содержащий экстракт, оказывающий широкий спектр действия на восстановление тела после облучения, ран, ожогов, пролежней и рубцов после хирургических операций.

В настоящем изобретении также доказывается способность гомогената галобактерий DN-1 усиливать радиационное повреждение клеток солидной опухоли в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Солидные опухоли могут быть доброкачественными и злокачественными. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы как правило, не образуют солидных опухолей.

Саркомы представляют собой злокачественные опухоли, образованные из соединительных тканей организма, таких как кости или мышцы. Данный тип солидной опухоли классифицируют как низкодифференцированный, среднедифференцированный и высокодифференцированный в зависимости от клеточных характеристик онкологического заболевания.

Низкодифференцированные саркомы обычно лечат путем хирургического вмешательства. Среднедифференцированные и высокодифференцированные саркомы, как правило, лечат с использованием сочетания хирургии, химиотерапии и лучевой терапии.

Карциномы возникают в клетках железистого эпителия и эпителиальных клетках организма. Указанные клетки выстилают дыхательные пути и желудочно-кишечный тракт в организме. Адренокортикальные карциномы возникают в коре надпочечников, которые продуцируют гормоны, помогающие организму работать должным образом. Тироидные карциномы возникают в щитовидной железе, которая вырабатывает гормоны, оказывающие влияние на частоту сердечных сокращений, температуру тела, запас энергии и уровень кальция. Другие карциномы включают карциному носоглотки, которая влияет на верхнюю часть гортани, и карциному кожи.

Лимфомы возникают в лимфоидных органах, которые включают лимфатические узлы, селезенку и вилочковую железу. Указанные органы ответственны за продуцирование и хранение клеток, которые помогают организму бороться с инфекцией. Лимфомы являются наиболее распространенной формой рака крови в развитых странах мира и составляют 5,3% из всех случаев онкологических заболеваний в Соединенных Штатах.

Не существует четких симптомов для солидной опухоли из-за широкого разнообразия органов, где она может развиваться. Симптомы, которые ощущает человек, зависят от того, на какой орган нацелена злокачественная опухоль, где в данном органе находится солидная опухоль, зависят от скорости роста раковых клеток и от того, распространился ли рак на другие органы (метастазирование).

Лечение солидных опухолей зависит от ряда факторов, включая расположение злокачественной опухоли, стадии ее развития и состояние здоровья пациента. Другие возможности удаления опухоли, помимо хирургического вмешательства, включают химиотерапию и лучевую терапию.

Лекарственные формы композиции галобактерий по настоящему изобретению включают пилюлю, таблетку, капсулу, натуральную форму или любую подходящую твердую пероральную форму. Следует отметить, что способ введения (ROA) для доставки лекарственного средства зависит от лекарственной формы активного вещества.

Композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать экстракты водоросли *Dunaliella*. *Dunaliella salina* представляет собой тип зеленой галофильной микроводоросли, которая, в частности, обнаруживается на промыслах морской соли. Известно, что *Dunaliella* обладает антиоксидантной активностью благодаря способности продуцировать большое количество каротиноидов.

При выращивании в определенных условиях микроводоросли *Dunaliella*, галотолерантные зеленые водоросли, накапливают большие концентрации α -каротина. Микроводоросли *Dunaliella* обладают способностью накапливать в определенных условиях очень большие количества β -каротина (более 10% от сухой массы водорослей). Было показано, что степень накопления β -каротина прямо зависит от суммарного количества света и высокой концентрации NaCl, которым водоросли подвергаются во время цикла деления.

β -Каротин обладает мощными противораковыми свойствами. Он снижает количество вредных свободных радикалов в организме, которые в противном случае могут повредить ДНК, что, в свою очередь, вызывает косметические проблемы, такие как морщины, а в качестве более серьезной характерной черты, могут увеличить риск развития у субъекта онкологического заболевания. Как известно, *Dunaliella*

оказывают непосредственное влияние на иммунные клетки.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения клеточная мембрана водорослей рода *Dunaliella* становится гидрофобной, когда водоросли контактируют с растворами хлорида натрия, имеющими концентрацию приблизительно 3М или выше, и подобное поведение позволяет водорослям адсорбироваться на веществах, имеющих гидрофобную поверхность; тем самым создаются условия, при которых водоросли могут быть быстро и экономично отделены и выделены из солевой среды, в которой они были выращены. Было обнаружено, что при более низких концентрациях хлорида натрия, которые обнаруживаются в морской воде, на поверхности клеточной мембраны доминируют полярные группы, и она не является гидрофобной и, следовательно, водоросли не будут адсорбироваться или оставаться адсорбированными на гидрофобной поверхности.

Микроводоросль *Dunaliella* дополнительно содержит каротиноид, называемый зеаксантином, который представляет собой ценный антиоксидант, способный помочь как предотвратить, так и лечить тяжелое протекающее состояние, которое вызывает прогрессирующую потерю зрения.

Сочетание *Dunaliella* и галобактерий еще более усиливает действие лучевой терапии и параллельно сокращает количество опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*.

В определенной выше композиции по настоящему изобретению композиция антиоксидантов оказывает синергический терапевтический эффект на чувствительность субъектов к радиоактивному облучению в отношении уменьшения размеров солидной опухоли.

В определенной выше композиции по настоящему изобретению синергическое действие определяется как, по меньшей мере, 50%-ное повышение радиочувствительности при лучевой терапии раковых клеток в отношении увеличения радиационного повреждения опухолевых клеток в условиях *in vitro*.

В определенной выше композиции по настоящему изобретению синергический эффект определяется как более высокая радиочувствительность пациентов при лучевой терапии в отношении более выраженной регрессии опухолей.

В определенной выше композиции по настоящему изобретению синергическое действие определяется как увеличение продолжительности жизни, по сравнению с контрольной группой. Вышеуказанную композицию по настоящему изобретению назначают перорально.

Вышеуказанную композицию по настоящему изобретению назначают перорально, при этом композиция находится в форме, выбранной из группы, которая включает: таблетки, капсулы, твердые таблетки в форме капсул или любые подходящие пероральные формы.

В определенной выше композиции по настоящему изобретению экстракт галобактерий, гомогенат галобактерий DN-1, оказывает модифицирующее действие на радиочувствительность к гамма-облучению с дозой 5 и 10 Гр.

Примеры

На фиг. 1-7 показано влияние гомогената галобактерий DN-1 на радиочувствительность опухолевых клеток, облученных в суспензии.

Клетки меланомы B-16 мыши и клетки V-79 китайского хомячка подвергают гамма-облучению в суспензии в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Мышей делят на различные группы, при этом одну группу тестируют без добавления DN-1 или через 15 мин после добавления к суспензии 10%-ного DN-1, который готовят с различной концентрацией клеток галобактерий или с различной концентрацией растворов NaCl: концентрация NaCl 3,5% и концентрации NaCl 7%. Способность клеток формировать видимые колонии, клоногенность, является критическим параметром и ее рассматривают как способность клеток к выживанию.

Данную методику применяют для экстракции галобактерий. Она основана на слабости клеточных оболочек данных микроорганизмов, когда они подвергаются воздействию низких концентраций солей, например, в пресной воде; в указанных условиях клетки галофильных бактерий подвергаются лизису (разрушаются), высвобождая в среду все клеточные компоненты.

Следующие примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, тем не менее, они не ограничивают настоящее изобретение.

In vitro.

Настоящее изобретение раскрывает эффект препарата DN-1 на пролиферацию интактных и облученных злокачественных и нормальных клеток в условиях *in vitro*. DN-1 представляет собой гомогенат галобактерий, приготовленный в 7,5%-ном растворе NaCl.

Эффект 0,13% DN-1 в среде для роста на скорость деления клеток изучают для опухолевых клеток мыши: клеток меланомы B-16, клеток карциномы легких Льюиса и клеток EMT-6 карциномы молочной железы, а также клеток HT-29 карциномы ободочной кишки человека и эпителиальных клеток кишечника эмбриона человека. Модифицирующее действие DN-1 на чувствительность к радиоактивному облучению оценивают для нескольких клеточных линий в экспериментах с дозой гамма-облучения 5 и 10 Гр.

Более ранние данные нескольких авторов, указывающие на подавление роста злокачественных клеток под действием DN-1, подтверждены в двух клеточных линиях. Указанный эффект усиливается пропорционально концентрации DN-1 и продолжительности лечения. Тем не менее, клетки EMT-6 являются исключением, и скорость их деления не зависит от DN-1 в указанной концентрации.

Добавление 3% DN-1 в среду за 1 ч до и в процессе гамма-облучения повышает смертность от радиации клеток карциномы легкого Льюиса, меланомы В-16 и НТ-29 карциномы толстого кишечника человека, но не модифицирует повреждение эпителиальных клеток нормального кишечника человека. DN-1 в значительной степени ингибирует пролиферацию двух типов опухолевых клеток мыши в условиях *in vitro*: клеток В-16 и клеток карциномы легких Льюиса, но не влияет на пролиферацию клеток ЕМТ-6. Введение DN-1 в питательную среду за один час до и во время облучения существенно увеличивает радиационное повреждение опухолевых клеток человека (НТ-29), не изменяя чувствительность нормальных клеток аналогичного происхождения.

Эффект гомогената галобактерий DN-1 дополнительно проявляется в радиочувствительности опухолевых клеток, облученных в суспензии. Клетки В-16 меланомы мыши и клетки V-79 китайского хомячка подвергают гамма-облучению в суспензии без добавления DN-1 или через 15 мин после добавления в суспензию 10%-ного DN-1, который получают с различной концентрацией клеток галобактерий или в растворах NaCl с уменьшенной концентрацией (концентрация NaCl 3,5%, а не 7%). Способность клеток формировать видимые колонии (клоногенность) является критическим параметром, и ее рассматривают как способность клеток к "выживанию".

Чувствительность к радиоактивному облучению представляет собой относительную восприимчивость клеток, тканей, органов или организмов к вредному воздействию ионизирующего излучения. Клетки наименее чувствительны, когда они находятся в S-фазе, затем в G₁-фазе, затем G₂-фазе и наиболее чувствительны в M-фазе клеточного цикла. По правилу Бергонье - Трибондо быстро делящиеся опухолевые клетки, как правило, более чувствительны, чем большинство клеток организма. Это не всегда верно. Опухолевые клетки могут быть гипоксическими и, следовательно, менее чувствительными к рентгеновскому излучению, которое в основном оказывает свое действие за счет свободных радикалов, образующихся при ионизации кислорода. Позднее было показано, что наиболее чувствительными клетками являются те, которые не дифференцированы, имеют полноценное питание, быстро делятся и в высокой степени метаболически активны. Среди клеток организма, наиболее чувствительны сперматогонии и эритробласты, эпидермальные стволовые клетки, желудочно-кишечные стволовые клетки. Наименее чувствительны нервные клетки и мышечные волокна. Очень чувствительными клетками также являются ооциты и лимфоциты, хотя они представляют собой дремлющие клетки и не отвечают описанным выше критериям.

In vivo.

Эффект гомогената галобактерий DN-1 исследуют, изучая динамику регрессии двух опухолей - карциномы ELD и меланомы В-16, - трансплантированных в мышцы голени мышей после гамма-облучения опухоли, и длительность выживаемости мышей после лечения.

Облучение осуществляют с использованием клинической кобальтовой пушки, снабженной дополнительным экраном для защиты тела мышей. Облучение проводят 6-7 дней после трансплантации опухоли, когда диаметры голени увеличиваются от ~4 до 8-9 мм.

"Экспериментальные" мыши получают ежедневно перорально 0,2 мл разведенных (1:10) растворов DN-1, которые получают с обычным, 46 мг (вариант I), или двойным, 96 мг (вариант II), количеством клеточной массы галобактерий в 1 мл 7%-ного раствора NaCl, а также получают восстановлением из DN-1, который получают в 3,5%-ном растворе NaCl, а затем лиофилизируют (вариант III).

Объемы опухолей измеряют после обработки три раза в неделю. Результаты представлены на фиг. 2-4 для регрессии и рецидива опухоли и на фиг. 1 и 5-7 для выживания мышей.

"Питание" животных с использованием DN-1 приводит к более выраженной регрессии обоих типов опухолей и к увеличению продолжительности времени жизни.

В приведенной ниже табл. 1 проиллюстрированы различные методики, которые используют для получения композиций по настоящему изобретению. Композицию применяют для исследования сенсбилизации клеток V-79 китайского хомячка и клеток меланомы В-16 мыши к действию гамма-облучения путем добавления DN-1 к суспензии клеток.

Таблица 1

Условия облучения	Клетки V-79		Клетки В-16	
	Доза облучения, которая приводит к снижению выживаемости клеток до 20% от исходного количества, Гр	DMF	Доза облучения, которая приводит к снижению выживаемости клеток до 20% от исходного количества, Гр	DMF
Облучение без добавления DN-1	20	1	17	1

Облучение в присутствии DN-1	14	1,4	12	1,4
Облучение в присутствии DN-1 (II)	10	2,1	9	1,9
Облучение в присутствии DN-1 (III)	11	2,0	9,5	1,8

DN-1 - гомогенат галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl;

DN-1 (II) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl;

DN-1 (III) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl.

DMF - фактор изменения дозы, который показывает, во сколько раз может быть снижена доза облучения, благодаря присутствию DN-1 в различных препаратах, которая приводит к такому же снижению выживаемости клеток после облучения, как и в контрольной группе (без DN-1).

Фиг. 1 иллюстрирует выживаемость клеток меланомы B-16, облученных в условиях *in vitro* в суспензии без DN-1 и с добавлением 10% DN-1, который получают различными путями:

DN-1 - гомогенат галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl;

DN-1 (II) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl;

DN-1 (III) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl.

На фиг. 2 приведен график, который иллюстрирует динамику роста меланомы B-16 мыши после локальной дозы гамма-облучения, равной 25 Гр.

Меланому B-16 трансплантируют в икроножную мышцу мыши.

Опухоли облучают на 9-й день после трансплантации, когда икроножные мышцы достигают среднего диаметра 9 мм.

Мышей содержат либо на обычной диете, либо им дают ежедневно перорально 0,2 мл DN-1 гомогената, полученного с помощью одной из трех различных методик:

I - DN-1 получают в 7%-ном растворе NaCl;

II - Двойную концентрацию DN-1 получают в 7%-ном растворе NaCl;

III - Восстановленный раствор получают из лиофилизованного DN-1, приготовленного с удвоенной концентрации в 3,5%-ном растворе NaCl.

Результаты, полученные в соответствии с описанной выше методикой, сравнивают с результатами для мышей, не получавших гомогенат DN-1.

V_t/V_0 обозначает отношение между V_t , который представляет собой средний объем опухоли в день измерения, после лечения, и V_0 , который представляет собой средний объем опухоли в день облучения.

На фиг. 3-4 приведены графики, которые иллюстрируют динамику роста солидной ELD карциномы, трансплантированной в икроножную мышцу мыши, после воздействия локальной дозы облучения 25 Гр.

Карциному ELD Эрлиха трансплантируют в икроножную мышцу.

Опухоли облучают на 8-й день после трансплантации, когда икроножные мышцы достигают среднего диаметра 8 мм.

Животных содержат либо на обычной диете, либо они получают ежедневно перорально 10%-ный гомогенат галобактерий DN, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl, используя одну из трех различных методик.

На графике представлены:

□ - Группа животных, которая не получала DN;

○ - группа животных, которым давали DN-1, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl;

△ - группа животных, которым давали DN, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl с двойной концентрацией галобактерий;

◇ - группа животных, которым давали DN, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl с 4-кратной концентрацией галобактерий;

V_t/V_0 обозначает отношение между V_t , который представляет собой средний объем опухоли в день измерения, после лечения, и

V_0 , который представляет собой средний объем опухоли в день облучения.

На фиг. 5 представлен процент выживаемости мышей с меланомой B-16 после локального гамма-облучения (25 Гр), при этом животным вводили ежедневно перорально 0,2 мл 10%-ного DN-1 или DN-1 (II) (III) - полученного с двойным содержанием галобактерий.

На фиг. 6 показана выживаемость мышей с опухолью ELD после локального гамма-облучения (25

Гр), при этом животным вводили ежедневно перорально 0,2 мл 10%-ного DN-1 или DN-1 (II) (III) - полученного с двойным содержанием массы галобактерий.

Фиг. 7. Выживаемость V-79 клеток, облученных в суспензии в условиях *in vitro* без DN-1 и с добавлением 10%-ного DN-1, приготовленного разными путями:

DN-1 - гомогенат галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl;

DN-1 (II) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl;

DN-1 (III) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl.

Далее приводится пример варианта осуществления настоящего изобретения, который выполняют в условиях *in vitro*.

Экстракция гомогената галобактерий DN-1.

Гомогенат из красных галобактерий-*Archea* выделяют из 7,5%-ного раствора NaCl с pH 7.

Проводят экстракцию гомогената галобактерий DN-1, полученного из *Halobacterium halobium*, приготовив маточный солевой раствор:

в колбу добавляют 240 л NaCl, 30 л $MgCl_2 \times 6H_2O$, 35 л $MgSO_4 \times 7H_2O$, 7 л KCl. Добавляют в ту же колбу чистую воду практически до конечного требуемого объема, а соль затем растворяют, используя магнитную мешалку, при температуре 50°C.

Добавляют 5 мл $CaCl_2 \times 2H_2O$.

Доводят pH раствора в колбе до 7 с помощью 1M буферного раствора TrisCl.

Переносят вышеуказанный раствор в градуированный цилиндр и добавляют воду до точного конечного объема.

Определенное количество бактериальной массы диспергируют заранее и добавляют к раствору, как описано ниже:

добавляют 767 мл вышеуказанного маточного раствора соли, 200 мл чистой воды, 5 г пептона, 1 г дрожжевого экстракта, 5 мл бактериального маточного раствора и 1 г казеина.

Доводят объем до 1000 мл чистой водой.

Стерилизуют культуру в автоклаве.

Инкубируют культуру в течение достаточного времени при температуре -37°C (42°C).

Культуру оставляют на две недели.

В конце двухнедельной фазы четыре порции по 50 мл каждая переносят в чистые контейнеры и центрифугируют.

Центрифугируют культуру после 2 недель культивирования со скоростью 7500 об./мин при температуре 4°C в течение 15 минут и получают осадок. Выделяют осадок и повторно суспендируют в смеси 2M раствор NaCl+0,15M раствор $MgCl_2$.

Центрифугируют раствор со скоростью 7500 об./мин при температуре 4°C в течение дополнительных 15 минут и получают осадок. Выделяют осадок и вновь суспендируют его в 7,5%-ном растворе NaCl. Обрабатывают вышеуказанный раствор ультразвуком три раза по 30 с в 15 мл контейнерах. В промежутках охлаждая раствор на бане со льдом до тех пор, пока не появится разница в цвете и непрозрачности или прозрачности раствора.

Центрифугируют раствор, получая фракции разделения (центрифугирование осуществляют со скоростью 7500 об./мин при температуре 4°C в течение 10 мин). Полученный осадок выделяют и хранят при -4°C.

Для приготовления раствора галобактерий-*Archea* смешивают: 375 г NaCl, 75 мл указанного выше гомогената, добавляют воду до достижения точного объема 5 л.

Раствор микроводорослей *Dunaliella* добавляют к раствору с 14-дневной культурой галобактерий и полученную смесь инкубируют при температуре 25°C и постоянном освещении.

Водоросли выращивают в питательной среде, которая содержит:

г/л	Соль
240	NaCl
30	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$
35	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
7	KCl
0,2	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
1,0	KNO_3
0,035	KH_2PO_4

Доводят кислотность питательной среды до pH 7.

Центрифугируют культуру после 2 недель культивирования со скоростью 7500 об./мин при температуре 4°C и получают осадок. Выделяют осадок и повторно суспендируют в смеси 2M раствор

NaCl+0,15M раствор MgCl₂.

Центрифугируют раствор со скоростью 7500 об./мин при температуре 4°C и получают осадок. Выделяют осадок и вновь суспендируют его в 7,5%-ном растворе NaCl. Обрабатывают вышеуказанный раствор ультразвуком три раза по 15 сек, всякий раз, в промежутках охлаждая раствор на бане со льдом до тех пор, пока не появится разница в цвете и непрозрачности или прозрачности раствора.

Центрифугируют раствор, получая фракции разделения (центрифугирование осуществляют со скоростью 7500 об./мин при температуре 4°C в течение 10 мин). Полученный осадок выделяют и хранят при -4°C.

Способ получения таблетки для перорального введения Перечисленные ниже основные ингредиенты смешивают в течение приблизительно 20 мин в смесителе Day для сыпучих материалов или в планетарной мешалке. К базовой смеси добавляют экстракт, и смесь вновь перемешивают в течение приблизительно 30 мин, добавляя лубриканты. Наконец, готовую смесь оставляют для скрепления в течение не менее 24 ч при комнатной температуре. Таблетки прессуют в виде капсулообразных пероральных таблеток с насечкой.

Диспергирование каждого ингредиента в смеси осуществляют в соответствии с определенной дозой. Проводят классификацию мелких частиц для большей равномерности дозы (уменьшение размера, помол, дробление, истирание, измельчение).

После уменьшения размера частиц и смешивания проводят гранулирование, при этом гранулирование композиции обеспечивает лучшую однородность распределения лекарственного средства в смеси.

Сушат, с целью поддержания остаточного содержания влаги на достаточно низком уровне, чтобы предотвратить ухудшение свойств препарата и обеспечить сыпучесть вещества. (Процесс сушки можно осуществить, используя сушилку с псевдооживленным слоем, вакуумную полочную сушилку, микроволновую сушилку, распылительную сушилку, сублимационную сушилку, центробежную турбосушилку или сушилку с мешалкой.)

Прессование таблетки проводят после получения гранул (в случае влажного гранулирования), или после получения крупинки определенного размера (в случае сухой грануляции), или после смешивания ингредиентов (в случае прямого прессования) и после прессования получают конечный продукт.

В настоящем изобретении раскрывается состав оказывающего синергическое действие экстракта *Dunaliella* и галобактерий, который благотворно воздействует на носителей линий раковых клеток. Раскрываются антипролиферативные свойства, а также способность композиции Synergy вызывать апоптоз у двух типов линий раковых клеток и изменять способность к инвазии в модели камеры Бойдена.

Носитель раковых клеток.

Используют два типа сертифицированных клеточных линий: саркома кожи человека (получают от компании CLS GmbH) и меланома кожи человека (получают из ATCC). Авторы настоящего изобретения раскрывают противораковые способности экстрактов, исследуя их влияние на пролиферацию (цитотоксичность) и апоптоз. Кроме того, раскрывается анализ на инвазивность, с целью контролировать движение клеток через внеклеточный матрикс (который осуществляется в фундаментальных процессах, протекающих в клетках, таких как ангиогенез, эмбриональное развитие, иммунная ответная реакция, метастазирование и инвазия раковых клеток).

Антипролиферативные свойства и индуцирование апоптоза.

Анализ проводят для каждой индивидуальной линии клеток. Раковые клетки высевают на 96-луночные планшеты в количестве (приблизительно) $0,3 \times 10^6$ клеток на миллилитр в 200 мкм/лунка свежей питательной среды. Планшеты инкубируют при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ до достижения 70%-ной конфлюентности (оценивают визуально). После того, как клетки достигают требуемой конфлюентности, среду заменяют заранее приготовленными маточными растворами, которые содержат максимальную дозу и оптимизированное соотношение между *Dunaliella* и галобактериями для экстракта Synergy (200 мкм/лунка). Планшеты оставляют инкубироваться на ночь при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Выживаемость и степень апоптоза в раковых клетках определяют после инкубирования, используя анализы с МТТ и каспазой-3.

Инвазия.

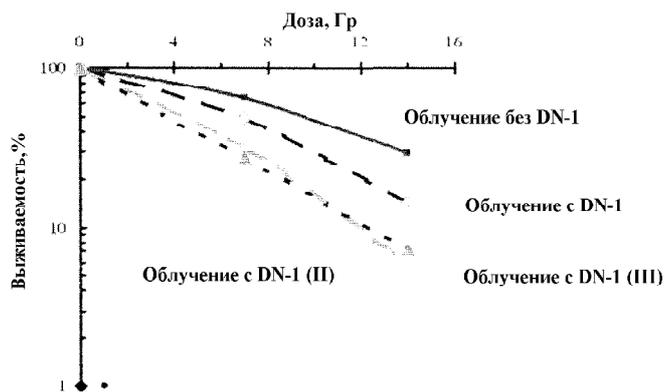
Линии раковых клеток обрабатывают без максимальной летальной дозы или с максимальной летальной дозой или с оптимизированным для экстракта Synergy отношением между *Dunaliella* и галобактериями (20:80). В день проведения анализа нужные клетки помещают в камеру для изучения инвазии, следуя инструкциям производителя. В качестве отрицательного контроля используют не содержащую сыворотку среду. Каждый анализ проводят трижды. Инвазивные свойства двух типов раковых клеток определяют, следуя методике производителя.

В приведенном выше описании, варианты осуществления настоящего изобретения, в том числе предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, представлены, с целью иллюстрации и описания. Их не следует рассматривать как исчерпывающие или ограничивающие настоящее изобретение какой-либо конкретной раскрытой формой. В соответствии с приведенным выше описанием, возможны очевидные модификации или вариации настоящего изобретения. Варианты осуществления

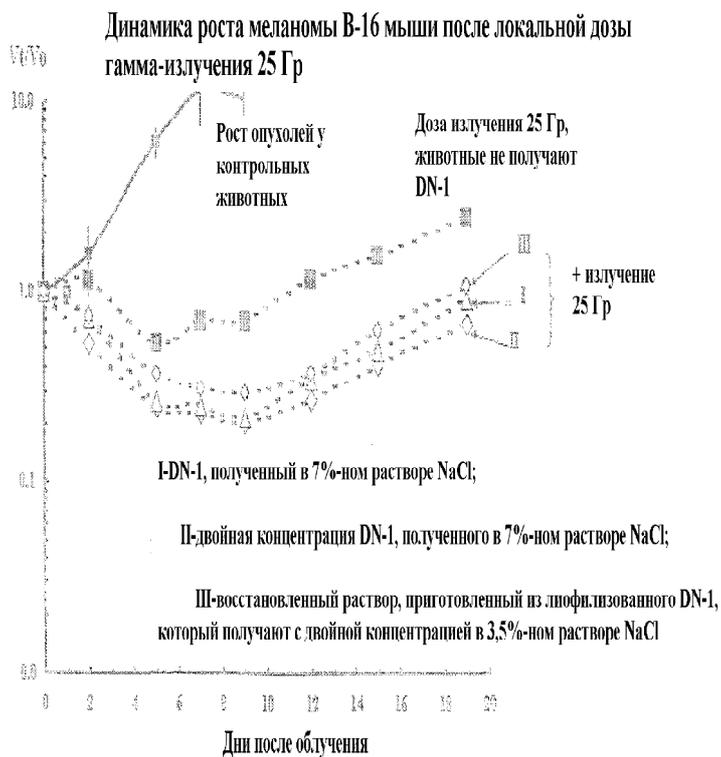
настоящего изобретения были выбраны и описаны для лучшей иллюстрации принципов настоящего изобретения и его практического применения и для того, чтобы обычные специалисты в данной области техники смогли использовать изобретение в различных вариантах его осуществления и с различными модификациями, которые подходят для конкретного применения. Все подобные модификации и изменения входят в объем настоящего изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения, если интерпретировать их в соответствии с шириной охраны, на которую они определены, на законных основаниях и объективно претендуют.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

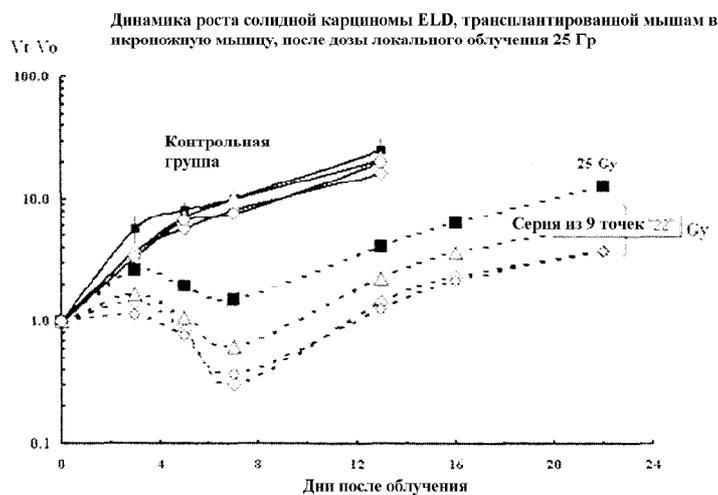
1. Применение композиции, содержащей:
 - a) экстракт галобактерий, содержащий по меньшей мере одну водорастворимую фракцию и по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию, и
 - b) экстракт *Dunaliella*
для усиления действия лучевой терапии солидной опухоли.
2. Способ усиления действия лучевой терапии солидной опухоли у млекопитающего, включающий введение пероральной дозированной формы, содержащей:
 - a) экстракт галобактерий, содержащий по меньшей мере одну водорастворимую фракцию и по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию, и
 - b) экстракт *Dunaliella*.
3. Способ по п.2, где указанный экстракт галобактерий присутствует в количестве от приблизительно 2,5% до приблизительно 10 мас.% и содержит терапевтическую дозу гомогената галобактерий DN-1 (гомогената галофильных архебактерий).
4. Способ по п.2, где указанное усиление действия определяется как:
 - a) по меньшей мере на 50% более высокая чувствительность раковых клеток к радиоактивному облучению при проведении лучевой терапии в отношении увеличения радиационного повреждения опухолевых клеток в условиях *in vitro*;
 - b) более высокая радиочувствительность к лучевой терапии у пациентов в отношении более выраженной регрессии опухолей и
 - c) увеличение продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой.
5. Способ по п.2, где указанную композицию вводят перорально в форме, выбранной из группы, состоящей из таблеток, капсул, твердых таблеток в форме капсул или любых подходящих пероральных форм.
6. Способ по п.2, где указанный экстракт галобактерий содержит:
 - a) DN-1(I) - гомогенат, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl, приводит к регрессии приблизительно 10% опухолевых клеток и к выживаемости менее чем 10% опухолевых клеток после облучения с дозой больше, чем 16 Гр;
 - b) DN-1(II) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 7%-ном растворе NaCl, приводит к регрессии приблизительно 10% опухолевых клеток и к выживаемости менее чем 10% опухолевых клеток после облучения с дозой больше, чем 10 Гр; и
 - c) DN-1(III) - гомогенат с двойной концентрацией галобактерий, приготовленный в 3,5%-ном растворе NaCl, приводит к регрессии приблизительно 10% опухолевых клеток и к выживаемости менее чем 10% опухолевых клеток после облучения с дозой больше, чем 10 Гр.
7. Способ по п.2, где указанная композиция:
 - a) оказывает модифицирующее действие на радиочувствительность к поглощенной дозе гамма-излучения, равной 5 и 10 Гр;
 - b) воздействует на радиочувствительность опухолевых клеток, облученных в суспензии, и приводит к явно выраженной регрессии опухолевых клеток и к увеличению продолжительности жизни млекопитающих;
 - c) увеличивает радиационное повреждение опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*;
 - d) уменьшает пролиферацию опухолевых клеток; и
 - e) вызывает эффект подавления роста злокачественных клеток, при этом указанный эффект возрастает пропорционально концентрации DN-1 и длительности лечения.



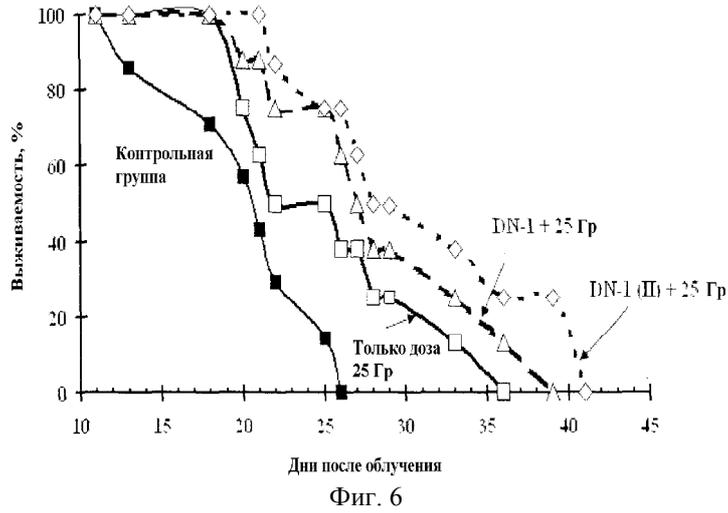
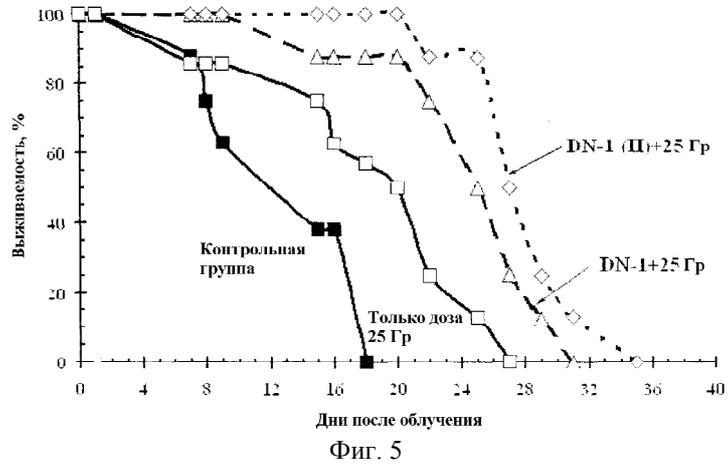
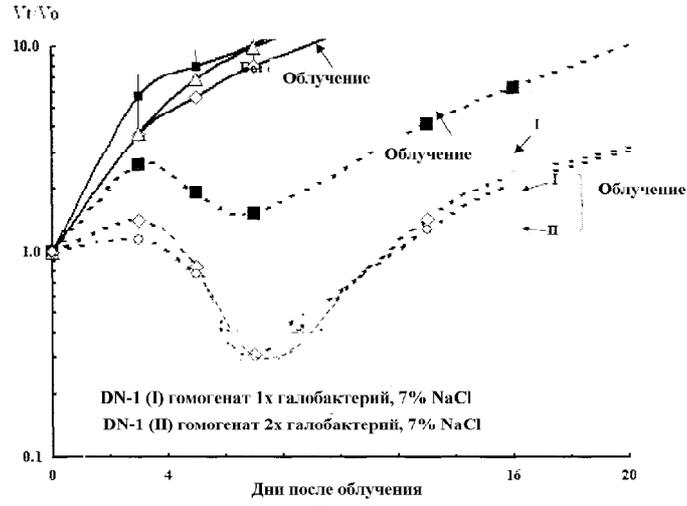
Фиг. 1

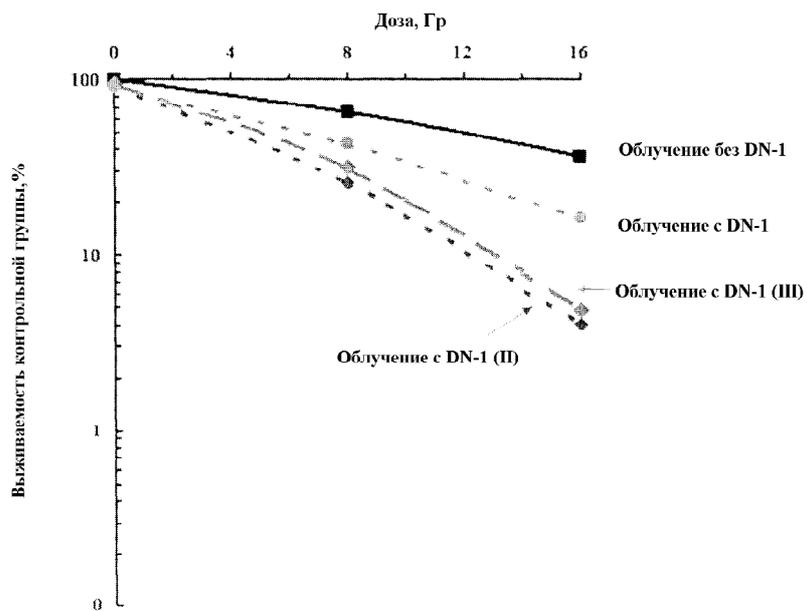


Фиг. 2



Фиг. 3





Фиг. 7

