



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **49483** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
A61K 39/00
A61K 35/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІМУНОТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА РАК ЛЕГЕНІ

1

(21) u200912738

(22) 08.12.2009

(24) 26.04.2010

(46) 26.04.2010, Бюл.№ 8, 2010 р.

(72) ХРАНОВСЬКА НАТАЛЯ МИКОЛАЇВНА, СКАЧКОВА ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА, СИТЬКО ВАЛЕНТИНА ВІТАЛІЇВНА, ГАНУЛ ВАЛЕНТИН ЛЕОНІДОВИЧ, ГАНУЛ АНДРІЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ, СОВЕНКО ВОЛОДИМИР МИХАЙЛОВИЧ, ОРЕЛ ВАЛЕРІЙ ЕММАНУїЛОВИЧ

2

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ

(57) Спосіб імунотерапії хворих на рак легені, що включає проведення чотирьох курсів внутрішньовенної вакцинотерапії на основі дендритних клітин, який відрізняється тим, що на 6 добу культивування дендритні клітини навантажують аутологічним лізатом механомодифікованих ліофілізованих пухлинних клітин і вводять з інтервалом в один місяць.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме - онкології, і може бути використаний для імунотерапії хворих на рак легені.

Відомо, що основним методом лікування хворих на рак легені є хірургічне видалення пухлини. Однак результати самостійного хірургічного методу досить часто є незадовільними [1]. З числа радикально оперованих хворих 5 років переживають близько 20%. Більша частина рецидивів захворювання спричинена віддаленим метастазуванням та ураженням пухлинним процесом регіонарних лімфовузлів.

У зв'язку з цим виникає необхідність у розробці нових методів лікування, які б підвищили ефективність існуючих. Відомо, що застосування опромінення та хіміотерапевтичних заходів після радикальної операції з приводу раку легені, не підвищує безрецидивну виживаність хворих. Тому в цілях профілактики виникнення повторних проявів захворювання застосовуються різні види протиракових вакцин [2].

Відомі наступні способи лікування онкологічних хворих: введення гамма-опромінених аутологічних пухлинних клітин разом із вакциною проти туберкульозу (Bacillus Calmette-Guerin) БЦЖ, її дериватами, ад'ювантами типу DETOX, цитокінами (гама-інтерферон, фактор некрозу пухлин, інтерлейкін-1); спосіб лікування онкохворих із застосуванням імунотерапії неспецифічними імуномодуляторами (левамізол, т-активін, тималін, спленін тощо); застосування лімфокін-активованих клієрів (ЛАК) у поєднанні з введенням інтерлейкіну-2 (0,5 - 1млн МЕ); метод застосування ЛАК-

імунотерапії у онкохворих із занедбаним злоякісним плевритом [3].

За найближчий аналог обрано спосіб імунотерапії дендритними клітинами пацієнтів з дрібноклітинним раком легені [A. Ishikawa, S. Motohashi, E. Ishikawa, H. Fuchida, K. Higashino, M. Otsuji, T. Nakayama, M. Taniguchi, T. Fujisawa A phase I study of a-galactosylceramide (KRN7000) - pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cells lung cancer // Clinical cancer research. - 2005. - V.II.- P. 1910-1917], а саме імунотерапію дендритними клітинами, навантаженими гліколіпідним антигеном а-галактозилцерамідом, що є специфічним активатором натуральних кілерних Т-клітин (NKT-клітин), шляхом 4-разового внутрішньовенного введення ДК з інтервалом в 1 тиждень.

Позитивним у найближчому прототипі є те, що проведена терапія зменшує кількість рецидивів та метастазів за рахунок активації NKT-клітин під час лікування хворих на рак легені.

Недоліком даного способу є те, що запропонована дендритноклітинна вакцина стимулює лише один з компонентів Т-клітинної ланки імунітету, оскільки для навантаження дендритних клітин (ДК) використовується синтетичний гліколіпід, що активує виключно NKT-клітини у хворих.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб імунотерапії хворих на рак легені, шляхом використання протипухлинної аутовакцини на основі дендритних клітин, що дасть можливість підвищити тривалість життя хворих та зменшити кількість рецидивів та метастазів.

(13) **U**(11) **49483**(19) **UA**

Поставлена задача вирішується наступним чином:

Усі маніпуляції проводять з дотриманням правил асептики за такою схемою.

У хворого забирається 50 мл периферичної крові у стерильний флакон ємністю 250 мл з додаванням 25 од/мл гепарину («Біохемі»). Кров відстоюють протягом 40 хв при t 20-22 °C для відділення лейкомаси з плазмою від еритроцитарної маси. Лейкоцити концентрують шляхом центрифугування лейкоцитарної маси при 1500 об/хв. протягом 10 хв. Потім клітини сепаративно розділяють на градієнті щільності фікола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Клітини ресуспендують в середовищі культивування (RPMI-1640, фірми "Sigma") з 2 mM L-Gly, 100 мкг/мл стрептоміцину та 100 од/мл пеніциліну та інкубують у пластиковому флаконі T25 при 37°C, 5% CO₂ протягом 2-3 годин. Клітини м'яко струшують та видаляють ті, що не прикріпилися шляхом їх змивання попередньо прогрітим до 37°C середовищем. Концентрацію клітин доводять до $0,5 \times 10^6$ /мл середовищем культивування і додають 1% аутологічної плазми та 100 нг/мл гранулоцит-макрофагальний колонієстимулюючий фактор ГМ-КСФ ("Leucomax" "Novartis/T'Schering-Plough") або рекомбінантний ГМ-КСФ людини фірми "ICN", США), 20 нг/мл інтерлейкіну-4 (ІЛ-4) ("Sigma", США). Клітини культивують при 37°C, 5% CO₂ протягом 6 діб. На 6 добу культивування додають пухлинний антиген (ПА). Після 24 годин інкубації для повного дозрівання ДК додають 100 нг/мл фактору некрозу пухлин (ФНП)- α або ліпополісахарид (ЛПС) ("Sigma") та α -2b-інтерферону (ІФН) - 10 тис. МО/мл. У якості ПА використовувались механо-хімічно гетерогенізовані пухлинні клітини [5].

Отримані ДК оцінюють шляхом фенотипування за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) до CD86 та HLA-DR - антигенів. Рівень експресії цих молекул є важливим параметром, який характеризує ступінь зрілості ДК [6].

Розведену у розчині Рінгера до 20 мл аутовакцину повільно вводять внутрішньовенно хворому. Усім хворим проводять 4 вакцинації з періодичністю 1 раз на місяць з наступним контролем імунологічних показників [7].

За даним способом проведено лікування 34 хворих на недрібноклітинний рак легені IIIA стадії (T2N2M0, T3N2M0).

У контрольній групі 30 хворих отримували тільки хірургічне лікування.

Вказані групи були однорідними за віком, статтю, стадією захворювання, видами оперативних втручань, частотою супутньої патології. У кожній з груп гістологічно були представлені 2 гістологічних типи: аденокарцинома і плоскоклітинний рак. Співвідношення гістологічних типів, які зустрічались в обох групах, однакове.

Відмічено добру переносимість лікування. Тільки у 4 хворих через 4-6 годин після введення аутовакцини виникли реакції у вигляді лихоманки. Підвищення температури тіла до 38,0 - 38,5°C було короточасним.

Вживаність хворих визначали актуальним методом. Порівняльний аналіз виживання проводили за допомогою logrank-критерію. Класифікацію

пухлин проводили за системою TNM (4-те вид., 2007 р.).

Переконаливими прикладами ефективності запропонованого способу є представлені тести хворих.

Дендритні клітини, генеровані у хворих на рак легені, оцінювали за рівнем експресії поверхневих молекул CD86 та HLA-DR на кожному етапі проведеної імунотерапії. Результати представлені в табл.1.

Таблиця 1

Фенотипова характеристика ДК моноцитарного походження, навантажених механогетерогенізованих ліофілізованих пухлинних клітин (м/м ЛФПК), у хворих на рак легені.

№	Етапи вакцинації	Рівень експресії CD86 ⁺ та HLA-DR ⁺ , %
1	До вакцинації	63,50 ±2,15
2	Після I введення вакцини	68,13 ±6,22
3	Після II введення вакцини	69,00 ±4,33
4	Після III введення вакцини	78,71 ±3,16*

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно з I введенням

Отримані ДК мали достатній ступінь зрілості для проведення імунотерапії хворим на рак легені. Виявлено, що ступінь зрілості ДК зростає з кожним наступним введенням ДК-вакцини.

Для оцінки ефективності проведеної імунотерапії проводили наступні функціональні тести: визначення цитотоксичної активності лімфоцитів, проліферативної активності лімфоцитів, визначення стану Т-ланки імунітету в реакції гальмування міграції лейкоцитів.

Основою неспецифічної імунної відповіді є функціонування макрофагів і натуральних кілерних клітин (НКК). НСК елімінують пухлинні клітини різних типів [8, 9]. Тому визначення цитотоксичної активності лімфоцитів протягом всіх етапів ДК-вакцинації - важливий функціональний тест. Результати представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Визначення цитотоксичної активності лімфоцитів у хворих на етапах імунотерапії

№	Етапи вакцинації	Цитотоксична активність лімфоцитів, %
1	До вакцинації	12,67±3,24
2	Після I введення вакцини	18,00±3,97
3	Після II введення вакцини	13,45±2,37
4	Після III введення вакцини	28,50±1,93*
5	Практично здорові люди	14,13±1,5

Примітка * - $p < 0,05$ в порівнянні з показниками групи до вакцинації

Встановлено, що у хворих на рак легенів після проведення курсів вакцинотерапії значно зростає цитотоксична активність лімфоцитів і становить $(12,67 \pm 3,24)$ % до лікування, а після 3 курсу - $(28,5 \pm 1,93)$ % при нормальних показниках $(14,13 \pm 1,5)$ %.

Наступним функціональним тестом є реакція бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ). РБТЛ дає можливість визначити здатність клітин до активації синтезу ДНК за наявності подразника. Унаслідок цього відбувається збільшення проліферативної активності лімфоцитів. Тому визначення змін проліферативної активності лімфоцитів при субкультивуванні з ПА є важливим тестом для

оцінки ефективності проведення ДК-вакцинотерапії. Результати представлені в табл. 3.

Встановлено, що на перших етапах вакцинотерапії у хворих на рак легені не спостерігається імунологічної клітинної відповіді на ПА, але вже після проведення 3-х курсів вакцинацій ДК зростає відсоток проліферуючих лімфоцитів після співкультивування з ПА (контрольні значення $(13,49 \pm 0,07)$ % проти $(17,95 \pm 1,81)$ % в досліді), а індекс проліферативної активності зростає майже в 2,5 рази $(2,32 \pm 0,50)$ проти $0,94 \pm 0,15$) - це може свідчити про ефективність проведеної ДК-вакцинотерапії.

Таблиця 3

Проліферативна активність лімфоцитів при співкультивуванні з пухлинним антигеном у хворих на рак легені

	Етапи ДК-вакцинотерапії		Рівень апоптозу, %	Фази клітинного циклу			Кількість клітин проліферативного пулу, %	ІПА
				G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S		
1	Після I-ї вакцини	контроль 1	29,87±8,03	79,95±6,80	11,12±3,79	8,93±1,86	18,76±8,62	0,70±0,35
		ФГА	46,67±13,49	67,30±8,11	6,10±2,32	26,53±7,68	32,63±8,08	4,13±3,52
		контроль 2	14,57±1,67	60,23±6,42	16,24±2,11	25,72±5,62	41,49±6,34	3,09±0,88
		ПА	14,76±0,60	62,52±4,81	15,92±2,28	21,53±3,83	31,62±1,27	2,55±0,33
2	Після II-ї вакцини	контроль 1	14,72±1,98	78,76±7,28	17,10±7,13	4,16±0,81	21,25±3,26	1,44±0,39
		ФГА	37,48±3,81	54,63±2,21	16,82±3,26	28,62±2,96	45,44±5,21	1,21±0,45
		контроль 2	19,33±4,66	77,72±8,17	12,15±0,80	10,14±8,96	22,28±8,16	2,34±1,38
		ПА	14,85±9,09	85,25±10,94	6,86±4,41	7,89±6,54	14,75±10,94	2,33±1,13
3	Після III-ї вакцини	контроль 1	14,62±6,41	84,21±2,15	12,97±3,03	2,82±0,88	14,25±3,91	4,93±3,67
		ФГА	34,97±5,99	65,94±0,70	10,92±1,68	23,13±0,98	27,58±4,83	2,65±1,47
		контроль 2	14,77±2,43	85,72±0,86	7,45±4,88	6,04±4,95	13,49 ± 0,07	0,94±0,15
		ПА	9,40±3,43	82,05±2,81	11,98±6,39	6,00±3,58	17,95±1,81*	2,32±0,50*

Примітка * - $p < 0,05$ в порівнянні із контрольними показниками

Наступний функціональний тест - визначення стану Т-ланки імунітету в реакції гальмування міграції лейкоцитів (РГМЛ).

РГМЛ характеризує функціональний стан Т-клітинної ланки імунної системи. Метод ґрунтується на здатності сенсibilізованих Т-лімфоцитів в реакціях з антигенами або мітогенами виділяти лімфокіні, що сприяють гальмуванню міграції лейкоцитів. Результати досліджень представлені в табл. 4.

Таблиця 4

Вплив ДК-вакцинотерапії на функціональний стан Т-ланки імунітету у хворих на рак легені

№	Етапи вакцинотерапії	Хворі на рак легені	
		ФГА	ПА
1	До вакцинотерапії	46,33 ± 29,10	0
2	Після I вакцини	24,00 ± 16,65	18,67 ± 18,67
3	Після II вакцини	41,40 ± 12,20	33,60 ± 10,85
4	Після III вакцини	68,00 ± 14,52	28,17 ± 6,27

У всіх хворих на початку вакцинотерапії не спостерігається реакції на ПА, але з кожним наступним курсом вакцинації відбувається зростання відсотка гальмування міграції лейкоцитів на стимуляцію ПА, що свідчить про ефективність проведеної вакцинотерапії (11,12,13).

Протягом вакцинотерапії у хворих на злоякісні новоутворення проводиться моніторинг стану клі-

тинного імунітету з оцінкою відносного та абсолютного вмісту Т-лімфоцитів (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), В-лімфоцитів (CD20⁺), активованих Т- і В-лімфоцитів (CD95⁺, CD11b⁺, CD38⁺, HLA-DR⁺), а також визначаються такі гематологічні показники, як кількість лейкоцитів, моноцитів, лімфоцитів. Результати досліджень представлені в табл. 5, 6.

Таблиця 5

Визначення гематологічних показників у хворих на рак легені

	Етапи вакцинотерапії	Лейкоцити x 10 ⁹ /л	Моноцити		Лімфоцити	
			%	абс.	%	абс.
1	До лікування	7,74 ± 0,60	7,04 ± 0,65	0,54 ± 0,08	19,71 ± 2,11	1,47 ± 0,14
2	Після I вакцини	6,77 ± 0,37	6,24 ± 0,72	0,43 ± 0,07	28,00 ± 2,70	1,87 ± 0,19
3	Після II вакцини	6,89 ± 0,66	6,21 ± 0,67	0,40 ± 0,05	22,95 ± 2,62	1,42 ± 0,16
4	Після III вакцини	6,73 ± 0,58	5,38 ± 1,38	0,45 ± 0,15	27,44 ± 2,57*	1,76 ± 0,20
5	Практично здорові люди	5,89 ± 0,30	5,09 ± 0,45	0,29 ± 0,03	33,91 ± 1,51	1,97 ± 0,12

Примітка * - p<0,05 в порівнянні з контролем

Протягом лікування не відмічено значного впливу вакцинотерапії на гематологічні показники хворих, крім статистично достовірного зростання лімфоцитів до лікування (19,71 ± 2,11) % після

введення четвертої вакцини (27,44 ± 2,57) %. Також не спостерігалися значні зміни в складі основних субпопуляцій лімфоцитів під час проведення вакцинотерапії.

Таблиця 6

Визначення субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих на рак легені

	Етапи вакцинотерапії	CD3%	CD20%	CD4%	CD8%	CD4/CD8	CD16%	CD HLA-DR%	CD95%	CD 11b%	CD38%
1	До лікування	74,20 ± 1,09	9,16 ± 0,16	44,78 ± 0,99	26,38 ± 1,49	2,03 ± 0,06	17,28 ± 0,28	10,22 ± 3,21	34,89 ± 15,45	27,61 ± 12,39	32,19 ± 5,81
2	Після I вакцини	71,49 ± 0,97	7,03 ± 0,59	44,81 ± 1,03	26,49 ± 0,82	1,97 ± 0,13	18,11 ± 2,11	10,73 ± 1,18	32,53 ± 15,63	26,85 ± 13,85	29,87 ± 8,31
3	Після II вакцини	71,33 ± 0,89	8,44 ± 1,66	42,83 ± 0,94	29,89 ± 1,33	1,32 ± 0,29	17,58 ± 1,56	11,39 ± 3,05	28,31 ± 10,81	30,42 ± 13,42	29,79 ± 2,01
4	Після III вакцини	70,08 ± 0,75	6,81 ± 0,02	44,03 ± 0,86	27,02 ± 2,47	1,91 ± 0,09	20,17 ± 1,50	9,56 ± 2,12	36,91 ± 10,50	28,44 ± 12,56	24,89 ± 10,45
5	Практично здорові люди	75,30 ± 3,80	8,00 ± 1,70	45,70 ± 2,70	21,30 ± 2,10	1,30-2,60	22,90 ± 3,40	13,26 ± 0,83	52,70 ± 7,90	22,50 ± 2,10	40,30 ± 6,90

Примітка * - p<0,05 в порівнянні з контролем

На сьогодні можна представити дані клінічної результативності імунотерапії ДК, навантажених ПА, на основі аналізу виживаності хворих на рак легені протягом 3-річного періоду після закінчення лікування. Результати 3-річної виживаності хворих на рак легені представлені в табл. 7. При вивченні клінічної ефективності ДК-вакцинотерапії в групі вакцинованих хворих на рак легені встановлено, що середня тривалість безрецидивного періоду від початку лікування склала (67,9±1,33) міс. проти (39,5±0,61) міс. у групі хворих без вакцинотерапії (p<0,05). 3-річна загальна виживаність склала 66 % проти 30 % в основній та контрольній групах відповідно.

Показники виживаності хворих на рак легені, що отримували ДК, навантажених ПА

Група хворих, п	3-річна безрецидивна виживаність, %	3-річна виживаність, %
Операція+ДК-вакцина, 28 хворих	67,9	66*
Операція (контроль), 43 хворих	39,5	30

Примітка. * - p<0,05 в порівнянні з групою хворих, що не отримували ДК-вакцину

Прикладами реалізації заявленого способу можуть бути витяги з 3-х історій хвороб:

I. Хворий О. П. С 1951 р. н. (історія хвороби №139) поступив у відділення торакальної онкології з діагнозом Са верхньої долі бронхів або легені, ПГЗ № 1405/07 : плоскоклітинний Са, TNM: T₃N₁M₀, 3A клінічна група, проведена операція - верхня білобектомія.

Через 15 днів після операції провели імунотерапію протипухлинною ДК-вакциною внутрішньовенно з повторними введеннями в подальшому 1 раз на місяць, всього 4 рази.

Всі маніпуляції проводяться з дотриманням правил асептики за наступною схемою.

У хворого забирається 50 мл периферичної крові у стерильний флакон ємністю 250 мл з додаванням 25 од/мл гепарину («Біохемі»). Кров відстоюють протягом 40 хв. при t 20-22°C для відділення лейкомаси з плазмою від еритроцитарної маси. Лейкоцити концентрують шляхом центрифугування лейкоцитарної маси при 1500 об/хв. протягом 10 хв. Потім клітини сепаративно розділяють на градієнті щільності фікола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Клітини ресуспендують у середовищі культивування (RPMI-1640, фірми "Sigma") з 2 мМ L-Gly, 100 мкг/мл стрептоміцину та 100 од/мл пеніциліну та інкубують в пластиковому флаконі T25 при 37°C, 5% CO₂ протягом 2-3 годин. Клітини м'яко струшують та видаляють ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання попередньо прогрітим до 37 °C середовищем. Концентрацію клітин доводять до 0,5 x 10⁶/мл середовищем культивування та додають 1% аутологічної плазми та 100 нг/мл гранулоцит-макрофагальний колонієстимулюючий фактор ГМ-КСФ ("Leucomax" "Novartis"/"Schering-Plough") або рекомбінантний ГМ-КСФ людини фірми "ICN", СІ-ЛА), 20 нг/мл інтерлейкіну -4 (ІЛ-4) ("Sigma", США). Клітини культивують при 37 °C, 5% CO₂ протягом 6 діб. На 6 добу культивування додають пухлинний антиген (ПА). Після 24 годин інкубації для повного дозрівання ДК додають 100 нг/мл фактору некрозу пухлин (ФНП)- α або ліпополісахарид (ЛПС) ("Sigma") та α -2b-інтерферону (ІФН) - 10 тис. МО/мл. У якості ПА використовувались механохімічно гетерогенізовані пухлинні клітини. У процесі проведення курсів імунотерапії дендритними клітинами у хворого проводили моніторинг імунологічних показників.

Переносимість ДК-вакцини - без ускладнень. У подальшому хворому 1 раз на 3 місяці проводили контрольну рентгенографію органів грудної порожнини та УЗД органів черевної порожнини, також 1 раз на 6 місяців проводили контрольну комп'ютерну томографію органів грудної та черевної порожнини. На 16.07.2009 р. хворий перебуває під спостереженням без ознак прогресування загального захворювання.

II. I. Хвора С. М. М. 1946 р. н. (історія хвороби №841) поступила у відділення торакальної онкології з діагнозом Са верхньої долі легені, ПГЗ № 2301-08/07: аденокарцинома, TNM: T₃N₀M₀, 3A клінічна група, проведена операція - верхня білобектомія.

Через 15 днів після операції провели імунотерапію протипухлинною ДК-вакциною внутрішньовенно з повторними введеннями в подальшому 1 раз на місяць, всього 4 рази.

Венно з повторними введеннями в подальшому 1 раз на місяць, всього 4 рази.

Усі маніпуляції проводяться з дотриманням правил асептики за наступною схемою.

У хворой забирається 50 мл периферичної крові у стерильний флакон ємністю 250 мл з додаванням 25 од/мл гепарину («Біохемі»). Кров відстоюють протягом 40 хв. при t 20-22°C для відділення лейкомаси з плазмою від еритроцитарної маси. Лейкоцити концентрують шляхом центрифугування лейкоцитарної маси при 1500 об/хв. протягом 10 хв. Потім клітини сепаративно розділяють на градієнті щільності фікола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Клітини ресуспендують у середовищі культивування (RPMI-1640, фірми "Sigma") з 2 мМ L-Gly, 100 мкг/мл стрептоміцину та 100 од/мл пеніциліну та інкубують в пластиковому флаконі T25 при 37°C, 5% CO₂ протягом 2-3 годин. Клітини м'яко струшують та видаляють ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання попередньо прогрітим до 37°C середовищем. Концентрацію клітин доводять до 0,5 x 10⁶/мл середовищем культивування та додають 1% аутологічної плазми та 100 нг/мл гранулоцит-макрофагальний колонієстимулюючий фактор ГМ-КСФ ("Leucomax" "Novartis"/"Schering-Plough") або рекомбінантний ГМ-КСФ людини фірми "ICN", США), 20 нг/мл інтерлейкіну-4 (ІЛ-4) ("Sigma", США). Клітини культивують при 37°C, 5% CO₂ протягом 6 діб. На 6 добу культивування додають пухлинний антиген (ПА). Після 24 годин інкубації для повного дозрівання ДК додають 100 нг/мл фактору некрозу пухлин (ФНП)- α або ліпополісахарид (ЛПС) ("Sigma") та α -2b-інтерферону (ІФН) - 10 тис. МО/мл. У якості ПА використовувались механохімічно гетерогенізовані пухлинні клітини. У процесі проведення курсів імунотерапії дендритними клітинами у хворого проводили моніторинг імунологічних показників.

Переносимість ДК-вакцини - без ускладнень. У подальшому хворій 1 раз на 3 місяці проводили контрольну рентгенографію органів грудної порожнини та УЗД органів черевної порожнини, також 1 раз на 6 місяців проводили контрольну комп'ютерну томографію органів грудної та черевної порожнини. На 19.010.2009 р. хвора перебуває під спостереженням без ознак прогресування загального захворювання.

III. Хворий Г. Ю. А. 1947 р. н. (історія хвороби №162) поступив у відділення торакальної онкології з діагнозом Са бронхіо-альвеолярний, ПГЗ № 6877-85/06 : плоскоклітинний Са, TNM: T₃N₁M₀, 3B клінічна група, проведена операція - верхня білобектомія.

Через 15 днів після операції провели імунотерапію протипухлинною ДК-вакциною внутрішньовенно з повторні введення в подальшому 1 раз на місяць, всього 4 рази.

Всі маніпуляції проводяться з дотриманням правил асептики за наступною схемою.

У хворого забирається 50 мл периферичної крові у стерильний флакон ємністю 250 мл з додаванням 25 од/мл гепарину («Біохемі»). Кров відстоюють протягом 40 хв. при t 20-22°C для відділення лейкомаси з плазмою від еритроцитарної маси. Лейкоцити концентрують шляхом центрифугування лейкоцитарної маси при 1500 об/хв. про-

тягом 10 хв. Потім клітини сепаративно розділюють на градієнті щільності фікола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Клітини ресуспендують у середовищі культивування (RPMI-1640, фірми "Sigma") з 2 mM L-Gly, 100 мкг/мл стрептоміцину та 100 од/мл пеніциліну та інкубують в пластиковому флаконі T25 при 37°C, 5% CO₂ протягом 2-3 годин. Клітини м'яко струшують та видаляють ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання попередньо прогрітим до 37°C середовищем. Концентрацію клітин доводять до $0,5 \times 10^6$ /мл середовищем культивування та додають 1% аутологічної плазми та 100 нг/мл гранулоцит-макрофагальний колонієстимулюючий фактор ГМ-КСФ ("Leucomax" "Novartis/T'Schering-Plough") або рекомбінантний ГМ-КСФ людини фірми "ICN", США), 20 нг/мл інтерлейкіну-4 (ІЛ-4) ("Sigma", США). Клітини культивують при 37°C, 5% CO₂ протягом 6 діб. На 6 добу культивування додають пухлинний антиген (ПА). Після 24 годин інкубації для повного дозрівання ДК додають 100 нг/мл фактору некрозу пухлин (ФНП)- α або ліпополісахарид (ЛПС) ("Sigma") та α -2b-інтерферону (ІФН) - 10 тис. МО/мл. У якості ПА використовувались механохімічно гетерогенізовані пухлинні клітини. У процесі проведення курсів імунотерапії дендритними клітинами у хворого проводили моніторинг імунологічних показників.

Переносимість ДК-вакцини - без ускладнень. У подальшому хворому 1 раз на 3 місяці проводили контрольну рентгенографію органів грудної порожнини та УЗД органів черевної порожнини, також 1 раз на 6 місяців проводили контрольну комп'ютерну томографію органів грудної та черевної порожнини. На 25.06.2009 р. хворий перебуває під спостереженням без ознак прогресування загального захворювання.

Джерела інформації

1. Рак в Україні в 2006-2007 рр. Захворюваність, смертність, показники онкологічної діяльності / гол. ред. І.Б. Щепотіна ; авт. : З.П. Федоренко, Л.О. Гулак, Є.Л. Горох [та ін.] ; Національний інститут раку // Бюл. Національного канцер-реєстру. - К., 2008. - № 9. - 31 с

2. Гриневич Ю. А. Основные принципы использования иммунотерапии при лечении больных со злокачественными новообразованиями / Ю. А. Гриневич // Онкология. - 2001.-Т.3, № 2-3. - С.216-219.

3. Результати комплексної терапії хворих на рак грудної залози з використанням аутовакцино-терапії / Г.П. Потєбня., Г.С. Лісовенко, С.Ю. Скляр [та ін.] // Специфічна імунотерапія в онкології : Ак-

туальні питання специфічної імунотерапії хворих на злоякісні новоутворення : матеріали наук.- прак. конф., м. Умань, 2007 / за ред. Ю.А. Гриневича. - К.,2008.-С. 185-198.

4. A phase I study of a-galactosylceramide (KRN7000) - pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cells lung cancer / A. Ishikawa, S. Motohashi, E. Ishikawa [et al.] // Clinical cancer research.-V. II.-P. 1910-1917 (прототип).

5. Антиметастатическая активность вакцин на основе дендритных клеток у мышей с метастазирующей опухолью / Храновская Н.Н, Бендюг Г.Д. Гриневич Ю.А. [др.] // Иммунология. - 2005. - № 6. - С. 346 - 351.

6. Гриневич Ю.А. Вакцины на основе антиген-презентирующих дендритных клеток в иммунотерапии больных злокачественными опухолями. / Ю.А. Гриневич, Н.Н. Храновская //Онкология. - 2007. -№4.-С. 365-370.

7. Орел В.Е. Применение механически модифицированных сингенных опухолевых клеток в иммунотерапии больных раком молочной железы / В.Е. Орел, В.С. Тарутинов, Ю.А. Гриневич // Эксперим. онкология. -2000.-№22.-С. 271.

8. Clinical responses in patients with advanced colorectal cancer to a dendritic cell based vaccine / S. Burgdorf, A. Fischer, P. Myszczek [et.al.] // Oncol. Rep.-2008.-V.20, N6.-P. 1305-11.

9. Sevko A.L. Flow cytometry analysis of dendritic cell surface antigens in the different ways of EL-4 lymphoma cell administration/ A.L. Sevko, Shurin M.R. // Experim. Oncology. - 2002. - V. 24, № 1. - P. 28 - 31.

10. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor 1 y sate in patients with hepatocellular carcinoma / P. Palmer, R. Midgley, N. Mirza [et.al.] //Hepatology. -2009.-V.49, N 1.- P. 124-132.

11. A dendritic cell-based tumour vaccine for lung cancer: full-length XAGE-Ib protein-pulsed dendritic cells induce specific cytotoxic T lymphocytes in vitro / Q. Zhou, A. Guo, C Xu [et.al.] // Clin. Exp. Immunol.-2008. - Vol. 153, N3.-P. 392-400.

12. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells /L. Holtl, C. Zelle-Rieser, H. Gander et al. // Clin. Cancer. Res. - 2002. - № 45 - P. 3369 - 3376.

13. A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors./Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H. et.al. // Cancer Ther. -2008.-N 6(B).-P.955-964.