



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43727 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 35/28МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ МЕТАСТАЗІВ

1

2

(21) u200903729

(22) 16.04.2009

(24) 25.08.2009

(46) 25.08.2009, Бюл.№ 16, 2009 р.

(72) ФІЛЬЧАКОВ ФЕОДОСІЙ ВІКТОРОВИЧ, ШУ-
МІЛІНА КАТЕРИНА СТАНІСЛАВІВНА, ЛЬОН ГАН-
НА ДАРІЇВНА, ГРІНЕВИЧ ЮРІЙ ЯКИМОВИЧ(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ
ІНСТИТУТ РАКУ"

(57) Спосіб профілактики метастазів, що включає використання пухлиноспецифічного фактора переносу, який **відрізняється** тим, що ксеногенний пухлиноспецифічний фактор переносу отримують із лімфоцитів, сенсibilізованих *in vivo* до антигенів пухлини, на піку імунної відповіді щурів після внутрішньоочеревинної імунізації живими клітинами мишачої карциноми легені Льюїс і вводять реципієнту внутрішньоочеревинно.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема - онкології, і може бути використана в імунотерапії хворих онкологічного профілю.

Злоякісна пухлина у будь-якій стадії може виявитись системним захворюванням, яке супроводжується прихованою дисемінацією пухлинних клітин, тому ад'ювантне лікування як метод запобігання метастазуванню відіграє дуже важливу роль. В цьому сенсі, поряд з хіміотерапією цитостатиками та променевою терапією, біотерапія набуває особливого значення [1]. Перспективним є пошук засобів, спрямованих на посилення механізмів протипухлинної резистентності організму [2]. Таким засобом може бути імунотерапія, що ґрунтується на адаптивному переносі протипухлинної імунореактивності, зокрема, за допомогою субклітинних фракцій - фактора переносу (ФП), виділеного із сенсibilізованих до пухлинних антигенів лімфоцитів [3]. Діюча речовина ФП - це трансферфакторні поліпептиди Т-клітинного походження, які відносяться до родини гідрофільних поліпептидних молекул з низькою молекулярною масою (3,5-12,0кД) [4, 5].

Препарати ФП, які застосовувались у хворих онкологічного профілю, у більшості випадків отримані з лейкомасти донорів [6-8]. Ці препарати не володіють пухлиноспецифічною активністю, їх імунотерапевтична дія може бути непрогнозованою при використанні в імунотерапії таких хворих. Дослідження препаратів ФП, специфічних до пухлинних антигенів, в імунотерапії хворих онкологічного профілю малочисельні. Використання в ад'ювантній терапії ФП, специфічного до вірусу Епштейн-Барр [9], покращує виживаність хворих на карци-

ному носоглотки в порівнянні з контрольною групою хворих. Проте, зважаючи на невелику кількість хворих дослідної групи, остаточні висновки щодо ефективності цього препарату робити зарано.

За прототип обрано спосіб використання ФП в терапії хворих на гормон-незалежний рак простати [A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer / G.Pizza, C. de Vinci, D.Cuzzocrea et al. // Biotherapy. - 1996. - Vol.9, №1-3. - P.123-132], за яким автори застосовували препарат ФП, специфічний до пухлиноасоційованих антигенів раку простати, який був отриманий в системі *in vitro*. У 50 хворих на гормоннезалежний рак простати такий препарат був застосований внутрішньом'язово в дозі 2-5ум.од. один раз на місяць довготривалий час. Спостереження за хворими впродовж 1-9 років показало повну ремісію у 2 пацієнтів, часткову ремісію - у 6 і відсутність прогресії метастатичної хвороби - у 14 пацієнтів. Медіана виживаності склала 126 тижнів, що вище за контрольний показник. Автори відзначають відсутність побічної дії при застосуванні специфічного ФП і перспективність використання такого напрямку імунотерапії у онкохворих.

Позитивним в прототипі є здатність використаного ФП, специфічного до пухлиноасоційованих антигенів раку простати, посилювати клітинно-опосередковану імунну відповідь у хворих на рак простати, результатом чого є гальмування процесу метастазування і збільшення виживаності хворих, які отримували специфічний ФП.

(19) UA (11) 43727 (13) U

Недоліком прототипу є спосіб отримання специфічного ФП в системі *in vitro*, що обмежує фізіологічні умови сенсibiлізації лімфоцитів до антигенів пухлини для забезпечення генерації пухлиноспецифічних трансферфакторних пептидів імунокомпетентними клітинами.

Задачею корисної моделі є створення способу профілактики метастазів шляхом введення ксеногенного пухлиноспецифічного (до антигенів конкретної пухлини) ФП, отриманого з лімфоцитів селезінки щурів на піку імунізації живими ксеногенними пухлинними клітинами мишачої карциноми легені Льюїс (КЛ), що дасть можливість запобігти виникненню метастазів у мишей при попередньому введенні (до імплантації КЛ) або загальмувати їх ріст (при введенні на початковій стадії росту КЛ) при його застосуванні.

Поставлена задача вирішується таким чином:

Інтактним мишам C57BL/6 внутрішньоочеревинно одноразово в дозі 200пг/тварину вводять препарат ксеногенного пухлиноспецифічного ФП, отриманого з лімфоцитів селезінки щурів на піку імунної відповіді (на 14-у добу) після внутрішньоочеревинної імунізації живими клітинами КЛ згідно методики [II]. Через 5 діб після ін'єкції ФП для відтворення моделі пасивного метастазування КЛ тваринам внутрішньовенно вводять живі клітини КЛ (життєздатність 95%) в об'ємі 0,1мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) в дозі $0,6 \times 10^6$ кл/мишу. На 16-у добу тварин умертвляють під ефірним наркозом шляхом дислокації шийних хребців і оцінюють антиметастатичний ефект ФП.

Підтвердженням того, що внутрішньоочеревинне введення ФП запобігає метастазуванню, є формування протективної імунної відповіді за допомогою попереднього введення ФП реципієнтам пухлини, що проявляється в попередженні виникнення метастазів КЛ в легенях у 60% тварин та гальмуванні їх росту.

Прикладами реалізації заявленого способу можуть вважатися результати експериментальних досліджень - гальмування процесу метастазування у тварин після введення їм ксеногенного пухлиноспецифічного ФП.

I. Інтактним мишам C57BL/6 внутрішньоочеревинно одноразово в дозі 200пг/тварину вводили препарати ксеногенного пухлиноспецифічного ФП, отриманих з лімфоцитів селезінки щурів на 7-, 14-, 60-у добу (відповідно ФП7-І, ФП14-І, ФП60-І) після внутрішньоочеревинної імунізації живими клітинами КЛ. Дію цих препаратів порівнювали з дією неспецифічного ФП (ФПН), отриманого з лімфоцитів селезінки інтактних тварин. Через 5 діб після ін'єкції ФП тваринам внутрішньовенно були введені живі клітини КЛ (життєздатність 95%) в об'ємі 0,1мл ЗФР в дозі $0,6 \times 10^6$ кл/мишу. На 16-у добу тварин умертвляли під ефірним наркозом шляхом дислокації шийних хребців і оцінювали антиметастатичний ефект ФП. Показано, що на тлі попереднього введення ФП14-І в 60% випадків метастазів КЛ в легенях не виявлено. На відміну від цього попереднє введення ФП7-І запобігло появі метастазів лише у 14% тварин, а після введення ФП60-І або ФПН-О %, як і в контрольній групі. Кількість метастазів, значно менша за показник в контроль-

ній групі ($47,00 \pm 2,68$), виявлена на тлі попереднього введення ФП14-І ($5,50 \pm 0,67$) та ФП60-І ($4,00 \pm 1,48$). Про ефективне формування протективного імунітету свідчить і значне зменшення об'єму метастазів у тварин досліджуваних груп: найменший об'єм зафіксовано в групі з попереднім введенням ФП14-І ($5,40 \pm 4,23$ мм³), найбільший - в групі з ФП7-І ($111,82 \pm 48,16$ мм³) та ФПН ($111,28 \pm 31,63$ мм³) проти об'єму метастазів в контрольній групі ($345,72 \pm 1,60$ мм³).

Таким чином, попереднє одноразове внутрішньоочеревинне введення ксеногенного пухлиноспецифічного ФП14-І в дозі 200пг/тварину запобігає розвитку метастазів КЛ в легенях у 60% тварин та гальмує їх ріст у випадку виникнення.

II. Інтактним мишам C57BL/6 підшкірно прищепили КЛ. На 2-у добу і потім через кожні 7 діб (всього 4 ін'єкції) тваринам дослідних груп внутрішньоочеревинно вводили зразки ФП14-І та ФПН в дозі 200пг в 0,1мл ЗФР та 0,1мл ЗФР - тваринам контрольної групи. На 35-у добу тварин умертвляли під ефірним наркозом і проводили дослідження кількості та об'єму метастазів. Кількість метастазів після введення ФП14-І зменшилась у 1,3 рази, а після введення ФПН практично не відрізнялась від показника в контрольній групі. Введення ФП14-І та ФПН істотно вплинуло на інтенсивність росту метастазів: це проявилось збільшенням кількості метастазів в аваскулярній фазі на 20% в порівнянні з контрольною групою. Крім того, встановлено, що ФП14-І сприяв зменшенню об'єму метастазів в легенях в 2,2 рази, а ФПН такої дії не справляв.

Отже, порівняльний аналіз впливу зразків ФП14-І та ФПН на процес спонтанного метастазування КЛ в легені мишей C57BL/6 виявив, що ФП14-І ефективно гальмує розвиток метастазів у мишей, що підтверджує виразну антиметастатичну дію цього препарату.

Таким чином, в описаному способі профілактики метастазів шляхом внутрішньоочеревинного введення мишам ксеногенного пухлиноспецифічного ФП, отриманого з лімфоцитів селезінки щурів на піку імунної відповіді (на 14-у добу) після внутрішньоочеревинної імунізації живими клітинами КЛ, досягнуто утворення протективного імунного захисту організму стосовно КЛ. Це проявляється запобіганням виникнення метастазів КЛ в легенях мишей та пригніченням їх росту при профілактичному одноразовому внутрішньоочеревинному введенні тваринам наднизьких концентрацій пухлиноспецифічного ФП ксеногенного походження та терапії в повторюваному режимі наднизькими дозами препарату. Подальше дослідження властивостей пухлиноспецифічного ФП ксеногенного походження дозволить отримувати препарати для імунотерапії в післяопераційному періоді з метою профілактики рецидивів та метастазів у хворих онкологічного профілю.

Джерела інформації:

1. T cell Memory, anergy and immunotherapy in Breast cancer / V. Schirmacher, M. Feuerer, P. Beckhove et al. // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. - 2002. -Vol.7, №2.-P.201-207.

2. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and

immunosubversion // Nature Reviews. - 2006. - Vol.6. - P.715-727.

3. Immunotherapy with transfer factor in hormone-resistant metastasized carcinoma of the prostate / F. Corrado, G. Pizza, C. de Vinci et al. // Arch. Esp. Urol. - 1989. - №42. - P.191-196.

4. Kirkpatrick C.H. Structural nature and functions of transfer factors // Ann. N. Y. Acad. - 1993. - Vol. 685. - P. 362-368.

5. Биологические и клинические аспекты фактора переноса - В кн.: Иммунологическая инженерия / М.П. Арала-Чейвз, М. Хорсманхейлео, Дж.М. Гоуст и др.; Под ред. Д.У.Джирша: Пер. с англ. - М.: Медицина, 1982.-С.53-104.

6. Fujisawa T., Yamaguchi Y. Postoperative immunostimulation after complete resection improves survival of patients with stage 1 nonsmall cell lung carcinoma // Cancer. - 1996. - №78. - P.1892-1898.

7. Transfer factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy / V. Pilotti, M. Mastrorilli, G. Pizza et al. // Biotherapy. - 1996. - Vol.9, №1-3. -P.117-121.

8. Adjuvant treatment using transfer factor for bronchogenic carcinoma: long-term follow-up / R.J.Whyte, M.A.Schork, A.Hoan et al. // Ann. Thorac. -1992. - Vol.53, №3. - P.391-396.

9. Transfer factor with anti-EBV activity as an adjuvant therapy for nasopharyngeal carcinoma: A pilot study / U. Prasad, M.A. bin Jalaludin, P. Rajadurai et al. // Biotherapy. - 1996. - Vol.9, №1-3. - P.109-115.

10. A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer / G. Pizza, C. de Vinci, D. Cuzzocrea et al. // Biotherapy. - 1996. - Vol.9, №1-3. - P.123-132 (прототип).

11. Деклараційний патент на корисну модель №16938, UA. МПК А61К35/28. Спосіб отримання пухлиноспецифічного фактора переносу / Ін-т онкології АМН України. Ф.В.Фільчаков, Л.І.Бобро, К.С.Шуміліна, Ю.Я.Гріневич (UA). - Заявка №200504315. Заявл. 06.05.2005. Опубл. 15.09.2006. -Бюл. №9, 2006.