



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68031** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61K 39/00
A61K 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 10719	(72) Винахідник(и): Храновська Наталя Миколаївна (UA), Скачкова Оксана Володимирівна (UA), Сітько Валентина Віталіївна (UA), Свергун Наталія Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.09.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.03.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.03.2012, Бюл.№ 5	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)

(54) СПОСІБ КОМБІНОВАНОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ

(57) Реферат:

Спосіб комбінованої імунотерапії включає синергічне застосування ДК-вакцинотерапії та низьких доз циклофосфаміду. Циклофосфамід вводять внутрішньочеревинно з чітким визначенням доз лікарського засобу.

UA 68031 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини, а саме - онкології, і може бути використана для підвищення ефективності специфічної імунотерапії у хворих на злоякісні новоутворення.

Імунотерапія є порівняно новим напрямом в лікуванні онкологічних хворих [1]. Її дія спрямована на досягнення протипухлинного ефекту за допомогою препаратів біогенного походження (цитокіни, моноклональні антитіла), вакцин на основі модифікованих пухлинних клітин або за рахунок власних ресурсів організму, посилених за допомогою біопрепаратів (адоптивна імунотерапія) [2]. Методи імунотерапії залучають до протипухлинного захисту імунну систему, впливаючи на біологічні фактори, які контролюють протеси апоптозу і ангиогенезу та опосередковано впливають на стимуляцію різних ланок імунної системи, що забезпечує їх протипухлинний ефект [3, 4].

Одним з напрямів лікарської терапії є розробка схем режимів введення хіміопрепаратів через невеликі проміжки часу, що впливає на можливість репопуляції пухлинних клітин між циклами терапії. Таким способом є метрономна терапія, тобто використання хіміопрепаратів щоденно або декілька разів на тиждень у невеликих концентраціях протягом тривалого часу [5]. При цьому реалізується насамперед антиангіогенний, а не цитотоксичний ефект лікарських засобів. Відомі наступні препарати, які використовувались в метрономному режимі: капецитабін, метотрексат, мітоміцин, вінкрисдин, доксорубіцин, циклофосфамід (ЦФ) та інші [6].

На сьогоднішній день відомо, що ЦФ при використанні в малих дозах має імуномодулюючі властивості, а саме впливає на функціональну активність таких лімфоцитів, як Т-хелперів, так і Т-регуляторних клітин (Т-рег) [7]. При сумісному застосуванні препарату з протипухлинними вакцинами він може зменшувати негативний вплив пухлини на організм за рахунок виснаження популяції Т-рег та потенційно впливати на антиметастатичний ефект проведеної терапії [8, 9].

Таким чином, поєднання різних імунотерапевтичних підходів, наприклад, комбінування неспецифічної та специфічної, активної та адоптивної імунотерапії, системних та локальних підходів може суттєво підвищити ефективність імунотерапії і є перспективним.

Найближчим аналогом даної заявки є робота [Low-dose cyclophosphamide synergizes with dendritic cell-based immunotherapy in antitumor activity / J. Veltman, M. Lambers, M. Nimwegen [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. - 2010. - V. №3. - P. 115-1165], в якій автори пропонують спосіб синергічного застосування протипухлинної вакцинотерапії на основі дендритних клітин (ДК) та низьких доз ЦФ для інгібування росту пухлинного процесу у мишей лінії BALB/c з мезотеліомою.

Позитивним у найближчому аналозі є те, що проведення сумісної вакцинотерапії на основі ДК та низьких доз ЦФ сприяє значному подовженню тривалості життя тварин; зменшенню кількості В-лімфоцитів та збільшенню кількості Т-лімфоцитів у периферичній крові та селезінці.

Недоліком найближчого аналога є те, що для комбінованої терапії ЦФ застосовують перорально (препарат розчиняють у воді та використовують для поїння тварин), при цьому доза лікарського засобу, яка потрапляє в організм тварини, не може бути чітко визначена та проконтрольована. Концентрація ЦФ є дуже важливим фактором, адже доведено, що препарат має імуномодулюючі властивості тільки в низьких концентраціях.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб комбінованої імунотерапії шляхом застосування специфічної ДК-вакцинотерапії в поєднанні з низькими дозами ЦФ в експерименті, що дозволить досягти вищого протипухлинного та антиметастатичного ефекту імунотерапії на основі ДК.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

В експериментальних дослідженнях були задіяні миші лінії C57B1/6, самці вагою 18-22 г, віком 1,5-2 міс. Як експериментальну модель використовували карциному Льюїс (КЛ), що активно метастазує в легені гематогенним шляхом. Пухлинні клітини КЛ вводили внутрішньовенно (в/в) в кількості 300×10^5 клітин/мишу. Тваринам починали вводити ЦФ в концентрації 2 мг/кг внутрішньочеревинно з 7-ї доби після перещеплення пухлини та вводили ЦФ щоденно упродовж 4-х днів. Загальна кількість ЦФ на курс лікування складала 40 мг.

ДК-вакцинотерапію починали на наступну добу після останнього введення ЦФ. ДК-вакцину вводили в/в 3 рази кожні 3 доби. як пухлинний антиген (ПА) для навантаження ДК використовували механохімічно модифіковані ліофілізовані пухлинні клітини (м/м ЛФПК) КЛ у концентрації 0,05 мг/мл. На 30-ту добу після перещеплення пухлини проводили підрахунок кількості та об'єму метастазів у легенях, визначали цитотоксичну активність спленоцитів та формування специфічної імунної відповіді на ПА. Кожна експериментальна група складалася з 10 мишей.

Тварини були розподілені на такі групи:

- 1-й групі мишей вводили лише клітини КЛ, контроль КЛ;

- 2-й групі мишей вводили клітини КЛ + ЦФ;
- 3-й групі мишей вводили клітини КЛ + ДК, навантажені м/м ЛФПК КЛ;
- 4-й групі мишей вводили клітини КЛ + ЦФ + ДК, навантажені м/м ЛФПК КЛ.

Для експериментальних досліджень джерелом ДК нами були використані спленоцити сингенних інтактних мишей. Такі ДК є мієлоїдними за походженням і майже не відрізняються за своїми фенотиповими та функціональними властивостями від ДК, генерованих з моноцитів периферичної крові людини. ДК отримували з селезінки інтактних мишей ліній C57BL/6 з дотриманням правил асептики згідно з протоколом [11].

Антиметастатичний ефект комбінованої імунотерапії оцінювали за частотою метастазування пухлини. При цьому підраховували кількість та об'єм метастазів в легенях мишей. Об'єм метастатичної колонії розраховували за формулою:

$$V = 0,52D^3, \text{ де}$$

0,52 - коефіцієнт;

V - об'єм метастатичної колонії;

15 D - її діаметр (мм).

Також розраховували індекс гальмування метастазування (ІГМ) з використанням загальноприйнятого методу за формулою:

$$\text{ІГМ} = \frac{[K - D]}{K} \times 100\%, \text{ де}$$

K - та D - середній об'єм метастазів на мишу в контрольній та дослідній групах.

20 Спонтанні та індуквані процеси апоптозу і проліферації клітин селезінки (аналог реакції бластної трансформації лімфоцитів, РБТЛ) визначали за допомогою проточноцитометричних методів. Частину селезінки для досліджень забирали у флакони з 2 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) окремо від кожної тварини. Суспензію клітин отримували шляхом механічної дезагрегації тканини. Для ізоляції окремих клітин, отриману суспензію фільтрували крізь нейлоновий фільтр. Отримані клітини в концентрації 10^6 /мл культивували в 24-коміркових планшетах у середовищі RPMI з додаванням 300 мкг/мл глутаміну, 25 ммоль/мл 5-меркаптоетанолу, 100 мкг/мл гептаміцину та 10 % сироватки ембріонів теляти в атмосфері 5 % CO₂. Як стимулятор використовували фітогемаглютинін L-ФГА ("Sigma") в концентрації 30 мкг/мл або ПА (0,1 мл). Культивування здійснювали протягом 3 діб.

30 Визначали вміст ДНК в спленоцитах за допомогою методу проточної цитометрії після їх фарбування флюорохромом PI [12]. Фарбування клітин за допомогою флюорохромного барвника PI включало наступні етапи: клітини у кількості 10^6 на пробу після однократного відмивання в 5 мл ЗФР при 1000 об./хв. протягом 10 хв. ресуспендували в 1 мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1 % цитрат натрію, 0,1 % Triton X-100, 5 мкг/мл PI). Всі реагенти фірми "Sigma Chemical Co", США). Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25 °C протягом 30 хв. у темряві. Визначали рівень клітин, що знаходяться в апоптозі, та розподіл клітин за фазами клітинного циклу. Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу (G_{1/0}, S, G₂ + M) гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми Mod Fit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh. 35 Індекс проліферативної активності (ІПА) визначали шляхом поділу відсоткового показника кількості клітин проліферативного пулу (в G₂ + M + S-фазах) у випадку спонтанної проліферації на відсотковий показник кількості клітин, що знаходяться в апоптозі.

Функціональну активність природних кілерних клітин (ПКК) селезінки мишей оцінювали з використанням проточної цитометрії. як клітини-мішені використали дві перещеплювані лінії 45 клітин КЛ, адаптовану для росту на пластику (сингенна система мішень-ефектор), та індуквані вірусом саркоми Молоні мишачої Т-клітинної лімфоми YAC-1 (алогенна система мішень-ефектор).

Усі проточно-цитометричні дослідження виконувалися на приладі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США), оснащеному двома лазерами (довжиною хвилі 488 та 625 нм), з використанням програми CellQuest-PRO для комп'ютерів Макінтош для придбання та аналізу даних. Для виміру флюоресценції фікоеритрину та PI використовували вузькосмуговий фільтр 585/42 нм, флюоресценції ФІТЦ - 642/75 нм [12].

Дані впливу комбінованої імунотерапії на основі ДК та низьких доз ЦФ на процеси метастазування КЛ у мишей лінії C57BL/6 подані в табл.1.

55

Таблиця 1

Вплив комбінованої імунотерапії на кількість та об'єм метастазів в легенях у мишей лінії C57B1/6 з КЛ

№ з/п	Назва групи	Кількість метастазів	Об'єм метастазів, мм ³	ІГМ, %
1	Контроль КЛ n=5	50,14±12,26	99,21±25,79	
2	КЛ + ЦФ n=5	10,33±2,19*	11,09±3,21*	79
3	КЛ + ДК n=5	22,60±5,47*	56,51±7,68	54
4	КЛ + ЦФ + ДК n=5	0,22±0,15*	0,28±0,19*	99

Примітка. * - p<0,05 порівняно з контролем.

- 5 За результатами проведених досліджень встановлено, що будь-яка з застосованих схем терапії є ефективною щодо гальмування метастазування пухлини. В групі тварин, яка отримувала ДК-вакцинотерапію та низькі дози ЦФ, кількість метастазів була достовірно менша порівняно з контролем і становила 0,22±0,15 проти 50,14±12,26 відповідно, об'єм метастазів також був достовірно меншим, ніж у контролі, і складав 0,28±0,19 мм³ проти 99,21±25,79 мм³.
- 10 Також ІГМ в цій групі складав 99 %, що свідчить про ефективність комбінованої імунотерапії на основі ДК та низьких доз ЦФ.

- 15 Імунна відповідь організму на ПА складається з комплексу процесів, у яких взаємодіють ефекторні та регуляторні механізми. Тому для забезпечення максимальної ефективності регуляторні механізми повинні впливати на різні ланки імунітету як на неспецифічну - функціонування макрофагів і ПКК, так і на антигенспецифічну, переважно, на її Т-ланку. Тому, дослідження цитотоксичної активності (ЦА) Т-лімфоцитів щодо сингенних клітин-мішеней та алогенних пухлинних клітин є дуже важливим. Результати досліджень представлені в табл.2.

Таблиця 2

Вплив комбінованої імунотерапії на основі ДК та низьких доз циклофосфаміду на цитотоксичну активність спленоцитів мишей лінії C57B1/6 з КЛ

№ з/п	Назва групи	Цитотоксична активність, %	
		КЛ	УАС-1
1	Інтактні тварини, n=5	68,60±2,44	64,40±1,69
2	Контроль КЛ, n=5	74,40±2,23	53,20±3,68
3	КЛ + ДК, n=5	82,80±0,73	64,40±0,75
4	КЛ + ЦФ2, n=5	83,70±1,86	78,30±1,67*
5	КЛ + ЦФ2 + ДК, n=5	86,60±1,60*	70,20±3,94*

- 20 Примітка. * - p<0,05 порівняно з контролем.

- 25 Підвищення ЦА спостерігалось в усіх групах тварин. Найбільше посилення ЦА щодо сингенних клітин-мішеней було відмічено в групі тварин, що отримали комбіновану імунотерапію на основі ДК та ЦФ, де вона становила 86,60±1,60 % проти 74,40±2,23 % в контролі. Також в цій групі спостерігалось збільшення в 1,3 рази ЦА щодо стандартних (алогенних) клітин-мішеней УАС-1. У групі тварин, які отримували монотерапію ЦФ, активність ПКК була найвищою, і становила 78,30±1,67 % при контрольних значеннях 64,40±1,69 %.

- 30 Встановлено, що формування специфічної імунної відповіді на сингенний ПА, тобто збільшення кількості проліферуючих клітин (в G₂/M + S-фазах клітинного циклу) у відповідь на ПА, спостерігається в групі тварин, що отримували комбіновану імунотерапію на основі ДК сумісно з ЦФ, дані представлені в табл.3. У цій групі ІПА становить 1,29±0,46 проти 1,07±0,48 в контролі. Слід зазначити, що в групах тварин, що отримували монотерапію ЦФ при будь-якій схемі його застосування, відмічено зниження проліферативної активності спленоцитів (табл.3).

- 35 В експериментальних дослідженнях показано, що схема комбінованої імунотерапії на основі ДК та ЦФ у дозі 40 мг на курс викликає формування антигенспецифічної імунної відповіді на ПА та суттєво активує системи природної протипухлинної резистентності, як по відношенню до алогенних, так і до сингенних пухлинних клітин-мішеней.

Таблица 3

Вплив комбінованої імунотерапії на основі ДК та низьких доз циклофосфаміду на проліферативну відповідь спленоцитів мишей лінії С57В1/6 з КЛ на сингенний ПА в РБТЛ

Назва групи		Рівень апоптозу, %	Кількість клітин у фазах клітинного циклу, %				ІПА
			G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	S+G ₂ /M	
Контроль КЛ n=5	Контроль	21,32±2,79	78,86±3,43	1,98±0,8	19,14±2,88	21,13±3,43	1,02±0,18
	ФГА	23,92±5,05	75,38±5,2	4,28±2,17	20,35±3,43	24,61±5,21	4,13±0,33
	м/м ЛФПК	26,86±5,05	75,39±6,31	4,8±2,29	19,81±4,85	24,61±6,31	1,39±0,75
КЛ + ДК n=5	Контроль	29,52±11,46	75,28±4,38	6,97±1,28	17,76±3,65	24,65±4,36	1,71±0,7
	ФГА	19,56±2,46	63,75±3,13	8,13±0,75	28,12±2,53	35,75±2,85	1,91±0,27
	м/м ЛФПК	27,1±7,27	70,29±4,09	7,5±1,92	22,21±2,63	29,72±4,09	1,75±0,73
КЛ + ЦФ n=5	Контроль	20,54±1,09	66,64±2,34	4,15±1,9	29,2±3,33	33,35±2,3	1,64±0,12
	ФГА	23,63±6,7	68,87±4,41	7,31±1,86	23,81±3,45	31,13±4,41	1,49±0,41
	м/м ЛФПК	31,09±14,96	70,04±3,54	6,75±1,29	23,2±2,91	29,75±3,35	1,3±0,37
КЛ + ЦФ + ДК n=5	Контроль	23,83±7,3	74,44±2,98	8,84±2,13	16,72±1,37	24,48±3,57	1,07±0,48
	ФГА	44,82±16	71,45±6,65	7,83±2,78	20,73±9,43	28,55±6,65	1,22±0,83
	м/м ЛФПК	22,35±6,82	74,83±4,32	8,52±0,56	16,25±3,75	25,17±4,31	1,29±0,46

Таким чином, отримані нами дані свідчать, що використання комбінованої імунотерапії, що з включенням специфічної активної імунотерапії на основі ДК та низьких доз ЦФ, застосованих синергічно, є одним з перспективних напрямів імунотерапії онкологічних захворювань.

Джерела інформації:

1. Rosenberg S.A. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines / S.A. Rosenberg, J.C. Yang, N.P. Restifo // Nature Medicine. - 2004. - V. 10, №9. - P.909-915.

2. Recent advances in cancer vaccines: an overview / K. Itoh, A. Yamada, T. Mine, M. Noguchi // Jpn.J.Clin Oncol - 2009. - V. 39, №2. - P. 73-80.

3. Москалева Е.Ю. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека / Е.Ю. Москалева, С.Е. Северин // Иммунология. - 2002. - №1. - С. 8-15.

4. Development of a dendritic cell (DC) - based vaccine for patients with advanced colorectal cancer / N. Rains, P.J. Carman, W. Chen, R.S. Stubbs // Hepatogastroenterology. - 2001. - V. 48, №38. - P. 347-351.

5. Metronomic therapy wit cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas / R. Elmslie, P. Glawe, S. Dow // J. Vet. Intern. Med. - 2008. - Vol.22, №6. - 1373-1379.

6. Чубенко В.А. Перспективные методы лечения злокачественных новообразований / В.А. Чубенко // Практическая онкология. - 2004. - Т. 8, №4. - С. 228-234.

7. Сорочан П.П. Регуляторные Т-клетки и новые стратегии противоопухолевой иммунотерапии / П.П. Сорочан, И.А. Громакова, Н.Э. Прохач // Международный медицинский журнал. - 2009. - №2. - С. 85-90.

8. Hopkins J. Combining low-dose cyclophosphamide with GM-CSF-secreting prostate cancer immunotherapy enhances antitumor immune effects / J. Hopkins, S. Kimme] // Cancer Res. - 2009. - Vol. 10. - N. 69 - P. 4309-4318.

9. Selective depletion of CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels / J. Zhao, Y. Cao, Z. Lei [et al.] // Cancer Res. - 2010. - Vol. 10. - P. 1529-1538.

10. Low-dose cyclophosphamide synergizes with dendritic cell-based immunotherapy in antitumor activity J. Veltman, M. Lambers, M. Nimwegen [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. - 2010. - №3. - P. 1155-1165 (найближчий аналог).

11. Пат. №24077. UA, 7 МПК А61К 39/00. Спосіб протипухлинної імунотерапії / Храновська Н.М., Бендюк Г.Д., Гріневич Ю.А., Орел В.Е., Дзятковська Н.М. / Національний інститут раку; 3. №а200507740; Заявл. 04.08.2005. Опубл. 25.06.2007. - Бюл. №9.

12. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. - М., - 2001. - 53 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб комбінованої імунотерапії, що включає синергічне застосування ДК-вакциноtherапії та низьких доз циклофосфаміду, який **відрізняється** тим, що циклофосфамід вводять внутрішньочеревинно з чітким визначенням доз лікарського засобу.

Комп'ютерна верстка А. Рябко

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

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