



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76656 (13) C2
(51) МПК (2006)
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 38/02
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОТИПУХЛИННОЇ ВАКЦИНИ

1

2

(21) а200502695

(22) 24.03.2005

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Потебня Григорій Платонович, Сафронова Лариса Анатоліївна, Підгорський Валентин Степанович, Черемшенко Надія Леонідівна, Лісовенко Галина Степанівна, Сорокулова Ірина Борисівна, Приходько Валерія Олексіївна, Танасієнко Ольга Андріївна, Чехун Василь Федорович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАЇНИ

(56) UA, C2, 57869, 15.07.2003

UA, C2, 26068, 30.04.1999

UA, C2, 47308, 15.08.2004

UA, C2, 51187, 15.11.2002

RU, A, 2178300, 20.01.2002

Потебня Г.П., Лісовенко Г.С., Мосієнко В.С., Лісовенко В.Г. Ефективність комплексного застосування протипухлинної вакцини та імуномодулюючого препарату бластолен// Укр. Хіміотер. Журнал.- 2002.- № 2.- с. 61-65

Черынцева Н.В., Литвяков Н.В., Смольянинов Е.С. и др. Модуляция противоопухолевой активности циклофосфана рекомбинантным пробиотиком субалином// Вопр. Онкологии.- 1997.- Том 43.- №3.- с.312-317

(57) Спосіб підвищення ефективності протипухлинної вакцини шляхом застосування імуномодулюючого препарату бактеріального походження, який **відрізняється** тим, що в період імунізації протипухлинною вакциною 5-15-кратно перорально вводять препарат субалін.

Винахід відноситься до медицини, а саме, до онкології і стосується способу підвищення ефективності протипухлинних засобів.

Центральна проблема і мета експериментальної і клінічної онкології - підвищення ефективності лікування хворих злоякісними новоутвореннями. Найінтенсивніше розробляються засоби імунотерапії пухлин, які ґрунтуються на специфічній індукції протипухлинної резистентності організму, а саме, імунізації протипухлинними вакцинами, що містять пухлиноасоційовані антигени. Такі вакцини являють собою вбиті і модифіковані вірусами чи мікробами пухлинні клітини або їх фрагменти.

Встановлено, що при застосуванні протипухлинних вакцин спостерігається позитивна динаміка в лікуванні хворих колоректальним раком, меланою, раком нирок та інших локалізацій [1-3].

Результати експериментальних та клінічних досліджень ефективності вітчизняної протипухлинної аутовакцини для профілактики рецидивів та метастазів показали її стимулюючий вплив на активність клітинного і гуморального імунітету [4-6].

Проте, аналіз сучасних даних щодо застосування в онкологічній практиці протипухлинних вакцин свідчить про неможливість досягнення високого ступеня профілактичної і терапевтичної ефективності лікування хворих за допомогою засобів імунотерапії. Відомо, що практично всі специфічні протипухлинні вакцини діють ефективніше при використанні їх з ад'ювантами різного походження (RANES, DETOX, БЦЖ, цитокіни та ін. імуномодулятори).

Для лікування онкологічних захворювань все частіше застосовуються комбіновані схеми лікування, використовуючи при цьому широкий спектр модифікаторів біологічних реакцій. В останній час інтенсивно вивчається можливість використання в якості ад'ювантів різних цитокінів, які здатні чинити стимулюючий вплив на ключовий ланцюг імунної відповіді. Відома ад'ювантна дія широкого спектру цитокінів: інтерферон (ІФН) – α , β , γ , ІЛ-1, -2, -5, -6 [7-9]. Однак їх використання обмежене високою вартістю і парентеральними формами введення препаратів.

(13) C2

(11) 76656

(19) UA

Останнім часом велику увагу приділяють розробці імуномодуляторів на основі різних штамів мікроорганізмів, які мають імуномодулюючу і протипухлинну активність. Такі препарати почали використовувати в онкології для підвищення ефективності протипухлинної хіміо- та променевої терапії, зниження їх небажаної токсичної дії, або з метою запуску чи активації специфічних механізмів, які здатні елімінувати злоякісні клітини з організму чи запобігти їх розвитку. В цьому плані велику увагу приділяють пробіотикам - препаратам з живих мікробних культур, які є багатим джерелом отримання біологічно активних речовин, що мають протипухлинну дію [9-11].

Найближчим аналогом до способу, що заявляється, є підвищення ефективності протипухлинної вакцини за допомогою імуномодулюючого препарату бластолен, цей аналог ми беремо за прототип [12]. Дослідження комбінованого застосування протипухлинної вакцини та бластолену проведені на моделі солідної форми саркоми-37 у мишей лінії Balb/c. Протипухлинну вакцину, виготовлену за способом [13], вводили підшкірно на 1, 4 та 9-у добу, разова доза складала 0,3 мл. Розчин бластолену готували ex tempore, разова доза складала 2 мкг в 0,2 мл ізотонічного розчину і вводили підшкірно на 1 і 9-у добу за 3 год до застосування протипухлинної вакцини. Доведене підвищення ефективності комбінованого застосування протипухлинної вакцини і бластолену завдяки значніше вираженому гальмуванню пухлинного росту, ніж при ізольованому використанні протипухлинної вакцини і бластолену, та зростанню середньої тривалості життя дослідних тварин. Але описаний засіб, за допомогою якого підвищують протипухлинну ефективність вакцини, досить дорогий.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу удосконалення способу підвищення ефективності протипухлинної вакцини шляхом включення в схему імунізації пробіотика бактеріального походження нового покоління, нешкідливого для організму з тим, щоб забезпечити значне підвищення ефективності протипухлинної вакцини при зменшенні додаткових витрат на імунізацію.

Поставлена задача вирішується тим, що в період імунізації протипухлинною вакциною застосовують препарат субалін [14].

Суть способу підвищення ефективності протипухлинної вакцини полягає у тому, що препарат субалін включають в схему вакцинотерапії шляхом 5-15 - ти кратного перорального введення.

Удосконалення відомого способу вирішується за рахунок комбінованого застосування протипухлинної вакцини та субаліну, які проявляють синергічну протипухлинну дію, що й дозволяє підвищити імуногенність вакцини, підсилити протипухлинну резистентність організму і таким чином досягти значно вищої лікувальної ефективності та в 2 рази зменшити витрати на імунізацію за способом, що заявляється, завдяки значно дешевшому ад'юванту та пероральному його застосуванню.

Препарат субалін відносять до пробіотиків нового покоління. Його основою є рекомбінантний штам бактерій *B.subtilis* 2335/105, який містить ген

синтезу універсального антивірусного агента α - інтерферону людини. Здатність до синтезу людського α -інтерферону є вагомою перевагою пробіотика з бацил порівняно з бластоленом. Відомо, що рекомбінантний α -інтерферон є одним з перших цитокінів, який з успіхом використовується в клінічній практиці при вірусних захворюваннях та імунодефіцитних станах. Інтерферон є одним з ключових факторів активації механізмів неспецифічної резистентності. Крім того, дуже важливим моментом є те, що синтез інтерферону здійснюється бактеріями, які вводять перорально в шлунково-кишковий тракт. Такий спосіб введення інтерферону має ряд переваг порівняно з парентеральним надходженням відомих препаратів інтерферону.

При цьому знижується імунна відповідь по відношенню до інтерферону, який виробляється бактеріями в кишечнику, збільшується термін його дії, а також не спостерігається побічної дії препарату [15]. Розроблений в Інституті мікробіології і вірусології НАН України разом з науково-дослідним конструкторсько-технологічним Інститутом біологічно активних речовин НПО "Вектор" (RU) [Патент України № 26068 А61К35/74, С12Н1/21] пробіотик субалін не має аналогів в СНГ та за кордоном. Препарат субалін дозволений комітетом з питань імунобіологічних препаратів МОЗ України для медичного застосування [Протокол № 8/99 від 03.11.99 р.].

Препарат характеризується високою антагоністичною активністю по відношенню до широкого спектру патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів та антивірусною активністю. Проведені всебічні випробування безпечності (включаючи гістологічне вивчення різних органів і тканин) препарату субаліну та культури, яка входить до його складу, на лабораторних та сільськогосподарських тваринах довели, що при різних способах введення (в тому числі і парентеральному) в дозах, які значно перевищують рекомендовані до застосування, ні культура, ні препарат не викликають у тварин ніяких патологічних змін [15].

Проведені клінічні випробування субаліну довели його безпечність і високу ефективність при лікуванні гепатитів А та В, менінгоенцефалітів вірусної, бактеріальної та змішаної етіології, гострих кишкових інфекцій. Побічних ефектів, пов'язаних із його застосуванням, не виявлено [16]. Протипоказань для застосування субаліну не зареєстровано.

Субалін здатний також підвищувати ефективність терапевтичної дії циклофосфану за рахунок стимулюючого впливу на цитотоксичну активність перитонеальних макрофагів [16].

Синергічна дія протипухлинної вакцини та субаліну обумовлена скоріше за все регулюючим ефектом α -інтерферону, який продукується бактеріями пробіотика в кишечнику. Інтерферон взаємодіє з рецепторами слизової оболонки та чинить системний імуномодулюючий вплив на імунокомпетентні клітини слизової оболонки кишечника. Пероральний спосіб доставки інтерферону в організм має ряд переваг, а отже

очевидною є і перспективність використання субаліну в якості ад'юванта[15-17].

Субалін допомагає модифікувати стан пухлинних клітин, обмежуючи їх генетичну нестабільність, регулюючи реакції на ростові фактори, потенціюючи імуногенність, пригнічуючи ангиогенез, а також здатний підвищувати активність ефекторних клітин системи природної резистентності організму.

Сукупність експериментальних та клінічних даних і дала основу для включення субаліну в схему імунізації для підвищення ефективності протипухлинної вакцини.

Спосіб підвищення ефективності протипухлинної вакцини здійснювали за наступних умов. Протипухлинну терапевтичну активність комбінованого застосування вакцини та субаліну досліджували на експериментальних тваринах, на моделі солідної форми карциноми легені Льюїс, оскільки саме ця модель пухлинного росту метастазуюча і вважається наближеною до клінічних форм. У кожній експериментальній групі було по 8-10 мишей-самців лінії C57Bl (2-2,5-місячного віку з масою 18-20 г). Тваринам прищеплювали внутрішньом'язево по 1×10^6 живих клітин карциноми Льюїс. Протипухлинну вакцину, одержану за способом [патенту № 57869], вводили 3-кратно, підшкірно в однакових дозах (0,3 мл) на 1, 4, 9 добу після прищеплення пухлинних клітин. Розчин субаліну готували кожного разу ex tempore та вводили в об'ємі 0,5 мл ізотонічного розчину, щоденно перорально протягом 5-15-ти діб в дозі (1×10^8) колонієутворюючих одиниць (КУО). Миші дослідних груп одержували субалін (I група), вакцину (II група) та комбіновано субалін з вакциною (III група). Мишам контрольної IV групи після прищеплення пухлини вводили ізотонічний розчин.

Ефективність лікування визначали по гальмуванню росту пухлини, яке оцінювали по об'єму первинного пухлинного вузла та вираховували

індекс гальмування росту пухлини за формулою: $ІГП = (А_k - А_d) : А_k \times 100 \%$;

де $А_k$ - середній об'єм первинного пухлинного вузла в контрольній групі ($мм^3$);

$А_d$ - середній об'єм первинного пухлинного вузла в дослідній групі ($мм^3$).

Антиметастатичну дію препаратів оцінювали по середній кількості метастазів на 1 тварину і вираховували індекс гальмування метастазування за формулою: $ІГМ = (В_k - В_d) : В_k \times 100 \%$;

де $В_k$ - середня кількість метастазів на 1 тварину в контрольній групі;

$В_d$ - середня кількість метастазів на 1 тварину в дослідній групі.

Середню тривалість життя (СТЖ) розраховували на основі даних про тривалість життя всіх тварин групи.

Для висновку про характер взаємодії протипухлинної вакцини та субаліну підраховували очікуваний ефект за формулою: $A + (100 - A \times B : 100)$, де A - ефект першого впливу. B - ефект другого впливу. Якщо реальний ефект був рівний очікуваному або перевищував його, робили висновок про потенціюючу дію агентів [17].

Суть способу, що заявляється, пояснюють приклади конкретного виконання:

Приклад 1

Проведено терапевтичний дослід, де після прищеплення пухлини субалін вводили щоденно перорально протягом 3-х діб в дозі 1×10^8 КУО на мишу в об'ємі 0,5 мл ізотонічного розчину (група 1). Вакцину вводили підшкірно, 3-кратно (по 0,3 мл), на 1, 4, 9 добу (група П). Мишам дослідної групи Ш вводили комбіновано субалін та вакцину. Мишам контрольної IV групи вводили ізотонічний розчин.

Протипухлинну резистентність мишей до карциноми легені Льюїс при комбінованому лікуванні протипухлинною вакциною та субаліном представлено в табл.1.

Таблиця 1

Вплив вакцини, субаліну та їх комбінації на показники перебігу пухлинного процесу в порівнянні з "контролем прищеплення"

Група	Лікування	ІГП, % (на 40 добу)	ІГМ, %	СТЖ, діб
I	Субалін	4,8	17,0	47,9±4,7
II	Вакцина	49,2	68,5	62,5±4,1
III	Вакцина+Субалін	50,8	69,0	65,7±3,4
IV	Контроль прищеплення			47,1±2,8

З даних табл.1 видно, що терапевтична ефективність комбінованого застосування протипухлинної вакцини при 3-кратному введенні субаліну, не підвищувалась. В даному прикладі потенціюючої дії агентів не одержали.

Приклад 2

Проведено терапевтичний дослід, де субалін вводили щоденно перорально протягом 5-ти діб в

дозі 1×10^8 КУО на мишу в об'ємі 0,5 мл ізотонічного розчину. Інші умови досліді відповідали прикладу 1.

Протипухлинну резистентність мишей до карциноми легені Льюїс при комбінованому лікуванні протипухлинною вакциною та субаліном представлено в табл.2.

Таблиця 2

Вплив вакцини, субаліну та їх комбінації на показники перебігу пухлинного процесу в порівнянні з "контролем прищеплення"

Група	Лікування	ІГП, % (на 40 добу)	ІГМ, %	СТЖ, діб
I	Субалін	34,9	46,0	49,3±3,2
II	Вакцина	49,2	68,5	62,5±4,1
III	Вакцина+Субалін	74,6	87,1	81,0±3,4
IV	Контроль прищеплення			47,1±2,8

З даних табл.2 видно, що терапевтична ефективність комбінованого застосування протипухлинної вакцини при 5-кратному введенні субаліну, підвищувалась. В даному прикладі потенціюючу дію агентів було досягнуто.

Приклад 3

Проведено терапевтичний дослід, де субалін вводили щоденно перорально протягом 10-ти діб в

дозі 1×10^8 КУО на мишу в об'ємі 0,5 мл ізотонічного розчину.

Протипухлинну резистентність мишей до карциноми легені Льюїс при комбінованому лікуванні протипухлинною вакциною та субаліном представлено в табл.3.

Таблиця 3

Вплив вакцини, субаліну та їх комбінації на показники перебігу пухлинного процесу в порівнянні з "контролем прищеплення"

Група	Лікування	ІГП, % (на 40 добу)	ІГМ, %	СТЖ, діб
I	Субалін	36,5	51,0	50,1±3,7
II	Вакцина	49,2	68,5	62,5±4,1
III	Вакцина+Субалін	76,2	88,1	81,9±3,4
IV	Контроль прищеплення			47,1±2,8

З даних табл.3 видно, що терапевтична ефективність комбінованого застосування протипухлинної вакцини при 10-кратному введенні субаліну, підвищувалась. В даному прикладі потенціюючу дію агентів було досягнуто.

Приклад 4

Проведено терапевтичний дослід, де субалін вводили щоденно перорально протягом 15-ти діб в дозі 1×10^8 КУО на мишу в об'ємі 0,5мл ізотонічного розчину. Протипухлинну резистентність мишей до карциноми легені Льюїс при комбінованому лікуванні протипухлинною вакциною та субаліном представлено в табл.4.

Таблиця 4

Вплив вакцини, субаліну та їх комбінації на показники перебігу пухлинного процесу в порівнянні з "контролем прищеплення"

Група	Лікування	ІГП, % (на 40 добу)	ІГМ, %	СТЖ, діб
I	Субалін	38,1	53,6	51,5±4,7
II	Вакцина	49,2	68,5	62,5±4,1
III	Вакцина+Субалін	77,8	82,4	82,4±3,4
IV	Контроль прищеплення			47,1±2,8

З даних табл.4 видно, що терапевтична ефективність комбінованого застосування протипухлинної вакцини при 15-кратному введенні субаліну, підвищувалась. В даному прикладі потенціюючу дію агентів було досягнуто.

Застосування спеціальної формули дозволяє говорити про потенціюючу дію субаліну на протипухлинну активність вакцини. При цьому у мишей, які одержували комбіноване лікування, зменшувався об'єм пухлин, гальмувалось метастазування та збільшувалась середня тривалість їх життя.

Таким чином, виявлені властивості субаліну підвищувати протипухлинну і антиметастатичну дію вакцини, дозволяє вважати його перспективним для подальшої оцінки можливості застосування його в терапії злоякісних новоутворень.

Запропонований спосіб підвищення ефективності протипухлинної вакцини дозволяє одержати вищу терапевтичну ефективність та значно зменшити затрати на придбання нового імуномодуючого препарату. Спосіб не вимагає додаткового спеціального обладнання і може широко застосовуватися для підвищення ефективності імунізації протипухлинною вакциною.

Отже, висока ефективність і відсутність негативних побічних впливів

способу, що заявляється, створює експериментальне обґрунтування впровадження його в клінічну практику для підвищення ефективності лікування оперованих хворих з метою профілактики рецидивів і метастазів, збільшення тривалості життя та покращення його якості.

Література:

1. Hoover HC Jr, Brandh6rst JS, Peters LC, et al. 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.
2. Berd D, Kairys J, Dunton C, et al. Autologous, hapten-modified vaccine as a treatment for human cancers. *Semin Oncol* 1998; 25(6): 646-53.
3. Mulders P, Tso CL, Gitlitz B, et al. Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines. *Clin Cancer Res* 1999; 5(2): 445-54.
4. Затула Д.Г. Микроорганизмы, рак и противоопухолевый иммунитет. Киев: Наук думка, 1985. 247 с.
5. Колесник Е.А., Потебня Г.П., Кикоть В.А. и др. Противоопухолевая вакцина в лечении больных распространенным колоректальным раком. *Онкол* 1999; 2: 192-5.
6. Потебня Г.П., Смоланка Н.И., Лисовенко Г.С. и др. Эффективность иммунотерапии ауто-вакциной в лечении больных раком легкого. *Онкол* 2000;2:191-4.
7. Tompkins W.A. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of mterferon-ccmechanizm of action. *J Interferon Cytokine Res*. 1999; 19: 817-28.
8. Tovey M.G., Maury C. Oral mucosal interferon therapy: Marked antiviral and antitumor activity. *Ibid*: 145-55.
9. Иммунология в 3-х томах (перев. С англ. под ред.У.Пола). - М.:Мир,1987; 89.Т.3:360с.
10. Рахмилевич АП. Бактериальные иммуномодуляторы в экспериментальной иммунологии. *Успехи совр. биологии* 1990; 109(3): 379-92.
11. Моисеенко В.М., Блинов Н.Н., Хансон К.П. Биотерапия при злокачественных новообразованиях. *Рос. онкол. журнал* 1997; 5: 67-9.
12. Потебня Г.П., Лисовенко Г.С., Мосієнко В.С., Лисовенко В.Г. Ефективність комплексного застосування протипухлинної вакцини та імуномодуючого препарату бластолен. *Укр. Хіміотер. журнал* 2002; 2(14): 60-4.
13. Патент А61К35/12, 35/74 № 57869 Україна "Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини" / Потебня ГП, Лисовенко ГС, Черемшенко НЛ, Тана-сієнко ОА, Чехун ВФ. (Україна); № 2001064158; Заявл. 15.06.2001; Опубл.15.07.2003, Бюл. № 7.
14. Патент А61К35/74, С12Н1/21 № 26068 Україна „Профілактичний біопрепарат субалін” /Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова І.Б., Сахдахчієв Л.С. (RU), Петренко ВА (RU), Ільчов А.А. (RU), Белявская В.А. (RU), Тимофеев І.В. (RU) - № 93006450; Заявл. 07.07.1993; Опубл. 30.04.99, Бюл. № 2.
15. Белявская В.А. Конструирование лечебно-профилактических препаратов на основе живых генетически модифицированных микроорганизмов. [Автореф дис ... докт биол наук]. Кольцове, 2002. 46с.
16. Сорокулова И.Б. Изучение безопасности и реактогенности нового пробиотика субалина для добровольцев. *Мікробиол. журн.* 1998; 60(1):43-6.
17. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Смолянинов Е.С. и др. Модуляция противоопухолевой активности циклофосфана рекомбинантным пробиотиком субалином. *Вопр онкологии* 1997; 43(3): 313-6.
18. Jackson R, Harrap A. Computer model af anticancer drug interaction. *Pharmacol Ther* 1979; 4: 245-50.