



УКРАЇНА

(19) UA (11) 79952 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
A61K 35/74 (2007.01)  
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) ЗАСТОСУВАННЯ MYCOBACTERIUM W ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ

1

(21) 20040705575  
(22) 10.12.2002  
(24) 10.08.2007  
(86) PCT/IB02/05516, 10.12.2002  
(31) 1167/MUM/2001  
(32) 10.12.2001  
(33) IN  
(46) 10.08.2007, Бюл. №12, 2007р.  
(72) Ххамар Бакулеш Мафатлал, IN  
(73) Ххамар Бакулеш Мафатлал, IN  
(56) GB A 2236480 10.04.1991  
US A 6056964 02.05.2000  
(57) 1. Спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що страждає на рак, лікарського препарату, що приготовлений з використанням Mycobacterium w.  
2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що є ефективним у пом'якшенні симптомів раку у пацієнта, який підлягає лікуванню.  
3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що здатний викликати регресію або навіть повністю подавити розвиток раку у пацієнта, який підлягає лікуванню.  
4. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що пацієнту, що страждає на рак, вводять лікарський препарат, в якому Mycobacterium w є вбитою Mycobacterium w.  
5. Спосіб за п. 4, який відрізняється тим, що Mycobacterium w є вбитою фізичним способом, таким як нагрівання чи опромінення, а найкраще нагріванням у вигляді обробки в автоклаві.  
6. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що пацієнту, що страждає на рак, вводять лікарський препарат, який отримують із Mycobacterium w шляхом обробки ультразвуком.  
7. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що пацієнту, що страждає на рак, вводять лікарський препарат, який отримують із Mycobacterium w шляхом екстракції.  
8. Спосіб за п. 1 або 7, який відрізняється тим, що пацієнту, що страждає на рак, вводять лікарський препарат, який отримують із Mycobacterium w шляхом екстракції органічними розчинниками.  
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1, 7 і 8, який відрізняється тим, що пацієнту, що страждає на рак, вводять лікарський препарат, який отримують екстракцією з використанням розчинника, вибраного з

2

хлороформу, етилового спирту, метилового спирту, ацетону, фенолу, ізопропілового спирту, оцтової кислоти, сечовини або гексану.

10. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що пацієнту, що страждає на рак, вводять лікарський препарат, який містить ад'юванти, які вибирають із мінеральної олії, мінеральної олії і сурфактанту, ад'юванту Рібі, Тітер-макса, допоміжної речовини синтакс, ад'юванту із солі алюмінію, абсорбованого на нітроцелюлозі антигену, імунних стимулювальних комплексів, ад'юванту Гебра, суперносія, елваксу 40w, L-тирозину, монатаніду (сполука манід-олеат), хімзасобу Ад'ю, сквалену, натрію фталіл ліпополісахариду, кальцію фосфату, сапоніну, антигену меланоми або мураміл дипептиду (МДП).

11. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що пацієнту вводять лікарський препарат, який містить сурфактант.

12. Спосіб за п. 11, який відрізняється тим, що сурфактантом є Твін 80.

13. Спосіб за п. 11 або 12, який відрізняється тим, що пацієнту вводять лікарський препарат, в якому кількість сурфактанту становить до 0,4%, а краще 0,1%.

14. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що є ефективним, коли використовується окремо чи в комбінації з іншими способами лікування раку, такими як хіміотерапія, променева терапія, хірургія.

15. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що є ефективним у покращанні якості життя пацієнта, що страждає від раку.

16. Спосіб за п. 15, який відрізняється тим, що покращання якості життя досягається як за відсутності, так і за наявності інших способів лікування раку.

17. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що є ефективним у зменшенні об'єму ракової тканини.

18. Спосіб за п. 17, який відрізняється тим, що зменшення об'єму ракової тканини досягається як за відсутності, так і за наявності інших способів лікування раку.

19. Спосіб за п. 17, який відрізняється тим, що ракова тканина може бути первинним або вторинним (метастатичним) ураженням.

20. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що додатково зменшує частоту побічних ефектів ін-

(13) C2

(11) 79952

(19) UA

ших способів протиракової терапії, таких як променева терапія й хіміотерапія.

21. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що побічними ефектами є гематологічні побічні ефекти.

22. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що побічними ефектами є лейкопенія, тромбоцитопенія, анемія, нудота, блювання, запалення слизової оболонки, діарея.

23. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що зниження частоти побічних ефектів дозволяє уникнути відстрочки хіміотерапії та/або радіотерапії.

24. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вводять препарат парентеральним шляхом.

25. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вводять препарат внутрішньом'язовим, підшкірним або інтрадермальним шляхом, переважно інтрадермальним шляхом.

26. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кількість *Mycobacterium w*, яку вводять суб'єкту за один раз, дорівнює або перевищує  $1 \times 10^5$  *Mycobacterium w*.

27. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кількість *Mycobacterium w*, яку вводять суб'єкту за один раз, дорівнює або перевищує  $1 \times 10^7$  *Mycobacterium w*.

28. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кількість *Mycobacterium w*, яку вводять суб'єкту за один раз, має переважно складати від  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{10}$  *Mycobacterium w*.

29. Застосування *Mycobacterium w* при виготовленні лікарського препарату для використання при лікуванні раку.

30. Застосування за п. 29, в якому лікарський препарат виготовляють шляхом інкорпорування цільних клітин *Mycobacterium w* та/або дезінтегрованих клітин *Mycobacterium w* та/або екстракту *Mycobacterium w*, отриманого за допомогою розчинника та/або екстракту *Mycobacterium w*, отри-

маного шляхом ферментації, разом із фармацевтично прийнятним носієм і, необов'язково, консервантом у єдиний препарат у вигляді фармацевтичної композиції, де клітини *Mycobacterium w* не є живими.

31. Застосування за п. 29 чи п. 30, в якому доза лікарського препарату, що вводиться суб'єкту за один раз, містить  $1 \times 10^5$  або більше *Mycobacterium w*, краще  $1 \times 10^7$  або більше *Mycobacterium w*, а найкраще від  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^9$  клітин *Mycobacterium w*.

32. Застосування за п. 30, в якому інкорпорують дезінтегровані клітини *Mycobacterium w*.

33. Застосування за п. 30, в якому інкорпорують екстракт *Mycobacterium w*, отриманий за допомогою розчинника.

34. Застосування за п. 30, в якому інкорпорують екстракт *Mycobacterium w*, отриманий шляхом ферментації.

35. Застосування за п. 30, в якому змішують цільні клітини *Mycobacterium w* із дезінтегрованими клітинами *Mycobacterium w* та/або екстрактом *Mycobacterium w*, отриманим за допомогою розчинника, та/або екстрактом *Mycobacterium w*, отриманим шляхом ферментації, для наступного інкорпорування.

36. Застосування за п. 30, яке **відрізняється** тим, що включає додавання ад'юванту.

37. Застосування за п. 36, яке **відрізняється** тим, що ад'ювант вибирають із мінеральної олії, мінеральної олії і сурфактанту, ад'юванту Рібі, Тітермакса, допоміжної речовини синтакс, ад'юванту із солі алюмінію; абсорбованого на нітроцелюлозі антигену, імунних стимулювальних комплексів, ад'юванту Гебра, суперносія, елваксу 40w, L-тироzinу, монотаніду (сполука манід-олеат), хімзасобу Ад'ю, сквалену, натрію фталіл ліпополісахариду, кальцію фосфату, сапоніну, антигену меланому або мураміл дипептиду (МДПТ).

Даний винахід стосується способу лікування раку.

Вважають, що рак викликається uszkodженою імунною системою. Численні спроби поліпшити імунну систему успіху не принесли. Як це не дивно, виявилось, що препарати, до складу яких входить *Mycobacterium w* і які застосовуються для поліпшення імунного статусу хворих на проказу, є корисними також у веденні раку. Вони виявляються корисними у зменшенні тяжкості хвороби й пом'якшенні симптомів, які асоціюються з раком. Ще більш дивною була їх синергія зі звичайною терапією, незважаючи на те, що в основі їх дії лежить зовсім інший механізм. Також дивним було скоріше зниження побічних ефектів інших препаратів, аніж зростання їх загальної частоти, не дивлячись на використання тих самих терапевтичних доз, і це при збільшенні ефективності лікування.

Лікування раку традиційно здійснювалось шляхом хіміотерапії разом із променевою терапією для первинної елімінації лейкемій, новоутворень і

пухлин. З іншої сторони, для видалення солідних пухлин застосовувалась хірургія. Терапія передбачає як лікувальні, так і паліативні заходи, спрямовані на одужання й зменшення страждань хворого. Імунотерапевтичні способи лікування також виявились ефективними проти обмеженого кола пухлин мезодермального походження, припускаючи, що імунна система здатна попереджувати або уповільнювати ріст пухлин в певних випадках.

Традиційно для підвищення імунітету хворих на рак використовується вакцина БЦЖ (БЦЖ = *bacillus Calmette-Guérin*; вакцина БЦЖ - це вакцина, виготовлена з культур ослаблених бичачих туберкульозних бацил, яка використовується для створення імунітету проти туберкульозу - прим, перекл.). Цей підхід не був цілком визнаний як спосіб лікування через неоднозначні результати. Єдиним визнаним застосуванням вакцини БЦЖ було лікування раку сечового міхура шляхом її внутрішньоміхурового введення. Недоліком, пов'язаним із використанням вакцини БЦЖ, є розвиток

системного й місцевого туберкульозу, спричинений БЦЖ. Це пояснюється тим, що вакцина БЦЖ містить живі організми, які можуть бути патогенними для хазяїна з порушенням імунітету.

В [патенті США №6,030,618] описаний винахід, пов'язаний з препаратами, способами та комплексами для профілактики й лікування первинного й метастатичного раків та/або інфекційних хвороб із застосуванням білків теплового шоку/стресу (hsp) - як узятих окремо, так і в комбінаціях з іншими - та антигенних молекул для посилення імунних реакцій на генотоксичні та негенотоксичні чинники, пухлини, патогени та збудники інфекцій.

В [патенті США №5,767,156] описаний спосіб стимулювання функції макрофагів, нейтрофілів та/або моноцитів у суб'єкта. Цей спосіб передбачає введення ефективної кількості вільних жирних кислот, що мають ланцюжок довжиною 18-24 атомів вуглецю з 2-6 подвійними зв'язками, і TNF (чинник некрозу пухлин -прим, перекл.), або фрагменту TNF, або GMCSF, або інтерферону гамма.

[Патент США № 6,080,725] містить посилання на вакцини, що містять один чи більше бактеріальних, вірусних чи асоційованих із пухлиною антигенів, а також один чи більше сапонін-ліпофільних кон'югатів, в якому ліофільна частина, така як ліпід, жирна кислота, PEG або терпен, ковалентно зв'язана неацильованим чи деацильованим тритерпеновим сапоніном через карбоксильну групу, наявну на 3-О-глюкуроновій кислоті тритерпенового сапоніну. Бактеріальний антиген у вакцині асоціюється з бактерією, вибраною з різноманітних груп бактерій, включаючи *Mycobacterium tuberculosis*.

[Патент США №6,221,351 В1], загалом, стосується туморицидних препаратів і способів, а більш точно суперантигенів чи ентеротоксинів, похідних від *Staphylococcus aureus*. Пептиди, гомологічні цим ентеротоксинам, включаючи токсин шокowego синдрому, стрептококові пірогенні ендотоксини, види мікоплазми і мікобактерій, допоміжні лімфоцит-стимулюючі антигени, білки теплового шоку, стресові пептиди, пептиди вірусу пухлини молочної залози, гомологічні синтетичні поліпептиди, біохімічно отримані ентеротоксини; ентеротоксини, отримані шляхом генної інженерії, та білки зрощення. Цей винахід стосується також суперантигенів, експресованих на поверхні ліпідних краплинок у препаратах типу ад'ювант-основа або експресованих на поверхні біологічних клітин як результат трансфекції геном ентеротоксину, які застосовуються, щоб викликати туморицидну реакцію у хазяїв, що є носіями пухлин. Він стосується також ентеротоксинів і споріднених сполук, які вводяться внутрішньовенно, підшкірно, як у вигляді ад'юванту, або використовуються екстракорпорально у вільній чи зв'язаній формі, щоб стимулювати імунітет, які потім вводять у тканини, що несуть пухлину.

[Патент США №6,090,385] описує спосіб лікування хворого на рак, який включає введення вказаному хворому ефективної щодо протипухлинної дії кількості щонайменше одного водорозчинного термостабільного макромолекулярного антигенного комплексу, що є інтерспецифічним для мікроор-

ганізмів із групи *Mycobacteria*, *Nocardia* і *Corynebacteria* і демонструє після електрофорезу картину імунно-електрофоретичної преципітації, яка відповідає такій антигенного комплексу 60 зі штамму *Bacillus Calmette Guerin Mycobacterium bovis* або імуногенних фрагментів такого комплексу. Цей спосіб передбачає додатковий етап введення терапевтичного препарату, специфічного щодо раку даного хворого.

В [патенті США №6,056,964] описаний спосіб уповільнення чи попередження росту або розповсюдження новоутворень молочної залози чи бронхіальних новоутворень, який включає введення суб'єкту, що потребує цього, антигенного та/або імунорегуляторного матеріалу, що містить вбиті клітини штаму NCTC 11659 *Mycobacterium vaccae* в кількості, достатній принаймні для уповільнення чи попередження росту вказаного новоутворення. Такий матеріал може вводиться шляхом інтрадермальної ін'єкції.

[Патент США №6,033,669] описує спосіб стимулювання генерації цитотоксичних Т клітин (ЦТК) у пацієнта, за яким ЦТК мають потенціал руйнувати чи ослаблювати клітини з характерною, асоційованою з хворобою структурою вуглеводів. Спосіб включає введення пацієнту ефективної дози кон'югатного комплексу пептид/вуглевод, здатної генерувати цитотоксичний Т-клітинний імунітет проти вуглеводної структури. Указана кон'югатна структура містить (1) пептидний компонент, здатний зв'язувати МНС (МНС = головний комплекс гістосумісності, прим. перекл.) молекулу класу I і (2) вуглеводний компонент з імуногенною специфічністю до вказаної вуглеводної структури, асоційованої з хворобою, що має розмір, який дає можливість Т-клітинному рецептору захоплювати епітоп (антигенна детермінанта - прим, перекл.) вказаної вуглеводної структури, асоційованої з хворобою. В цьому патенті стверджується, що описаний спосіб є ефективним у лікуванні меланоми, раку молочної залози, раку легень і раку шлунково-кишкового тракту.

Несподівано виявилось, що фармацевтичні препарати, які містять *Mycobacterium w*, є ефективними в лікуванні широкого кола онкологічних захворювань. Фармацевтичні препарати за даним винаходом можуть містити екстракти *Mycobacterium w* -окремо або в різних комбінаціях. В іншому втіленні фармацевтичний препарат за даним винаходом може містити інший імунomodлятор. Препарат може вводиться різними шляхами, включаючи інтрадермальний і оральний, та у вогнище ураження. Даний винахід стосується таких препаратів, способу їх виготовлення та застосування.

*Mycobacterium w* - це швидкоростуча мікобактерія, що не є патогеном.

*Mycobacterium w* є непатогенною, придатною для культивування, атипичною мікобактерією з біохімічними властивостями і швидкими ростовими характеристиками, що нагадує представників IV класу групи Runyons мікобактерій за метаболічними та ростовими властивостями, але не є ідентичною до тих штамів, які зараз зараховані до цієї групи. Тому можна вважати, що  $M_w$  є цілком новим

штамом. Видова приналежність  $M_w$  була встановлена за допомогою визначення послідовності ДНК у полімеразній ланцюговій реакції.

Виявилось, що вона поділяє антигени з *Mycobacterium leprae* та *Mycobacterium tuberculosis*. Вона забезпечує профілактику людей проти прокази шляхом перетворення індивідумів, негативних щодо лепроміну, на лепромін-позитивних. Встановлено також, що вона забезпечує профілактику проти туберкульозу у тварин. Було показано, що у хворих на проказу вона скорочує тривалість лікування, спрямованого на умертвіння бактерій, очищення, а також клінічного виліковування, коли застосовується в комбінації з іншими препаратами.

Згідно з даним винаходом, фармацевтична композиція, виготовлена з "*Mycobacterium w*" ( $M_w$ ), виявляється корисною у веденні раку. Зараз нами вже встановлено, що цей фармацевтичний препарат дійсно є корисним у веденні раку. Застосування препаратів, що містять *Mycobacterium w*, асоціюється зі зменшенням тягаря ракової тканини, пом'якшенням пов'язаних із раком симптомів і покращанням якості життя. Вони також поліпшують переносимість інших лікувальних засобів.

Терапевтичний препарат за цим винаходом містить *Mycobacterium w*, непатогенну, придатну для культивування, атипичну мікобактерію з біохімічними властивостями і швидкими ростовими характеристиками, що нагадує представників IV класу групи *Runyon* мікобактерій за метаболічними та ростовими властивостями, але не є ідентичною до тих штамів, які зараз зараховані до цієї групи. Тому можна вважати, що  $M_w$  є цілком новим штамом.

Видова приналежність  $M_w$  була встановлена за допомогою визначення послідовності ДНК у полімеразній ланцюговій реакції і віддиференційована від тридцяти інших видів мікобактерій. За допомогою аналізу послідовності поліморфної ділянки структури було встановлено, що  $M_w$  є унікальним видом, який відрізняється від багатьох інших відомих видів мікобактерій, таких як *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. shimoidei*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. triviale*, *M. marinum*, *M. flavescens*, *M. simian*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. asiaticum*, *M. aurum*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. fortuitum subsp. fortuitum*, *M. fortuitum subsp. Peregrinum*, *M. chelonae subsp. Chelonae*, *M. chelonae subsp. Abscessus*, *M. genavense*, *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>*, *M. paratuberculosis*.

Мета даного винаходу - це створення фармацевтичного препарату, який містить "*Mycobacterium w*" ( $M_w$ ), для лікування раку.

Інша мета даного винаходу - це створення фармацевтичного препарату, який містить "*Mycobacterium w*" ( $M_w$ ), для покращання якості життя хворих на рак.

Ще одна мета даного винаходу - це створення фармацевтичного препарату, похідного від мікобактерії *w*, що є корисним у веденні раку.

Ще одна мета даного винаходу - це створення фармацевтичного препарату, похідного від мікоба-

ктерії *w*, для пом'якшення симптомів у хворих на рак.

Ще одна мета даного винаходу - це створення фармацевтичного препарату, який знижує частоту побічних ефектів стандартної терапії, такої як хіміотерапія і променева терапія.

Ще одна мета даного винаходу - це створення фармацевтичного препарату, який містить "*Mycobacterium w*" ( $M_w$ ), що зменшує тягар ракових клітин/тканин на первинній та/або вторинній (метастатичній) стадії хвороби, чутливої та/або рефрактерної до звичайної терапії.

Ще одна мета даного винаходу - це створення фармацевтичного препарату, який поліпшує ефективність звичайної терапії.

Короткий опис малюнків

Фіг.1 показує рентгенограму не дрібноклітинного раку легень до лікування (Суб'єкт 1).

Фіг.2 показує рентгенограму не дрібноклітинного раку легень після лікування (Суб'єкт 1).

Фіг.3 показує рентгенограму не дрібноклітинного раку легень до лікування (Суб'єкт 2).

Фіг.4 показує рентгенограму не дрібноклітинного раку легень після лікування (Суб'єкт 2).

Фіг.5 демонструє зріз КТ хворого, оперованого з приводу колоректального раку з метастазом у печінку, до лікування.

Фіг.6 демонструє зріз КТ хворого, оперованого з приводу колоректального раку з метастазом у печінку, після лікування.

Відповідно до даного винаходу, в наступних прикладах будуть описані склад фармацевтичного препарату, спосіб його приготування, отримані за допомогою високоефективної рідинної хроматографії характеристики його безпечності та переносимості, способи використання та результати лікування. Ці приклади слугують тільки для ілюстрації даного винаходу і не обмежують сферу його застосування.

Приклад 1. Фармацевтичні препарати:

А. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

<i>Mycobacterium w</i> (убита нагріванням)	0,50×10 <sup>9</sup>
Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Твін 80	0,1% в/о
Тіомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

В. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

<i>Mycobacterium w</i> (убита нагріванням)	0,50×10 <sup>9</sup>
Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тритон x 100	0,1% в/о
Тіомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

С. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

<i>Mycobacterium w</i> (убита нагріванням)	0,50×10 <sup>9</sup>
Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тіомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

Д. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

Екстракт після обробки ультразвуком  $1 \times 10^{10}$  Mycobacterium w

Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тиомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

Е. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

Метанольний екстракт з  $1 \times 10^{10}$  Mycobacterium w

Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тиомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

Ф. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

Хлороформний екстракт з  $1 \times 10^{10}$  Mycobacterium w

Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тиомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

Г. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

Ацетоновий екстракт з $1 \times 10^{10}$ Mycobacterium w	
Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тиомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

Н. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

Етанольний екстракт з $1 \times 10^{10}$ Mycobacterium w	
Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тиомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

І. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

Літіказний екстракт з $1 \times 10^{10}$ Mycobacterium w	
Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тиомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

Ж. Кожна 0,1-мл доза терапевтичного препарату містить:

Мycobacterium w (убита нагріванням)	$0,50 \times 10^7$
-------------------------------------	--------------------

Екстракт з  $1 \times 10^3$  Mycobacterium w, отриманий шляхом дезінтеграції, екстракції розчинником або ферментативної екстракції

Натрію хлорид І.Ф.	0,90% в/о
Тиомерозал І.Ф. (як консервант)	0,01% в/о
Вода для ін'єкцій І.Ф. q.s. до	0,1мл

Приклад 2. Процес приготування фармацевтичного препарату

А. Культивування Mycobacterium w

і) Приготування культурального середовища

Mycobacterium w культивують на твердому середовищі, такому як середовище L J, або рідкому середовищі, такому як середовище Міддлбрука чи середовище Саутона. Для досягнення кращого виходу середовище Міддлбрука збагачують. З цією метою краще додавати глюкозу, бактотриптон і BSA (бичачий сироватковий альбумін - прим. перекл.). Їх оптимальне співвідношення становить 20:30:2.

Таке збагачене середовище додають до середовища Міддлбрука. Це робиться переважно у співвідношенні від 15:1 до 25:1, а краще у співвідношенні 20:1.

ii) Робота біореактора

а) Підготовка посудини

Внутрішні контактні частини посудини (сполучення, механічні ущільнення, канавки під кільцеві прокладки і т.п.) повинні бути ретельно очищені, щоб запобігти забрудненню. Наповнюють посудину 0,1N NaOH і залишають на 24 години для видалення пірогенних матеріалів та інших забруднень. Після цього посудину чистять спочатку підкисленою водою, потім ополіскують звичайною водою. Насамкінець посудину промивають дистильованою водою (тричі) перед приготуванням живильного середовища.

b) Стерилізація біореактора

Біореактор, що містить 9 л дистильованої води, стерилізують гострою парою (непрямою). Подібним чином біореактор стерилізують ще раз середовищем Міддлбрука. Інші деталі, такі як склянки, фільтри для вхідного й вихідного повітря і т.п., стерилізують в автоклаві (двічі) при 121°C упродовж 15 хвилин. Перед використанням їх висушують у сушильній шафі при 50°C.

с) Параметри оточуючого середовища

i) Температура:  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$

ii) pH: на початку від 6,7 до 6,8

В. Збір та концентрування

Типово це робиться в кінці 6-ого дня культивування в асептичних умовах.

Концентрування клітин (викладання) досягається шляхом центрифугування.

С. Промивання клітин

Викладені таким чином клітини промивають мінімум тричі фізіологічним розчином. Їх можна промивати і будь-якою іншою рідиною, краще ізотонічною.

D. Додавання фармацевтично прийнятного носія

До викладених клітин додають фізіологічний розчин, що не містить пірогенів. В якості фармацевтичного носія може використовуватись будь-яка інша ізотонічна рідина, що не містить пірогенів. Носій додають в такій кількості, щоб отримати бажану концентрацію активної речовини у кінцевій лікарській формі.

Е. Додавання консерванту

Консервант додають із тією метою, щоб продукт не містив інших забруднюючих бактерій упродовж всього терміну зберігання. Кращим консервантом є тиомезол, який використовується в кінцевій концентрації 0,01% в/о.

Ф. Кінцева стерилізація

Кінцева стерилізація може виконуватись різними фізичними способами, такими як нагрівання, іонізуюче опромінення чи стерильна фільтрація.

Нагрівання може здійснюватись сухим чи вологим теплом. Воно може здійснюватись також у формі кип'ятіння чи пастеризації. Краще за все обробляти готовий продукт в автоклаві.

Це можна зробити після наповнення кінцевої упаковки.

Г. Контроль якості

i. Матеріал оцінюють у відношенні чистоти й стерильності.

ii. Організми перевіряють на кислотостійкість після фарбування за Грамом.

iii. Тест на інактивацію: Цей тест виконується шляхом культивування продукту на живильному

середовищі L J із метою виявлення будь-якого живого організму.

iv. Патогенність та/або забруднення патогеном.

Культивовані організми вводять мишам Balb/c.

Жодна миша не повинна померти, і всі повинні залишитись живими і набирати вагу тіла. Не повинно бути жодних макро- чи мікроскопічних уражень у печінці, селезінці, легенях чи в будь-яких інших органах, коли тварин забивають через 8 тижнів після обробки.

v. Біохімічний тест:

Культивований організм піддають наступним біохімічним тестам:

а) Уреаза

б) Гідроліз Твіну 80

в) Ніациновий тест

г) Тест на відновлення нітрату

Культивований організм дає негативні результати в тестах на уреазу, гідроліз Твіну 80 і ніацин і позитивний результат у тесті на відновлення нітрату.

Н. Приготування складових частин *Mycobacterium w*

Складові частини *Mycobacterium w* для цілей даного винаходу можна приготувати шляхом:

I. Дезінтеграції (руйнування) клітин

II. Екстракції розчинником

III. Ферментативної екстракції

Дезінтеграцію клітин можна здійснити шляхом обробки ультразвуком, або використанням дезінтеграції під високим тиском, або прикладенням градієнту осмотичного тиску.

Для екстракції розчинником можна скористатись будь-яким органічним розчинником, таким як хлороформ, етиловий спирт, метиловий спирт, ацетон, фенол, ізопропиловий спирт, оцтова кислота, сечовина, гексан і т.п.

Для ферментативної екстракції можна скористатись ферментами, здатними перетравлювати клітинну стінку/мембрани. Типово вони є протеолітичними за своєю природою. Кращими ферментами у цьому відношенні є літіказа й проназа. Для досягнення мети даного винаходу складові частини *Mycobacterium w* можуть використовуватись окремо, замість організмів *Mycobacterium w*, або їх можна додавати до продукту, який містить *Mycobacterium w*.

Додавання клітинних складових забезпечує підвищену ефективність даного продукту.

Приклад 3. Характеристики складових частин *Mycobacterium w*, отримані за допомогою ВЕРХ

Складові частини *Mycobacterium w*, які використовуються для досягнення мети даного винаходу, при аналізі за допомогою ВЕРХ дають єдиний пік із часом утримання 11 хвилин. Ніяких інших суттєвих піків не виявляється. Цей пік є гомогенним і не має жодної вирізки, що засвідчує однорідність отриманого матеріалу.

Аналіз за допомогою ВЕРХ був здійснений на апараті для вискоефективної рідинної хроматографії системи Уотерс:

Колонка: Novapak c1860A, 4мкм,  
3,9×150мм  
Захисна колонка: Novapak c18

Температура колонки: 30°C

Швидкість потоку: 2,5мл/хв.

Об'єм інжекції: 25мкл

Мобільна фаза: Розчинник А: метиловий спирт чистоти як для ВЕРХ  
Розчинник В: метиленхлорид чистоти як для ВЕРХ

Бінарний градієнт:

Градієнт ВЕРХ спочатку складав 98% (о/о) метилового спирту (розчинник В). Цей градієнт підвищувався лінійно до 80% розчинника А і 20% розчинника В через 1 хвилину; до 35% розчинника А і 65% розчинника В через 10 хвилин, утримувався впродовж 5 секунд, після чого знижувався знову до 98% розчинника А і 2% розчинника В.

Приклад 4. Терапія раку, рефрактерного до стандартного лікування

Випадок 1:

Жінка 70-ти років, що страждала на множинну мієлому, впродовж 5 років приймала лікування малфаланом і преднізолоном. Хвороба рецидивувала з болем в кістках. Загальний стан хворої був поганим, вона була прикута до ліжка. Рівень гемоглобіну впав до 5,5г/дл. Хворій було призначено інтрадермальну ін'єкцію фармацевтичного препарату, що містить *Mycobacterium w* (тобто препарат за даним винаходом). Препарат вводили в дозі 0,1мл на ділянці дельтовидного м'яза з інтервалом в 1 тиждень. Через 3 місяці її симптоми значно пом'якшали, загальний стан поліпшився, і вона змогла стати на свої ноги. Рівень гемоглобіну зріс з 5,5 до 7,7г/дл за відсутності будь-якого специфічного лікування від анемії.

Випадок 2:

50-річна постклімактерична жінка перенесла видалення пухлини останньої молочної залози (карцинома молочної залози T<sub>4</sub>, N<sub>1</sub> M<sub>1</sub>). Пухлина була гормонально незалежною, і статус рецепторів естрогену та прогестерону був негативним. Після операції у хворої розвинулись кашель та задишка. Виявилось, що це пов'язано з великим метастатичним ураженням у її грудній клітці. До її лікування було додано фармацевтичний препарат за даним винаходом. Через 3 місяці спостерігалось суттєве покращання щодо кашлю та задишки. Рентгенограма грудної клітки / показала 25% зменшення розміру метастатичного ураження. Вміщуючий *Mycobacterium w* фармацевтичний препарат за даним винаходом вводився інтрадермально на ділянці дельтовидного м'яза.

Випадок 3:

Чоловік 68-річного віку, що страждав на карциному середньої третини стравоходу, прийняв променеву терапію і знаходився на хіміотерапії (один курс був завершений). Через прогресування хвороби у нього розвинулась дисфагія (утруднене ковтання - прим, перекл.). В нього також була нейтропенія з падінням загальної кількості лейкоцитів. Хворому було призначене лікування фармацевтичним препаратом за даним винаходом. Воно привело до поступового покращання симптомів. Через 3 місяці ковтання нормалізувалось, загальний стан покращився, кількість лейкоцитів стала нормаль-

ною. Фармацевтичний препарат за цим винаходом вводили в дозі 0,1мл один раз на тиждень. З другою дозою вийшла затримка, і її було введено через 15 днів після першої. Вона складала 0,3мл замість 0,1мл.

У випадках 1 і 3 покращання спостерігалось, не дивлячись на відсутність хіміотерапії, тоді як у випадку 2 хіміотерапія (FAC) продовжувалась.

Таким чином, ці випадки показують, що фармацевтичний препарат, який містить *Mycobacterium w* ( $M_w$ ), за даним винаходом є корисним у лікуванні раку, рефрактерного до стандартної терапії. Його застосування асоціюється з пом'якшенням симптомів, покращанням загального самопочуття і якості життя, а також поліпшенням інших супутніх станів, таких як анемія і нейтропенія.

Приклад 5. Дія фармацевтичного препарату на рак, коли він використовується як монотерапія

Поверхневий рак сечового міхура маніфестує себе як гематурія. Він піддається різним формам терапії. Препарати, які застосовуються для досягнення ремісії, наприклад, доксорубіцин або БЦЖ, вводяться внутрішньоміхурово.

Чотирьом пацієнтам із поверхневим раком сечового міхура, діагностованим цистоскопічно, фармацевтичний препарат за даним винаходом був призначений інтрадермально. Доза 0,1мл вводилась один раз на місяць. Через 6 місяців (після двох ін'єкцій) симптоми зникли у всіх пацієнтів. Вісім тижнів по тому була виконана цистоскопія. Результат вразив - в жодному випадку не було виявлено будь-якого ураження сечового міхура. Наступне спостереження впродовж 6 місяців не виявило жодного випадку повернення симптомів. Цистоскопія показала нормальну слизову оболонку сечового міхура за відсутністю будь-яких уражень.

Ці дані засвідчують, що фармацевтичний препарат, який містить *Mycobacterium w* ( $M_w$ ), за даним винаходом є ефективною терапією у веденні раку сечового міхура, коли вводиться інтрадермально на ділянці дельтовидного м'яза.

Приклад 6. Дія *Mycobacterium w*, коли променева терапія є неадекватною

М'язовий інвазивний рак сечового міхура

М'язовий інвазивний рак сечового міхура (T<sub>4</sub>) можна лікувати шляхом радикальної цистектомії. Однак було б бажано зберегти сечовий міхур. Променева терапія та/або хіміотерапія є недостатніми для досягнення місцевого контролю/ремісії хвороби.

П'ять пацієнтів із м'язовим інвазивним раком сечового міхура лікувались інтрадермальними ін'єкціями *Mycobacterium w* на ділянках обох дельтовидних м'язів. Інтрадермальну ін'єкцію *Mycobacterium w* повторювали щомісяця на ділянці одного з дельтовидних м'язів упродовж 6 місяців. Усі пацієнти отримали стандартну променеву терапію в загальній дозі 71gy.

В кінці двомісячного періоду всі пацієнти звільнились від симптомів хвороби. Цистоскопія і комп'ютеризована аксіальна томографія (КТ зріз) не виявили будь-якого ураження сечового міхура, засвідчуючи повну ремісію хвороби. Наступне спо-

стереження впродовж щонайменше 8 місяців від початку лікування не виявило повернення хвороби у жодному випадку.

Отже *Mycobacterium w* є ефективним засобом для досягнення повної ремісії і її підтримування.

У жодного з цих пацієнтів не спостерігалось будь-яких побічних ефектів.

Приклад 7. Дія *Mycobacterium w*, коли хіміотерапія є неадекватною

Не дрібноклітинний рак легень

Не дрібноклітинний рак легень важко піддається лікуванню. Звичайно він не реагує відчутно на хіміотерапію чи променеву терапію. Частота реакції зворотно пропорційна стадії захворювання. На стадії T<sub>4</sub> хірургічне втручання не є показаним, а хіміотерапія та/або променева терапія ледве мають якусь дію; ця стадія несе поганий прогноз.

Таким чином, дані цього дослідження засвідчують, що *Mycobacterium w* має суттєвий вплив на рак, який важко піддається лікуванню.

Приклад 8. Вплив лікування з включенням *Mycobacterium w* на якість життя і побічні ефекти хіміотерапії

а) Карцинома молочної залози з метастазами в кістку

Дія *Mycobacterium w* оцінювалась в контрольному дослідженні за участю 20 пацієнтів із раком молочної залози й метастазами в кістку. Усі пацієнти отримали хіміотерапію у вигляді циклофосфаміду, адриаміцину і 5-фторурацилу. Препарати, що містять *Mycobacterium w*, вводили шляхом інтрадермальних ін'єкцій об'ємом 0,1мл один раз на тиждень впродовж двох місяців, потім кожних 15 днів упродовж наступних двох місяців, а потім один раз на місяць упродовж останніх двох місяців лікування (всього 6 місяців). Десятеро з цих 20 пацієнтів, вибраних випадково, приймали препарат за даним винаходом, тоді як решта слугувала контролем.

У жодного з пацієнтів основної групи не спостерігалось діареї чи блювання, порівняно з 8 з 10 пацієнтів у контрольній групі. Мукозит спостерігався у 1 пацієнта в основній групі проти 5 пацієнтів у контрольній групі. Пригнічення кісткового мозку, яке проявлялось лейкопенією, тромбоцитопенією та анемією, спостерігалось у 2 пацієнтів в основній групі проти 6 у контрольній. Збільшення ваги тіла було зареєстроване у 3 пацієнтів в основній групі, чого не спостерігалось у жодного пацієнта в контрольній групі. В основній групі всі пацієнти відмітили покращання якості життя, в контрольній групі цього не відмітив жодний з пацієнтів.

б) Рак голови й шиї

Дія *Mycobacterium w* оцінювалась в контрольному дослідженні за участю 20 пацієнтів із гістологічно підтвердженим, просунутим раком голови й шиї, що мали щонайменше 6-місячну очікувану тривалість життя. Усі ці пацієнти отримали хіміотерапію у складі цисплатину і 5-фторурацилу. *Mycobacterium w* вводили 10 із цих 20 пацієнтів, вибраних випадково, шляхом інтрадермальних ін'єкцій об'ємом 0,1мл на ділянці дельтовидного м'яза один раз на 15 днів упродовж трьох місяців. Перша доза вводилась об'ємом

0,2мл, розділених на дві ділянки дельтовидних м'язів.

Хіміотерапія спричинила гематологічні побічні ефекти, які змусили відкласти хіміотерапію у 2 з 10 пацієнтів основної групи та у 5 з 10 пацієнтів контрольної групи.

Мукозит проявився на 15-тий день після хіміотерапії у 2 пацієнтів в основній групі та у 6 пацієнтів у контрольній групі.

Нудота/блювання спостерігались у всіх пацієнтів контрольної групи, тоді як в основній групі цього не було у жодного з пацієнтів.

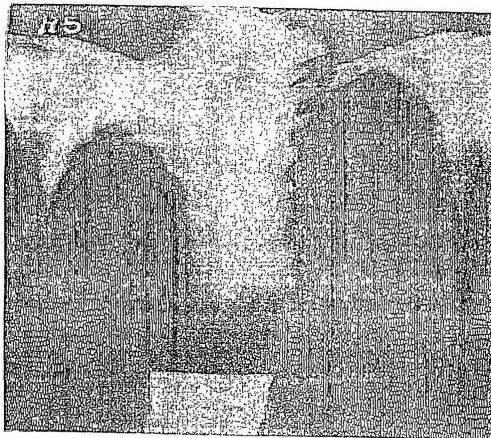
Таким чином, застосування *Mycobacterium* w було корисним із точки зору пом'якшення побічних ефектів хіміотерапії.

Приклад 9. Застосування *Mycobacterium* w у термінально хворих на рак пацієнтів

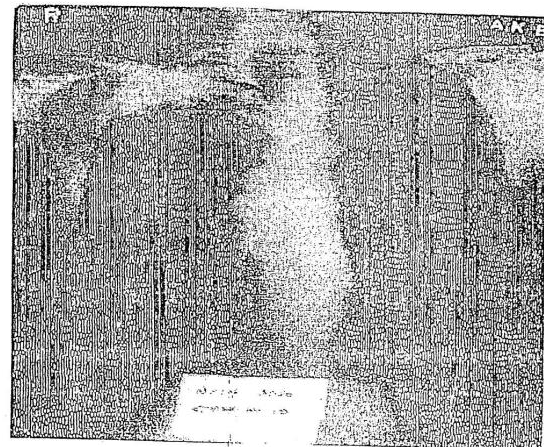
65-річному чоловікові був поставлений діагноз карциноми підшлункової залози з метастазами в печінку й легені. Було прийнято рішення, що це термінально хворий з невиліковним раком, і йому

не було запропоновано жодного лікування. У хворого розвинулись екстенсивний кашель і задишка, він втратив здатність спати. Цьому пацієнту вводили *Mycobacterium* w в дозі 0,3мл інтрадермально 1 раз на два тижні. В межах 10 днів кашель був подоланий, і загальний стан показував покращання. Хворий почав сам виконувати всю свою звичайну роботу, до нього повернувся нормальний сон. Коли з якихось причин введення *Mycobacterium* w затримувалось більш ніж на 4 дні, то звичайно спостерігалось повернення кашлю і розладу сну. Цей хворий прожив 14 тижнів після лікування і помер природною смертю. Рентгенограми грудної клітки до лікування і після 2 місяців лікування показали певне покращання ураження. Весь цей час хворий не приймав жодної іншої терапії.

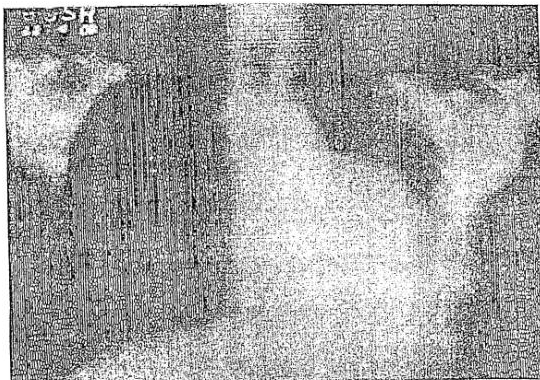
Отже *Mycobacterium* w була корисною у пом'якшенні симптомів у термінально хворого пацієнта на рак.



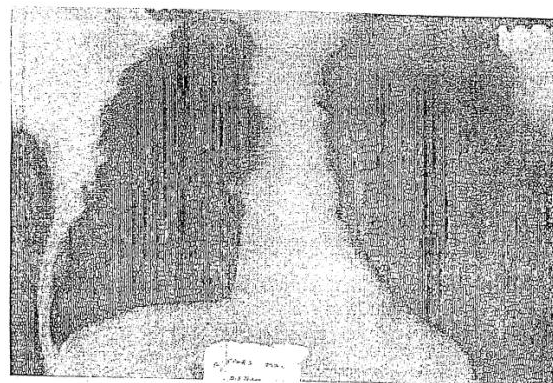
ФІГ. 1



ФІГ. 2

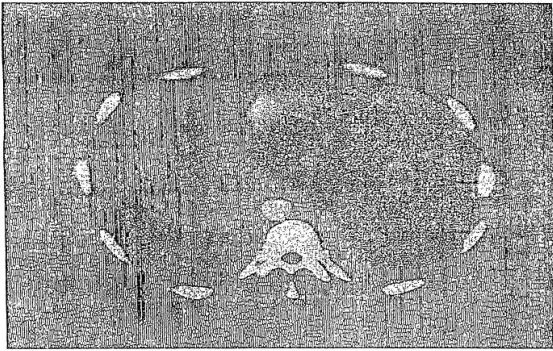


ФІГ. 3

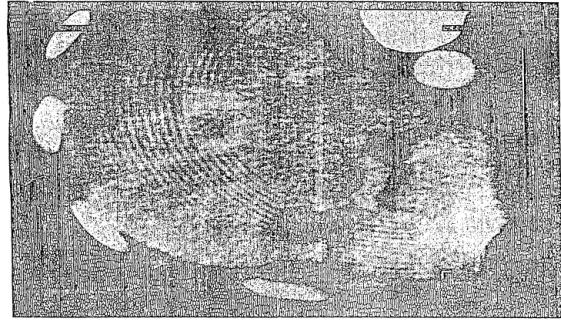


ФІГ. 4





ФІГ. 5



ФІГ. 6