



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **45751** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 35/66

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА

1

2

(21) u200905645

(22) 02.06.2009

(24) 25.11.2009

(46) 25.11.2009, Бюл. № 22, 2009 р.

(72) ПОТЕБНЯ ГРИГОРІЙ ПЛАТОНОВИЧ, ЛУК'Я-
НОВА НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА, БАЗАСЬ ВОЛОДИМИР
МИКОЛАЙОВИЧ, ЛІСОВЕНКО ГАЛИНА СТЕПАНІ-
ВНА, ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕДОРОВИЧ(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛО-
ГІЇ, ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕ-ЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇ-
НИ(57) Спосіб лікування хворих на рак шлунка, що
включає післяопераційний курс вакцинотерапії та
ревакцинації, який **відрізняється** тим, що в після-
операційних зразках пухлин методом імуногістохі-
мії визначають маркери і, при наявності позитивної
реакції з моноклональними антитілами проти біл-
ків p53, EGFR, HER-2, β-катеніну, VEGF та Bcl-2,
призначають протипухлинну аутовакцину.

Заявка належить до галузі медицини, зокрема
- до онкології, і може бути використана для імунотерапії хворих на рак шлунка.

Рак шлунка залишається одним з найбільш
поширених онкологічних захворювань: домінують
розповсюджені форми захворювання (до 60%),
спостерігається висока смертність протягом пер-
шого року після встановлення діагнозу, відзнача-
ється низька чутливість до хіміо- і променевої те-
рапії [1, 2]. У зв'язку з цим на передній план
виходить пошук нових методів лікування хворих на
злоякісні новоутворення шлунка [3, 4].

Сучасна імунотерапія включає кілька напрям-
ків: використання імуномодуляторів, моноклональ-
них антитіл та кон'югатів на їх основі, а також про-
тиракових вакцин, дія яких ґрунтується на
специфічній індукції протипухлинних реакцій орга-
нізму за допомогою пухлино-асоційованих антиге-
нів та ад'ювантів [5]. Вакцини, призначені для ши-
рокого клінічного застосування, в ідеальному
випадку повинні бути безпечними, ефективними
проти широкого спектру пухлин одного гістологіч-
ного типу, досить діючими, щоб можна було обме-
житися невеликим числом імунізацій, мати стабі-
льні властивості, давати відтворювані результати,
бути простими у використанні [6].

Поряд з цим, на сьогодні вже відомо, що у
хворих, які мають пухлини однакової гістологічної
будови і стадії поширення хвороби, результати
лікування варіюють у широких межах, а агресив-
ність перебігу хвороби при окремих злоякісних
новоутвореннях корелює зі змінами рівня експресії
деяких онкопротейнів [7].

Відомі способи прогнозування перебігу захво-
рювання на рак шлунка, які базуються на аналізі
клініко-морфологічних факторів прогнозу (локалі-
зація пухлини, тип росту пухлини, глибина інвазії,
розміри пухлини, її гістологічний тип, наявність
метастазів тощо) [2, 8] та молекулярно-біологічних
особливостей пухлин (визначення пухлиноспеци-
фічних білків, пошкоджень ДНК, показників апоп-
тозу, порушень міжклітинних контактів) [9, 10].

За прототип можна вважати спосіб специфіч-
ної імунотерапії протипухлинною аутовакциною
(П АВ) хворих на рак шлунка [Пат. 60171. України.
МПК7 А61Р35/00. Спосіб специфічної імунотерапії
аутовакциною хворих на рак шлунка /Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Г.П.Потебня,
В.О.Чорний, Г.С.Лісовенко та ін.; Заявл.
19.02.2003. Опубл. 15.07.2005. Бюл. №7], який
полягає в тому, що хворим на рак шлунка прово-
дять імунотерапію шляхом 3-х щотижневих підшкі-
рних ін'єкцій вакцини, починаючи з 10-14 доби піс-
ля хірургічного втручання, з ревакцинацією через 1
та 6 місяців.

Позитивним у прототипі є те, що визначені оп-
тимальні дози введення аутовакцини хворим на
рак шлунка.

Недоліком прототипу є відсутність імуногісто-
хімічного аналізу у хворих, яким було призначено
аутовакцину, що може призводити до неефектив-
ного впливу імунотерапії.

В основу корисної моделі поставлено задачу
удосконалити спосіб лікування хворих на рак шлу-
нка шляхом визначення білків p53, Bcl-2, α-

(13) **U**
(11) **45751**
(19) **UA**

катеніну, β -катеніну, Е-кадгерину, HER-2/neu, EGFR та VEGF за допомогою імуногістохімічного методу, що дає можливість корегувати курс імуно-терапії та подовжити час ремісії хворого до 3-х років.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Після хірургічного втручання пухлинну тканину фіксують у 10%-му водному розчині нейтрального формаліну і заливають в парафін за загально-прийнятним методом.

Імуногістохімічне дослідження (ІГХД) експресії білків p53, BCL-2, HER-2/neu, EGFR, Е-кадгерину, α -, та β -катеніну, та VEGF проводять на парафінових зрізах пухлинної тканини. Парафіновані зрізи товщиною 4-6мкм монтують на скельця, покриті полі-L-лізином, або на скельця з адгезивними властивостями SuperFrost Plus («Sigma», Німеччина) і залишають на добу в термостаті при 37°C або ж на 30хв. в термостаті при 56°C (у разі застосування скелець Super Frost Plus). У день проведення імуногістохімічної реакції проводять депарафінування та зневоднення зрізів.

Для оптимального імуногістохімічного визначення експресії антигенів проводять демаскування антигенів в розчині 0,1М цитратного буферу (pH-6,0), шляхом інкубування у мікрохвильовій печі протягом 2хв. за потужності 600 Вт, або на водяній бані протягом 20хв. за температури 90°C з подальшим охолодженням скелець до кімнатної температури у розчині цитратного буферу. Надалі виявлення антигенів проводять у вологій камері при кімнатній температурі. Для зменшення неспецифічного забарвлення на зрізи наносять 1%-ий розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Білки, що входять до його складу, блокують усі високо заряджені неспецифічні ділянки, з якими може відбутися неспецифічне зв'язування моноклональних антитіл (МКАТ). Потім протягом однієї години проводять інкубацію препаратів з МКАТ, специфічними до вищезазначених білків. Після цього зрізи тричі відмивають у фізіологічному розчині. NaCl, забуференому фосфатами, pH-7,4. Всі інкубаційні цикли, що передбачені при імуногістохімічному виявленні антигенів, проводять у вологій камері при кімнатній температурі.

Для візуалізації застосовують систему «EnVision+» (Dako Cytomation, Данія), яку наносять після МКАТ, з подальшою обробкою 3-,3-діамінобензидином (Dako Cytomation, Данія) для визначення активності пероксидази через 30 хв інкубації з вищевказаною системою. Після виявлення активності пероксидази зрізи тканини пухлин дофарбовують гематоксиліном протягом 2-3хв. і укладають в бальзам або Faramount Aqueous Mounting Medium (Dako Cytomation, Данія). Оцінку результатів фарбування проводять за допомогою світлового мікроскопу (збільшення $\times 400$). Пухлину вважають p53-позитивною, якщо в тканині пухлини позитивна реакція спостерігається більше, ніж у 5% ядер пухлинних клітин. Для ідентифікації інших маркерів (Е-кадгерину, α - та β -катеніну, рецепторів епідермального фактору росту, HER-2/neu та фактору росту ендотелію судин) пухлину вважають

позитивною, якщо кількість клітин з даним білком більша за 20%.

Нами виявлені клініко-морфологічні та імуно-фенотипові характеристики злоякісних пухлин шлунка, за наявності яких доцільно проводити імунотерапію з використанням ПАВ: це диференційовані пухлини III та IV стадій T₃₋₄N₁₋₂M₀, (табл.1-3) які виявляють позитивну реакцію на моноклональні антитіла, специфічні до білків p53, EGFR, HER-2, β -катеніну, VEGF та Bcl-2.

Таблиця 1

Вплив застосування ПАВ на показники загальної виживаності хворих на рак шлунка в залежності від стадії захворювання

Клінічна стадія за класифікацією TNM	Загальна 3-річна виживаність, %		t
	Хворі, які отримували ПАВ	Контрольна група	
III	70,8 \pm 5,6	39,4 \pm 8,5	3,08*
IV	40,9 \pm 10,5	26,7 \pm 11,4	0,92

* - p<0,05 при порівнянні показників між групами.

Таблиця 2

Вплив застосування ПАВ на показники загальної виживаності хворих на рак шлунка в залежності від ураження лімфатичних вузлів

Ступінь ураження регіонарних лімфатичних вузлів	Загальна 3-річна виживаність, %		T
	Хворі, які отримували ПАВ	Контрольна група	
N ₀	81,2 \pm 4,7	67,7 \pm 8,4	1,40
N ₁₋₂	54,3 \pm 6,5	23,1 \pm 6,7	3,34*

* - p<0,05 при порівнянні показників між групами.

Таблиця 3

Вплив застосування ПАВ на показники загальної виживаності хворих на рак шлунка в залежності від ступеню диференціювання пухлини

Ступінь диференціювання пухлини	Загальна 3-річна виживаність, %		T
	Хворі, які отримували ПАВ	Контрольна група	
G ₁₋₂	77,4 \pm 7,5	55,6 \pm 11,7	1,57
G ₃₋₄	67,6 \pm 4,5	40,4 \pm 6,8	3,34*

* - p<0,05 при порівнянні показників між групами.

Відсутність імуногістохімічної реакції з білками білків p53, EGFR, HER-2, β -катеніном, VEGF та Bcl-2 вказують на недоцільність застосування вак-

цини (табл. 4). При цьому імуногістохімічне визначення Е-кадгерину та α -катеніну не мають прогностичного значення.

Таблиця 4

Кореляція експресії молекулярних маркерів в пухлинних клітинах шлунка зі ступенем ураження стінки шлунка (Т)

Досліджений маркер	Т3		Т4	
	Хворі, які отримували ПАВ	Контрольна група	Хворі, які отримували ПАВ	Контрольна група
EGFR	26,47 \pm 5,12%	58,33 \pm 8,45%	14,50 \pm 2,11%	48,25 \pm 7,74%
VEGF	35,29 \pm 5,38%	26,13 \pm 5,02%	36,00 \pm 3,25%	50,00 \pm 8,04%
p53	72,35 \pm 7,45%	65,00 \pm 8,68%	62,90 \pm 5,06%	75,33 \pm 10,12%
Bcl-2	18,82 \pm 3,12%	25,25 \pm 4,98%	22,25 \pm 2,48%	25,00 \pm 6,45%
A-катеніни	38,24 \pm 5,50%	24,66 \pm 4,85%	37,50 \pm 3,38%	23,33 \pm 6,23%
B-катеніни	55,88 \pm 6,33%	33,33 \pm 6,50%	33,50 \pm 3,02%	26,00 \pm 6,77%
Е-кадгерин	47,06 \pm 5,94%	41,67 \pm 6,89%	55,50 \pm 5,02%	52,16 \pm 9,89%
HER2/neu	29,41 \pm 5,22%	35,33 \pm 6,77%	34,33 \pm 3,31%	25,00 \pm 6,45%

Прикладами конкретного виконання данного способу можуть бути витяги з історій хвороб трьох пацієнтів.

1. Хворий В., 1957р.н. Історія хвороби №А107913. Діагноз - рак середньої третини шлунку, який було хірургічно видалено 06.12.2001р. з встановленням IIIa стадії пухлинного процесу Т3N1M0 (патологічне заключення 4213-20/01). Після хірургічного видалення пухлини за правилами загальноприйнятої технологічної процедури обробки біологічного матеріалу вироблявся парафіновий блок. ІГХД експресії білків p53, Bcl-2, HER-2/neu, EGFR, Е-кадгерину, α - та β -катеніну, VEGF було проведено на парафінових зрізах за наведеною вище методикою.

В результаті проведення ІГХД встановлено відсутність у пухлині білків p53, а також VEGF, HER-2/neu та EGFR, а також наявність Bcl-2, Е-кадгерину, α - та β -катеніну. Хворому було призначено лікування ПАВ шляхом трьох щотижневих введень, починаючи з 10-ї доби після хірургічного втручання загальною дозою 60 мг за вмістом білку з подальшою ревакцинацією через 1 та 6 місяців.

Через 7 місяців від дати встановлення діагнозу хворий помер.

2. Хвора Г. 1961р.н. Історія хвороби №А005611. Діагноз - рак шлунка, тотальне ураження, який був хірургічно видалений 02.10.2000р. з встановленням IV стадії пухлинного процесу Т4N2M0 (патологічне заключення 15957-64/2000). Після хірургічного видалення пухлини за правилами загальноприйнятої технологічної процедури обробки біологічного матеріалу вироблявся парафіновий блок. ІГХД експресії білків p53, Bcl-2, HER-2/neu, EGFR, Е-кадгерину, α - та β -катеніну, VEGF було проведено на парафінових зрізах за наведеною вище методикою.

В результаті проведення ІГХД встановлено відсутність у пухлині Е-кадгерину, α - та β -катеніну, HER-2/neu, а також присутність EGFR, VEGF і білків p53 та Bcl-2. Хворій було призначено лікування ПАВ шляхом трьох щотижневих введень, починаючи з 10-14-ї доби після хірургічного втручання

загальною дозою 60мг за вмістом білку з подальшою ревакцинацією через 1 та 6 місяців.

Протягом 3 років метастази не розвинулись і хвора жива до цього часу.

3. Хворий К. 1925р.н. Історія хвороби №А100763. Діагноз - рак середньої третини шлунка, який був хірургічно видалений 08.02.2001р. з встановленням IV стадії пухлинного процесу Т4N0M0 (патологічне заключення 2741-50/2001). Після хірургічного видалення пухлини за правилами загальноприйнятої технологічної процедури обробки біологічного матеріалу вироблявся парафіновий блок. ІГХД експресії білків p53, Bcl-2, HER-2/neu, EGFR, Е-кадгерину, α - та β -катеніну та VEGF було проведено на парафінових зрізах за наведеною вище методикою.

В результаті проведення ІГХД встановлено відсутність у пухлині Е-кадгерину, α - та β -катеніну, VEGF, а також присутність EGFR, FIER-2/neu і білків p53 та Bcl-2. Хворому було призначено лікування ПАВ шляхом трьох щотижневих введень, починаючи з 10-14-ї доби після хірургічного втручання загальною дозою 60 мг за вмістом білку з подальшою ревакцинацією через 1 та 6 місяців.

Протягом 5 років метастази не розвинулись і хворий живий до цього часу.

Спосіб виконано у 68 хворих на рак шлунка, які перебували на стаціонарному лікуванні в Національному інституті раку.

Таким чином, за заявленим способом, імуногістохімічне визначення присутності зазначених вище білків p53, Bcl-2, HER-2/neu, EGFR, Е-кадгерину, α - та β -катеніну та VEGF дає змогу підвищити ефективність імунотерапії хворих на рак шлунка, вказуючи на доцільність її застосування у випадку присутності білків p53, EGFR, HER-2, β -катеніну, VEGF та Bcl-2. У разі відсутності даних білків ефективність вакцинотерапії з використанням ПАВ буде низькою.

Джерела інформації:

1. Gastric cancer / V. Catalano, R. Labianca, G.D. Beretta et al. //Cr. Rev. Oncol. Hematol. -2005. - №3. P.209-241.

2. Gastric adenocarcinoma. Review and considerations for future directions /B.J. Dicken, D.L. Bigam, C. Cass et al. // Ann. Surg. - 2005. - №1. P.27-39.

3. Mosolits S., Ullenhag G., Mellstedt H. Therapeutic vaccination in patients with gastrointestinal malignancies. A review of immunological and clinical results //Ann. Oncol. - 2005. - Vol.6. - №16. - P.847-862.

4. The development of therapeutic and preventive vaccines for gastric cancer and *Helicobacter pylori* /S.Y. Chui, T.M. Clay, H.K. Lyster, et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. - 2005. - Vol.8. - №14. P.1883-1889.

5. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer /J.A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, et al. // J. Clin. Invest. - 2004. - Vol.11. - №113. P. 1515-1525.

6. Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины. //Практ. онкол. -2003. - т. 3. - №4. С.157-166.

7. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches /M. Scartozzi, E. Galizia, F. Freddari, et

al. // Cancer Treatment Rev. - 2004. - Vol.5. - №30. P.451-459.

8. TNM classification of malignant tumours (5th ed.) /Eds. L.H. Sobin, C Wittekind. - New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-Liss. - 1997. - 285p.

9. van Krieken J.H., Sasako M., van de Vele C.J. Gastric cancer. /Prognostic factors in cancer Eds. Gospodarowicz M.K., Henson D.E., Hutter R.V.P et al. - New York: Wiley-Liss. - 2001. - P.251-265.

10. Molecular basis of gastric cancer development and progression /L. Zheng, L. Wang, J. Ajani et al. // Gastric Cancer. - 2004. - Vol.7. - P.61-77.

11. Пат. 60171. України. МПК7 А61Р35/00. Спосіб специфічної імунотерапії аутовакциною хворих на рак шлунка /Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Г.П.Потебня, В.О.Чорний, Г.С.Лісовенко та ін.; Заявл. 19.02.2003. Опубл. 15.07.2005. Бюл. №7 (прототип).