



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 51420

(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 ІМУНОТЕРАПІЇ АУТОВАКЦИНОЮ ХВОРИХ РАКОМ ЛЕГЕНІ

1

2

(21) 2002032131

(22) 18 03 2002

(24) 15 11 2002

(46) 15 11 2002, Бюл №11, 2002 р

(72) Потебня Григорій Платонович, Смоланка Іван Іванович, Лісовенко Галина Степанівна, Кохановська Любов Миколаївна, Черемшенко Надія Леонідівна, Чехун Василь Федорович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ РЄ КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб імунотерапії аутовакциною хворих раком легені, який полягає в тому, що імунотерапію починають на 7 - 10 день після радикальної операції шляхом 3-разового підшкірного введення аутовакцини з інтервалом в 7 днів, який відрізняється тим, що застосовують аутовакцину, виготовлену з пухлинних клітин, оброблених фільтратом культуральної рідини мікроорганізму B subtilis B-7025 в дозі 2,5 - 4,5мл по наростаючій з наступною ревакцинацією через 3 - 4 місяці

Винахід стосується медицини, а саме онкології і може використовуватися при імунотерапії оперованих хворих раком легені

Статистичні дані свідчать, що у зв'язку з погіршенням екологічної ситуації, на початку третього тисячоліття основною причиною смерті на планеті стане рак легені. У багатьох державах Європи, США, а також в Україні рак легені вийшов на перше місце в структурі онкологічної захворюваності чоловічого населення. За даними ВООЗ в Європі щодня від раку легені помирає біля 300 хворих. В Україні захворюваність на рак легені в 1999 році становила 43,7, а смертність від раку легені становила 35,9 на 100 тисяч населення [1]. 70% хворих на рак легені виявляють лише при III-IV стадії. Тому радикальне хірургічне лікування можливе тільки у обмеженого контингенту хворих. Розширення об'єму операції, до цього часу, характеризується незадовільними віддаленими результатами - п'ятирічний термін переживають лише 10 - 20% оперованих хворих. Особливо важливе прогностичне значення має наявність метастатичного пошкодження регіонарних лімфатичних вузлів. В такому випадку більше 3-х років живуть тільки 8% хворих, тоді як 3- і 5-річне виживання хворих з інтактними лімфатичними вузлами становить відповідно 40 і 20%.

Порушення в системі імунітету у хворих на рак легені доведено багатьма дослідженнями. Спочатку виникають зміни в системі управління функціями лімфоїдних клітин, так як ця система виявляється найбільш вразливою. У зв'язку з цим все більшого значення набувають комбіновані методи лікування раку легені. Актуальність використання

імунотерапії при комбінованому лікуванні хворих обумовлена її перевагами перед променевою та хіміотерапією. Імунотерапевтичні заходи діють на зпоякісні клітини незалежно від фази клітинного циклу і на відміну хіміопроменевої терапії не пошкоджують нормальні клітини.

Найчастіше імунотерапія застосовується як ад'ювантний (післяопераційний) спосіб при лікуванні зпоякісних пухлин. Відомо, що імунотерапевтичні методи і без залучення хіміо-або радіологічних методів можуть забезпечити пролонгований клінічний ефект. Саме тому імунотерапія розглядається як четвертий основний спосіб в онкології і включає в себе різні методи впливу як на зпоякісну клітину, так і на імунну систему.

Перші спроби лікування починалися з неспецифічної імунотерапії раку за допомогою мікробів. Один з мікробних імуностимуляторів відомий під назвою БЦЖ. При роботі з ним розкрито основні явища, властиві неспецифічній імуномодуляції. Проведені рандомізовані випробування (терапія БЦЖ раку легені) показали, що статистично значущої різниці між досліджуваними і контрольними групами не виявлено. Ефективність імунотерапії за допомогою мікроорганізмів-імуномодуляторів у хворих на рак легені в цілому низька. Але є спостереження про збільшення тривалості життя у хворих при використанні імунотерапії за допомогою БЦЖ [2].

У зв'язку з цим актуальний пошук нових способів комбінованого лікування хворих раком легені при використанні специфічної імунотерапії.

Відомо, що специфічна імунотерапія включає методи активації специфічного протипухлинного

(13) A

(11) 51420

(19) UA

імунітету за допомогою імунізації інактивованими або живими ауто-та алогенними пухлинними клітинами, які входять до складу протиракових вакцин. Такі вакцини містять пухлиноасоційовані антигени (ПАА), котрі стимулюють активність Т-лімфоцитів, цитотоксичних антитіл проти специфічних мішеней, а також утворення цитокінів. Такі ПАА містяться в цілих або лізованих пухлинних клітинах. Найчастіше в онкологічній практиці використовують аутологічні вакцини, в яких імуногенність ПАА підсилена за допомогою хімічних речовин, γ-променів, непатогенних вірусів і мікроорганізмів (вірус коров'ячої віспи, хвороби Ньюкастла, БЦЖ).

Частіше всього для імунотерапії хворих на рак легень використовували γ-опромінені аутологічні пухлинні клітини сумісно з БЦЖ [3, 4], при цьому суттєвий лікувальний ефект досягався лише при ранніх (I-II) стадіях захворювання.

Відомий спосіб лікування хворих на рак легень після радикальної операції за допомогою пухлиноасоційованих глікопротеїнів, виділених з клітин раку легень, який свідчить про суттєве збільшення лікувального ефекту лише у пацієнтів з I - II стадією захворювання [5]. Також відомі розробки способу специфічної імунотерапії онкологічних хворих, засновані на використанні універсальних технологій приготування імуномодуляторів з пухлин різного походження з високою терапевтичною активністю. Такий спосіб був розроблений Д.Г. Затулою і заснований на інактивації пухлинних клітин без втрати імуногенних властивостей за допомогою культуральної рідини мікроорганізму *B. subtilis* AB-56. Оброблені таким способом клітини як експериментальних, так і пухлин людини одержували здатність активувати імунні реакції, що ефективно попереджало розвиток рецидивів та метастазів у післяопераційному періоді [6].

Найбільш близьким аналогом до способу, що заявляється, є спосіб післяопераційної імунотерапії хворих раком легень [7], який полягає в тому, що імунізацію хворих починали на 7 - 10 день після операції шляхом підшкірного введення аутовакцини, виготовленої з використанням штаму *B. subtilis* AB-56. Курс імунізації складався з 3 ін'єкцій (3 - 5мл) по наростаючій з тижневим інтервалом, з наступною ревакцинацією через 3 місяці. Сумарна доза введення по білку становила 220мг.

У вакцинованих пацієнтів не зареєстровано побічних ефектів і тільки у 21,2% хворих спостерігали пірогенні реакції транзитного характеру (підвищення температури тіла до 37,5 - 37,8°C на протязі 4 - 6 годин), котрі після прийняття парацетамолу зникали без ускладнень, 17,3% пацієнтів скаржились на біль в місці введення вакцини.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу удосконалення способу імунотерапії хворих раком легень після операції, шляхом використання протипухлинної аутовакцини з вищою імуногенністю і створення такої схеми лікування хворих, яка дозволила б стимулювати більш виражену протипухлинну резистентність організму, щоб забезпечити попередження розвитку рецидивів та метастазів, покращити якість життя лікуваних пацієнтів і таким чином підвищити ефективність лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що застосовують протипухлинну аутовакцину, виготовлену з пухлинних клітин, оброблених фільтратом культуральної рідини мікроорганізму *B. subtilis* B-7025 [8], в дозі 2,5 - 4,5мл по наростаючій з наступною ревакцинацією через 3 - 4 місяці.

Використання аутовакцини з більш вираженою імуногенністю дозволяє зменшити дозу введення вакцини для зменшення білкового навантаження на організм, що позитивно впливає на стан хворих раком легень при імунотерапії.

Імунотерапію аутовакциною починають на 7 - 10 день після операції, щоб дати хворому достатньо часу на реабілітацію після імунодепресії, яку могли викликати анестезія і хірургічне втручання.

Суть способу імунотерапії аутовакциною хворих раком легень полягає в тому, що на 7 - 10 день після операції хворим проводять підшкірне 3-разове імунізацію аутовакциною, виготовленою з пухлинних клітин, оброблених фільтратом культуральної рідини мікроорганізму *B. subtilis* B-7025 в дозі 2,5 - 2,5мл по наростаючій з наступною ревакцинацією через 3 - 4 місяці.

Аутовакцину стандартизували по білку, визначали його по методу Lowry, сумарна доза становила 185мг.

Дозу аутовакцини для терапії підбирали і контролювали, використовуючи реакції гіперчутливості уповільненого типу (РГУТ). В клінічній імунології позитивна РГУТ розцінюється як сприятлива прогностична ознака і свідчить про формування клітинного імунітету. Тобто корелює з активністю Т-лімфоцитів-хелперів периферійної крові, котрі є необхідними для генерації специфічних протипухлинних лімфоцитів.

Вивчення імунологічних параметрів у крові лікуваних пацієнтів проводили до вакцинації і після її завершення, відмічена нормалізація показників. Клінічні випробування способу проводили у відділенні торакальної онкології Інституту онкології АМН України.

Способом, що заявляється, у післяопераційному періоді проліковано протипухлинною аутовакциною (ПАВ) 27 хворих - основна група. Серед них 24 (88,9%) чоловіків та 3 (11,1%) жінок. Вік хворих знаходився у межах 31 - 72 років. Середній вік складав $54,1 \pm 5,8$ роки. Центральна форма раку відмічена у 14 (51,8%), периферична - у 13 (48,1%). Розповсюдженість процесу відповідно до міжнародної класифікації TNM подана у таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл хворих на рак легень по стадіях TNM

| Стадія | Кількість хворих | |
|--|------------------|-------|
| | Абсолютне число | % |
| T ₁ N ₀ M ₀ | 1 | 3,7 |
| T ₁ N ₁ M ₀ | 1 | 3,7 |
| T ₂ N ₀ M ₀ | 5 | 18,5 |
| T ₂ N ₁ M ₀ | 4 | 14,8 |
| T ₃ N ₀ M ₀ | 10 | 37,1 |
| T ₃ N ₁ M ₀ | 3 | 11,1 |
| T ₃ N ₂ M ₀ | 3 | 11,1 |
| Всього | 27 | 100,0 |

Розподіл хворих на рак легені по стадіях (ВО-ОЗ) I стадія - 7 (25,93%), II стадія - 4 (14,81%) хворих, IIIA стадія - 16 (59,26%) хворих У 37,04% хворих виявлено метастази в лімфатичних вузлах Морфологічна структура пухлин представлена в таблиці 2

Таблиця 2

Гістологічні форми раку легені

| Гістологічний тип | Кількість хворих | |
|--------------------|------------------|-------|
| | Абсолютне число | % |
| Плоскоклетинний | 11 | 40,74 |
| Аденокарцинома | 12 | 44,44 |
| Недиференційований | 4 | 14,82 |
| Всього | 27 | 100,0 |

Всім хворим проведені радикальні оперативні втручання пневмонектомія - 10 (37,1%), лоб- та білобектомія - 15 (55,5%), часткова резекція - 2 (7,4%)

В контрольній групі були аналогічні хворі (54 пацієнта), яким проведена тільки радикальна операція (РО) Вказані групи були однорідними за віком, стадіями захворювання, наявністю супроводжуючої патології, видами оперативних втручань

Результати ефективності лікування хворих на рак легені після імунотерапії аутовакциною порівнювали з результатами лікування у групі хворих після самостійної радикальної операції (контрольна група)

Основними критеріями ефективності лікування були якість і тривалість життя лікованих пацієнтів Враховуючи те, що більше половини хворих на рак легені помирає на протязі перших двох років, основну увагу приділяли двох- та п'ятирічному виживанню хворих

Віддалені результати радикального хірургічного лікування з використанням способу імунотерапії аутовакциною аналізували в залежності від основних прогностичних факторів стадії розповсюдження по лімфатичних вузлах (N) - таблиця 3, гістологічної форми пухлини - таблиця 4

Приведені дані 2-х та 5-ти річного виживання в усіх групах хворих які одержували лікування за способом, що заявляється, порівнювали аналогічні в групах хворих, лікованих за способом - протипом

Таблиця 3

Виживання хворих раком легені в залежності від стадії хвороби та наявності регіонарних метастазів (N₀ або N₁₋₂) після лікування

| Стадія пухлинного процесу | Спосіб лікування | Виживання, % | |
|--|------------------|--------------|---------|
| | | 2 роки | 5 років |
| I-II | РО+ПАВ | 100,00 | 63,64 |
| | РО | 77,27 | 54,55 |
| IIIA | РО+ПАВ | 62,50 | 43,75 |
| | РО | 28,13 | 9,38 |
| T ₁₋₃ N ₀ M ₀ | РО+ПАВ | 82,35 | 58,82 |

| | | | |
|--|--------|-------|-------|
| T ₁₋₃ N ₁₋₂ M ₀ | РО | 58,82 | 38,24 |
| | РО+ПАВ | 70,00 | 40,00 |
| | РО | 30,00 | 20,00 |

Враховуючи незначну кількість хворих, для аналізу виживання в залежності від гістологічної форми пухлини, всіх хворих (з IIIA стадією) розподіляли на 2 підгрупи хворі з плоскоклетинним раком і хворі з іншими гістологічними формами раку

Таблиця 4

Залежність виживання хворих від гістологічної форми раку легені (IIIA стадія) після лікування

| Гістологічна форма раку | Спосіб лікування | Виживання, % | |
|-------------------------|------------------|--------------|---------|
| | | 2 роки | 5 років |
| Плоскоклетинний | РО+ПАВ | 72,73 | 63,64 |
| | РО | 31,82 | 13,64 |
| Не плоскоклетинний | РО+ПАВ | 62,50 | 31,25 |
| | РО | 21,88 | 9,38 |

Дані таблиці свідчать, що найбільш виражений лікувальний ефект спостерігали при 5-річному виживанні у пацієнтів з плоскоклетинною формою раку після лікування їх способом, що заявляється

Аналізуючи одержані результати, необхідно підкреслити, що показники виживання в групах імунізованих хворих перевищували аналогічні в контрольних групах Але слід відмітити, що у хворих раком легені I-II стадії тільки через 2 роки після операції відмічено достовірну різницю між групами, тоді як у хворих IIIA стадії застосування протипухлинної аутовакцини сприяло суттєвому збільшенню показників виживання як через два, так і через п'ять років спостереження Показники 5-річного виживання становили 43,75% проти 9,38% в контролі

Необхідно підкреслити, що імунотерапія аутовакциною сприяє підвищенню показників виживаності, як при плоскоклетинному раку легені, так і при його не плоскоклетинних формах Лише з такою різницею, що найкращі показники ефективності лікування спостерігали при 5-річному виживанні хворих з плоскоклетинним раком - 63,64% проти 13,64% в контролі

Після імунізації аутовакциною у пацієнтів не спостерігали ніяких побічних реакцій Відмічена нормалізація імунологічних показників та покращення якості життя лікованих пацієнтів на 70% (по Карневському)

Отже, одержані позитивні результати ефективності лікування хворих за способом, що заявляється, свідчать про доцільність і перспективність застосування імунотерапії аутовакциною хворих раком легені, особливо при IIIA стадії і навіть при наявності метастазів (N₁₋₂)

Суть способу пояснюють таблиці 1-4 і приклади (1,2) конкретного виконання

Приклад 1

Хворий Чег-цев Є П, 1949 р н, історія хвороби № 5077 Диагноз рак легені III стадія, II кл гр (T₃N₀M₀) Операція 18.09.96-пневмонектомія зліва Через 8 днів після операції провели імунотерапію аутовакциною 3-разово, підшкірно в дозі

2,5мл, 3,5мл, 4,5мл з інтервалом 7 днів. Після закінчення імунізації через 3 місяці провели одноразову ревакцинацію в дозі 4,5мл.

В процесі лікування визначали імунологічні показники: кількість Т-лімфоцитів - до операції $20,7 \pm 2,4\%$, після імунізації $38,9 \pm 1,9\%$ (норма $40,4 \pm 2,1\%$). Проліферативна активність лімфоїдних клітин (РБТЛ) з ФГА-до операції $43,1 \pm 2,5\%$, після імунізації $65,5 \pm 4,3\%$, (норма $70,1 \pm 3,6\%$).

Фагоцитарна активність нейтрофілів крові по відношенню *B megaterium* H (модель пухлинної клітини) - до операції $52,1 \pm 3,9\%$, після I введення аутовакцини $65,3 \pm 4,1\%$, після III введення аутовакцини $89,5 \pm 7,5\%$.

Рівень імуноглобулінів в сироватці крові: IgA - до операції $2,6 \pm 0,05$ г/л, після імунізації $1,7 \pm 0,02$ г/л (норма $1,58 \pm 0,08$ г/л), IgM - до операції $1,2 \pm 0,07$ г/л, після імунізації $0,92 \pm 0,03$ г/л, (норма $0,85 \pm 0,08$ г/л).

Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) - до операції $90,5 \pm 11,0$ од, після імунізації $57,1 \pm 5,8$ од, (норма $58,9 \pm 7,8$ од).

Отже імунотерапія аутовакциною сприяла активізації і нормалізації імунного комплексу.

Приклад 2

Хворий Біл-ко О О, 1951 р н, історія хвороби № 1361. Діагноз: рак легень IIIA стадія (T₃N₀M₀). Операція 18.03.98 - пневмонектомія зліва. Через 7 днів після операції провели імунотерапію аутовакциною 3-разово підшкірно в дозі 2,5мл, 3,5мл, 4,5мл з інтервалом 7 днів. Після закінчення імунізації через 4 місяці провели одноразову ревакцинацію в дозі 4,5мл.

В процесі лікування визначали імунологічні показники: кількість Т-лімфоцитів - до операції $26,7 \pm 2,7\%$, після імунізації $38,0 \pm 1,0\%$ (норма $40,4 \pm 2,1\%$).

Проліферативна активність лімфоїдних клітин - до операції $48,1 \pm 2,6\%$, після імунізації $66,8 \pm 4,8\%$, (норма $70,1 \pm 3,6\%$).

Фагоцитарна активність нейтрофілів крові по відношенню *B megaterium* H (модель пухлинної клітини) - до операції $53,8 \pm 3,0\%$, після I введення аутовакцини $65,8 \pm 4,7\%$, після III введення аутовакцини $88,6 \pm 7,8\%$.

Рівень імуноглобулінів в сироватці крові - IgA -

до операції $2,8 \pm 0,06$ г/л, після імунізації $1,78 \pm 0,02$ г/л (норма $1,58 \pm 0,08$ г/л), IgM - до операції $1,4 \pm 0,07$ г/л, після імунізації $0,98 \pm 0,08$ г/л, (норма $0,85 \pm 0,08$ г/л).

Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) - до операції $96,5 \pm 10,6$ од, після імунізації $59,7 \pm 6,8$ од, (норма $58,9 \pm 7,8$ од).

Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) - до операції $90,5 \pm 11,0$ од, після імунізації $57,1 \pm 5,8$ од, (норма $58,9 \pm 7,8$ од).

Джерела інформації

1. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюлетень національного канцер-реєстру України. Київ, 2001. 116с.

2. Macchiarini P, Hardin M, Angiletti C A. Long-term evaluation of intrapleural bacillus Calmette-Guerin with or without adjuvant chemotherapy in completely resected stages II and III non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 1991, 14(4): 291-7.

3. Schulof RS, Mai D, Nelson MA, Paxton HM, Cox JW Jr, Turner ML, Mills M, Hix WR, Nochomovitz LE, Peters LS. Active specific immunotherapy with an autologous tumor cell vaccine in patients with resected non-small cell lung cancer. *Mol Biother* 1988, 1: 30-6.

4. Stack BH, McSwan N, Stirling JM. Autologous X-irradiated tumour cells and percutaneous BCG in operable lung cancer. *Thorax* 1982, 37: 588-93.

5. Takita H, Hollinshead AC, Adler RH, Bhayana J, Ramundo M, Moskowitz R, Rao UN, Raman S. Adjuvant, specific, active immunotherapy for resectable squamous cell lung carcinoma: a 5-year survival analysis. *J Surg Oncol* 1991, 46(1): 9-14.

6. Затула ДГ. Микроорганізми, рак і протипухлинний імунітет. Київ: Наук. думка, 1985. 247с.

7. Потебня ГП, Смопанка ІІІ, Лисовенко ГС, Ромашко НІ, Семерников ВА, Колесник ЕА. Ефективність імунотерапії аутовакциною при ліченні хворих раком легкого. *Онкологія* 2000, 2(3): 191-4.

8. Заявка № 2001042565 від 17.04.2001 на винахід «Штам бактерій *Bacillus subtilis* продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин».

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