



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 47308

(13) A

(51) 6 A61K35/74

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

(54) СПОСІБ СПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ ХВОРИХ КОЛОРЕКТАЛЬНИМ РАКОМ

1

2

(21) 2001117503

(22) 02 11 2001

(24) 17 06 2002

(46) 17 06 2002, Бюл. № 6, 2002 р.

(72) Потебня Григорій Платонович, Кикоть Володимир Онуфрійович, Колесник Олена Олександрівна, Лісовенко Галина Степанівна, Черемшенко Надія Леонідівна, Чехун Василь Федорович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб специфічної імунотерапії хворих колоректальним раком після радикальної операції шляхом 3-разового підшкірного введення аутовакцини з інтервалом в 7 днів, який відрізняється тим, що для імунізації використовують аутовакцину, отриману на основі пухлинних клітин, оброблених фільтратом культуральної рідини штаму B subtilis B-7025, починаючи на 7-10 день після хірургічного видалення пухлини в дозі 9 мл з наступними одноразовими ревакцинаціями через 1 та 6 місяців

Винахід стосується медицини, а саме онкології і може використовуватися для імунотерапії радикально оперованих хворих колоректальним раком

Питання лікування колоректального раку в останній час набуває все більшу актуальність. Це пов'язано з тим, що захворюваність колоректальним раком займає 3 - 4 місце в загальній структурі онкологічних захворювань. Не дивлячись на удосконалення методів лікування, смертність залишається на другому місці в структурі злоякісних новоутворень [1, 2].

Відомо, що хірургічне лікування хворих є основним методом лікування хворих колоректальним раком. Враховуючи той факт, що безперервно зростає кількість хворих з різними формами колоректального раку, тільки у 70 - 75% вперше виявлених хворих можливе виконання радикальних операцій. Але при використанні тільки хірургічного методу часто не досягається повного видалення хворих, оскільки він не завжди забезпечує попередження метастазів чи рецидивів blastom.

В зв'язку з цим виникає необхідність в подальшому вдосконаленні існуючих і розробці нових, більш перспективних комбінованих і комплексних методів лікування. Тому в цілях профілактики подальшого розвитку процесу застосовуються різні види опромінення або хімотерапевтичні засоби. Однак використання їх теж не у всіх випадках ефективне. Це викликало

необхідність інтенсивних досліджень імунології пухлин, що базуються на існуванні антигенних відмінностей у злоякісних і нормальних клітин. Методи імунотерапії розробляються і застосовуються в різних онкологічних установах, при цьому найбільш інтенсивно досліджуються протиракові вакцини. Накопичені експериментальні і клінічні дані про ефективність методів активної специфічної імунотерапії, які проводяться за допомогою протипухлинної вакцини в післяопераційний період для профілактики рецидивів і метастазів пухлин.

Найчастіше при імунотерапії хворих колоректальним раком вводили гама-опроміненні аутологічні пухлинні клітини разом з БЦЖ, її дериватами, ад'ювантами типу DETOX і цитокінами (гама-інтерферон, фактор некрозу пухлин, інтерлейкін 1 і т.п.).

Відомий спосіб лікування хворих колоректальним раком [3] протипухлинною вакциною, виготовленою з аутологічних пухлинних клітин сумісно з БЦЖ. Установлено, що ефективність такої вакцини була різною у хворих раком прямої і ободової кишки - поряд із збільшенням показників виживання у хворих раком ободової кишки не відмічено позитивного ефекту у лікуванні хворих раком прямої кишки. А на місці введення вакцини спостерігали тривалі не загоючі язви діаметром 1,5 - 2,0 см, у 60% хворих розвивалась аденопатія, яка зникла протягом 3-х місяців. Отже низька лікувальна ефективність та

(13) A

(11) 47308

(19) UA

негативний побічний ефект ставить перешкоди до широкого застосування такого способу імунотерапії

Відомо також спосіб активної специфічної імунотерапії онкохворих при різних локалізаціях захворювання (рак шлунку, прямої кишки, молочної залози, легенів) в післяопераційний період вгичизняною протипухлинною аутовакциною, виготовленою з аутологічних пухлинних клітин за допомогою фільтрату культуральної рідини штаму B mesentericus A5-56 [4 - 6]

Найбільш близьким аналогом до способу, що заявляється, є спосіб післяопераційної специфічної імунотерпії онкологічних хворих [6], який полягає в тому, що через 5 - 7 днів після радикального вилучення пухлини хворим проводять 3 - 5 разову імунізацію аутовакциною, отриманою в результаті обробки пухлинних клітин фільтратом культуральної рідини штаму B mesentericus A5-56 [7] з інтервалом 3 - 7 днів підшкірно в дозі від 3 до 7мл по наростаючій з наступною ревакцинацією через 3 - 6 місяців. Ніяких серйозних побічних ефектів у вакцинованих пацієнтів не зареєстровано і тільки у 20 - 25% відмічено незначне підвищення температури тіла до 37,5 - 37,8°C на протязі 4 - 10 годин. При цьому способі активується клітинна і гуморальна системи імунітету, за рахунок чого досягається багаторічний ефект попередження рецидивів та метастазів у вакцинованих хворих. Ефективність способу по 5-річному виживанню імунізованих хворих при III стадії ( $T_{3.4}N_0M_0$ ) прямої кишки становить 80,4%, а при чистій хірургії, тобто контроль - 55,1%. Необхідно відмітити, що процент виживання підраховували для III стадії за старою класифікацією з'яяксіних пухлин 3-го видавництва. Зараз використовують нову класифікацію 4-го видавництва від 1997р, за якою  $T_{3.4}N_0M_0$  - це II стадія, а  $T_{3.4}N_1M_0$  - це III стадія [8].

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу удосконалення способу імунотерапії хворих колоректальним раком після радикальної операції шляхом використання протипухлинної аутовакцини з вищою імуногенністю та створення такої схеми лікування онкологічних хворих, що дозволила б стимулювати вищу протипухлинну резистентність організму і забезпечити попередження розвитку рецидивів та метастазів і таким чином підвищити ефективність імунотерапії

Поставлена задача вирішується тим, що використовують протипухлинну аутовакцину, виготовлену з пухлинних клітин, які обробляють фільтратом культуральної рідини штаму B subtilis B-7025 [9], починаючи на 7 - 10 день після хірургічного вилучення пухлини в дозі 9мл з наступними одноразовими ревакцинаціями через 1 та 6 місяців

Застосування протипухлинної аутовакцини з вищою імуногенністю дозволяє зменшити дозу введення вакцини для зменшення білкового навантаження на організм, що позитивно впливає на імунізацію хворих колоректальним раком після радикальної операції

Вакцинацію починали на 7 - 10 день після

резекції пухлини, щоб дати хворому достаньо часу на відновлювання після імунодепресії, яку могли викликати анестезія і хірургічне втручання. Попередні клінічні дані показали, що титр специфічних антитіл та активність клітин-ефекторів протипухлинного імунітету знижуються через 1 та 6 місяців після вакцинації, і тому в цей термін проводили ревакцинацію

Суть способу специфічної імунотерапії хворих колоректальним раком полягає в тому, що через 7 - 10 днів після радикального вилучення пухлини хворим проводять 3-разову імунізацію аутовакциною, одержаною в результаті обробки пухлинних клітин фільтратом культуральної рідини штаму B subtilis B-7025 підшкірно по 3мл вакцини на 1 введення з інтервалом 7 днів з наступними одноразовими ревакцинаціями через 1 та 6 місяців

Способом, що заявляється, лікували після радикального оперативного втручання 104 хворих раком ободової кишки (1 група) та 259 хворих раком прямої кишки (2 група) при II та III стадії захворювання. Імунізація протипухлинною вакциною проведена у 36 хворих 1 групи і у 80 - 2 групи, інші хворі лікувались тільки хірургічним методом. Вказані групи були однорідними за віком, статтю, стадіям захворювання, наявністю супроводжуючої патології, видами оперативних втручань (табл 1), всі пухлини були аденокарциномами

Аутовакцину стандартизували по білку, визначали його по методу Lowry, сумарна доза становила 180мг

Кількість аутовакцини для імунотерапії підбирали і контролювали за допомогою реакції гіперчутливості уповільненого типу (РГУТ), тобто визначали ступінь розвитку реакції на введення антигену аутовакцини у хворих [10]

Таблиця 1

Розподілення хворих з урахуванням способу лікування - радикальна операція (РО), введення протипухлинної аутовакцини (ПАВ)

Стадія пухлинного процесу	Кількість пацієнтів у групах			
	Рак ободової кишки (1-а група)		Рак прямої кишки (2-а група)	
	РО+ПАВ	РО	РО+ПАВ	РО
$T_{3.4}N_0M_0$ (II стадія)	24	50	60	109
$T_{3.4}N_1M_0$ (III стадія)	12	18	20	70
Всього	36	68	80	179

Ця реакція свідчить про формування клітинного імунітету і використовується в клінічній імунології. Позитивна РГУТ розцінюється як сприятлива прогностична ознака і корелює з активністю Т-лімфоцитів-хелперів периферійної крові у хворих з різними пухлинами, котрі є необхідними для генерації специфічних протипухлинних лімфоцитів

РГУТ проводили шляхом внутрішньошкірного введення протипухлинної аутовакцини в кількості

0,1мл (0,4мг по білку), ступінь її розвитку визначали через 24 години після введення. Реакцію оцінювали як позитивну у випадку появи ертеми діаметром 4 - 5см. Було встановлено, що найкраща відповідь РГУТ співпадала з заявленими нами дозами вакцини.

Також визначали вміст в крові імунізованих хворих основні популяції лімфоцитів, які приймають участь у формуванні протипухлинного імунітету до вакцинації і після її завершення. Відмічена нормалізація показників цих показників, зокрема популяції Т-активних ( $CD3^+DR^+$ ), В-активних ( $CD3^+R^+$ ) лімфоцитів, Т-хелперів ( $CD4$ ), В-лімфоцитів ( $CD19$ ) та продукції гама-інтерферону мононуклеарами.

Вживання хворих визначали актуальним методом, порівняльний аналіз вживання проводили за допомогою logrank-критерію [11]. Класифікацію пухлин проводили за системою TNM 4-го видання 1997р [8].

Клінічне апробування способу імунотерапії проводили у відділенні абдоминальної онкології Інституту онкології АМН України.

Суть способу пояснюють таблиця 2 і приклади конкретного виконання (1 - 3).

Таблиця 2 Показники 5-річного виживання хворих колоректальним раком після радикальної операції при застосуванні ПАВ (%)

Таблиця 2

Показники 5-річного виживання хворих колоректальним раком після радикальної операції при застосуванні ПАВ (%)

Стадія пухлинного процесу	Кількість пацієнтів у групах			
	Рак ободової кишки (1-а група)		Рак прямої кишки (2-а група)	
	PO+ПАВ	PO	PO+ПАВ	PO
T <sub>3-4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> (II стадія)	87 ± 6	74 ± 2	75 ± 5	62 ± 2
T <sub>3-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub> (III стадія)	57 ± 12	46 ± 5	48 ± 9	30 ± 5

#### Приклад 1

Хвора Бог-ка Л М, 1939р н, історія хвороби №3063/94. Діагноз: рак сигмовидної кишки II стадія (T<sub>4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>). Операція 13.06.1994р - комбінована резекція сигми по Грекову з резекцією стінки сечового міхура. Через 7 днів після операції провели імунотерапію протипухлинною аутовакциною підшкірно 3 рази по 3мл на одне введення з інтервалом 7 днів. Після закінчення імунізації через 1 та 6 місяців провели одноразові ревакцинації в дозі по 3мл на 1 введення.

В процесі лікування визначали імунологічні та гематологічні показники до операції і після імунізації. Відмічена нормалізація основних субпопуляцій лімфоцитів крові до операції: Т-активні ( $CD3^+DR^+$ ) - 6,8%, після імунізації - 10,1% (норма - 10,0%), В-активні ( $CD3^+R^+$ ) до операції - 8,5%, після імунізації - 10,9% (норма - 15,0%), Т-хелпери ( $CD4$ ) до операції - 52,9%, після імунізації - 43,4% (норма - 40,0%), В-лімфоцити ( $CD19$ ) до операції - 5,9%, після імунізації 12,5% (норма -

15,0%). Продукція гама-інтерферону мононуклеарами до операції 18МЕ, після імунізації - 29,2МЕ (норма - 32МЕ).

Загальний аналіз крові до лікування: гемоглобін - 80г/л, еритроцити -  $3,0 \times 10^{12}$ , лейкоцити -  $15,4 \times 10^9$ , ШОЕ - 48мм/год, після лікування: гемоглобін - 106г/л, еритроцити -  $3,6 \times 10^{12}$ , лейкоцити -  $7,5 \times 10^9$ , ШОЕ - 15мм/год.

На 14.07.2000р хвора знаходиться під наглядом без проявів прогресування хвороби.

#### Приклад 2

Хворий Воз-ко М А, 1939р н, історія хвороби №2712/94. Діагноз: рак прямої кишки II стадія (T<sub>4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>). Операція 18.05.1994р - брюшно-анальна резекція прямої кишки. Через 8 днів після операції провели імунотерапію протипухлинною аутовакциною підшкірно 3 рази по 3мл на одне введення з інтервалом 7 днів. Після закінчення імунізації через 1 та 6 місяців провели одноразові ревакцинації в дозі по 3мл на 1 введення.

В процесі лікування визначали імунологічні та гематологічні показники до операції і після імунізації. Відмічена нормалізація основних субпопуляцій лімфоцитів крові до операції: Т-активні ( $CD3^+DR^+$ ) - 6,5%, після імунізації - 10,5% (норма - 10,0%), В-активні ( $CD3^+R^+$ ) до операції - 8,8%, після імунізації - 10,7% (норма - 15,0%), Т-хелпери ( $CD4$ ) до операції - 51,9%, після імунізації - 43,4% (норма - 44,2%), В-лімфоцити ( $CD19$ ) до операції - 5,5%, після імунізації 13,2% (норма - 15,0%).

Продукція гама-інтерферону мононуклеарами до операції 19МЕ, після імунізації - 28,3МЕ (норма - 32МЕ).

Загальний аналіз крові до лікування: гемоглобін - 118г/л, еритроцити -  $3,2 \times 10^{12}$ , лейкоцити -  $4,1 \times 10^9$ , ШОЕ - 36мм/год, після лікування: гемоглобін - 120г/л, еритроцити -  $3,5 \times 10^{12}$ , лейкоцити -  $4,8 \times 10^9$ , ШОЕ - 18мм/год.

На 30.06.2000р хворий знаходиться під наглядом без проявів прогресування хвороби.

#### Приклад 3

Хвора Ляш-вич Г А, 1930р н, історія хвороби №4687/94. Діагноз: рак ободової кишки III стадія (метастази в лімфовузлах) (T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>). Операція 29.08.1994р - геміколектомія ободової кишки справа (ПКЕ). Через 10 днів після операції провели імунотерапію протипухлинною аутовакциною підшкірно 3 рази по 3мл на одне введення з інтервалом 7 днів. Після закінчення імунізації через 1 та 6 місяців провели одноразові ревакцинації в дозі по 3мл на 1 введення.

В процесі лікування визначали імунологічні та гематологічні показники до операції і після імунізації. Відмічена нормалізація основних субпопуляцій лімфоцитів крові до операції: Т-активні ( $CD3^+DR^+$ ) - 6,4%, після імунізації - 10,3% (норма - 10,0%), В-активні ( $CD3^+R^+$ ) до операції - 8,3%, після імунізації - 10,6% (норма - 15,0%), Т-хелпери ( $CD4$ ) до операції - 52,4%, після імунізації - 45,4% (норма - 40,0%), В-лімфоцити ( $CD19$ ) до операції - 5,2%, після імунізації 10,5% (норма - 15,0%).

Продукція гама-інтерферону мононуклеарами до операції 18МЕ, після імунізації - 27,2МЕ (норма - 32МЕ).

Загальний аналіз крові до лікування: гемоглобін - 86г/л, еритроцити -  $2,8 \times 10^{12}$ ,

лейкоцити -  $3,8 \times 10^9$ , ШОЕ - 32мм/год, після лікування гемоглобін -104г/л, еритроцити -  $3,0 \times 10^{12}$ , лейкоцити -  $4,1 \times 10^9$ , ШОЕ - 16мм/год

На 7 02 2000р хвора знаходиться під наглядом без проявів прогресування хвороби

Таким чином, результати ефективності по критерію 5-річного виживання імунізованих хворих за способом, що заявляється, свідчать про перспективність і доцільність застосування цього способу імунотерапії у хворих колоректальним раком

#### Література

- 1 Федоренко З П, Міщенко А Н, Гулак Л О, Голубчикова Б М, Ліщишина О М, Ширякова Л І Розповсюдженість злоякісних новоутворень в популяції України в 1991 - 1996рр Київ, 1997 118с
- 2 Survival of cancer patients in Europe The Eurocare study Berrino F, Sant M, Verdecchia A, Capocaccia R, Hakulinen T, Ester J (ed.) IARC 1995 32p
- 3 Hoover HC Jr, Brandhorst JS, Peters LC, Surdyke MG, Takeshita Y, Madanaga J, Muenz LR, Hanna MG Jr Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer 6 5-year median follow-up of a phase III prospectively randomized trial J Clin Oncol 1993, 11(3) 390-9
- 4 Затула Д Г Микроорганізми, рак и противоопухолевый иммунитет Киев Наукова думка 1985 213с
- 5 Колесник Е А, Потебня Г П, Кикоть В А, Черный В А, Лисовенко Г С, Семерников В А

Противоопухолевая аутовакцина в лечении больных распространенным колоректальным раком Онкология 1999, 2 104-9

6 Патент 10555 України, МІПК А61К35/74 Спосіб специфічної імунотерапії онкологічних хворих після радикальної операції / Потебня Г П, Загадарчук Н Л, Ситенко В К, Кикоть В О, №93005385, Заявл 5 08 93, Опубл 11 10 99, Бюл №8

7 Затула Д Г Експериментальне обґрунтування практичного застосування специфічних протиракових вакцин Вісник АН УРСР 1982, 11 51-62

8 Атлас TNM Иллюстрированное руководство по TNM/pTNM классификации злокачественных опухолей /Пер с англ 4-го издания/ Под ред В Е Кратенка, Е А Короткевича Минск Белорусский центр науч мед информации 1998 381с

9 Заявка №2001042585 від 17 04 2001 на винахід «Штам бактерій *Bacillus subtilis* продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин»

10 Hoover HC Jr, Surdyke M, Dangel RB, Peters LC, Hanna MG Jr Delayed cutaneous hypersensitivity to autologous tumor cells in colorectal cancer patients immunized with an autologous tumor cell *Bacillus Calmette-Guerin* vaccine Cancer Res 1984, 44(4) 1671-6

11 Esteve J, Benhamou E, Raymond L Statistical methods in cancer research (v 4) Descriptive Epidemiology IARC s p N128 IARC, Lyon 1994 302pp

---

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул Сим'ї Хохлових, 15, м Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

---

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул Артема, 77, м Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71