



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38574 (13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗЛОЯКІСНОЇ ПУХЛИНИ

(21) 2000074532

(22) 27.07.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Драник Георгій Миколайович, Душко Миколай
Євгенович(73) Драник Георгій Миколайович, Душко Миколай
Євгенович

(57) 1. Спосіб лікування злоякісної пухлини, який включає видалення злоякісної пухлини, проведення імунотерапії шляхом лімфоцитаферезу - отримують лімфоцити із крові пухлиноносія, отримують пухлинні клітини із видаленої пухлини з подальшим їх опроміненням, інкубують пухлинні клітини та лімфоцити, їх відокремлюють один від одного, потім активовані лімфоцити вводять пухлиноносію внутрішньовенно, який відрізняється тим, що проводять медикаментозну терапію, ставлять реакцію непрямой імуофлюоресценції пухлинних клітин з

моноклональними антитілами та антивидовими антитілами на предмет виявлення на поверхні пухлинних клітин коstimуляційних молекул CD80 та CD86 і при негативній реакції непрямой імуофлюоресценції проводять трансфекцію гену B7-1, додатково проводять місцеве введення активованих аутологічних лімфоцитів пухлиноносію.

2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що проводять медикаментозну терапію лафероном за 10 діб до введення активованих лімфоцитів хворому, при цьому лаферон вводять внутрішньом'язово у кількості 3 млн. од. на добу протягом 10 діб з повторенням курсу.

3. Спосіб за п.п.1,2, який відрізняється тим, що проводять медикаментозну терапію інтерлейкіном 12 після введення активованих лімфоцитів, при цьому інтерлейкін 12 вводять підшкірно протягом 8 тижнів.

Винахід відноситься до області медицини, а саме, - до онкології, імунології та генетики, та може бути використаний при лікуванні злоякісних пухлин різноманітної етіології.

Відомий спосіб лікування злоякісних пухлин по Osmond, який включає проведення імунотерапії (В.І.Новиков, В.І.Карандашов, І.Г.Сидорович. Иммунотерапия при злокачественных новообразованиях. - С.103). Спосіб здійснюється тим, що проводять імунотерапію шляхом лімфоцитаферезу - отримують лімфоцити із крові пухлиноносія, отримують пухлинні клітини із видаленої пухлини з подальшим їх опроміненням, інкубацію пухлинних клітин та лімфоцитів, та їхнє відокремлювання один від одного. Потім пухлиноносію вводять активовані аутологічні лімфоцити внутрішньовенно.

Недоліком способу є те, що не в усіх хворих пухлинний процес підлягає регресу.

В основу винаходу покладено задачу удосконалення способу лікування злоякісної пухлини, в якому установлюють наявність на поверхні пухлинних клітин коstimуляційних молекул CD80 і CD86 та, при їх відсутності, за допомогою трансфекції гену B7-1 забезпечують наявність коstimуляційних молекул CD80 на пухлинних клітинах, за рахунок цього утворюються специфічні активовані

T- лімфоцити-кіллери, які раніше не генерувались (за методом прототипу), через відсутність на поверхні пухлинних клітин коstimулюючих молекул CD80, в результаті чого пухлинний процес призупиняється.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі лікування злоякісної пухлини, який включає проведення імунотерапії шляхом лімфоцитаферезу - отримують лімфоцити із крові пухлиноносія, отримують пухлинні клітини із видаленої пухлини з подальшим їх опроміненням, інкубують пухлинні клітини та лімфоцити, їх відокремлюють один від одного, та далі вводять внутрішньовенно активовані аутологічні лімфоцити пухлиноносію, згідно винаходу проводять медикаментозну терапію, ставлять реакцію непрямой імуофлюоресценції між пухлинними клітинами, моноклональними антитілами анти-CD80 та антивидовими антитілами на предмет наявності на поверхні пухлинних клітин коstimуляційних молекул CD80, при негативній реакції непрямой імуофлюоресценції проводять трансфекцію гену B7-1, додатково проводять місцеве введення активованих аутологічних лімфоцитів пухлиноносію.

Згідно винаходу, проводять медикаментозну терапію лафероном за 10 діб до введення активованих

(19) UA (11) 38574 (13) A

ваних аутологічних лімфоцитів хворому, при цьому лаферон вводять внутрішньом'язково у кількості 3 млн. од. у добу протягом 10 діб з повторенням курсу.

Згідно винаходу, медикаментозну терапію проводять інтерлейкіном 12, при цьому інтерлейкін 12 вводять підшкірно протягом 8 тижнів.

Винахідний рівень забезпечується неочевидністю можливості цілеспрямованої зміни гено- та фенотипу пухлинних клітин при проведенні трансфекції і внаслідок цього генерації специфічних Т-лімфоцитів - кіллерів у тих випадках, в яких раніше цього не відбувалося та неочевидністю запропонованої комбінації медикаментозної терапії, за рахунок чого досягається кінцевий результат.

Спосіб здійснюється таким чином: у хворого перед видаленням пухлини, проводять процедури лімфоцитаферезу за стандартною методикою (Гравитационная хирургия крови / За ред. О.К.Гаврилова. - С. 52-80). Отримані лімфоцити містять в стерильні умови в культуральне середовище RPMJ 1640, яке містить L-глутамін (2мМ), 2-меркаптоетанол (50 мкМ), пеніцилін (100 одмл), стрептоміцин (100 мкг/мл) та 10% АВ-сироватку людини. Проводять видалення пухлини. Пухлину містять в стерильний посуд, доставляють з операційної у лабораторію. Пухлину подрібнюють, окремі фрагменти пухлинної тканини підлягають ферментативній обробці у трипсинізованих культуральних флаконах при 37°C (3 рази протягом 45 хвилин). Отримують клітинну суспензію. Проводять відмивання порціями середовища, усунення клітинних уламків еритроцитів у градієнті фікол-паку. Вилучають із суспензії пухлинних клітин 1мл. Проводять дві реакції непрямой імунофлюоресценції між пухлинними клітинами, моноклональними антитілами (анти-СД80 і анти-СД86) та антивидовими антитілами до них, які помічені флюоресцеїном. Реакції здійснюють таким чином: пухлинні клітини з 1 мл суспензії наносять на два предметних скла, роблять два мазки і фіксують ацетоном. Після чого обробляють перший мазок моноклональними антитілами анти-СД80, другий мазок обробляють моноклональними антитілами анти-СД86, інкубують 30 хвилин у вологій камері при t 37°C, відмили, далі обидва мазки обробляють антивидовими ан-

титілами, які помічені флюоресцеїном, інкубують 30 хвилин. При розгляданні мазків у флюоресцентному мікроскопі специфічного світлення не виявляється, тобто обидві реакції негативні: експресії на пухлинних клітинах коstimуляційних молекул СД80 та СД86 немає.

Методом електропорації проводять трансфекцію гену В7-1 в пухлинні клітини, які містяться у суспензії.

Опромінують пухлинні клітини енергією 10000 Рад. Проводять інкубацію пухлинних клітин і лімфоцитів: до суспензії пухлинних клітин додають лімфоцити, які були одержані шляхом лімфоцитаферезу та попередньо (за 45 хвилин) проінкубовані з моноклональними антитілами анти-СД3 у концентрації 10 нг/мл середовища протягом 45 хвилин. В культуральне середовище додають інтерлейкін 1, інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, альфа-інтерферон і гама-інтерферон. Інкубують пухлинні клітини та лімфоцити протягом 6 діб, по закінченні яких, проводять повне відокремлення лімфоцитів та пухлинних клітин у переривчастому градієнті фікол-гіпаку (75% розчин). Отримують однорідну клітинну суспензію лімфоцитів, яка складається з активованих лімфоцитів пухлиноносія та плазми. Активовані аутологічні лімфоцити вводять пухлиноносію внутрішньовенне та місцеве.

За 10 діб до цього розпочате введення хворому лаферону по 3 млн. од. на добу внутрішньом'язково 10 діб поспіль, а далі - також кожні півтора місяця протягом півроку.

Після введення активованих лімфоцитів вводять інтерлейкін 12 підшкірно протягом 8 тижнів.

Приклад.

Хворий N потрапив у відділення загальної хірургії з діагнозом: меланома лівої пахової області, III стадія, інвазія за Кларком 3, хворому проведене видалення меланоми з лівобічною паховою лімфаденектомією. Подальше проведення введення активованих аутологічних лімфоцитів і медикаментозна терапія за вищезгаданою методикою.

Подальше ознак пухлинного росту немає.

Перевага способу складається в тому, що пухлинний процес призупиняється у тих випадках, коли раніше, при використанні методу-прототипу, цього не відбувалося.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
