

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043588**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.02**

**(21)** Номер заявки  
**201891722**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.02.15**

**(51)** Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 36/185** (2006.01)  
**C07K 14/42** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)

---

**(54) ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩЕЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЛЕКТИНЫ ОМЕЛЫ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

---

**(31)** **16155735.0**

**(32)** **2016.02.15**

**(33)** **EP**

**(43)** **2019.01.31**

**(86)** **PCT/EP2017/053429**

**(87)** **WO 2017/140739 2017.08.24**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**МЕЛЕМА ФАРМА ГМБХ (DE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Лентцен Ханс (DE)**

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

**(56)** EP-A1-2508195

WO-A2-03054544

GABIUS H-J ET AL.: "THE IMMUNOMODULATORY BETA-GALACTOSIDE-SPECIFIC LECTIN FROM MISTLETOE: PARTIAL SEQUENCE ANALYSIS, CELL AND TISSUE BINDING, AND IMPACT ON INTRACELLULAR BIOSIGNALLING OF MONOCYTIC LEUKEMIA CELLS", ANTICANCER RESEARCH - INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND TREATMENT, INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH, GR, vol. 12, no. 3, 1 May 1992 (1992-05-01), pages 669-675, XP002019005, ISSN: 0250-7005 abstract; figures

SCHOTTERL S ET AL.: "Mistletoe compounds as anti-cancer drugs: Effects and mechanisms in the treatment of glioblastoma", TRANSLATIONAL RESEARCH IN BIOMEDICINE 20150528 S. KARGER AG CHE, vol. 4, 28 May 2015 (2015-05-28), pages 48-56, XP009191027, ISSN: 1662-405X page 53, paragraph 2 - page 54, column 1

ZUZAK T J ET AL.: "Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to Viscum album (Mistletoe) preparations", ANTICANCER RESEARCH, vol. 26, no. 5A, September 2006 (2006-09), pages 3485-3492, XP055290309, ISSN: 0250-7005 the whole document

---

**(57)** Изобретение относится к лекарственному средству и/или фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантные лектины омелы для лечения опухолей головного мозга, в частности первичных опухолей головного мозга, глиом, глиобластом, менингиом и аденом гипофиза, и к их применению.

---

**B1**

**043588**

**043588**

**B1**

Изобретение относится к лекарственному средству и/или фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантные лектины омелы для лечения опухолей головного мозга, в частности, первичных опухолей головного мозга, глиом, глиобластом, менингиом и аденом гипофиза, и их использованию.

Первичные опухоли головного мозга, такие как глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза, происходят из нейроэпителия, ганглиозных клеток, мозговых оболочек, эпинеургии, общей глии или нейроглии и гипофиза или эктопических внутричерепных тканей (герминативно-клеточные опухоли или опухоли мальформаций), и их причины связаны главным образом с генетическими и гормональными факторами, онкогенными вирусами и экзогенными канцерогенами. Речь идет о локализованных в головном мозге, истинных опухолях центральной нервной системы (ЦНС) различной дифференциации, а также их подвидов, таких как, в частности: астроцитарные опухоли, олигодендроглиома, глиома смешанного типа (олигоастроцитомы), эпендимомы, опухоли Хоройдного сплетения, ретинобластома.

Классификации ВОЗ опухолей по степени соответствует степени злокачественности: I степень (доброкачественная опухоль/доброкачественное новообразование), II степень (полудоброкачественная опухоль; период послеоперационной выживаемости составляет 3-5 лет), III степень (полузлокачественная, период послеоперационной выживаемости составляет 2-3 года), IV степень (злокачественная; период послеоперационной выживаемости составляет 6-15 месяцев); частота возникновения: доля от общего числа или первичных опухолей головного мозга во всех случаях онкологических заболеваний составляет: 7-9% (Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., and Cavenee, W.K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 3, 215-225).

Глиома представляет собой гистологический диагноз, характеризуемый (гигантоцитными) (олиго-) астроцитомами, олигодендроглиомами, глиомами смешанного типа, глиобластомами, и дифференцируется в зависимости от развития, такого как, в частности, изоморфное, анапластическое, поликистозное.

Кроме того, можно прогнозировать подгруппы глиом на основании потери гетерозиготности (Smith, J.S., and Jenkins, R. B. (2000) Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci.* 5, 213-231), которая приводит к потере генов-супрессоров опухолей (Tews, B., Felsberg, J., Hartmann, C., Kunitz, A., Hahn, M., Toedt, G., Neben, K., Hummerich, L., von Deimling, A., Reifenberger, G., and Lichter, P. (2006) Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer.* 119, 792-800).

В частности, глиобластомы (ГБМ) относятся к числу наиболее злокачественных опухолей головного мозга. Медианная выживаемость пациентов с ГБМ, даже при лучших терапевтических условиях, составляет лишь около 12-15 месяцев. Естественные киллеры (ЕК) клетки как компоненты врожденной иммунной системы играют важную роль в уничтожении раковых клеток. Клетки ГБМ разрабатывают стратегии, позволяющие им избегать этого уничтожения и заключающиеся в том, что они содействуют снижению экспрессии белков, необходимых для взаимодействия с ЕК-клетками, так называемых белков Danger/Stranger главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), последовательности родственной полипептиду класса I ГКГС (MIC)-А и -В или UL16-связывающих белков (ULBP) 1, 2, 3, более специфично с помощью опосредуемой TGF- $\beta$  иммуносупрессии. С этой целью сверхэкспрессия TGF- $\beta$  является существенной особенностью ГБМ, и у пациентов с глиомой могут быть обнаружены высокие уровни концентрации TGF- $\beta$  в цереброспинальной жидкости, что коррелирует с развитием опухоли (Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O et al.: Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer* 2000; 89: 251-258). Кроме того, TGF- $\beta$  ответственен за снижение экспрессии ГКГС, усиление дифференциации неактивированных клеток среди регуляторных Т-клеток, блокирование созревания дендритных клеток и индуцирование некроза клеток касательно ЕК- и Т-клеток (Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M et al.: TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 2006; 129: 2416-2425, Platten M, Wick W, Weller M: Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 401-410).

Поэтому существует большая потребность в предоставлении лекарственного средства для лечения и профилактики опухолей головного мозга, в частности, первичных опухолей головного мозга, таких как глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза.

Экстракты омелы использовали в терапевтических целях на протяжении многих веков. В частности, с разной степенью успеха препараты омелы использовали при лечении рака (Bocci V 1993 *J Biol Regulators and Homeostatic Agents* 7(1): 1-6; Gabius H-J, Gabius S, Joshi S et al. 1993 *Planta Med* 60: 2-7; Gabius H-J & Gabius S 1994 *PZ* 139: 9-16; Ganguly C & Das S 1994 *Chemotherapy* 40: 272-278, Hajto T, Hostanska K, Gabius H\_J 1989 *Cancer Res* 49: 4803-4808, Hajto T, Hostanska K, Frei K et al. 1990 *Cancer Res.* 50: 3322-3326). Оказалось, что терапевтические эффекты опосредуются, в частности, с помощью так называемых лектинов омелы (вискумин, агглютинин омелы белой (*Viscum album Agglutinine*, VAA)). При этом в дополнение к цитотоксическому эффекту лектинам омелы также приписывают неспецифическую иммунную стимуляцию, положительные эффекты которой используются для лечения онкологических пациентов. Различные исследования с лектинами омелы *in vitro* (Hajto et al., 1990 (см. выше); Mannel D N, Beck-

er H, Gundt A et al. 1991 *Cancer Immunol Immunother* 33: 177-182; Beuth J, Ko K L, Tunggal L et al. 1993 *Drug Res* 43: 166-169) и *in vivo* (Hajto T 1986 *Oncology* 43 suppl 1: 51-65; Hajto et al., 1989 (см. выше), Beuth J, Ko H L, Gabius H-J et al. 1991 *In Vivo* 5: 29-32; Beuth J, Ko H L, Gabius H-J et al. 1992 *J Clin Invest* 70: 658-661), а также клинические исследования (Beuth et al., 1992 (см. выше)) продемонстрировали повышенное высвобождение воспалительных цитокинов (ФНО-альфа, IL-1, IL-6) и активацию клеточных компонентов иммунной системы (ТН-клетки, ЕК-клетки, В- и Т-лимфоциты) (Braedel-Ruoff S: *Immunomodulatory effects of Viscum album extracts on natural killer cells: review of clinical trials. Forsch Komplementmed* 2010; 17: 63-73, Gren A: *Effects of Iscador preparations on the reactivity of mouse immune system. Neuro Endocrinol Lett* 2009; 30: 530-534, Lee CH, Kim JK, Kim HY et al.: *Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin in vitro and in vivo. Int Immunopharmacol* 2009; 9: 1555-1561, Nikolai G, Friedl P, Werner M et al: *Effect of a mistletoe extract (Iscador QuFrF) on viability and migratory behavior of human peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes in three-dimensional collagen lattices. In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33: 710-716).

Благодаря анализу экстракта омелы до настоящего времени можно было определить три лектина омелы (ML-I, ML-II, ML-III) с различными молекулярными массами и специфичностью связывания сахаров. Была возможность продемонстрировать, что иммуностимулирующий эффект экстракта омелы обусловлен ML-I. Лектин ML-I состоит из двух гликозилированных цепей А и В (MLA или MLB). Цепь А отвечает за ферментативную дезактивацию рибосом (Endo Y, Tsurugi K & Franz H 1988 *FEBS Lett* 231: 378-380), а цепь В участвует в связывании углеводов. Обе цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. Полученные в результате мономеры лектинов омелы могут собираться в димеры с образованием нековалентных связей.

Возможно получать биологически активный лектин омелы предпочтительно рекомбинантным способом. EP 0751221 описывает получение полипептидов лектина омелы в чистом виде как структурно однородного вещества, при этом можно получить происходящие из нуклеотидных последовательностей гена рекомбинантные высокочистые одинарные цепи (цепь А, цепь В) лектина омелы, которые могут быть заново ассоциированы, и таким образом получить рекомбинантный голопротеин лектина омелы, который является однородным в отношении его белковой химии, ферментативном и структурном отношении, так называемый авискумин (*Aviscuminum*). В соответствии с EP 0751221, рекомбинантный полипептид лектина омелы является пригодным как в качестве голопротеина, так и в качестве частичной цепи и в виде субфрагментов в терапевтических целях и в соответствии с данным изобретением.

Кроме того, в WO 2012104355 A1 описан противовирусный эффект рекомбинантных лектинов омелы. В WO 2012136857 A1 раскрыто лечение меланомы, в частности, злокачественной меланомы также в виде метастатической опухоли, с помощью рекомбинантных лектинов омелы.

До сих пор рекомбинантные лектины омелы использовали предпочтительно при лечении онкологических заболеваний. Тем не менее, применение рекомбинантных лектинов омелы при лечении опухоли головного мозга, в частности, первичных опухолей головного мозга, таких как глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза, не описано в известном уровне техники.

В известном уровне техники Podlech et al. (Podlech O, Harter PN, Mittelbronn M et al.: *Fermented mistletoe extract as a multimodal antitumoral agent in gliomas. Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 501796) описывает использование ISCADOR -полученного путем ферментации экстракта омелы - в качестве ингибитора роста для ГБМ и делает вывод о противоопухолевой пригодности ISCADOR в лечении ГБМ.

Lenartz (Lenartz et al., *Immunoprotective Activity of the Galactoside-Specific lectin from mistletoe after Tumor Destructive Therapy in Glioma Patients, Anticancer Research* 16: 3799-3802 (1996)) сообщает об экстракте омелы (ML-1) для лечения пациентов с глиомой, причем экстракты омелы обладают специфическим гликозилированием.

Лектины омелы растительного происхождения, описанные в известном уровне техники, -будь то полученные из произведенных путем ферментации или из произведенных не путем ферментации экстрактов омелы -неоднородны (Soler MH, Stoeva S, Schwamborn C et al. 1996 *FEBS Letter* 399: 153-157, Soler HS, Stoeva S, Voelter W 1998 *Biochem Biophys Res Comm* 246: 596-601) и отличаются один от другого неоднородно в отношении их эффекта (EP 1051495 B1), а также сами по себе не эффективны в качестве активного вещества или в качестве иммуномодулятора. Поэтому лектин омелы, полученный, например, из омелы корейской (*Viscum album colaratum*), следует в действительности причислять к белкам RIP II, однако они имеют значительные структурные отличия по структуре и конформации от обсуждаемых в данном документе рекомбинантных лектинов омелы (Kang TB, Song SK, Yoon TJ et al. 2007 *J Biochem Mol Biol* 40(6): 959-965). Особенно невыгодным является то, что невозможно точно регулировать дозу и что лектины омелы, полученные из растительных экстрактов, полученных путем ферментации или не путем ферментации, имеют примеси. К тому же лектины омелы, полученные из растительных экстрактов, полученных путем ферментации или не путем ферментации, имеют различия в гликозилировании, которое влияет на эффективность (особенно кинетику и т.д.). Кроме того, при приготовлении каждой новой партии экстракта омелы получают продукт, не идентичный предыдущей партии, с иным содержанием составляющих его веществ, включая гликозилированные лектины омелы.

Рекомбинантные лектины омелы в соответствии с данным изобретением предпочтительно не имеют такого гликозилирования, являются абсолютно чистыми и могут быть получены воспроизводимым способом.

В настоящее время было неожиданно продемонстрировано, что рекомбинантные лектины омелы обладают не только указанными преимуществами, такими как более высокая воспроизводимость, однородность и регулируемая дозировка, но и улучшенной цитотоксичностью клеток ЕК через маркер поверхности клеток ЕК NKG2D по отношению к растительному или ферментативному экстракту омелы из известного уровня техники, и поэтому они особенно пригодны для лечения опухоли головного мозга, глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза. Кроме того, рекомбинантные лектины омелы демонстрируют специфический и предпочтительный антимигрирующий эффект по отношению к клеткам опухоли головного мозга.

Клетки естественные киллеры (ЕК) в качестве компонентов врожденной иммунной системы играют важную роль в уничтожении раковых клеток. Для обеспечения уничтожения опухолевых клеток ЕК-клетками необходим контакт между ЕК-клетками и опухолевыми клетками. При этом важную роль играет NKG2D-рецептор на ЕК-клетках и поверхностные белки, необходимые для активации (NKp30, NKp44, NKp46). В примерах воздействие рекомбинантных лектинов омелы сравнивают со воздействием ферментированного экстракта омелы ISCADOR Q на взаимодействие ЕК-клеток с клеткой ГБМ LNT-229-Luc.

Таким образом, целью данного изобретения является предоставление лекарственного средства и фармацевтического препарата для лечения опухоли головного мозга, в частности первичных опухолей головного мозга, таких как глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза.

Указанной цели достигают путем предоставления лекарственного средства, а также фармацевтической композиции, содержащей эти рекомбинантные лектины омелы для лечения рака головного мозга, в частности, первичных опухолей головного мозга, таких как глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза.

Лекарственное средство в соответствии с изобретением предпочтительно содержит цепь А лектина омелы (MLA) или цепь В лектина омелы (MLB), по отдельности или совместно, также в форме димеров (см., например, EP 0 751 221 или EP 1 051 495).

Рекомбинантный полипептид лектина омелы цепи А лектина омелы содержит следующие последовательности: SEQ ID NO. 1-3, включая их изоформы или их функциональный фрагмент.

Рекомбинантный полипептид лектина омелы цепи В лектина омелы содержит следующие последовательности: SEQ ID NO. 4-12, включая их изоформы или их функциональный фрагмент (в дальнейшем обобщенно называемые "рекомбинантными лектинами омелы").

Кроме того, рекомбинантный лектин омелы в соответствии с изобретением предпочтительно представляет собой гетеродимер, состоящий из последовательностей SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 4, см., например, EP 0 751 221 (так называемый авискумин).

В контексте данного изобретения термин "функциональный фрагмент" определяет фрагменты указанных полипептидов, имеющие ту же биологическую функцию, что и указанный выше полипептид с соответствующей аминокислотной последовательностью.

В этом контексте термин "та же биологическая функция" описывает, например, что фрагменты или производные полипептидов индуцируют в клетке такие же сигналы, что и указанные пептиды. Примерами фрагментов являются пептидные участки с определенными функциями. "Та же биологическая функция" также включает цитотоксичность, иммунную стимуляцию (как нативной, так и адаптивной иммунной системы), стимуляцию высвобождения цитокинов, антигенность, индукцию экспрессии или активацию поверхностных маркеров, индукцию апоптоза или стимуляцию эндорфинов.

Под "биологической активностью рекомбинантного лектина омелы" подразумевается любая биологическая активность из диапазона видов общей биологической активности рекомбинантного лектина омелы. Такой функцией является, например, фармакологический эффект рекомбинантного лектина омелы.

Исследования мономеров ML-I выявили 25 различных изоформ, обусловленных различными комбинациями разнообразных цепей А и В, а также различными состояниями гликозилирования цепей.

Поэтому для данного изобретения принимается во внимание полипептид лектина омелы или его фрагмент, который содержит вариативность последовательности различных цепей MLA и MLB в последовательностях SEQ ID NO. 1-12 в соответствии с изобретением.

Лекарственное средство в соответствии с изобретением предпочтительно содержит рекомбинантный полипептид лектина омелы, имеющий последовательности SEQ ID NO. 1-12, или его функциональный фрагмент или любую их комбинацию.

Кроме того, предпочтительно, чтобы использование рекомбинантных лектинов омелы в соответствии с изобретением осуществлялось в тех группах пациентов, которые не реагируют на противоопухолевые препараты в рамках стандартного лечения или включают в себя случаи отсутствия реагирования на лечение или неэффективности лечения.

Таким образом, данное изобретение охватывает таких пациентов или группы пациентов со случаями отсутствия реагирования на лечение или неэффективности лечения в отношении лечения опухоли

головного мозга, в частности первичных опухолей мозга, таких как глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза, в случае которых стандартное лечение опухолей не является успешным.

Термин "опухоль головного мозга" в соответствии с данным изобретением включает первичные опухоли головного мозга, такие как глиомы, менингиомы и аденомы гипофиза, происходящие из нейроэпителия, ганглиозных клеток, мозговых оболочек, эпинеурия, общей глии или нейроглии и гипофиза или эктопических внутричерепных тканей (герминативно-клеточные опухоли или опухоли мальформаций), и их причины связаны главным образом с генетическими и гормональными факторами, онкогенными вирусами и экзогенными канцерогенами.

Тем не менее предпочтительным вариантом реализации в соответствии с данным изобретением является лечение глиом (см., например, характеристику показаний в Pschyrembel®, 2 66. Auflage 2014, De Gruyter Verlag, Berlin).

Данное изобретение также относится к лекарственному средству для лечения опухоли головного мозга, в частности, первичных опухолей головного мозга, таких как глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза, рекомбинантный полипептид лектина омелы которого необязательно включает фармацевтически приемлемый носитель с образованием фармацевтической композиции. Примеры особенно пригодных фармацевтически приемлемых носителей известны специалистам в данной области лечения опухолей и включают забуференные растворы хлористого натрия (физрастворы), воду, в частности, различные виды очистительных средств, стерильные растворы и т.д. Лекарственные средства, содержащие такие носители, могут быть приготовлены с помощью известных традиционных способов. Эти лекарственные средства могут вводиться индивидууму в подходящей дозе. Введение может быть локальным, пероральным или парентеральным, например, производиться внутривенно, внутривенно, подкожно, внутримышечно, локально, интраназально, интрабронхиально или внутрикожно, или через катетер в определенном месте артерии. Тип дозировки определяется лечащим врачом в соответствии с клиническими факторами. Специалистам в данной области техники известно, что тип дозировки зависит от различных факторов, таких как, например, размер тела или вес, площадь поверхности тела, возраст, пол или общее состояние здоровья пациента, а также от конкретного средства для введения, продолжительности и способа введения и других лекарственных средств, которые могут вводиться параллельно.

Фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантные полипептиды лектина омелы в соответствии с данным изобретением, могут вводить локально или системно.

Предпочтительной оказалась дозировка лектинов омелы в соответствии с изобретением для применения к человеку в диапазоне от 2 до 10 нг/кг (масса тела). Особенно предпочтительной является дозировка в диапазоне от 3 до 7 нг/кг. Предпочтительно вводимое количество составляет 5 нг/кг массы тела. Предпочтительная дозировка для человека, не связанная с массой тела, составляет 350 нг.

Лекарственное средство в соответствии с изобретением вводят в течение по меньшей мере 8 недель с частотой от 1 раза в день до 1 раза в неделю. Предпочтительно лекарственное средство вводят 2-3 раза в неделю, особенно предпочтительно - 2 раза в неделю.

Таким образом, данное изобретение относится к способу дозировки рекомбинантных лектинов омелы в соответствии с изобретением или лекарственного средства в соответствии с изобретением, причем дозировка составляет от 2 до 10 нг/кг (массы тела). В частности, данное изобретение относится к способу дозировки рекомбинантных лектинов омелы в соответствии с изобретением или лекарственного средства в соответствии с изобретением, причем пациенту вводят дозу, составляющую 200-500 нг, в частности, 350 нг, и по меньшей мере 1 раз в неделю.

Следующие примеры и фигуры приведены для иллюстрации изобретения, а не для ограничения данного изобретения этими примерами.

Примеры и фигуры.

Пример 1. Композиции лекарственного средства.

Раствор для инъекций: 1 мл ампула, содержащая раствор для инъекций, состоящий от 0,5 до 1,0 мл; авискумин 200-500 нг; дигидрат моногидрофосфата натрия 2,8-5,6 мг; дигидрат дигидрофосфата натрия 0,078-0,155 мг; хлористый натрий 3,3-6,7 мг; эфир полиоксиэтиленсорбитана (полисорбат) 0,1 мг; глутаминовая кислота 0,1 мг; вода для инъекций от 0,5 до 1,0 мл а.д.

Пример 2. Композиции лекарственного средства.

Порошок для приготовления раствора для инъекций, стеклянная 2R колба, содержащая: авискумин 200-500 нг; трегалозу 40,0 мг; хлористый натрий 1,0 мг; трис(гидроксиэтил)аминометан (TRIS) 0,6 мг; эфир полиоксиэтиленсорбитана (полисорбат) 0,1 мг; соляная кислота для регулирования значения pH; для введения посредством инъекций порошок растворяют в 0,5 или 1,0 мл воды.

Пример 3.

Методика: клетки LNT-22 9-Luc растут в среде DMEM (Sigma, Тауфкирхен, Германия), дополненной 10%-й фетальной сывороткой теленка и пенициллином/стрептомицином в увлажненной атмосфере, насыщенной 5%-м CO<sub>2</sub>.

Для выделения ЕК-клеток РВМС получают из крови здоровых доноров и кокультивируют с облученными фидерными клетками RPMI 8866 (ATCC, США) в среде RPMI (Sigma, Тауфкирхен, Германия) для получения популяций поликлональных ЕК-клеток. ЕК-клетки очищают на > 98% с помощью набора

для выделения ЕК-клеток (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Их литическую активность по отношению к клеткам ГБМ определяют путем измерения активности люциферазы. Для деактивации активности ЕК-клеток, ЕК-клетки предварительно инкубируют с антителами к NKG2D (BioLegend, Фель, Германия) за 30 минут до их 4-часовой кокультивации (эффektorные клетки/лептоциты 20: 1) с клетками ГБМ. Клетки ГБМ, в свою очередь, предварительно обрабатывают в течение 24 ч с помощью авискумина или ISCADOR Q до их кокультивации с ЕК-клетками и промывают перед использованием в кокультуре.

Результат. Авискумин влияет на воздействие ЕК-клеток на клетки ГБМ за счет усиления взаимодействия их NKG2D-рецептора с клеткой-мишенью.

Блокада NKG2D-рецептора с помощью антитела ведет, как и ожидалось, к снижению на 52% опосредованного ЕК-клетками лизиса в контрольной группе (среда); авискумин частично противодействует воздействию антитела: поэтому опосредованный ЕК-клетками лизис ингибируется антителом только на 38%. Сравнение с ферментированным экстрактом омелы ISCADOR Q в этих условиях невозможно, так как при концентрации того же лектина о мелы, равной 8 нг/мл, клетки ГБМ без воздействия ЕК-клеток лизируются намного сильнее, чем в случае опосредованной контрольной группы. По-видимому, другие составные вещества ферментированного экстракта являются непосредственно цитотоксичными (см. табл.).

Лизис клеток ГБМ			
	Без предварительной обработки АК	предварительная обработка анти-NKG2D	
среда	67%	32,1% (Ингибирование: прекращение лизиса на 52,1%)	P<0,05
Авискумин	68,4%	42,6%	P<0,05
		(Ингибирование прекращение лизиса на 37,7%)	
Iscador Q	83,2%	61,6%	незначительно

Согласно Podlech, ISCADOR Q (200 мг) разбавляют в 2000 раз (100 мг/мл) для проведения экспериментов по инкубации. Экстракт, в частности, содержит различные лектины омелы, содержание которых в используемой партии составляет 15,050 микрограмма лектина омелы на мл. Это означает, что в экспериментах по инкубации концентрация лектина омелы составляет 7,5 нанограмма лектинов на мл. Концентрация 7,5 нанограмма лектинов на мл приводит к ингибированию роста почти на 20-30% в клетках глиомы LNT-229 и SMA560 через 48 ч.

Кроме того, ISCADOR Q содержит, в частности, различные цитотоксические вискотоксины, содержание которых дано в используемой партии на уровне 364 мкг вискотоксина на мл. Это означает, что концентрация вискотоксина составляет 182 нанограмма вискотоксинов на мл инкубационного раствора.

Поэтому при использовании ISCADOR неясно, какое из многочисленных составляющих веществ ингибирует рост клеток глиомы LNT-229 и SMA560.

Авискумин рекомбинантного лектина омелы ингибирует рост различных клеток опухоли головного мозга на 100% в диапазоне концентраций от 0,4 до 11 нг/мл, и, таким образом, как ингибитор клеток опухоли головного мозга является в >10 раз более мощным, чем ISCADOR Q. Если необходимо приписать эффект ISCADOR Q содержащимся в нем лектинам омелы, тогда, необходимо предположить наличие противодействующих лектину омелы ингредиентов в ферментированном экстракте.

Цитотоксическими являются также другие варьирующие составные вещества экстрактов омелы (см. Eggenschwiler J, von BL, Stritt B, Pruntsch D, Ramos M, Urech K, Rist L, Simoes-Wust AP, Viviani A; Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). BMC Complement Altern Med 2007, 7:14).

Пример 4.

Клеточную линию злокачественной глиомы человека LNT-229 инкубировали в течение 24 ч с содержащим лектины омелы экстрактом Iscador Qu, авискумином и нативным лектином омелы I. Используемые концентрации соответствовали 8 нг ML-I/мл. Через 24 ч клетки промывали, чтобы удалить активные вещества, и соответственно наносили 20000 клеток в камеру миграции клеток (камере Бойдена) на верхний слой поликарбонатной мембраны, которая является проницаемой для клеток из-за своих 8 мм пор и которая разделяет камеру на верхний и нижний отсеки. Клетки мигрируют через мембрану в зависимости от их адгезивных свойств (содержание промиграционных или антимиграционных белков) и либо прилипают к нижней стороне мембраны, либо попадают в буфер, расположенный в нижнем отсеке.

В конце эксперимента мембрана, на которой окрашиваются и подсчитываются прилипшие клетки, может быть удалена. Разница между общим количеством клеток и количеством прилипших клеток пред-

ставляет собой число мигрировавших клеток. Результаты показаны на фиг. 1.

По сравнению с необработанной контрольной группой, количество мигрирующих клеток уменьшается за счет эффекта лектина омелы. Антитела к лектинам омелы отменяют эффект.

Сильный анти-миграционный эффект достигается за счет авискумина (см. выше) ( $p < 0,001$ ).

Эти данные, согласно которым авискумин демонстрирует самый сильный эффект, можно объяснить конкретной снижением экспрессии про-миграционных генов MTA1 и MTA2 и повышением экспрессии антимиграционных генов BRMS1 и SERPINB5. В отличие от других препаратов лектина омелы, эти гены могут испытывать снижение или повышение экспрессии только за счет авискумина (см. сравнительную теплокарту на фиг. 2).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение лекарственного средства для лечения опухоли головного мозга, где лекарственное средство содержит рекомбинантный лектин омелы, представляющий собой гетеродимер, аминокислотная последовательность цепи А которого выбрана из SEQ ID NO.: 1-3; а аминокислотная последовательность цепи В выбрана из SEQ ID NO.: 4-12.

2. Применение по п.1, где опухоль головного мозга представляет собой первичную опухоль головного мозга.

3. Применение по п.1 или 2, где опухоль головного мозга выбрана из глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза.

4. Применение по любому из пп.1-3, где лекарственное средство предназначено для пациентов, для которых стандартное лечение этих опухолей неэффективно.

5. Применение по любому из пп.1-4, где лекарственное средство дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

6. Способ лечения опухоли головного мозга, включающий введение лекарственного средства, содержащего рекомбинантный лектин омелы, представляющий собой гетеродимер, аминокислотная последовательность цепи А которого выбрана из SEQ ID NO.: 1-3; а аминокислотная последовательность цепи В выбрана из SEQ ID NO.: 4-12.

7. Способ по п.6, где опухоль головного мозга представляет собой первичную опухоль головного мозга.

8. Способ по п.6 или 7, где опухоль головного мозга выбрана из глиомы, глиобластомы, менингиомы и аденомы гипофиза.

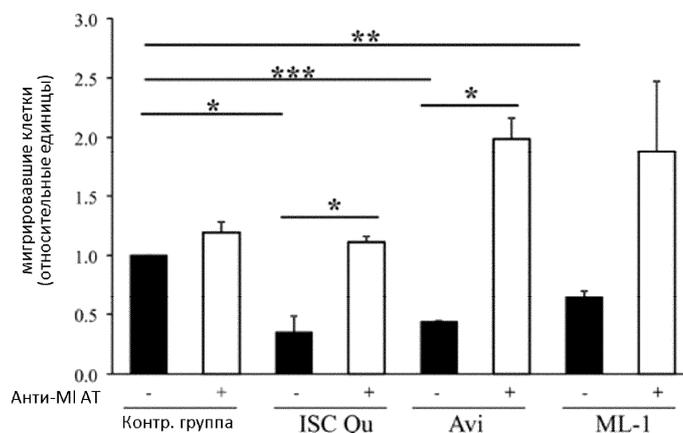
9. Способ по любому из пп.6-8, где лекарственное средство используют для лечения опухоли головного мозга у человека, причем лекарственное средство вводят в дозе в диапазоне 3-7 нг рекомбинантного лектина омелы на кг массы тела пациента.

10. Способ по п.9, где лекарственное средство вводят в дозе 5 нг рекомбинантного лектина омелы на кг массы тела пациента.

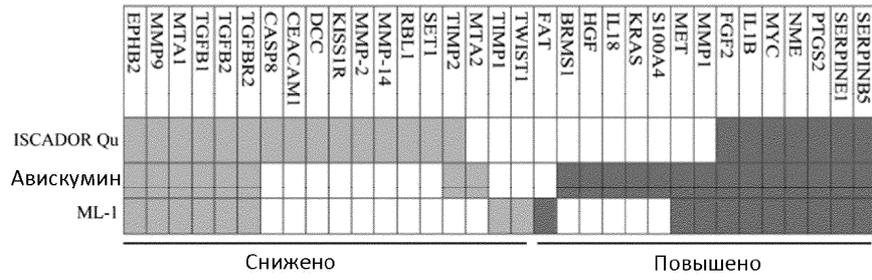
11. Способ по любому из пп.6-10, где рекомбинантный лектин омелы вводят в дозе в диапазоне 200-500 нг независимо от массы тела.

12. Способ по п.11, где рекомбинантный лектин омелы вводят в дозе 350 нг независимо от массы тела.

13. Способ по любому из пп.6-12, где лекарственное средство вводят по меньшей мере один раз в неделю, предпочтительно 2 или 3 раза в неделю.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2