



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112021** (13) **C2**  
(51) МПК (2016.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**A61P 43/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2015 02274</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Шляховенко Володимир Олексійович (UA), Міліневська Віра Олександрівна (UA), Орловський Олексій Аркадійович (UA), Залєток Софія Петрівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>16.03.2015</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>11.07.2016</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>UA 74937 U, 12.11.2012</b> Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації /О.В. Стефанов, ред. - Київ: "Авіценна", 2001. - С 361-370. Luqman S., Masood N., Srivastava S., Dubey V.A modified spectrophotometric and methodical approach to find novel inhibitors of ornithine decarboxylase enzyme: a path through the maze //Protocol Exchange. - 2013. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations //Mol. Biotechnol. - 2004. - V. 26, N. 3. - P. 249-261. Шляховенко В.О., Міліневська В.О. Визначення активності орнітиндекарбоксилази //Лаб. діагностика. - 2014. - Т. 67, № 1. - С. 36-38. Залєток С.П. Поліаміни-маркери злоякісного росту і мішень для протипухлинної терапії: дис... д-ра біол. наук: 14.01.07 / С.П. Залєток ; НАН України. Ін-т експерим. патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького. - К.: 2007. - 37 с. [18F]FLT PET for non-invasive assessment of tumor sensitivity to chemotherapy: studies with experimental chemotherapy TP202377 in human cancer xenografts in mice/ J.M.Munk, KD Erichsen , F Björklund et al.// PLoS One. - 2012. - Vol.7. - N 11.- e50618. The role of polyamine catabolism in anti-tumour drug response/ R.A.Casero, Y.Wang, T.M.Stewart et al.// Biochemical Society Transactions. - 2003. - Vol.31. - N 2.- P.361-365. Expression of epidermal ornithine decarboxylase and nuclear proto-oncogenes in phorbol ester tumor promotion-sensitive and -resistant mice/ Merle D. Kennard, Dong-Chul Kang, Raechelle L. et al.// Molecular Carcinogenesis. - 1995. - Volume 12, Issue 1, P. 14-22 Modulation of tumor cell proliferation and apoptosis by polyamine depletion in cells of head and neck squamous cell carcinomas/ JM Bock, MA Pickart, JJ Pink et al.// Radiat Res. - 1999. - Vol.152. - N 6. - P.604-610.
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>25.12.2015, Бюл.№ 24</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b>		

**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЧУТЛИВОСТІ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ДО ЛІКУВАЛЬНИХ ЧИННИКІВ**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних чинників і передбачає вимірювання активності рибонуклеаз (далі - РНКаз) та активності

UA 112021 C2

орнітиндекарбоксилази (далі - ОДК) у зразках пухлинної тканини, одержаної від тварин контрольної групи, тобто нелікованих тварин, з перещепленими або індукованими пухлинами, та від тварин паралельної дослідної групи з аналогічними пухлинами, яким застосовували досліджуваний лікувальний чинник, і за знаком та абсолютною величиною виявлених змін активності РНКаз та ОДК у пухлинах тварин дослідної групи у порівнянні з пухлинами тварин контрольної групи роблять висновки щодо наявності, інтенсивності й можливих механізмів протипухлинного ефекту досліджуваного лікувального чинника. При виконанні способу на клінічному операційному матеріалі однакові кількості операційного матеріалу трансплантують тваринам, ставлячи такі трансплантати в імунологічно привілейовані умови будь-яким з відомих способів, далі тварин розподіляють на контрольну та дослідну групи, як описано вище, після чого працюють з одержаним від тварин пухлинним матеріалом так само, як з матеріалом експериментальних пухлин, що дозволяє значно прискорити визначення чутливості злоякісних пухлин до лікувального чинника.

Винахід стосується медицини, зокрема онкології та фармакології.

Відомі такі прототиби та аналоги способу, що заявляється.

1. Повномасштабний онкологічний експеримент [1], в якому тваринам контрольної групи лише перещеплюють досліджувану пухлину, а тваринам дослідної групи після перещеплення вводять досліджуваний лікувальний чинник. Перевагою цього способу є можливість прямої кількісної оцінки протипухлинного ефекту препарату. Недоліки його - матеріаломісткість (для одержання статистично значущого результату чисельність кожної групи має складати близько 10 тварин) і тривалість (до двох місяців, а за певних обставин і значно більше).

2. Рентгенологічні та томографічні способи, в яких пацієнта або піддослідну тварину досліджують методами звичайної рентгенографії, рентгенівської або магнітно-резонансної томографії до та після введення досліджуваного лікувального чинника, оцінюючи геометричні розміри та щільність пухлин. Перевагою цієї групи способів є можливість прямої кількісної оцінки протипухлинного ефекту препарату. Недоліками є те, що ці методи здебільшого використовуються лише в клінічній онкології, оскільки для їх застосування в експерименті необхідна дуже дорога та складна спеціалізована апаратура для томографічного дослідження тварин, а також утруднена диференціація між простим гальмуванням росту пухлин (тобто переведенням живих пухлинних клітин у фазу G0 клітинного циклу) та власне індукцією процесів клітинної смерті в пухлині.

3. Прямий цитотоксичний тест, в якому досліджувану суспензію відокремлених пухлинних клітин інкубують протягом певного часу в термостаті в присутності (дослідний зразок) та у відсутності (контрольний зразок) досліджуваного лікувального чинника, після чого контрольний та дослідний зразки порівнюють за поглинанням клітинами барвників (зазвичай трипанового синього, метиленового синього або солей тетразолію) [2-4]. Перевагою цього способу є можливість прямої кількісної оцінки цитотоксичного ефекту. Недоліками є те, що цей спосіб непридатний для переважної більшості солідних пухлин, клітини яких неможливо перевести в суспензію неушкодженими, а також непридатність цього способу для тестування таких лікарських засобів, які для виявлення протипухлинного ефекту потребують попередньої активації ферментами печінки.

4. Гістологічна оцінка лікувального патоморфозу пухлин [5]. Перевагою цього способу є можливість диференційованої оцінки чутливості різновидів пухлинних клітин до лікувального чинника. Недоліком є те, що кількісна оцінка ефекту препарату можлива лише за умови використання методу серійних зрізів, який є дуже працемістким та тривалим і з цієї причини може бути використаний лише в поодиноких випадках.

5. Імплантація попередньо зважених шматочків досліджуваної пухлинної тканини в імунологічно привілейовані зони (зокрема, під капсулу нирки) мишей або щурів [6], причому тваринам контрольної групи лише імплантують пухлину, а тваринам дослідної групи після імплантації вводять досліджуваний лікувальний чинник, після чого імплантати видаляють та знову зважують. Різновидами цього способу є імплантація у черевну порожнину тварин дифузійних камер з пухлинним матеріалом, трансплантація пухлинного матеріалу тваринам безтимусним, або попередньо опроміненим іонізуючою радіацією, або тваринам з медикаментозно викликаною імносупресією. Перевагами цього способу є висока точність оцінки чутливості пухлин до лікарських препаратів, а також придатність як для експериментальних пухлин, так і для клінічного операційного матеріалу. Недоліки його - значні працемісткість та матеріаломісткість (потрібність великої кількості тварин для визначення спектра чутливості кожної пухлини), а також необхідність, для різних варіантів способу, або спеціального персоналу, навченого проводити хірургічні операції на дрібних тваринах, або дуже дорогих систем життєзабезпечення для імносупресованих тварин, або/та радіологічного обладнання і відповідних умов техніки безпеки.

6. Способи, засновані на виявленні фрагментації ДНК пухлинних клітин під впливом досліджуваного лікувального чинника [7-10]. Переваги способів цієї групи - їх досить висока швидкість та чутливість, порівняно низька праце- та матеріаломісткість, а також придатність і для експериментальних пухлин і для клінічного операційного матеріалу. Недолік - те, що поза увагою дослідника лишаються ранні метаболічні ефекти, які можуть передувати фрагментації ДНК, завдяки чому можуть залишитися поза увагою і перспективні лікувальні чинники з непрямою і порівняно повільною цитотоксичною дією.

Власне опис винаходу, що заявляється.

В основу винаходу поставлено задачу: розробити швидкий (реалізований протягом 1-2 робочих днів), придатний для скринінгових порівняльних досліджень груп лікувальних чинників та придатний як для експериментальних пухлин, так і для клінічного матеріалу, а також і як для асцитних, так і для солідних пухлин спосіб оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних

чинників, оснований на виявленні ранніх метаболічних змін у пухлинних клітинах у процесі лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що при виконанні способу, який заявляється, з пухлин тварин контрольної групи, тобто тварин, які не отримували лікування, з перещепленими або індукованими пухлинами, та з пухлин тварин паралельної дослідної групи з аналогічними пухлинами, яким застосовували досліджуваній лікувальний чинник, виділяють шматочки пухлинної тканини без візуальних ознак некрозу; виділені шматочки піддають гомогенізації; в гомогенатах визначають активність РНКаз, зокрема РНКаз L, та орнітиндекарбоксилази (ОДК) будь-яким з відомих способів; після чого за знаком та абсолютною величиною виявлених змін активності РНКаз та ОДК у пухлинах тварин дослідної групи у порівнянні з пухлинами тварин контрольної групи роблять висновки щодо наявності, інтенсивності та можливих механізмів протипухлинного ефекту досліджуваного лікувального чинника.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом винаходу наступний.

По-перше, підвищення загальної РНКазної активності в клітинах призводить до руйнування значної частини мРНК та рРНК, завдяки чому гальмується накопичення в S-фазі клітинного циклу білків, необхідних для мітозу, і тим самим гальмується проліферація клітин.

По-друге, поліаміни є необхідними чинниками проліферації клітин, а ОДК є ключовим ферментом біосинтезу поліамінів, завдяки чому зменшення активності ОДК в клітинах є найважливішою з ранніх метаболічних ознак гальмування проліферації клітин.

По-третє, зменшення вмісту поліамінів у клітинах та збільшення в них РНКазної активності функціонально пов'язані між собою. Зокрема, в клітинах присутня так звана РНКаз L, яка за нормального або підвищеного вмісту поліамінів у клітині є латентною (неактивною), а при зниженому вмісті поліамінів (який здебільшого обумовлений саме зменшенням активності ОДК) активується і може бути виявлена ензимологічними методами.

Таким чином, одночасне підвищення активності РНКаз, зокрема РНКаз L, та зменшення активності ОДК являють собою взаємопов'язані ранні метаболічні ознаки чутливості пухлини до досліджуваного лікувального чинника. Відповідно, відсутність таких ефектів свідчить про відсутність лікарської чутливості пухлини.

Приклади практичного застосування винаходу.

Як еталонні тест-агенти з відомою протипухлинною активністю застосовували один з широко вживаних в клінічній онкології протипухлинних препаратів - метотрексат, а також класичний специфічний інгібітор ОДК - диформетилорнітин (ДФМО), широко відомий своєю високою здатністю до гальмування росту злоякісних пухлин. Ці речовини належать до різних класів органічних сполук та справляють свою терапевтичну дію за допомогою принципово різних біохімічних механізмів.

Приклад 1. Мишам лінії C57B1/6 з перещепленою карциною легені Lewis підшкірно вводили ДФМО в дозі 800 мг/кг маси тіла, або метотрексат у дозі 0,8 мг/кг. Тваринам контрольної групи лише перещеплювали карциному легені Lewis, не проводячи надалі ніякої терапії.

Приклад 2. В іншому досліді нелінійним мишам з перещепленим раком Ерліха (асцитна форма) вводили ДФМО у дозі 800 мг/кг або метотрексат у дозі 0,8 мг/кг. Тваринам контрольної групи лише перещеплювали карциному легені Lewis, не проводячи надалі ніякої терапії. Тваринам контрольної групи лише перещеплювали асцитний рак Ерліха, не проводячи надалі ніякої терапії.

В обох дослідях тварин контрольної та дослідної груп забивали через 4 години після введення лікувальних засобів, тобто на рівні ранніх метаболічних реакцій пухлинних клітин; пухлини вилучали та використовували для біохімічних досліджень.

В пухлинних клітинах визначали активність ОДК за методом [11, 12], та активність внутріклітинних рибонуклеаз методом зимограм. Зимограми сканували на лазерному денситометрі LKB (Швеція) і результат виражали у відносних одиницях активності (далі - В.О.).

Результати досліджень за Прикладом 1 наведені на Фіг. 1 та Фіг. 3.

Результати досліджень за Прикладом 2 наведені на Фіг. 2 та Фіг. 4.

Як видно з наведених діаграм, на ранньому (4 години) терміні після одноразового введення будь-якого з випробуваних різномірних протипухлинних агентів спостерігалися статистично значущі ( $P < 0,05$ ) ефекти підвищення РНКазної активності та зменшення активності ОДК в пухлинних клітинах. Ці дані одержано на пухлинних моделях, різних за своїм походженням та характером росту, на лінійних та нелінійних тваринах.

Таким чином, технічного результату винаходу досягнуто.

Джерела інформації:

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації /О.В. Стефанов, ред. - Київ: "Авіценна", 2001. - С 361-370.

2. Орловський О.А., Залєток С.П., Лялюшко Н.М. та ін. Прояви закону Введенського в цитотоксичній дії протипухлинних препаратів, поліамінів та модуляторів їх метаболізму щодо клітин експериментальних пухлин //Актуальные проблемы медицины и биологии. - 2004. - №1. - С. 339-356.

3. Передерни В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. Иммуный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. - Киев, 1995. - С. 61-62.

4. Ohno M., Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 //J. Immunol. - 1991. - N 145. - P. 199-203.

5. Галахин К.А., Курик Е.Г. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей пищеварительного тракта. - Киев: "Книга плюс", 2000. - 176 с.

6. Гаврина Г.Б. Разработка подходов к индивидуализации антиметастатической терапии. - Дисс. ... канд. мед. наук. - Киев, 1990. - 139 с.

7. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death //Toxicol. Pathol. - 2007. - V.35, N4. - P. 495-516.

8. Galuzzi L, Vitale I., Abrams J.M., et al. Molecular definition of cell death subroutines: recommendations of Nomenclature Committee on Cell Death 2012 //Cell Death and Differentiation. - 2012. - V. 19. - P. 107-120.

9. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations //Mol. Biotechnol. - 2004.- V. 26, N. 3. - P. 249-261.

10. Шляховенко В.О., Орловський О.А. Спосіб оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних чинників. - Патент України на винахід № 104343 UA //Бюл. промисл. власн. - 2014. - № 2.

11. Luqman S., Masood N., Srivastava S., Dubey V.A modified spectrophotometric and methodical approach to find novel inhibitors of ornithine decarboxylase enzyme: a path through the maze //Protocol Exchange. - 2013. - DOI: 10.1038/protex.2013.045.

12. Шляховенко В.О., Міліневська В.О. Визначення активності орнітиндекарбоксилази //Лаб. діагностика. - 2014. - Т. 67, № 1. - С. 36-38.

Перелік фігур до заявки на корисну модель "Спосіб оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних чинників"

Фіг. 1. Вплив ДФМО та метотрексату на активність орнітин декарбоксилази в клітинах експериментального раку легені Lewis. Стовпчик 1 - показник контрольної групи тварин; стовпчик 2 - групи тварин, що одержували ДФМО; стовпчик 3 - групи тварин, що одержували метотрексат.

Фіг. 2. Вплив ДФМО та метотрексату на активність орнітин декарбоксилази в клітинах асцитного раку Ерліха. Стовпчик 1 - показник контрольної групи тварин; стовпчик 2 – групи тварин, що одержували ДФМО; стовпчик 3 - групи тварин, що одержували метотрексат.

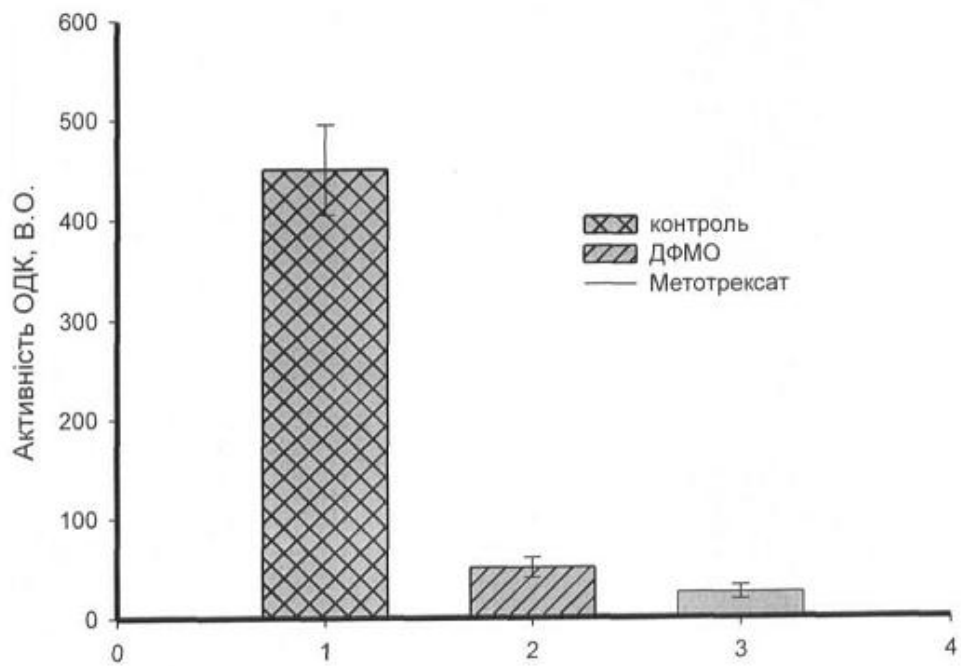
Фіг. 3. Вплив ДФМО і метотрексату на активність внутріклітинних рибонуклеаз в клітинах експериментального раку легені Lewis. Стовпчик 1 - показник контрольної групи тварин; стовпчик 2 - групи тварин, що одержували ДФМО; стовпчик 3 - групи тварин, що одержували метотрексат.

Фіг. 4. Вплив ДФМО та метотрексату на активність РНКаз в клітинах асцитного раку Ерліха. Стовпчик 1 - показник контрольної групи тварин; стовпчик 2 - групи тварин, що одержували ДФМО; стовпчик 3 - групи тварин, що одержували метотрексат.

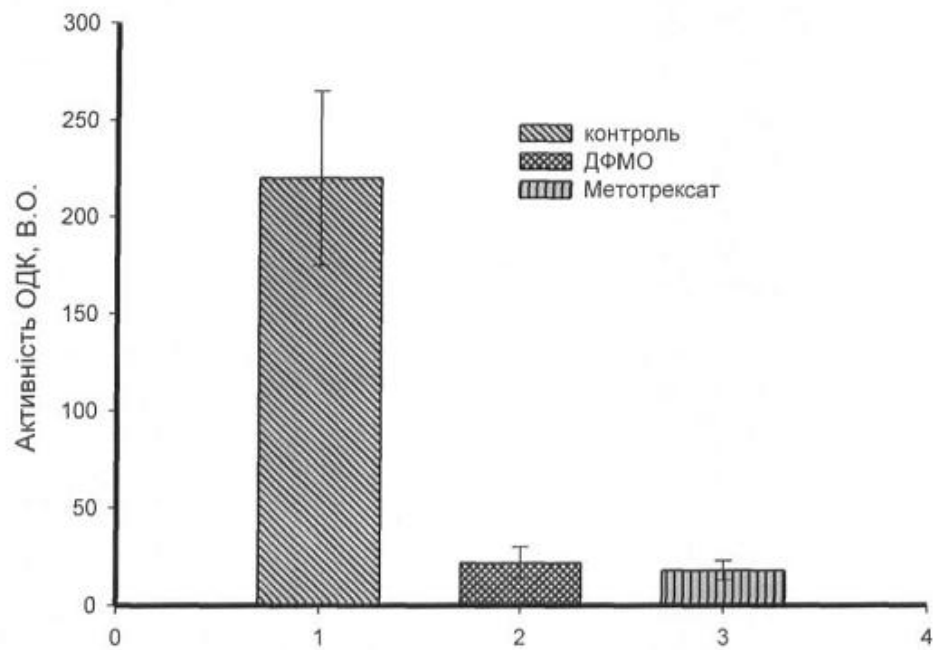
#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних чинників, який **відрізняється** тим, що в ньому вимірюють активність рибонуклеаз (далі - РНКаз) та активність орнітиндекарбоксилази (далі - ОДК) у зразках пухлинної тканини, одержаної від тварин контрольної групи, тобто нелікованих тварин, з перещепленими або індукованими пухлинами, та від тварин паралельної дослідної групи з аналогічними пухлинами, яким застосовували досліджуваний лікувальний чинник, і за знаком та абсолютною величиною виявлених змін активності РНКаз та ОДК у пухлинах тварин дослідної групи у порівнянні з пухлинами тварин контрольної групи роблять висновки щодо наявності, інтенсивності й можливих механізмів протипухлинного ефекту досліджуваного лікувального чинника, а при його виконанні на клінічному операційному матеріалі однакової кількості операційного матеріалу трансплантують тваринам, ставлячи такі трансплантати в імунологічно привілейовані умови будь-яким з відомих

способів, далі тварин розподіляють на контрольну та дослідну групи, як описано вище, після чого працюють з одержаним від тварин пухлинним матеріалом так само як з матеріалом експериментальних пухлин.



Фіг. 1



Фіг. 2

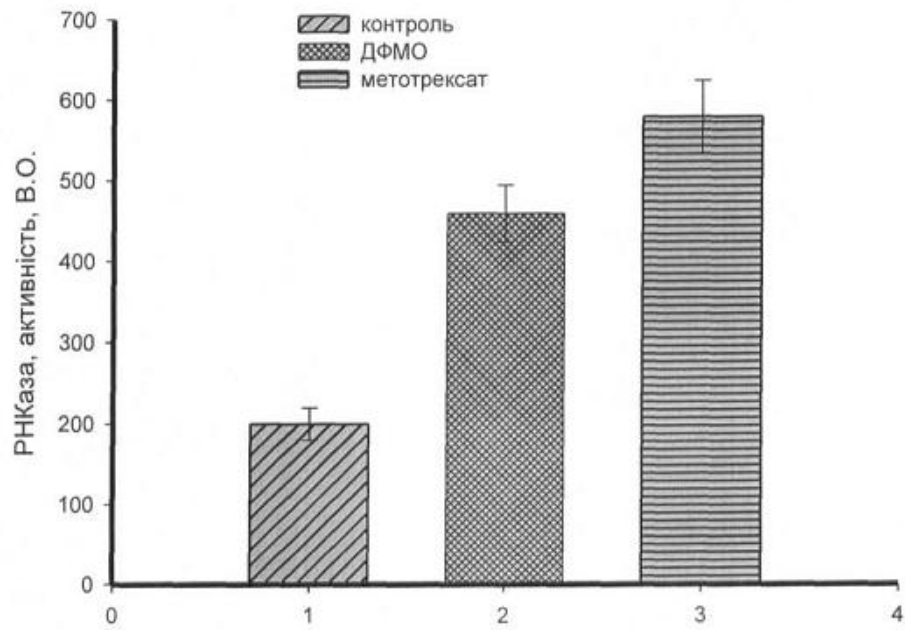


Fig. 3

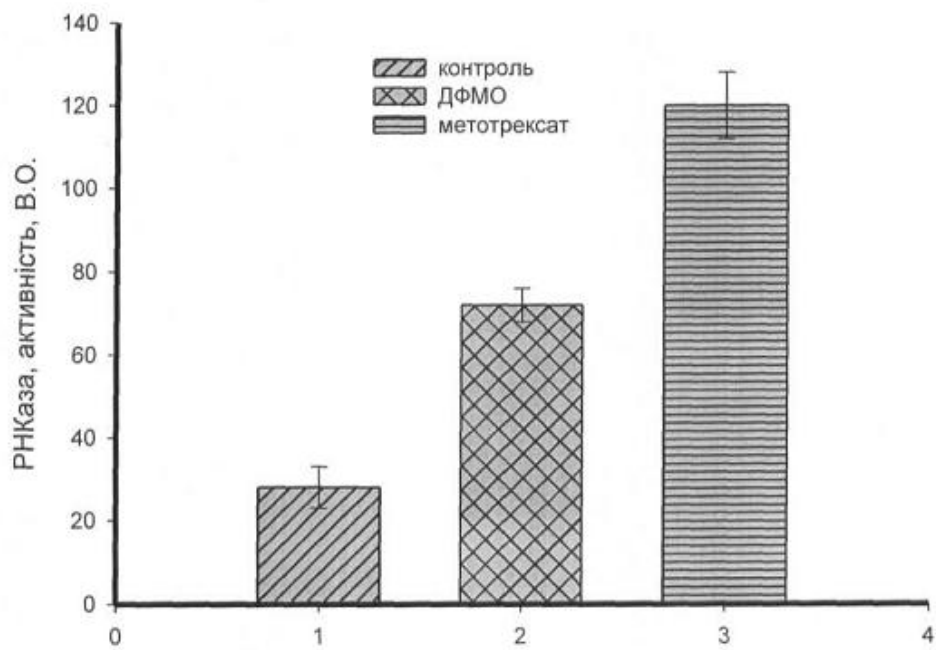


Fig. 4

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601