



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95522 (13) C2
(51) МПК (2011.01)
A61K 39/07 (2006.01)
A61P 35/00
A61N 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ ЗІ ЗЛОЯКІСНИМИ ПУХЛИНАМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРОТИПУХЛИННОЮ АУТОВАКЦИНОЮ

1

(21) а200912017
(22) 23.11.2009
(24) 10.08.2011
(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.
(72) ПОТЕБНЯ ГРИГОРІЙ ПЛАТОНОВИЧ, ТАНАСІЄНКО ОЛЬГА АНДРІЇВНА, БОМБІН АНДРІЙ В'ЯЧЕСЛАВОВИЧ, ЛІСОВЕНКО ГАЛИНА СТЕПАНІВНА, КОХАНІВСЬКА ЛЮБОВ МИКОЛАЇВНА, ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕДОРОВИЧ
(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ
(56) RU 2262941 C2 27.10.2005
UA 57869 C2 15.07.2003

2

RU 2197985 C2 10.02.2003
(57) Спосіб лікування хворих на злоякісні пухлини головного мозку протипухлинною аутовакциною, який полягає в тому, що імунотерапію пацієнтам з видаленою хірургічним шляхом пухлиною починають після променевої або променевої та хіміотерапії шляхом 3-разового з інтервалом в 7 днів підшкірного введення аутовакцини, який відрізняється тим, що застосовують вакцину, виготовлену з пухлинних клітин, оброблених 0,05-0,20% розчином цитотоксичного лектину, виділеного з культуральної рідини мікроорганізму *B. subtilis* B-7025, в кількості 3,0мл з ревакцинаціями через 1 та 3 місяці.

Винахід стосується медицини, а саме онкології, і може використовуватись при імунотерапії прооперованих хворих на злоякісні пухлини головного мозку (ЗПГМ).

Починаючи з 90-х років ХХ століття, в багатьох країнах світу, включаючи Україну, спостерігають поступове збільшення захворюваності на ЗПГМ. За даними Національного канцер-реєстру України вони віднесені до пухлин, які мають найбільші темпи зростання захворюваності населення і нині займають 9 місце в структурі онкологічних захворювань [1-2]. Гліальні пухлини уражають практично всі вікові групи, при цьому найчастіше спостерігаються в 30-50-річному віці. Високий ступінь злоякісності переважної більшості ЗПГМ, інвазивний характер росту, відсутність чітких меж пухлини, їх поширення у функціонально важливі зони та структури головного мозку суттєво обмежують можливості хірургічних та променевих методів лікування [3-4]. Все викладене обумовлює актуальність проблеми підвищення ефективності діагностики та лікування пацієнтів із ЗПГМ.

Сучасною стратегією лікування хворих зі ЗПГМ є комплексний підхід, який полягає у хірургічному видаленні пухлини, проведенні променевої та хіміотерапії, використанні ад'ювантних методів. Під-

вищення ефективності лікування таких хворих пов'язують з розробкою і використанням сучасних біотехнологій, зокрема засобів і методів імунотерапії [5-6]. Актуальність використання імунотерапії при комбінованому лікуванні хворих обумовлена її перевагами перед променевою та хіміотерапією, оскільки на відміну від останніх не пошкоджує нормальні клітини і діє на злоякісні клітини незалежно від фази клітинного циклу. Саме тому імунотерапія розглядається як четвертий основний спосіб лікування в онкології і включає в себе різні методи впливу як на пухлину, так і на імунну систему.

Найбільш близьким аналогом до способу, що заявляється, є спосіб післяопераційної специфічної імунотерапії хворих на ЗПГМ [7], який полягає в тому, що аутолізат пухлинних клітин хворого, отриманий за допомогою продуктів метаболізму бактеріального штаму *Bacillus mesentericus* АБ-56 вводили підшкірно 4 рази з інтервалом в 3-5 днів у збільшуваних дозах (3-4, 5, 6 та 7мл) з ревакцинацією через два місяці. На весь курс імунотерапії припадало 25 мл вакцини, що складало 280-340 мг загального білка. Включення методів активної специфічної імунотерапії або комбінованих методів імунотерапії з неспецифічним лікуванням (реміцином, левамізолем) злоякісних гліом приводило

(19) UA (11) 95522 (13) C2

до достовірного підвищення виживаності у цій категорії хворих порівняно з контрольними групами у 1,5 та 2 рази відповідно [8]. Застосування аутолізату пухлинних клітин і левамізолу в схемах лікування хворих зі ЗПГМ покращує показники клітинного та гуморального ланок імунітету.

В основу винаходу, що заявляється, поставлена задача удосконалення способу імунотерапії хворих на ЗПГМ після хірургічного видалення пухлини і вирішується шляхом: а) використання протипухлинної аутовакцини (ПАВ) з вищою імуногенністю, виготовленої за допомогою цитотоксичних пектинів [9], виділених з культуральної рідини бактеріального штаму *B.subtilis* B-7025 [10], б) комбінованого застосування променевої та/або хіміотерапії з імунотерапією ПАВ, що дозволяє підвищити ефективність лікування хворих зі ЗПГМ та подовжити середню тривалість і якість життя пацієнтів.

Поставлена задача вирішується шляхом використання ПАВ, виготовленої з пухлинних клітин прооперованого хворого, які обробляють цитотоксичними пектинами, виділеними з культуральної рідини бактеріального штаму *B. subtilis* B-7025. Вакцину вводять прооперованому хворому після променевої або променевої та хіміотерапії підшкірно 3 рази, з інтервалом у 7 днів, з наступними ревакцинаціями через 1 та 3 місяці.

Застосування ПАВ на основі одержаного та очищеного бактеріального цитотоксичного лектину дозволяє уникнути надмірного білкового навантаження на імунну систему пацієнтів, підвищити ефективність лікування та поліпшити якість життя хворих.

Суть способу лікування хворих на ЗПГМ, що заявляється, полягає в тому, що на 7-10 день після променевої або променевої та хіміотерапії проводять 3-разову підшкірну імунізацію аутовакциною, виготовленою з пухлинних клітин, оброблених 0,5% розчином виділеного з культуральної рідини мікроорганізму *B.subtilis* B-7025 і очищеного цитотоксичного лектину, в дозі 3,0мл з наступними ревакцинаціями через 1 та 3 місяці.

Клінічні випробування способу, що заявляється, проводили у 2-ому нейрохірургічному відділенні КЗ "Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І.Мечникова". Всі дослідження проведені відповідно до Закону України "Про лікарські засоби" з урахуванням вимог і етичних принципів Гельсінської декларації, а їх програма схвалена комісією з

біоетики Дніпропетровської державної медичної академії (протокол №9 від 19.09.2002р.). Усі хворі дали інформовану письмову згоду на участь у випробуваннях.

В залежності від схеми лікування хворі на ЗПГМ були рандомізовано розподілені на 6 груп: з них 4 контрольні (хірургічне видалення пухлини (ХВП) - 40 хворих, ХВП+хіміотерапія (ХТ) - 30, ХВП+променева терапія (ПТ)–n=40, ХВП+ПТ+ХТ–n=30) та 2 основні, хворі, у яких в комплексному лікуванні було застосовано аутовакцинотерапію (ХВП+ПТ+ПАВ–n=30, і ХВП+ПТ+ХТ+ПАВ–n=15).

Після хірургічного видалення пухлини 45 пацієнтам основних груп через 25-30 діб після закінчення променевої терапії підшкірно один раз на тиждень 3-разово вводили ПАВ, яку готували із аутологічного пухлинного матеріалу шляхом обробки цитотоксичним лектином, виділеним з продуктів метаболізму бактеріального штаму *B.subtilis* B-7025. Вакцину стерильно фасували і зберігали при температурі -18-25°C, розморожуючи безпосередньо перед введенням. Сумарна доза введеної ПАВ за білком складала 45-60мг.

Імунологічне обстеження проводили в динаміці лікування: до та після оперативного втручання, після закінчення променевої терапії, після закінчення повного курсу вакцинотерапії в основних групах та через аналогічний проміжок часу в контрольних групах.

Основними критеріями ефективності застосування ПАВ у комплексному лікуванні хворих зі ЗПГМ були тривалість та якість життя пацієнтів основних і контрольних груп, а також імунологічні показники імунотерапії. Враховуючи те, що практично 90-100% хворих зі ЗПГМ помирає протягом першого року, основну увагу приділяли аналізу одно- та 3-річної виживаності хворих.

Вплив ПАВ на ефективність лікування було виявлено вже на етапах проміжного аналізу результатів дослідження 1-го року спостереження (табл. 1). Вже через 6 місяців виживаність прооперованих хворих, у яких була застосована ПТ+ПАВ, на 45% перевищувала таку у хворих, які отримували лише ПТ. Через 12 місяців в контрольній групі (ХВП+ПТ) всі хворі померли, а в дослідній групі (ХВП+ПТ+ПАВ) 50% пацієнтів залишалися живими. Введення в схему лікування цих груп хіміотерапії практично не впливало на однорічну виживаність хворих.

Таблиця 1

Виживаність хворих із ЗПГМ протягом 1-го року спостереження при різних схемах лікування

№ групи	Групи хворих	Загальна виживаність (%) через:		
		6 міс.	9 міс.	12 міс.
1.	ХВП (n=40)	27,5±7,1	10,0±4,7	0
2.	ХВП+ХТ (n=30)	46,7±9,1	16,7±6,8	0
3.	ХВП+ПТ (n=40)	55,0±7,9	20,0±6,3	0
4.	ХВП+ПТ+ПАВ (n=30)	100,0 ^{*1,2,3}	80,0±7,3 ^{*1,2,3}	50,0±9,1 ^{*1,2,3,5}
5.	ХВП+ПТ+ХТ (n=30)	93,3±4,6	56,7±9,0	10,0±5,5
6.	ХВП+ПТ+ХТ+ПАВ (n=15)	100,0 ^{*1,2,3}	93,3±6,4 ^{*1,2,3,5}	60,0±12,6 ^{*1,2,3,5}
Примітки: ^{*1,2,3,5} p<0,05 порівняно з показником відповідної групи.				

При 2-річному спостереженні середня тривалість життя (СТЖ) вакцинованих пацієнтів практично була однаковою незалежно від схеми комплексного лікування: ХВП+ПТ+ПАВ: $17,3 \pm 2,3$, ХВП+ПТ+ХТ+ПАВ: $16,2 \pm 2,7$ місяця і перевищувала

СТЖ хворих контрольної групи в 2,7 і 1,8 рази (табл. 2). Показники 3-річної виживаності в цих групах становили відповідно 11,5% (3 з 30 пацієнтів) і 15,5 % (2 з 15).

Таблиця 2

Дворічна середня тривалість життя хворих
зі злоякісними пухлинами головного мозку при різних схемах лікування

№ групи	Групи хворих	Середня тривалість життя, місяці
1.	ХВП (n=40)	$4,68 \pm 0,39$
2.	ХВП+ХТ (n=30)	$6,17 \pm 0,43^{*1}$
3.	ХВП+ПТ (n=40)	$6,50 \pm 0,35^{*1}$
4.	ХВП+ПТ+ПАВ (n=30)	$17,31 \pm 2,29^{*1,2,3,5}$
5.	ХВП+ПТ+ХТ (n=30)	$9,09 \pm 0,44^{*1,2,3}$
6.	ХВП+ПТ+ХТ+ПАВ (n=15)	$16,19 \pm 2,67^{*1,2,3,5}$
Примітки: $^{*1,2,3,5} p < 0,05$ порівняно з показником відповідної групи		

Таким чином, поєднання іонізуючого опромінення з аутовакциною є найбільш ефективним і має перевагу перед застосованими режимами лікування з включенням хіміотерапії, у першу чергу, за рахунок виключення з терапії їх токсичного впливу на організм хворого.

Використання ПАВ в жодному випадку не супроводжувалось розвитком алергічних реакцій та ускладнень, які б суттєво впливали на загальний стан хворих. Побічні ефекти від застосування ПАВ, які спостерігали у 20,0% хворих і склалися з пірогенних реакцій транзитного типу та незначної болі у місці ін'єкції, були нетривалими, проходили без застосування жарознижуючих або знеболювальних засобів.

Імунологічними ефектами застосування ПАВ були: достовірне збільшення порівняно зі станом до вакцинації вмісту лейкоцитів, лімфоцитів, Т-лімфоцитів і їх субпопуляцій, В-лімфоцитів, натуральних кіперних клітин, покращення функціонального стану нейтрофільних лейкоцитів. Показники, що характеризують вміст Т-лімфоцитів і їх субпопуляцій, натуральних кіперних клітин, активність фагоцитуючих клітин та концентрація IgA в сироватці крові пацієнтів після вакцинотерапії достовірно перевищували такі у хворих, які не отримували ПАВ. Після закінчення вакцинації були практично відсутніми у пацієнтів основних груп прояви дефіциту Т-лімфоцитів. Вірогідно зросли (до і вище рівня донорів) функціональний резерв нейтрофілів, концентрації імуноглобулінів всіх досліджених класів. Водночас знизився рівень ЦКК. Все це є загальною позитивною прогностичною ознакою при лікуванні пацієнтів онкологічного профілю.

Суть способу пояснюють приклади конкретного виконання.

Приклад 1.

Хворий Ч-ка В.В., 1977р.н., історія хвороби №8252. Діагноз: Гліобластома лівої скроневотім'яної долі головного мозку. Операція: 21.07.2005р. - субтотальне видалення пухлини

головного мозку. ПГЗ №6594-605 - гліобластома 4 ступеня злоякісності.

Починаючи з 28-ої доби після променевої терапії хворому провели підшкірно 3-разову щотижневу імунізацію ПАВ в дозі 10мг по білку (що за об'ємом становило 3 мл). Перший курс ХТ (ломустин $80\text{мг}/\text{м}^2$ per os) проводили через 2 тижні після вакцинації. Ревакцинацію проводили через місяць після завершення курсу ХТ однократним введенням ПАВ в аналогічній дозі. Наступні 3 курси ХТ проводили між 1 та 2 ревакцинаціями.

В процесі лікування визначали відносну і абсолютну кількість лімфоцитарних субпопуляцій до операції, після операції і променевої терапії, після вакцинації. Відносна кількість (%): CD3 до операції - 48,65; після операції і променевої терапії - 42,67; після вакцинації - 52,17; (норма: 58,0-80,0); CD4 до операції - 32,83; після операції і променевої терапії - 25,83; після вакцинації - 37,83 (норма: 33-55); CD8 до операції - 23,67; після операції і променевої терапії - 24,1; після вакцинації - 30,5 (норма: 17-37); CD4/CD8 до операції - 1,39; після операції і променевої терапії - 1,07; після вакцинації - 1,26 (норма: 1,40-2,50); CD 19 до операції - 22,17; після операції і променевої терапії - 22,0; після вакцинації - 23,33 (норма: 9,00-25,00); CD16 до операції - 12,33; після операції і променевої терапії - 21,17; після вакцинації-23,83 (норма: 6,0-26,0).

Абсолютна кількість ($\times 10^9$): CD3 до операції - 1,22; після операції і променевої терапії - 0,44; після вакцинації - 0,66 (норма: 1,1-1,7); CD4 до операції - 0,42; після операції і променевої терапії - 0,27; після вакцинації - 0,44 (норма: 0,4-1,1); CD8 до операції - 0,36; після операції і променевої терапії - 0,25; після вакцинації - 0,34 (норма: 0,3-0,7); CD19 до операції - 0,22; після операції і променевої терапії - 0,22; після вакцинації - 0,29 (норма: 0,19-0,48); CD16 до операції - 0,30; після операції і променевої терапії - 0,26; після вакцинації - 0,29 (норма: 0,12-0,49). Хворий прожив після операційного втручання 447 днів.

Приклад 2.

Хвора Со-ка А.С., 1984р.н., історія хвороби №5605. Діагноз: Гліобластома правого бокового шлунку головного мозку. Операція: 17.06.02р. - тотальне видалення пухлини головного мозку. ПГЗ №36434-42 - гліобластома 4ст. злості.

Починаючи з 28-ої доби після променевої терапії, хворий провели підшкірно 3-разову щотижневу імунізацію ПАВ в дозі 12мг по білку (що за об'ємом становило 3 мл), а через 1 та 3 місяці провели одноразові ревакцинації в таких же дозах.

В процесі лікування визначали відносну і абсолютну кількість лімфоцитарних субпопуляцій до операції, після операції і променевої терапії, після вакцинації. Відносна кількість (%): CD3 до операції - 47,61; після операції і променевої терапії - 43,66; після вакцинації - 53,11; (норма: 58,0-80,0); CD4 до операції - 33,80; після операції і променевої терапії - 25,81; після вакцинації - 38,91 (норма: 33-55); CD8 до операції - 23,69; після операції і променевої терапії - 24,7; після вакцинації - 32,5 (норма: 17-37); CD4/CD8 до операції - 1,38; після операції і променевої терапії - 1,08; після вакцинації - 1,27 (норма: 1,40-2,50); CD19 до операції - 23,17; після операції і променевої терапії - 23,0; після вакцинації - 25,33 (норма: 9,00-25,00); CD16 до операції - 12,1; після операції і променевої терапії - 21,85; після вакцинації - 23,98 (норма: 6,0-26,0).

Абсолютна кількість ($\times 10^9$): CD3 до операції - 1,26; після операції і променевої терапії - 0,43; після вакцинації - 0,69 (норма: 1,1-1,7); CD4 до операції - 0,45; після операції і променевої терапії - 0,29; після вакцинації - 0,44 (норма: 0,4-1,1); CD8 до операції - 0,35; після операції і променевої терапії - 0,24; після вакцинації - 0,33 (норма: 0,3-0,7); CD19 до операції - 0,23; після операції і променевої терапії - 0,24; після вакцинації - 0,29 (норма: 0,19-0,48); CD 16 до операції - 0,32; після операції і променевої терапії - 0,27; після вакцинації - 0,3 (норма: 0,12-0,49). Хвора прожила після операційного втручання ще 807 днів.

Приклад 3.

Хворий Кля-н А.А., 1964р. н., історія хвороби №700. Діагноз: Гліобластома правої скроневі долі головного мозку. Операція: 13.12.02р. - субтотальне видалення пухлини головного мозку. ПГЗ №77604-8 - мультиформна гліобластома 4ст. злості.

Починаючи з 28-ої доби після променевої терапії, хворому провели підшкірно 3-разову щотижневу імунізацію аутовакциною в дозі 10мг по білку (що за об'ємом становило 3мл), а через 1 та 3 місяці провели одноразові ревакцинації в таких же дозах.

В процесі лікування визначали відносну і абсолютну кількість лімфоцитарних субпопуляцій до операції, після операції і променевої терапії, після вакцинації. Відносна кількість (%): CD3 до операції - 45,61; після операції і променевої терапії - 42,66; після вакцинації - 52,11; (норма: 58,0-80,0); CD4 до операції - 33,5; після операції і променевої терапії - 25,2; після вакцинації - 37,91 (норма: 33-55); CD8 до операції - 22,4 %; після операції і променевої терапії - 25,5; після вакцинації - 33,5 (норма: 17-37); CD4/CD8 до операції - 1,37; після операції і

променевої терапії - 1,07; після вакцинації - 1,25 (норма: 1,40-2,50); CD19 до операції - 24,47; після операції і променевої терапії - 23,6; після вакцинації - 26,63 (норма: 9,00-25,00); CD 16 до операції - 12,9; після операції і променевої терапії - 22,81; після вакцинації - 24,85 (норма: 6,0-26,0).

Абсолютна кількість ($\times 10^9$): CD3 до операції - 1,27; після операції і променевої терапії - 0,47; після вакцинації - 0,72 (норма: 1,1-1,7); CD4 до операції - 0,46; після операції і променевої терапії - 0,28; після вакцинації - 0,47 (норма: 0,4-1,1); CD8 до операції - 0,37; після операції і променевої терапії - 0,25; після вакцинації - 0,36 (норма: 0,3-0,7); CD 19 до операції - 0,24; після операції і променевої терапії - 0,26; після вакцинації - 0,29 (норма: 0,19-0,48); CD 16 до операції - 0,32; після операції і променевої терапії - 0,26; після вакцинації - 0,33 (норма: 0,12-0,49). Хворий прожив 1245 днів.

Таким чином, застосування ПАВ при ЗПГМ є безпечним і ефективним методом терапії, яке покращує віддаленні результати лікування, підвищує якість життя пацієнтів і їх застосування є доцільним і перспективним в комплексному лікуванні хворих зі ЗПГМ.

Джерела інформації:

1. Глиомы головного мозга / под ред. Ю.А.Зозули. - К.: УИПК "ЕксОб", 2007. - 636с.
2. Рак в Україні 2006-2007. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / З.П.Федоренко, Л.О.Гулак, Є.Л.Горох та ін. // Бюл. Національного канцер-реєстру України. - 2008. - №9. - 100с.
3. Лечение злокачественных опухолей головного мозга: общее состояние проблемы и пути ее решения (обзор литературы) // С.П.Осинский, В.И.Щеглов, Е.А.Аннин и др. // Укр. журн. малоінваз. ендоскоп, хірургії. - 1998. - Т. 2, №4. - С.37-44.
4. Second malignancies following radiotherapy: an analysis of 54 cases accumulated by mail survey in Japan / Y. Matsumoto, T. Nishimura, S. Hirota et al. // Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi. - 2002. - Vol. 62, №1. - P.27-31.
5. Van de Velde A.L., Bememan Z.N., Van Tendeloo V.F. Immunotherapy of hematological malignancies using dendritic cells // Bull. Cancer. - 2008. - V. 95, №3. - P.320-326.
6. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells / F. Schmitz, A. Heit, S. Dreher et al. // Eur. J. Immunol. - 2008. - V. 38, № 11. - P. 2981-2992.
7. Главацкий А.Я. Активная иммунотерапия в комбинированном лечении злокачественных глиом головного мозга: дис. ... кандидата мед. наук: 14.00.286 14.00.36 / - К., 1987. - 234с.
8. Маркова О.В., Главацкий А.Я., Кулик А.В. Результаты комбинированного лечения больных с глиомами головного мозга с применением противоопухолевой аутовакцины. // Специфічна імунотерапія в онкології: Матер. наук.-практ. конф. "Актуальні питання специфічної імунотерапії хворих на злоякісні новоутворення", Умань, 2007 р. - К.: Здоров'я, 2008. - С.153-159.
9. Потебня Г.П., Лісовенко Г.С., Черемшенко Н.Л., Танасієнко О.А., Чехун В.Ф. Спосіб одержан-

ня протипухлинних вакцин // Патент України, №56348 від 15.05.2003р. Бюл. №5.

10. Потебня Г.П., Лісовенко Г.С., Черемшенко Н.Л., Танасієнко О.А., Чехун В.Ф. Штам бактерій

Bacillus subtilis - продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин // Патент України, №57869 від 15.07.2003р. Бюл. №7.