



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109084** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/48 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

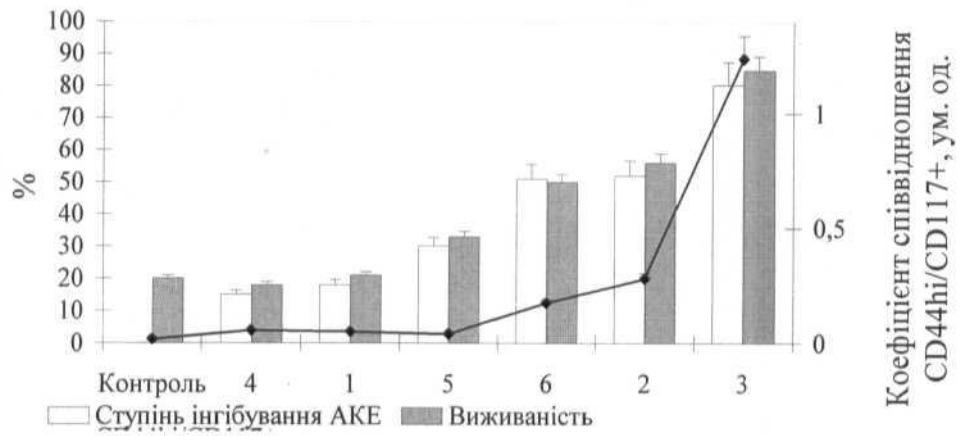
<p>(21) Номер заявки: а 2014 05121</p> <p>(22) Дата подання заявки: 15.05.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.07.2015</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 10.11.2014, Бюл.№ 21</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2015, Бюл.№ 13</p>	<p>(72) Винахідник(и): Гольцев Анатолій Миколайович (UA), Бондарович Микола Олександрович (UA), Бабенко Наталія Миколаївна (UA), Гаєвська Юлія Олександрівна (UA), Дубрава Тетяна Георгіївна (UA), Челомбітько Ольга Василівна (UA), Останков Максим Вадимович (UA), Клочков Володимир Кирилович (UA), Малюкін Юрій Вікторович (UA), Кавок Наталія Сергіївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Dengyu Chen. MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+ CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition/ Dengyu Chen, Yunxia Zhang et al // Journal of Ovarian Research.-2013.-Vol.6.-P.50-61. UA 87508 U, 10.02.2014 RU 2247377 C2, 27.02.2005 Shah V. Targeted nanomedicine for suppression of CD44 and simultaneous cell death induction in ovarian cancer: an optimal delivery of siRNA and anticancer drug/ V. Shah, O. Taratula, et al.// Clin Cancer Res. - 2013.- Nov 15.- Vol. 19(22).-P. 6193-6204</p>
--	---

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ РАКУ НАНОЧАСТИНКАМИ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини, а саме до онкології, та стосується способу оцінки ефективності лікування раку наночастинками, який полягає у визначенні середнього вмісту CD44^{hi} і CD117⁺ клітин в пухлині до і після лікування, на підставі співвідношення кількості цих клітин обчислюють коефіцієнт і при збільшенні його значення після лікування більш ніж в 9 разів прогнозують зниження симптомів генералізації захворювання і терапію оцінюють як ефективну, а відсутність зміни значення цього коефіцієнта свідчить про низьку ефективність лікування з наявністю симптомів продовженого росту злоякісної пухлини.

UA 109084 C2



Винахід належить до галузі медицини, а саме до онкології, і може бути застосований в експериментальних і клінічних дослідженнях при проведенні терапії асцитичної форми раку з використанням наночастинок (НЧ).

Відомий спосіб визначення ефективності протипухлинної терапії, що включає визначення розміру первинної пухлини молочної залози клінічним, рентгенографічним або ехографічним методом. Зменшення розмірів пухлини є свідченням позитивної реакції пухлини на лікування [1].

Недоліком даного способу є те, що він має суб'єктивний характер і часто не дозволяє визначити початкове зростання пухлини, уловлюючи його лише після збільшення розміру пухлини не менш ніж на 25 %.

Відомий спосіб оцінки ефективності лікування хворих на рак стравоходу, заснований на вивченні ряду імунологічних, біохімічних і гематологічних параметрів [2].

Суть способу полягає в тому, що після закінчення курсу хіміоімунотерапевтичного лікування аналізують вибрані показники гормонального та імунологічного статусу, зміна яких відбувається в результаті застосування терапії у хворих з повною або неповною регресією пухлини стравоходу. В результаті обчислення значень кожної ознаки для оцінки повної регресії пухлини стравоходу після лікування відбирають 10 найбільш інформативних показників: 1) розмір пухлини по довжині органа; 2) екскреція із сечею вільних 17-оксикортикостероїдів; 3) рівень активності тиреотропного гормону у сироватці крові; 4) рівень активності адренотропного гормону; 5) рівень активності тироксину; 6) рівень активності лютеїнізуючого гормону; 7) кількість лейкоцитів; 8) відсотковий вміст сегментоядерних нейтрофілів; 9) відсотковий вміст лімфоцитів; 10) загальне число розеткоутворюючих з еритроцитами барана клітин (Е-РОК).

Однак застосування даного способу обмежують і утрудняють такі його недоліки, як необхідність математичного обчислення прогностичних критеріїв з обов'язковим використанням таблиць, які не зовсім точно відображають залежність значень і ефективності проведеного лікування, що може явитися причиною суб'єктивної помилки; тривалість і складність технічного виконання ряду гормональних досліджень; неможливість одержання прогностичного рішення протягом одного дня, що виключає амбулаторне застосування даного способу.

Відомий спосіб оцінки лікарської терапії у хворих на рак молочної залози [3]. Оцінку здійснюють по дискримінантній функції з використанням 6 показників (3 гормонів і 3 катехоламінів), визначених у добовій сечі хворих: сумарні 17-кетостероїди (КС), третя фракція 17-КС-дегідроепіандростерону, п'ята фракція 17-КС-епіохоланолону, дофамін, норадреналін, адреналін.

Визначення шести зазначених параметрів робить даний спосіб оцінки надзвичайно трудомістким та тривалим (час проведення аналізу до 2 тижнів) і, що важливо, на екскрецію гормонів із сечею може впливати ряд соматичних патологічних процесів.

Відомий спосіб оцінки ефективності лікування раку передміхурової залози шляхом визначення активності ферменту кислої фосфатази в крові пацієнта [4].

Даний спосіб недостатньо точний і може бути застосований лише при захворюваннях передміхурової залози, коли спостерігається підвищення в крові рівня активності ферменту кислої фосфатази. Крім того, збільшення рівня цього ферменту відзначається лише в 25 % випадків зазначеної патології.

Відомий спосіб оцінки ефективності лікування раку шийки матки [5]. Спосіб включає визначення після променевої терапії, поєднаної з хіміотерапією, співвідношення абсолютного числа лімфоцитів периферичної крові до абсолютного числа моноцитів, поділене на 4,05 (співвідношення абсолютного числа лімфоцитів периферичної крові до абсолютного числа моноцитів у практично здорових жінок). При значеннях отриманої величини вище одиниці припускають відсутність імовірності розвитку рецидиву раку протягом першого року після лікування, при значеннях нижче одиниці прогнозують розвиток рецидиву раку в перший рік після лікування.

Однак внаслідок частого розвитку ушкодження здорової тканини після променевої терапії пухлини і пов'язаного з цим значного моноцитозу в крові хворих область застосування цього способу обмежена застосуванням тільки при поєднанні хіміотерапії з променевою.

За прототип узятий спосіб оцінки ефективності променевої і хіміопроменевої терапії раку верхніх дихальних шляхів, який включає вивчення зміни люмінозалежної хемілюмінесцентної активності клітин крові хворих [6]. Відповідно до способу, у пацієнтів після променевого впливу на основі курсу поліхіміо-, магніто- або лазеротерапії з периферичної крові на градієнті щільності виділяють мононуклеари (лімфоцити і моноцити) та гранулоцити (сегментоядерні нейтрофіли). Для цього на дно центрифугальних пробірок нашаровують невелику кількість розчину високої щільності і вносять суспензію. Після центрифугування

клітини відсмоктують і збирають фракції, що містять клітини. Далі на люменометрі проводять оцінку хіміолюмінесцентної активності клітин. Підвищення активності клітин крові указує на успішний результат при застосуванні даної форми терапії.

Однак даний спосіб не може бути застосований при лікуванні НЧ. Вплив хіміопроменевої терапії має системний характер на організм, що призводить до мобілізації резервних ефektorних функцій клітин крові, внаслідок чого вони набувають рис активованого стану. Це може виступати як чітка ознака участі клітин крові у відновленні гомеостазу в організмі хворих з пухлинами в ході проведеної хіміопроменевої терапії. Дія ж наночастинок направлена саме на пухлинні клітини, при цьому не зачіпається функціональний стан клітин крові.

Крім того, він досить трудомісткий через складність виділення ядровмісних клітин крові на градієнті щільності і визначення їхньої активності.

В основу винаходу поставлена задача створити такий спосіб оцінки ефективності лікування раку, який би можна було використовувати після лікування НЧ при мінімальних затратах труда і часу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі оцінки ефективності лікування раку, що включає дослідження клітинного матеріалу, відповідно до винаходу, визначають середній вміст CD44^{hi} і CD117⁺ клітин в пухлині до і після лікування, на підставі співвідношення кількості цих клітин обчислюють коефіцієнт і при збільшенні його значення після лікування більш ніж в 9 разів прогнозують зниження симптомів генералізації захворювання і терапію оцінюють як ефективну. При відсутності зміни значення цього коефіцієнта роблять висновок про низьку ефективність лікування і продовження злоякісного процесу.

Заявлений спосіб оцінки ефективності лікування раку НЧ є новим, тому що він невідомий в області онкології як критерій оцінки ефективності лікування раку.

Спосіб дозволяє виявити співвідношення тих популяцій клітин, які беруть участь у підтримці пухлинного росту, що дозволяє ідентифікувати ефективність терапевтичних агентів, до яких належать НЧ, дія яких має локальний характер, тобто спрямований безпосередньо на саму пухлину.

Використання способу дозволяє здійснювати об'єктивну оцінку ефективності лікування НЧ, дає можливість проводити її контроль і вже після нетривалого часу після початку терапії здійснювати найближчий і віддалений прогноз перебігу захворювання з метою вибору найбільш адекватного методу терапії.

Для здійснення способу не потрібно великих затрат праці, часу, оскільки визначення кількості клітин CD44^{hi} і CD117⁺ передбачає єдиноразове додавання моноклональних антитіл до зразка клітин пухлини і інкубацію клітин з моноклональними антитілами перед оцінкою на цитофлуориметрі протягом півгодини.

Запропонований підхід до критеріїв ефективності специфічної протипухлинної терапії визначається тим, що стовбурові ракові клітини (СРК) є основною структурною одиницею пухлин. Вони здатні не тільки формувати первинні злоякісні сайти, але й відповідати за підтримку росту і метастазування пухлин. Зміна їхнього кількісного вмісту здатна адекватно відображати характер пухлинної прогресії. У зв'язку з цим, вивчення їхнього вмісту в пухлині відкриває нові, що не використовувалися раніше, методологічні можливості. СРК при раку молочної залози, яєчників, ідентифікують на підставі підвищеної експресії CD44 маркера.

Для точного прогнозу перебігу захворювання оцінки тільки однієї субпопуляції СРК недостатньо, тому що характер поведінки СРК буде визначатися клітинами, що становлять їхнє мікрооточення. Як в умовах фізіології, так і в умовах розвитку пухлинного процесу, компоненти мікрооточення, відіграють важливу роль у регуляції функціональної активності стовбурових клітин за рахунок секреції великого спектра цитокінів, хемокінів і факторів росту [7]. Мікрооточення пухлини переважно представлено клітинами строми, які характеризуються експресією CD117 маркера [8]. Від співвідношення СРК і стромальних клітин буде залежати, наскільки повно СРК будуть реалізувати свій патогенетичний потенціал.

Суть способу оцінки ефективності лікування НЧ раку полягає в тому, що до зразка клітин пухлини єдиноразово додають моноклональні антитіла до CD44 і CD117 молекулам і проводять інкубацію протягом півгодини, після чого на цитофлуориметрі оцінюють вміст клітин CD44^{hi} і CD117⁺ та визначають коефіцієнт, який дорівнює відношенню середнього значення кількості клітин CD44^{hi} до значення величини вмісту CD117⁺ клітин, тобто CD44^{hi}/CD117⁺. Потім значення цього коефіцієнта порівнюють зі значенням коефіцієнта при патології до лікування НЧ і визначають величину її перевищення щодо патології. При збільшенні значень даного коефіцієнта більш ніж в 9 разів після проведеної протипухлинної терапії НЧ прогнозують зниження симптомів генералізації захворювання і терапію оцінюють як ефективну. Відсутність

змін цього коефіцієнту свідчить про низьку ефективність лікування з наявністю симптомів продовженого росту пухлини.

Для дослідження ефективності заявленого способу, як первинну культуру використовували стабілізовані після кріоконсервування клітини аденокарциноми Ерліха (АКЕ), які зберігалися при -196 °С в низькотемпературному банку Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Клітини АКЕ інкубували 3 години при кімнатній температурі в ізотонічному 5 %-ному розчині глюкози, що містить НЧ ортованадатів рідкісноземельних металів у різній концентрації.

Ефективність способу перевіряли після інкубації клітин АКЕ з НЧ:

1. АКЕ + сферичні НЧ (концентрація 0,875 г/л);
2. АКЕ + сферичні НЧ (концентрація 4,38 г/л);
3. АКЕ + веретеноподібні НЧ (концентрація 0,875 г/л);
4. АКЕ + веретеноподібні НЧ (концентрація 4,38 г/л);
5. АКЕ + стрижнеподібні НЧ (концентрація 0,875 г/л);
6. АКЕ + стрижнеподібні НЧ (концентрація 4,38 г/л).

Контролем були клітини АКЕ, які інкубували в ізотонічному розчині 5 %-ної глюкози без додавання НЧ.

Мишам самкам лінії BALB/c вводили внутрішньочеревно інкубовані з НЧ клітини АКЕ в дозі 3×10^6 клітин/мишу об'ємом 0,3 мл і культивували протягом 7 днів у перитонеальній порожнині (ПП). Контролем були миші лінії BALB/c, яким внутрішньочеревно вводили клітини АКЕ, попередньо інкубовані в ізотонічному розчині 5 %-ної глюкози без додавання НЧ (n=7). Індекс інгібіції росту АКЕ обчислювали по формулі:

$$\frac{V(\kappa) - V(\text{д})}{V(\kappa)} \times 100 \% , \text{ де}$$

$V(\kappa)$ - абсолютна кількість клітин АКЕ в ПП контрольної групи,

$V(\text{д})$ - абсолютна кількість кліток АКЕ в ПП дослідної групи.

Оцінку імунофенотипічних характеристик клітин АКЕ проводили при використанні моноклональних антитіл ("BD Pharmingen", США) до CD44, CD117 молекул на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США). Розрахунковим шляхом визначали співвідношення кількості CD44^{hi} і CD117 клітин черевного ексудату, тобто коефіцієнт CD44^{hi}/CD117⁺. Отримані дані зіставляли зі значеннями цього показника в групі з онкопатологією без лікування.

Результати дослідження наведені на графіку. Із графіка видно, що інгібування росту АКЕ у варіанті 2 на 51-53 % має пряму кореляцію з підвищенням співвідношення CD44^{hi}/CD117⁺ в 16 разів за рахунок більш ніж 20-кратного зниження вмісту клітин з фенотипом CD117⁺ у порівнянні з контролем. Даний факт може свідчити про причетність субпопуляцій CD117⁺ клітин до запуску в диференціювання високопотентних CD44^{hi} клітин.

Важливість концентраційних взаємин стовбурова ракова клітина - стромальна клітина в АКЕ при визначенні ступеня інгібування/експансії пухлини підтверджується і у випадку зміни форми та розміру НЧ. Установлено, що обробка клітин АКЕ веретеноподібними НЧ в концентрації 0,875 г/л (варіант 3) приводила до максимального інгібування росту АКЕ (індекс інгібування 80,34 %). Дана феноменологія супроводжувалася істотним підвищенням у порівнянні з контролем коефіцієнта CD44^{hi}/CD117⁺ (в 73 рази), що може свідчити про інгібування процесу диференціювання СРК і функціонування пула зрілих клітин.

На графіку показано інгібування пухлинного процесу на $51,0 \pm 4,3$ % при використанні стрижнеподібних НЧ у концентрації 4,38 г/л (варіант 6). При оцінці зміни коефіцієнта CD44^{hi}/CD117⁺ відзначено десятикратне його підвищення в порівнянні з контролем.

Значний інгібуючий ефект росту пухлини був відзначений також у варіантах 2 і 3, що супроводжувалося підвищенням співвідношення CD44^{hi}/CD117⁺ у порівнянні з контролем, причому веретеноподібні НЧ в концентрації 0,875 г/л (варіант 3) проявляли його в максимальному ступені. На графіку видно, що максимальне значення цього коефіцієнта співпадало з максимальною виживаністю мишей після обробки клітин АКЕ веретеноподібними НЧ (варіант 3).

Таким чином, особливу значимість у прояві інгібування росту пухлини під дією НЧ має зміна співвідношення субпопуляцій CD44^{hi} і CD117⁺ клітин. Ефект інгібування властивий тим НЧ, які найбільшою мірою (у порівнянні з контролем) підвищували значення коефіцієнта CD44^{hi}/CD117⁺.

Результати порівняльного аналізу свідчать про те, що значення співвідношення вмісту CD44^{hi} клітин пухлини до CD117⁺ клітин, тобто CD44^{hi}/CD117⁺, можна використовувати як показник чутливості ракових клітин до нанотерапії. При значеннях цього співвідношення, які не відрізняються від таких при патології без лікування НЧ, вже після нетривалого часу з моменту

початку терапії НЧ можна чекати відсутність клінічного ефекту лікування і наявність подальшого росту злоякісної пухлини. Навпаки, збільшення значення коефіцієнта $CD44^{hi}/CD117^{+}$ вище рівня контролю дозволяє прогнозувати позитивний ефект нанотерапії і виражену регресію пухлини.

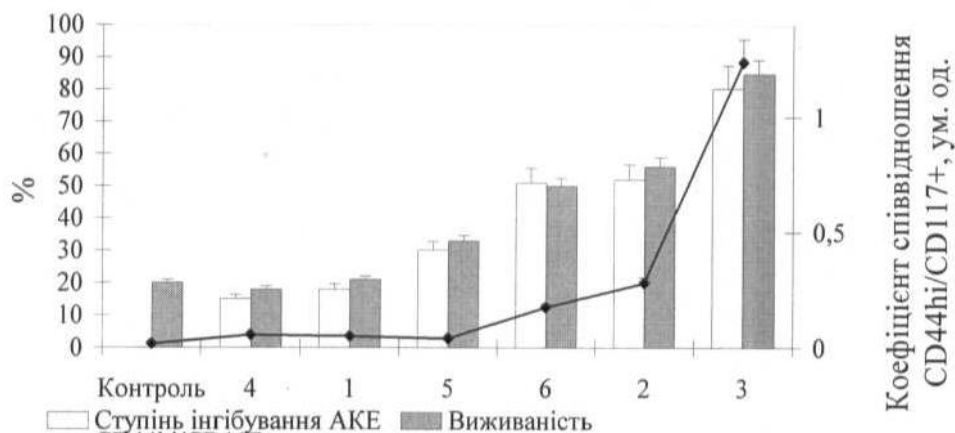
Таким чином, використання запропонованого способу дозволяє здійснювати контроль за проведеним лікуванням, оцінювати його ефективність і, якщо буде потреба, проводити адекватну корекцію.

Джерела інформації:

1. Переводчикова Н.И. Новое в терапии рака молочной железы. - М.: Медицина, 1998. - С. 45.
2. Рубцов В.Р. Консервативное лечение местнораспространенного рака пищевода. Автореф. дисс... докт. мед. наук., Л., 1989.
3. Бордюшков Ю.Н., Верховцева А.И., Миндлин С.С., Косинская Т.М., Малютина Л.И... Изучение возможностей оценки эффективности противоопухолевой терапии на основании исходных нейроэндокринных показателей. / Сб. Аутолимфохимиотерапия и другие вопросы онкологии. - М., 1997. - С. 178-183.
4. Покровский А.А. Справочник: Биохимические методы исследования в клинике. - М.: Медицина, 1969. - С. 108-109.
5. Пат. РФ 2247377, МПК G01N33/49, G01N33/48. опубл. 27.02.2005, Способ прогнозирования ранних рецидивов или/и метастазов рака шейки матки.
6. Петров В.Н., Андреев В.Г., Петров В.А., Будагов Р.С., Буякова М.Е., Панкратов В.А., Саяпина Е.В. Реакция клеток периферической крови у больных раком гортани на лучевую и химиолучевую терапию на фоне радиомодификации // Росс, онкол. журн. - 1999. - № 3. - С. 19-23.
7. Castano Z., Fillmore C.M., Kim C.F., McAllister S.S. The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells // Semin. Cancer. Biol. - 2012. - Vol.22. - P. 462-470.
8. Ho C.-M., Chang S.-F., Hsiao C.-C., Chien T.-Y., Shih D. T.-B. Isolation and characterization of stromal progenitor cells from ascites of patients with epithelial ovarian adenocarcinoma // Journal of Biomedical Science. - 2012. - Vol. 19. - P. 23-33.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб оцінки ефективності лікування раку наночастинками, що включає дослідження клітинного матеріалу, який **відрізняється** тим, що визначають середній вміст $CD44^{hi}$ і $CD117^{+}$ клітин в пухлині до і після лікування, на підставі співвідношення кількості цих клітин обчислюють коефіцієнт і при збільшенні його значення після лікування більш ніж в 9 разів прогнозують зниження симптомів генералізації захворювання і терапію оцінюють як ефективну, а при відсутності зміни значення цього коефіцієнта роблять висновок про низьку ефективність лікування і продовження росту злоякісної пухлини.



Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601