



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88842

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 35/12

A61K 35/66

A61K 39/07

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АУТОВАКЦИНИ

1

(21) a200807969

(22) 12.06.2008

(24) 25.11.2009

(46) 25.11.2009, Бюл.№ 22, 2009 р.

(72) ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕДОРОВИЧ, ЧЕРЕМШЕНКО НАДІЯ ЛЕОНІДІВНА, КУЛІК ГАЛИНА ІВАНІВНА, ЛІСОВЕНКО ГАЛИНА СТЕПАНІВНА, БАЗАСЬ ВОЛОДИМИР МИКОЛАЄВИЧ, ТОДОР ІГОР МИКОЛАЄВИЧ, ПОТЕБНЯ ГРИГОРІЙ ПЛАТОНОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(56) UA 2001064158 A 16.12.2002

UA 2002010695 A 15.11.2002

UA 2001075155 A 17.02.2003

UA 2001053528 A 16.12.2002

2

(57) 1. Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини шляхом промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення, обробки клітин продуктами метаболізму штаму мікроорганізму *Bacillus subtilis* IMB B-7025 та інкубації суміші, який **відрізняється** тим, що як пухлинні клітини використовують клітини модельної пухлини карциноми легені Льюїса, резистентної до цисплатину.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що як продукти метаболізму використовують фільтрат культуральної рідини штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7025 в кількості 1мл або виділений з нього лектин в дозі 0,08-1,0мг/мл на  $0,9 \times 10^7$  -  $1,1 \times 10^7$  пухлинних клітин.

Винахід відноситься до медицини, а саме, до онкології і стосується технології одержання протипухлинних засобів.

Підвищення ефективності лікування хворих на злоякісні новоутворення - центральна проблема і мета експериментальної і клінічної онкології. Найбільш інтенсивно розробляються методи імунотерапії пухлин, які ґрунтуються на специфічній індукції протипухлинної резистентності організму шляхом імунізації протипухлинними вакцинами, що містять пухлиноасоційовані антигени. Такі вакцини являють собою вбиті і модифіковані вірусами чи мікробами пухлинні клітини або їх фрагменти.

Переваги вакцин на основі аутологічних пухлинних клітин полягають в тому, що вони містять всі наявні антигени пухлини. При їх застосуванні

відпадає потреба в попередній ідентифікації антигенів, які потрібно включити у вакцину.

Відомий спосіб одержання протипухлинної аутовакцини шляхом промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення та обробки пухлинних клітин фільтратом культуральної рідини штаму мікроорганізму *B. mesentericus* АБ-56 [1].

Також відомий спосіб одержання протипухлинної аутовакцини шляхом обробки пухлинних клітин поліпептидом кислоти природи, виділеним з культуральної рідини штаму мікроорганізму *B. mesentericus* АБ-56 [2]. Однак, при одержанні фільтрату чи поліпептиду культуральної рідини за такими способами використовується дороге поживне середовище. Крім того, ці протипухлинні аутовакцини не мають необхідної на сьогодні профілактичної та терапевтичної ефективності.

(13) C2

(11) 88842

(19) UA

Найбільш близьким способом одержання протипухлинної аутовакцини до способу, що заявляється, є спосіб приготування протипухлинної аутовакцини шляхом обробки пухлинних клітин продуктами метаболізму штаму *B.subtilis* 1MB B-7025. В якості продуктів метаболізму використовують фільтрат культуральної рідини штаму *B.subtilis* 1MB B-7025, а також одержану з нього біологічно активну речовину - цитотоксичний лектин [3, 4].

Даний фільтрат і лектин не тільки девіталізували пухлинні клітини різного гістогенезу (саркома-37, рак Ерліха, лімфома NK/Ly, лімфосаркома OH-2, плазмодитома OH-3, карцинома Льюїса) *in vitro*, але попередньо аглютинували і частково їх лізували, підсилюючи при цьому імуногенність клітин. Крім того, вони є більш дешевими [5,6].

Однак, в зв'язку з природною або набутою лікарською резистентністю пухлинних клітин до цитостатиків, зокрема до цисплатину ці протипухлинні аутовакцини не забезпечують необхідну на сьогодні профілактичну і терапевтичну ефективність. Цисплатин (ЦП) відноситься до числа найбільш ефективних протипухлинних засобів, але його застосування при терапії злоякісних новоутворень обмежується досить швидкою природною або набутою резистентністю пухлинних клітин до дії цього препарату [7-12].

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу одержання протипухлинної аутовакцини для лікування хіміорезистентних пухлин, зокрема до ЦП. Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання протипухлинної аутовакцини використовують резистентний до ЦП штам-модельну карциному легені Льюїса (ХР КЛЛ), який одержують шляхом послідовних перещеплень пухлинних клітин, отриманих від мишей, котрим було проведено курс хіміотерапії. Курс хіміотерапії проводився таким чином: мишам лінії С57В1 перещеплювали суспензію клітин чутливого штаму КЛЛ внутрішньом'язево в кількості  $1,5 \times 10^6$  клітин. Тварин розділяли на дві групи - контрольну і дослідну. Мишам дослідної групи на 7-9 доби після прищеплення КЛЛ починали вводити ЦП (EBEWE, Austria) в дозі 1,2мг/кг внутрішньочеревинно через день (всього 5 ін'єкцій). Пухлини, які рецидивували після закінчення хіміотерапії (23-25 доба після перещеплення), використовували для приготування суспензії клітин, що йшла на перещеплення мишам другої серії експериментів, які також одержували ЦП за описаною вище схемою. Всі наступні серії дослідів були аналогічні попередній. Всього проведено 27 курсів хіміотерапії ЦП [11].

Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини здійснюють таким чином. Хіміорезистентну пухлинну тканину (ХР КЛЛ) тричі промивають стерильним фізіологічним розчином, подрібнюють, клітини обробляють фільтратом або цитотоксичним лектином штаму *B.subtilis* 1MB B-7025, одержану суміш інкубують в термостаті при 37°C протягом 0,5-1,0 години, періодично струшуючи. Для приготування 1мл вакцини до  $0,9 \times 10^7$ - $1,1 \times 10^7$  пухлинних клітин додають 1мл фільтрату, або 0,08-1,0мг/мл лектину. Після закінчення інкубації вак-

цину перевіряють на стерильність та життєздатність пухлинних клітин.

Виготовлена за таким способом протипухлинна аутовакцина (ПАВ) вірогідно гальмує ріст відповідної пухлини, збільшує середню тривалість життя (СТЖ) мишей, зменшує частоту виникнення метастазів легені та їх об'єм, що обумовлено підвищенням активності клітин-ефекторів протипухлинного імунітету.

Ефективність та механізми дії ПАВ досліджували на експериментальних тваринах - мишах лінії С57В1/6, масою 20-22г розведення експериментальної бази ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України. При цьому застосовували профілактичну та терапевтичну моделі використання ПАВ, тобто вакцинацію тварин проводили до/або після прищеплення пухлин.

Було проведено порівняльне вивчення впливу ПАВ, виготовлених за допомогою фільтрату або цитотоксичного лектину *B.subtilis* B-7025 з клітин чутливого до ЦП штамів модельної КЛЛ (ХЧ КЛЛ) - вакцина-прототип та резистентного до ЦП штамів модельної КЛЛ (ХР КЛЛ) - вакцина-заявлена, на перебіг пухлинного процесу та основні реакції протипухлинного захисту. Зокрема, досліджували ефективність цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), макрофагів (Мф) та природних кілерів (ПКК). Для характеристики перебігу пухлинного процесу визначали частоту прищеплюваності та гальмування росту пухлин, СТЖ мишей, розміри (об'єми) первинної пухлини та кількість і розміри метастазів. Розраховували індекси гальмування росту пухлин та індекси інгібіції метастазування в порівнянні з відповідним контролем.

Суть способу пояснюють приклади конкретного виконання.

#### Приклад 1.

Ефективність вакцин на основі цитотоксичних лектинів (ЦЛ) *B.subtilis* B-7025 в профілактичному експерименті.

Дослідним мишам підшкірно (п/ш) 3-разово по (0,3;0,5;0,5мл) вводили ПАВ, тваринам групи "контроль прищеплення" відповідно вводили 0,9% розчин хлориду натрію (ФР). На 29-у добу після завершення вакцинації було прищеплено в стегновий м'яз по  $4,5 \times 10^5$  клітин відповідних штамів КЛЛ, мишей залишали під наглядом до загибелі та аналізували показники СТЖ.

При дослідженні імунних показників після вакцинації, але до прищеплення пухлини встановлено, що цитотоксична активність ефекторів клітинного протипухлинного імунітету у мишей, які одержали ПАВ на основі хіміочутливої (ХЧ) і хіміорезистентної (ХР) КЛЛ, зростає (Фіг.1). Це в першу чергу стосується ЦТЛ та перитонеальних Мф. Між вакцинованими мишами спостерігалась суттєва різниця - у тих, що одержували ПАВ з ХР КЛЛ, в порівнянні з групою імунізованих ПАВ з ХЧ КЛЛ зареєстровано високу активність Мф.

Результати оцінки впливу попередньої імунізації ПАВ з ХЧ та ХР КЛЛ на ріст відповідних варіантів КЛЛ наведені в табл.1.

Таблиця 1

Перебіг росту ХЧ і ХР КЛЛ у вакцинованих та контрольних мишей С<sub>57</sub>ВІ на 38 добу пухлинного росту

Імунізація	Прищеплення пухлини	Частота прищеплення пухлин, %	Індекс гальмування пухлинного росту, %
Вакцина прототип	ХЧ КЛЛ	42,9±12,0	67,0
ФР(контр)		85,7±8,5	-
Вакцина прототип	ХР КЛЛ	61,5±12,2	57,0
Вакцина заявлена		54,5±13,3	78,0
ФР(контр)		84,6±9,0	-

У вакцинованих мишей зареєстровано виразне гальмування пухлинного росту: об'єм первинних пухлин протягом 11-38 доби був суттєво нижчим, ніж у відповідному контролі. Найкращий ефект спостерігали у мишей, імунізованих ПАВ з ХР КЛЛ, яким було прищеплено ХР КЛЛ - індекс гальмування пухлинного росту на 21-38 добу перевищував 75-78%. У мишей, імунізованих вакциною з ХЧ КЛЛ, після прищеплення такої ж ХР КЛЛ відповідний показник сягав 54-57% (Фіг.2).

Гальмування пухлинного росту у вакцинованих мишей супроводжувалось статистично достовірним подовженням середньої тривалості життя (СТЖ) (табл.2).

Слід підкреслити досить високі показники СТЖ у вакцинованих тварин після прищеплення їм гомологічного варіанту КЛЛ, які при використанні ПАВ з ХЧ і ХР КЛЛ на 74,7 і 85,44% перевищували показники відповідного контролю.

Таблиця 2

СТЖ мишей, імунізованих ПАВ з клітин ХЧ (прототип) або ХР КЛЛ (заявлена), після прищеплення пухлини

Імунізація	Пухлина	Х±m	Індекс модуляції, %
Вакцина-прототип	ХЧ КЛЛ	80,20±9,04	+74,7
ФР		45,91±3,46	
Вакцина-прототип	ХР КЛЛ	65,52±10,71	+68,47
Вакцина-заявлена		72,10±8,72	+85,44
ФР		38,88±0,82	

Імунологічні обстеження після прищеплення КЛЛ дозволили зареєструвати відмінності, як між вакцинованими та контрольними тваринами, так і між групами вакцинованих мишей. Так, у тварин з ХЧ пухлиною, імунізованих вакциною з ХЧ КЛЛ, активність ЦТЛ на 12 добу була на рівні відповідного контролю, але в подальшому (25 та 39 доба) цей показник суттєво перевищував контрольні. У вакцинованих мишей з ХР КЛЛ активність ЦТЛ в 1,5-1,8 рази перевищувала контрольні показники.

Активність Мф у контрольних мишей на 25 і 38 добу знижувалась до 4,7-10%. У тварин, які одержали ПАВ з ХЧ та ХР КЛЛ, активність Мф на відміну від контролю залишалась підвищеною (на 26,5 та 33,9%, відповідно). Всі вакциновані миші, у яких пухлина не розвинулась, і в ці строки також мали підвищений показник активності Мф. Подібні закономірності відзначені і при аналізі активності ПКК.

Так, у мишей, імунізованих вакциною з ХЧ КЛЛ, яким прищеплено ХР КЛЛ, на 38 добу пухлинного росту, активність ПКК, як і Мф зменшувалась до контрольного рівня. Цитотоксична активність ПКК у мишей, імунізованих вакциною ХР КЛЛ, з прищепленою ХР КЛЛ, в ці строки спостереження була найвищою - 44,8±6,6%, що співпадало з високими показниками СТЖ.

Таким чином, імуногенність ПАВ, виготовлених з клітин чутливого та резистентного до ЦП штамів КЛЛ, відрізняється - вакцина, виготовлена з клітин ХР КЛЛ (заявлена), в більшій мірі впливає на активність Мф і ПКК в порівнянні з вакциною ХЧ КЛЛ і більш виражено гальмує ріст прищепленої ХР КЛЛ, ніж вакцина з вихідного штаму КЛЛ (прототип).

#### Приклад 2.

Протипухлинна активність вакцин на основі цитотоксичного лектину *B.subtilis* B-7025, виготовлених з відповідних варіантів карциноми легені Льюїса (ХЧ КЛЛ і ХР КЛЛ), в терапевтичному експерименті.

Протипухлинну активність ПАВ, виготовлених за допомогою лектину *B.subtilis* B-7025 з клітин ХЧ і ХР штамів пухлини КЛЛ досліджували за терапевтичною схемою експерименту. Прищеплення клітин вихідного ХЧ штаму КЛЛ, та резистентного ХР штаму КЛЛ здійснювали загальноприйнятим методом - суспензію клітин КЛЛ, вводили мишам в стегновий м'яз в кількості  $4,5 \times 10^5$  клітин. Після прищеплення відповідного варіанту КЛЛ, ПАВ вводили п/ш, 5-разово, мишей залишали під наглядом та аналізували показники перебігу пухлинного процесу.

Результати оцінки частоти виходу та гальмування росту пухлин (29 доба після прищеплення) свідчать про більшу ефективність ПАВ з гомологічних штамів КЛЛ. Аналіз показників СТЖ цілком підтвердив відмічені закономірності (табл.3).

Таблиця 3

Ефективність ПАВ після прищеплення відповідних варіантів карциноми легені Льюїса (ХЧ і ХР КЛЛ)

Пухлина	Лікування	Частота прищеплення пухлини, %	Гальмування росту пухлини, %
ХЧ КЛЛ	Вакцина-прототип	84,6	24,14
	Вакцина-заявлена	69,3	16,3
ХР КЛЛ	Вакцина-прототип	78,6	34,6
	Вакцина-заявлена	57,1	51,6

Результати оцінки частоти виходу пухлин дозволяють зробити висновок про більшу ефективність ПАВ з ХР КЛЛ. При використанні ПАВ з ХЧ КЛЛ гальмування росту ХЧ КЛЛ та ХР КЛЛ складало 24,14% і 34,62% відповідно. Аналогічні показники для ПАВ з ХР КЛЛ сягали 16,32% і 51,64%, тобто вакцина з ХР КЛЛ суттєво гальмувала ріст гомологічної пухлини і майже не впливала на ріст вихідного штаму ХЧ КЛЛ. Аналіз показників СТЖ цілком підтвердив відмічені закономірності (табл.4).

Таблиця 4

СТЖ мишей з ХЧ і ХР КЛЛ, які одержували вакцини з відповідних варіантів КЛЛ на основі лектинів B.subtilis B-7025

Пухлина	Лікування	СТЖ, діб $X \pm m$	ІМ, %
ХЧ КЛЛ	Вакцина-прототип	53,85±4,03	+43,6
	Вакцина-заявлена	45,15±4,40	+20,4
	Контр(ФР)	37,50±1,07	
ХР КЛЛ	Вакцина-прототип	47,15±4,21	+22,1
	Вакцина-заявлена	55,86±5,09	+44,6
	Контр(ФР)	38,62±1,39	

Отже згідно з показниками СТЖ, лікування тварин з ХР КЛЛ суттєво збільшувало їх тривалість життя при використанні вакцини з ХР КЛЛ, показники СТЖ мишей на 44,6% перевищували контрольні і сягали 55,86±15,09 при 38,62±1,39 діб в "контролі прищеплення" ( $p < 0,05$ ).

Функціональні характеристики імунної системи вакцинованих тварин залежали від того, яку ПАВ було використано, але загальним було суттєве підвищення активності Мф. Так, в цей термін у мишей з пухлинами вихідного штаму КЛЛ після лікування ПАВ на основі ХЧ КЛЛ та ХР КЛЛ активність Мф перевищувала показники контролю в 3,2 та 4,7 рази відповідно. У мишей з пухлинами, що мають фенотип резистентності до ЦП, після лікування ПАВ на основі ХР КЛЛ також спостерігали достовірне підвищення активності Мф (у 2,1 рази; 22,6±6,5 та 47,1±9,4 %, відповідно).

Отже, ПАВ виготовлена з резистентного до ЦП штаму КЛЛ (заявлена), володіє здатністю вірогідно (на 52%) гальмувати ріст відповідної пухлини в терапевтичному експерименті та на 44,6% збільшувати показник СТЖ мишей; така вакцина в більшій мірі впливає на активність цитотоксичних Т-лімфоцитів і природних кілерів в порівнянні з вакциною з ХЧ КЛЛ.

#### Приклад 3.

Антиметастатична активність вакцини на основі цитотоксичного лектину B.subtilis B-7025 з ХР КЛЛ в терапевтичному експерименті.

Для вивчення антиметастатичної активності ПАВ з ХР КЛЛ на основі ЦП B.subtilis B-7025 мишам прищеплювали по  $5,0 \times 10^5$  клітин ХР КЛЛ в стеновий м'яз, I група одержувала ПАВ з ХР КЛЛ; II - ПАВ з ХЧ КЛЛ. На 34 добу мишей забивали під ефірним наркозом та визначали активність ЦТЛ, ПКК та Мф. Проводили підрахунок кількості та об'єму метастазів в легенях і розраховували індекси інгібіції метастазування (ІІМ). У вакцинованих мишей зареєстровано вірогідне зменшення розмірів пухлин практично в усі строки дослідження. Вакцина з ХР КЛЛ (заявлена) краще гальмувала ріст гомологічної КЛЛ (34,4%), ніж вакцина з ХЧ КЛЛ (прототип) (табл.5).

Таблиця 5

Динаміка росту хіміорезистентної КЛЛ при лікуванні мишей вакцинами, виготовленими з ХЧ і ХР КЛЛ на основі лектину B.subtilis B-7025

Доба	Об'єм пухлини, см <sup>3</sup>		
	Вакцина-заявлена	Вакцина-прототип	Контроль прищеплення
7	0,01±0,01	0,02±0,02	0,22±0,07
22	2,05±0,51	2,34±0,58	2,71±0,54
32	4,75±1,23	6,17±1,57	9,02±0,71

Незалежно від того, з якого штаму КЛЛ готували ПАВ, вакцинація вірогідно знижувала частоту виникнення метастазів легені та зменшувала їх об'єм (табл.6).

Таблиця 6

Показники метастазування хіміорезистентної КЛЛ при лікуванні мишей вакцинами, виготовленими з ХЧ і ХР КЛЛ

Лікування	Середня кількість метастазів	ІІМ, %	Середній об'єм метастазів, мм <sup>3</sup>	ІІМ, %
Вакцина-заявлена	6,0±2,58*	69,4	36,17*21,32*	87,8
Вакцина-прототип	7,71±2,19*	60,7	49,48±20,92*	83,4
Контр. прищепл.	19,6±3,09		297,18±79,19	

Індекс інгібіції метастазування у мишей, які одержували ПАВ з ХР КЛЛ становив 69,4%, а в тих, які одержували ПАВ з ХЧ КЛЛ - 60,7%. Антиметастатична активність ПАВ найбільше позначалася на об'ємі метастазів легені: при використанні вакцини з ХР КЛЛ цей показник був на 87,8% меншим, ніж такий в "контролі прищеплення". Вакцина з ХЧ КЛЛ гальмувала ріст метастазів легені на 83,4%. Також було визначено, що у мишей, які одержували ПАВ на основі ХР КЛЛ, титр активності фактора некрозу пухлини був у 1,7-1,9 рази більшим в порівнянні з усіма групами (табл.7).

Таблиця 7

Титр активності фактора некрозу пухлин при лікуванні мишей вакцинами, виготовленими з ХЧ і ХР КЛЛ на основі лектину B.subtilis B-7025

Лікування	Титр активності ФНП, $\log_2$	ІЦ у розведенні $2\log_2$ , %
Вакцина-заявлена	4,5±0,1	102,7±15,0
Вакцина-прототип	2,3±0,2	48,9±6,5
Контроль прищеплення	2,6±0,3	56,1±10,5
Інтактний контроль	2,8±0,2	62,8±10,6

Вакцина з клітин ХР КЛЛ (заявлена), в більшій мірі впливає на активність Мф і ЦТЛ в порівнянні з вакциною на основі клітин ХЧ КЛЛ (прототип) і більш ефективно гальмує ріст прищепленої ХР КЛЛ, що свідчить про різну імуногенність досліджених ПВ. Така різниця ефективності ПВ може бути обумовлена різною антигенністю ХЧ і ХР клітин КЛЛ, зв'язаною з можливими змінами протеому при формуванні резистентності до ЦП [9,11,12].

Вакцина, виготовлена за допомогою ЦЛ B.subtilis B-7025 з ХР КЛЛ вірогідно гальмує ріст відповідної пухлини, збільшує СТЖ мишей, зменшує частоту виникнення метастазів легені та їх об'єм, що обумовлено підвищенням активності клітин-ефекторів протипухлинного імунітету.

Приклад 4.

Ефективність вакцин на основі фільтрату культуральної рідини (ФКР) B.subtilis B-7025, в профілактичному експерименті.

Дослідним мишам п/ш, 3-разово, по 0,3; 0,5; 0,5мл, з інтервалом 7 діб вводили ПАВ, тваринам групи "контроль прищеплення" відповідно вводили 0,9% розчин хлориду натрію (ФР). На 29-у добу після завершення вакцинації було прищеплено в стегновий м'яз по  $4,0 \times 10^5$  клітин відповідних штамів КЛЛ, мишей залишали під наглядом до загибелі та аналізували показники СТЖ. Результати оцінки впливу попередньої імунізації ПАВ з ХЧ та ХР КЛЛ на ріст відповідних варіантів КЛЛ наведені в табл.8.

Таблиця 8

Перебіг росту ХЧ і ХР КЛЛ у вакцинованих та контрольних мишей C<sub>57</sub>Bl на 38 добу пухлинного росту

Імунізація	Прищеплення пухлини	Частота прищеплення пухлин, %	Індекс гальмування пухлинного росту, %
Вакцина прототип	ХЧ КЛЛ	65,9±11,4	64,1
ФР(контр)		83,6±8,5	-
Вакцина прототип	ХР КЛЛ	72,7±11,7	53,2
Вакцина заявлена		63,5±12,1	72,4
ФР(контр)		82,8±7,5	-

У вакцинованих мишей спостерігали виразне гальмування пухлинного росту: об'єм первинних пухлин протягом 11-38 доби був суттєво нижчим, ніж у відповідному контролі. Найкращий ефект спостерігали у мишей, імунізованих ПАВ з ХР КЛЛ (заявлена), яким було прищеплено ХР КЛЛ - індекс гальмування пухлинного росту на 21-38 добу перевищував 70-72%. У мишей, імунізованих вакциною з ХЧ КЛЛ, після прищеплення такої ж ХР КЛЛ відповідний показник сягав 50-53%.

Таблиця 9

Динаміка росту ХР КЛЛ при лікуванні мишей вакцинами, виготовленими з ХЧ і ХР КЛЛ на основі ФКР B.subtilis B-7025

Доба	Об'єм пухлини, см		
	Вакцина-заявлена	Вакцина-прототип	Контроль прищеплення
7	0,02±0,02	0,03±0,03	0,22±0,07
14	1,02±0,41	1,24±0,58	1,51±0,54
20	2,25±0,23	2,57±0,57	2,72±0,71
26	3,25±0,23	3,67±0,57	6,02±0,71
32	4,85±1,23	6,77±1,47	9,02±0,71

Гальмування пухлинного росту у вакцинованих мишей супроводжувалось статистично достовірним подовженням СТЖ (табл.10).

Таблиця 10

СТЖ мишей, імунізованих ПАВ з клітин ХЧ або ХР КЛЛ, після прищеплення пухлини

Імунізація	Пухлина	X±m	Індекс модуляції, %
Вакцина-прототип	ХЧ КЛЛ	70,1±8,04	+57,5
ФР		44,1±2,6	
Вакцина-прототип	ХР КЛЛ	55,4±9,7	+46,4
Вакцина-заявлена		64,1±7,7	+69,1
ФР		37,9±1,8	

Слід підкреслити високі показники СТЖ у вакцинованих тварин після прищеплення їм гомологічного варіанту КЛЛ, які при використанні ПАВ з ХЧ і ХР КЛЛ на 57,5 і 69,1% перевищували показники відповідного контролю. Таким чином, імуногенність ПАВ, виготовлених з клітин ХЧ та ХР КЛЛ відрізняється. Вакцина-заявлена, виготовлена з клітин ХР КЛЛ, більш виражено гальмує ріст прищепленої ХР КЛЛ, ніж вакцина-прототип з ХЧ штаму КЛЛ.

Приклад 5.

Протипухлинна активність вакцин, виготовлених з відповідних варіантів карциноми легені Льюїса (ХЧ КЛЛ і ХР КЛЛ) на основі ФКР B.subtilis B-7025, в терапевтичному експерименті.

Протипухлинну активність ПАВ, виготовлених за допомогою ФКР B.subtilis B-7025 з клітин ХР і ХЧ штамів пухлини КЛЛ досліджували за терапевтичною схемою експерименту. Прищеплення клітин ХЧ та ХР штамів КЛЛ здійснювали загальноприйнятим методом - суспензію клітин КЛЛ, вводили мишам в стегновий м'яз в кількості  $4,5 \times 10^5$  клітин. Після прищеплення відповідного варіанту КЛЛ, ПАВ вводили п/ш, 5-разово, по 0,3мл, з інтервалом 3-4 доби. Мишей залишали під наглядом та аналізували показники перебігу пухлинного росту КЛЛ.

Результати оцінки частоти виходу та гальмування росту пухлин (29 доба після прищеплення) свідчать про більшу ефективність ПАВ з гомологічних штамів КЛЛ. Аналіз показників СТЖ цілком підтвердив відмічені закономірності (табл. 11).

Таблиця 11

Ефективність ПАВ на основі ФКР B.subtilis B-7025 після прищеплення відповідних варіантів карциноми легені Льюїса (ХЧ та ХР КЛЛ)

Пухлина	Лікування	Частота прищеплення пухлини, %	Гальмування росту пухлини, %
ХЧ КЛЛ	Вакцина-прототип	60,0	21,14
	Вакцина-заявлена	80,0	13,52
ХР КЛЛ	Вакцина-прототип	85,0	31,12
	Вакцина-заявлена	65,0	47,54

Результати оцінки частоти виходу дозволяють зробити висновок про більшу ефективність ПАВ з гомологічних штамів КЛЛ. При використанні ПАВ з ХЧ КЛЛ гальмування росту ХЧ КЛЛ та ХР КЛЛ складало 21,14% і 31,12%, відповідно. Аналогічні

показники для ПАВ з ХР КЛЛ досягали 13,52% і 47,54%, тобто вакцина-заявлена суттєво гальмувала ріст гомологічної пухлини і майже не впливала на ріст вихідного штаму ХЧ КЛЛ. Аналіз показників СТЖ цілком підтвердив відмічені закономірності (табл. 12).

Таблиця 12

СТЖ мишей з ХЧ і ХР КЛЛ,  
яких лікували вакцинами на основі  
ФКР B.subtilis B-7025 з відповідних варіантів КЛЛ

Пухлина	Лікування	СТЖ, діб $\bar{X} \pm m$	ІМ, %
ХЧКЛЛ	Вакцина-прототип	47,55±3,03	+28,7
	Вакцина-заявлена	41,15±4,10	+12,4
	Контр(ФР)	36,90±1,07	
ХРКЛЛ	Вакцина-прототип	42,41±3,14	+12,5
	Вакцина-заявлена	50,70±4,09	+34,5
	Контр(ФР)	37,72±1,29	

Отже згідно з показниками СТЖ, лікування тварин з ХР КЛЛ, суттєво збільшувало їх тривалість життя при використанні вакцини-заявленої (з ХР КЛЛ), показники СТЖ мишей на 34,5% перевищували контрольні і сягали 50,70±4,09 при 37,72±1,29 діб в "контролі прищеплення".

Отже, ПАВ виготовлена з ХР штаму КЛЛ, володіє здатністю вірогідно (на 47,5%) гальмувати ріст відповідної пухлини в терапевтичному експерименті та на 34,5% збільшувати показник СТЖ мишей.

Приклад 6.

Антиметастатична активність вакцини з ХР КЛЛ на основі ФКР B.subtilis B-7025, в терапевтичному експерименті.

Для вивчення антиметастатичної активності ПАВ з ХР КЛЛ на основі ФКР B.subtilis B-7025 мишам прищеплювали по  $5,0 \times 10^5$  клітин ХР КЛЛ в стегновий м'яз, І група одержувала ПАВ з ХР КЛЛ; ІІ - ПАВ з ХЧ КЛЛ. На 34 добу мишей забивали під ефірним наркозом, проводили підрахунок кількості та об'єму метастазів в легенях і розраховували індекси інгібіції метастазування (ІІМ). У вакцинованих мишей зареєстровано вірогідне зменшення розмірів пухлин практично в усі строки дослідження. Вакцина з ХР КЛЛ дещо краще гальмувала ріст гомологічної КЛЛ ніж вакцина з ХЧ КЛЛ (табл. 13)

Таблиця 13

Динаміка росту ХР КЛЛ при  
лікуванні мишей вакцинами, виготовленими  
з ХЧ і ХР КЛЛ на основі ФКР B.subtilis B-7025

Доба	Об'єм пухлини, см <sup>3</sup>		
	Вакцина-заявлена	Вакцина-прототип	Контроль прищеплення
7	0,02±0,02	0,03±0,03	0,22±0,07
14	1,03±0,31	1,29±0,54	1,62±0,44
20	2,27±0,24	2,57±0,55	2,82±0,61
26	3,27±0,25	3,77±0,47	6,22±0,66
32	4,88±1,26	6,87±1,27	9,52±0,71

Незалежно від того, з якого штаму КЛЛ готували ПАВ, вакцинація позитивно впливала на час-

тоту виникнення метастазів легені та зменшувала їх об'єм (табл. 14).

Таблиця 14

Показники метастазування ХР КЛЛ при  
лікуванні мишей вакцинами, виготовленими  
з ХЧ і ХР КЛЛ на основі ФКР B.subtilis B-7025

Лікування	Середня кількість метастазів	ПМ, %	Середній об'єм метастазів, мм <sup>3</sup>	ПМ, %
Вакцина-заявлена	8,0±2,44*	59,2	39,27±18,32*	86,7
Вакцина-прототип	9,7±2,31*	50,5	54,58±19,12*	81,6
Контр. прищепл.	19,6±3,09		297,18±79,19	

Індекс інгібіції метастазування у мишей, які одержували ПАВ з ХР КЛЛ, становив 59,2%, а в тих, які одержували ПАВ з ХЧ КЛЛ - 50,5%. Антиметастатична активність ПАВ найбільше позначалася на об'ємі метастазів легені: при використанні вакцини з ХР КЛЛ цей показник був на 86,7% меншим, ніж такий в "контролі прищеплення", а вакцина з ХЧ КЛЛ гальмувала ріст метастазів легені на 81,6%.

Вакцина-заявлена, виготовлена з клітин ХР КЛЛ, в порівнянні з вакциною-прототипом на основі клітин ХЧ штаму КЛЛ більш ефективно гальмує ріст прищепленої ХР КЛЛ, що свідчить про різну імуногенність досліджених ПАВ. Така різниця ефективності ПАВ може бути обумовлена різною антигенністю ХЧ і ХР клітин КЛЛ, зв'язаною з можливими змінами протеому при формуванні резистентності до ЦП.

Одержана за таким способом ПАВ не проявляє негативних побічних ефектів і може використовуватися при лікуванні радикально оперованих онкологічних хворих з метою профілактики рецидивів і метастазів в комплексній терапії хворих з солідними пухлинами, більшість з яких мають природну чи набуту резистентність до хіміопрепаратів [13, 14].

Література:

1. Затула Д.Г. Експериментальне обґрунтування практичного застосування специфічних протипухлинних вакцин. Вісник АН УРСР 1982; 11: 51-62.
2. Патент України №1667. "Спосіб одержання протипухлинної вакцини"/Затула Д.Г., Ситенко В.К., Лісовенко Г.С., Танасієнко О.А., Завальнюк А.К., Загадарчук Н.Л., Хомяк О.Г., Сядро Т.А. (Україна); 25.10.94, Бюл. №3.
3. Патент №59483 Україна. "Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю" / Потебня Г.П., Танасієнко О.А., Лісовенко Г.С., Черемшенко Н.Л., Чехун В.Ф. (Україна); - №2001075155; Заявл. 19.07.2001; Опубл. 15.09.2003, Бюл.№9.
4. Патент №57869 Україна. "Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини" / Потебня Г.П., Лісовенко Г.С., Черемшенко Н.Л., Танасієнко О.А., Чехун В.Ф. (Україна); - №2001064158; Заявл. 15.06.2001; Опубл. 15.07.2003, Бюл.№7.
5. Патент №56348 Україна. "Штам бактерій Bacillus subtilis - продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин" / Потебня Г.П., Лісовенко Т.С., Черемшенко Н.Л., Танасієнко О.А., Чехун В.Ф.

(Україна); - №2001042565; Заявл. 17.04.2001; Опубл. 15.05.2003; Бюл.№5.

6. Патент №59472 Україна. "Спосіб одержання речовини з протипухлинною активністю" / Потебня Г.П., Танасієнко О.А., Черемшенко Н.Л., Лісовенко Г.С., Чехун В.Ф. (Україна); - №2001053528; Заявл. 25.05.2001; Опубл. 15.09.2003; Бюл.№9.

7. Соляник Г.И., Гарманчук Л.В., Пясковская О.Н., и др. Чувствительность карциномы легких Льюис к действию цисплатина существенно меняется в процессе ее роста и метастазирования. Бюл. эксп. биол. мед. 2004; 138(9): 333-6.

8. Чехун В.Ф., Тодор И.Н., Соляник Г.И. и др. Особенности окислительного фосфорилирования и энергетического статуса чувствительной и резистентной к доксорубину карциномы Герена. Эксперим. онкол. 2000; 22(4): 195-9.

9. Solyanik G.I., Pyaskovskaya O.N., Garmanchouk L.V. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion. Exp. Oncol. 2003; 25(4): 260-5.

10. Тодор И.Н., Третьובה Н.А., Ковтонуик О.В. и др. Особенности метаболизма и ультраструктуры метастазирующей карциномы легких Льюис при формировании резистентности к цисплатине.

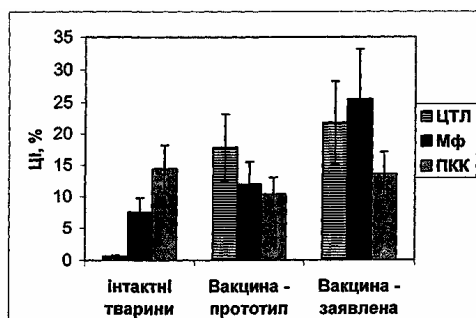
III Съезд онкологов и радиологов СНГ: материалы съезда. Минск, 25-28 мая 2004, ОДО "Тонпик", 2004; ч.1: 351.

11. Chekhun V.F., Kovtonyuk O.V., Todor I.N., Kulik G.I. Total proteolytic activity and levels of the main proteinase inhibitors in blood plasma of mice bearing Lewis lung carcinoma upon development of resistance to cisplatin. Exp. Oncol. 2005; 27(4): 286-9.

12. Chekhun V.F., Lukyanova N.Y., Urchenko O.V., Kulik G.I. The role of expression of the components of proteome in the formation of molecular profile of human ovarian carcinoma A2780 cells sensitive and resistant to cisplatin. Exp Oncol. 2005 Sep;27(3): 191-5.

13. Потебня Г.П., Скляр С.Ю., Бендюг Г.Д. та ін. Використання протипухлинної аутовакцини при комплексному лікуванні хворих на рак молочної залози. Укр. хіміотерапевтичний журнал 2003; 17(2): 48-52.

14. Зайчук В.В., Потебня Г.П., Лісовенко Г.С. та ін. Ефективність застосування протипухлинної аутовакцини в комплексному лікуванні хворих на рак молочної залози II стадії. Онкологія 2004; 6(1): 52-8.



Фіг.1. Цитотоксична активність ефektorів клітинного протипухлинного імунітету у мишей, які одержали вакцини з ХЧ КЛЛ (вакцина-прототип) та ХР КЛЛ (вакцина-заявлена) на основі ЦІІ B.subtilis B-7025.



Фіг.2. Динаміка росту ХР КЛЛ у мишей, імунізованих вакцинами, виготовленими за допомогою цитотоксичного лектину B. subtilis B-7025 з клітин ХЧ або ХР пухлини.