



(51) МПК  
*A61K 35/74* (2015.01)  
*A61K 38/43* (2006.01)  
*A61K 39/07* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014140172/15, 06.10.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 06.10.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.10.2014

(45) Опубликовано: 20.12.2015 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 5,194,257 A, 16.03.1993. **NOBARTH K., et al., Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. Eur Urol. 1992;21(3):206-10. US 2007/0185069 A1, 09.08.2007. JACOBSEN F., Increase of the in vitro complement-dependent cytotoxicity against autologous invasive human bladder tumor cells by** (см. прод.)

Адрес для переписки:

119270, Москва, Фрунзенская наб., 38/1, кв. 136,  
 Коваленко В.В.

(72) Автор(ы):

Должикова Инна Вадимовна (RU),  
 Логунов Денис Юрьевич (RU),  
 Артемичева Наталья Михайловна (RU),  
 Тухватулин Амир Ильдарович (RU),  
 Джаруллаева Алина Шахмировна (RU),  
 Филиппова Наталья Евгеньевна (RU),  
 Народицкий Борис Савельевич (RU),  
 Гинцбург Александр Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи") (RU)

(54) ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ НА ОСНОВЕ БЦЖ И СПОСОБ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается иммунобиологического средства для лечения рака мочевого пузыря на основе БЦЖ, дополнительно содержащего фермент или ферменты с обеспечением расщепления секрета слизистой оболочки мочевого пузыря и буфер, взятые в терапевтически эффективном соотношении. Группа изобретений также касается

способа использования иммунобиологического средства для лечения рака мочевого пузыря, заключающегося во введении указанного иммунобиологического средства в мочевой пузырь. Группа изобретений обеспечивает увеличение эффективности проникновения БЦЖ в клетки слизистой слоя мочевого пузыря. 2 н. и 12 з.п. ф-лы, 9 пр., 5 ил., 7 табл.

(56) (продолжение):

neuraminidase treatment. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C. 1982 Jun;90(3):187-92.

RU 2 571 822 С1

С1 2 571 822 RU



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 35/74* (2015.01)  
*A61K 38/43* (2006.01)  
*A61K 39/07* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2014140172/15, 06.10.2014**  
(24) Effective date for property rights:  
**06.10.2014**  
Priority:  
(22) Date of filing: **06.10.2014**  
(45) Date of publication: **20.12.2015** Bull. № **35**  
Mail address:  
**119270, Moskva, Frunzenskaja nab., 38/1, kv. 136,  
Kovalenko V.V.**

(72) Inventor(s):  
**Dolzhikova Inna Vadimovna (RU),  
Logunov Denis Jur'evich (RU),  
Artemicheva Natal'ja Michajlovna (RU),  
Tukhvatulin Amir Il'darovich (RU),  
Dzharullaeva Alina Shakhmirovna (RU),  
Filippova Natal'ja Evgen'evna (RU),  
Naroditskij Boris Savel'evich (RU),  
Gintsburg Aleksandr Leonidovich (RU)**  
(73) Proprietor(s):  
**federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie "Federal'nyj nauchno-  
issledovatel'skij tsentr ehpidemiologii i  
mikrobiologii imeni pochetnogo akademika N.F.  
Gamalei" Ministerstva zdravookhraneniya  
Rossijskoj Federatsii (FGBU "FNITsEhM im.  
N.F.Gamalei") (RU)**

(54) **BCG-BASED IMMUNOBIOLOGICAL MEDICATION FOR URINARY BLADDER CANCER THERAPY AND METHOD FOR THEREOF APPLICATION**

(57) Abstract:  
FIELD: medicine.  
SUBSTANCE: group of inventions deals with BCG-based immunobiological medication of treating urinary bladder cancer, which additionally contains enzyme or enzymes with provision of cleavage of secretion of urinary bladder mucosa membrane and buffer, taken in therapeutically effective ratio. Group of inventions also

deals with method for application of immunobiological medication for treating urinary bladder cancer, consisting in introduction of said immunobiological medication into urinary bladder.  
EFFECT: increased efficiency of BCG penetration into cells of urinary bladder mucous layer.  
14 cl, 9 ex, 5 dwg, 7 tbl

**C 1**  
**2 5 7 1 8 2 2**  
**R U**

**R U**  
**2 5 7 1 8 2 2**  
**C 1**

## Область техники

Изобретение относится к препаратам, созданным на основе вакцин для использования их в онкоурологии, и может быть использовано для терапии рака мочевого пузыря, а также для профилактики рецидивов рака мочевого пузыря после оперативного лечения.

## 5 Предшествующий уровень техники

В настоящее время рак мочевого пузыря (РМП) по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) является одной из самых распространенных форм рака в мире. Частота встречаемости РМП среди опухолей различных локализаций составляет от 3 до 5%. Ежегодно в России рак мочевого пузыря диагностируется у 11-15 тысяч людей, при этом более 7 тысяч людей погибают.

10 Известно, что основным методом лечения РМП является трансуретальная резекция (ТУР) опухоли (в кн.: «Современная диагностика и хирургия рака мочевого пузыря» / Под ред. Когана М.И. и Перепечай В.А. - Изд-во РГМУ, г. Ростов-на-Дону, 2002 г. - С. 61-66), однако у большинства больных (более 60%) возникают рецидивы и РМП 15 начинает прогрессировать заново, на большей глубине инвазии и с более агрессивным течением.

Одной из важнейших задач современной онкоурологии является поиск методов, которые бы позволили улучшить результаты оперативного лечения.

Известен способ лечения РМП, в котором авторы предлагают проводить 20 послеоперационную иммунопрофилактику различными противоопухолевыми препаратами и химиопрепаратами после оперативного удаления опухоли (Матвеев Б.П., Фигурин К.М. и Карякин О.Б. "Рак мочевого пузыря", Москва, 2001 г.). Однако недостатком указанного метода является зависимость эффективности лечения от дозы иммуномодуляторов, а также высокая токсичность химиопрепаратов, которые 25 действуют на стенку мочевого пузыря. Также к недостаткам метода можно отнести относительно низкую эффективность проникновения иммуномодуляторов и химиопрепаратов через слизистый слой мочевого пузыря.

Известно решение (патент РФ № RU 2290096), при котором предлагается способ 30 введения химиопрепаратов с помощью микроирригаторов, которые вшивают в подслизистый слой мочевого пузыря пациентов после оперативного вмешательства. Данный способ позволяет уменьшить общую токсичность химиопрепаратов за счет локального введения, однако имеет недостаток, связанный с высокой травматичностью метода, поскольку требует дополнительного оперативного вмешательства для удаления микроирригаторов.

35 Известно решение согласно клиническим исследованиям компании Halozyme Therapeutics, Inc. № HZ2-08-01 (вторичный № NCT00782587), где заявлено использование гиалуронидазы совместно с химиопрепаратом митомицином С, которые вводятся в мочевой пузырь после трансуретальной резекции неинвазивной опухоли. В данном случае гиалуронидаза используется для повышения эффективности проникновения 40 противоопухолевого антибиотика в клетки мочевого пузыря. Авторы отмечают снижение рецидивов, представленных только неинвазивными опухолями мочевого пузыря, в течение первого года с 50% (при обработке только митомицином С) до 30% (при совместной обработке митомицином С и гиалуронидазой).

Известно решение (патент US 8,273,721 B2), в котором предлагается способ 45 использования препарата вальрубицина совместно с ферментами, разрушающими слизь (трипсин и гиалуронидаза). В указанном решении ферменты, разрушающие слизь мочевого пузыря, используются для повышения эффективности проникновения противоопухолевого препарата вальрубицина в клетки мочевого пузыря.

Известно также решение по патенту US 5194257, где заявлено использование бактерий Кальмета-Герена (БЦЖ), которые вводятся в мочевой пузырь после оперативного удаления опухоли. Данное решение основывается на том, что БЦЖ является мощным неспецифическим иммуностимулятором, вызывающим комплекс локальных иммунных реакций, в котором задействованы Т- и В-лимфоциты, макрофаги и целый ряд цитотоксических цитокинов, что обеспечивает ее противоопухолевую активность.

Данное техническое решение как наиболее близкое к заявляемому по составу действующего вещества и способу его использования выбрано авторами заявляемого изобретения за прототип.

К недостаткам прототипа можно отнести следующее:

1) Низкая эффективность проникновения БЦЖ в уротелий мочевого пузыря при внутривезикулярном введении.

2) Относительно низкая иммуностимулирующая активность, требующая введения высоких доз БЦЖ, что приводит к увеличению токсичности.

Таким образом, в уровне техники существует острая потребность в разработке эффективного иммунобиологического средства для лечения рака мочевого пузыря вообще, а также после оперативного удаления опухолей, которое было бы лишено указанных недостатков.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание иммунобиологического средства для терапии рака мочевого пузыря на основе БЦЖ, которое способно высокоэффективно проникать в уротелий мочевого пузыря через секрет слизистого слоя, в то же время иммунобиологическое средство должно обладать высокой иммуностимулирующей активностью.

Задача решается за счет создания нового иммунобиологического средства. Сущность созданного иммунобиологического средства для лечения рака мочевого пузыря на основе БЦЖ состоит в том, что оно дополнительно содержит фермент с обеспечением расщепления секрета слизистой оболочки мочевого пузыря и буфер, взятые в терапевтически эффективном соотношении. При этом в иммунобиологическом средстве в качестве фермента используют гиалуронидазу, или нейраминидазу, или гиалуронидазу и нейраминидазу. В иммунобиологическом средстве в дозе на одну инсталляцию в мочевой пузырь содержится:

БЦЖ - от  $10^3$  КОЕ/дозу до  $10^{10}$  КОЕ/дозу;

Фермент, расщепляющий секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, а именно:

гиалуронидазы от 1 до 100000 единиц/дозу;

нейраминидазы от 0,001 до 100 единиц/дозу;

или их смесь в любых соотношениях;

Буфер - остальное.

Способ использования иммунобиологического средства для лечения рака мочевого пузыря заключается во введении заявленного иммунобиологического средства в мочевой пузырь. При этом в мочевой пузырь вводится только иммунобиологическое средство. Или в мочевой пузырь предварительно вводится фермент, расщепляющий секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в заявленном для иммунобиологического средства количестве, а затем иммунобиологическое средство. Указанный способ используют у пациента, страдающего раком мочевого пузыря. При этом указанный способ используют для лечения пациента, страдающего раком мочевого пузыря, самостоятельно, без хирургического вмешательства, или после трансуретальной резекции рака мочевого пузыря. При введении фермента перед введением иммунобиологического средства в

качестве фермента, расщепляющего секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, используют гиалуронидазу, или нейраминидазу, или гиалуронидазу и нейраминидазу.

#### Раскрытие изобретения

5 Указанная выше задача настоящего изобретения решается за счет того, что создано иммунобиологическое средство для лечения рака мочевого пузыря на основе БЦЖ, при этом данное иммунобиологическое средство дополнительно включает фермент(ы), расщепляющий(ие) полисахариды секрета слизистого слоя мочевого пузыря. Также разработан комбинированный способ лечения мочевого пузыря, позволяющий решить

10 В качестве ферментов используют гиалуронидазу, нейраминидазу или их композиции. При этом 1 терапевтическая доза препарата включает:

БЦЖ - от  $10^3$  КОЕ/дозу до  $10^{10}$  КОЕ/дозу

Гиалуронидазу от 1 до 100000 условных единиц активности (УЕ)

15 Нейраминидазу от 0,001 до 100 Международных единиц активности (МЕ)

Буфер - остальное.

Заявленное иммунобиологическое средство используют в эффективном количестве для терапии рака мочевого пузыря.

20 Противоопухолевое действие БЦЖ связано с тем, что она обладает иммуностимулирующими свойствами. Известно, что в состав данных бактерий входят структуры, которые являются лигандами рецепторов врожденной иммунной системы (TLR4, TLR5 и др.). Взаимодействие компонентов БЦЖ с данными рецепторами приводит к активации различных транскрипционных факторов (например, транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B), контролирующей экспрессию целого ряда провоспалительных молекул.

25 Так, было показано, что введение БЦЖ усиливает экспрессию адгезионных и костимуляторных молекул, включая внутриклеточные адгезионные молекулы ICAM-1, которые влияют на связывание Т-лимфоцитов и нейтрофилов с опухолевыми клетками. Также есть литературные данные, указывающие на то, что при введении данных бактерий увеличивается экспрессия HLAII, CD80, CD1b молекул, происходит индукция

30 экспрессии ряда цитокинов, таких как интерлейкин-8 (ИЛ-8), интерлейкин-6 (ИЛ-6), фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ), гранулоцитарно-макрофагальный фактор роста (GM-CSF).

Актуальной проблемой, ограничивающей использование БЦЖ-вакцины для лечения опухолевых образований в мочевом пузыре, является низкая эффективность их

35 проникновения через секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, состоящий из гликозамингликанов. Для более эффективной доставки различных веществ в клетки мочевого пузыря необходимо хотя бы частично разрушить секрет слизистой оболочки. Данная проблема решается в заявляемом иммунобиологическом средстве за счет

40 включения в его состав ферментов или их композиций (гиалуронидаза, нейраминидаза), которые расщепляют секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, тем самым способствуя прикреплению и проникновению БЦЖ в клетки мочевого пузыря. Так гиалуронидаза расщепляет кислые мукополисахариды (в т.ч. муцин, гиалуроновую кислоту, хондроитин-сульфат, дерматан-сульфат, которые входят в состав секрета

45 слизистой оболочки мочевого пузыря). Нейраминидаза гидролизует сиаловые кислоты в олигосахаридах, гликопротеинах, гликолипидах, что также способствует проникновению БЦЖ через слизистый слой мочевого пузыря, богатый сиаловой кислотой.

Более того, известно, что при развитии рака любой этиологии опухолевые клетки

имеют более выраженный гликокаликс по сравнению с нормальными клетками, что приводит к снижению эффективности распознавания таких клеток иммунной системой, а также снижению эффективности доставки различных препаратов внутрь этих клеток. Известно решение (патент US 6,977,169 B2), где предлагается использовать

5 периодические введения раствора нейраминидазы для лечения широкого спектра новообразований, что способствует частичной деградции гликокаликса опуолевых клеток и повышению эффективности распознавания таких клеток иммунной системой.

Исследования, показывающие эффективность иммунобиологического средства, разработанного авторами, включают: оценку эффективности проникновения БЦЖ в

10 клетки мочевого пузыря; оценку влияния схем введения иммунобиологического средства на эффективность проникновения БЦЖ в клетки мочевого пузыря; сравнительный анализ способности индуцировать иммунные реакции; оценку противоопухолевой активности и токсичности.

Краткое описание чертежей

15 На фиг. 1 представлена гистограмма, показывающая изменение титра КОЕ БЦЖ в клетках RT-4 при добавлении к ним иммунобиологического средства, содержащего различное количество ферментов, расщепляющих секрет слизистого слоя мочевого пузыря: гиалуронидазы и нейраминидазы.

Ось ординат - титр КОЕ БЦЖ.

20 Ось абсцисс - концентрация гиалуронидазы (УЕ/дозу).

Ось аппликат - концентрация нейраминидазы (МЕ/дозу).

На фиг. 2 представлена гистограмма, показывающая изменение концентрации цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-13, ФНОальфа, ИФНгамма в клетках RT-4 при добавлении иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ.

25 Ось ординат - концентрация цитокинов, пг/мл.

Ось абсцисс: 1 - ИЛ-2, 2 - ИЛ-6, 3 - ИЛ-8, 4 - ИЛ-13, 5 - ФНО альфа, 6 - гамма интерферон.

 - Фосфатный буфер

30  - БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу

 - БЦЖ в количестве  $10^{11}$  КОЕ/дозу

 - Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), при этом оно включает фермент гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу

35  - Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), при этом оно включает фермент нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу

40  - Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), при этом оно включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу

На фиг. 3 представлена схема исследования противоопухолевой активности иммунобиологического средства на основе БЦЖ. По оси абсцисс указано время от начала эксперимента (дни),

45 А - введение клеток рака мочевого пузыря мыши MB49,

В - введение стандартной вакцины БЦЖ,

С - введение иммунобиологического средства на основе БЦЖ, в качестве фермента используют гиалуронидазу,

Д - введение иммунобиологического средства основе БЦЖ, в качестве фермента

используют нейраминидазу,

Е - введение иммунобиологического средства на основе БЦЖ, отличающейся тем, что в качестве фермента используют гиалуронидазу и нейраминидазу,

Ф - введение физиологического раствора.

5 На фиг. 4 представлены результаты исследования противоопухолевой активности иммунобиологического средства.

По оси абсцисс указано время от начала эксперимента (дни), по оси ординат - выживаемость животных (%),

1 - БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу,

10 2 - иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, при этом в качестве фермента используют гиалуронидазу,

3 - иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, при этом в качестве фермента используют нейраминидазу,

15 4 - иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, при этом в качестве фермента используют гиалуронидазу и нейраминидазу,

5 - физиологический раствор.

На фиг. 5 представлена схема введения препаратов в исследовании влияния различных схем введения на эффективность проникновения БЦЖ в клетки мочевого пузыря.

По оси абсцисс указано время (минуты) введения препаратов,

20 А - введение стандартной вакцины БЦЖ,

В - введение иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ, при этом она включает ферменты гиалуронидазу и нейраминидазу, С - введение смеси ферментов гиалуронидазы и нейраминидазы.

Примеры осуществления настоящего изобретения

25 Пример 1

Определение эффективных доз ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в составе разрабатываемого иммунобиологического средства на основе БЦЖ.

30 Поскольку одной из основных проблем использования БЦЖ-вакцины для лечения опухолевых новообразований в мочевом пузыре является низкая эффективность проникновения бактерий в подслизистый слой, целью данного эксперимента было определение доз ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в составе разрабатываемого иммунобиологического средства (на основе БЦЖ) по способности БЦЖ проникать в обработанные ферментами опухолевые клетки мочевого пузыря в условиях *in vitro*. Для этого были использованы клетки рака мочевого пузыря человека RT-4, т.к. известно, что эти клетки обладают весьма выраженным гликокаликсом, сходным по своему составу и структуре с секретом слизистого слоя мочевого пузыря. Клетки культивировали на минимальной ростовой среде DMEM с 35 10% эмбриональной телячьей сывороткой и в присутствии необходимого количества заменимых и незаменимых аминокислот, при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  и содержании  $\text{CO}_2$  5%.

40 Далее клетки помещали на 48-луночный планшет в концентрации  $4 \times 10^4$  клеток/лунку и инкубировали 16 часов (до конфлюентности 70-80%).

45 Далее был получен ряд иммунобиологических средств на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), гиалуронидазы (в следующих концентрациях: 1 УЕ/дозу, 10 УЕ/дозу, 100 УЕ/дозу, 1000 УЕ/дозу, 10000 УЕ/дозу, 100000 УЕ/дозу, 1000000 УЕ/дозу) и нейраминидазы (в следующих концентрациях: 0,001 МЕ/дозу, 0,01 МЕ/дозу, 0,1 МЕ/дозу, 1 МЕ/дозу, 10 МЕ/дозу, 100 МЕ/дозу, 1000 МЕ/дозу). Под дозой понимается

количество препарата, предназначенное для единовременного (за 1 инсталляцию) введения в мочевой пузырь. Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевой пузырь, составляет 50 мл (инструкции к препаратам «Иммурон-вак», «Уро-БЦЖ медак»). Поскольку иммунобиологическое средство содержит живые бактериальные клетки, для разведения может быть использован любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае нами использовался физиологический раствор.

После разведения иммунобиологического средства 20 мкл из каждого образца было добавлено в соответствующие лунки планшета. Через три часа после добавления иммунобиологического средства клетки промывали трижды ростовой средой, чтобы избавиться от неприкрепившихся бактерий, и заливали свежей ростовой средой. Далее клетки инкубировали 18 часов. Затем клетки снимали с планшета, гомогенизировали с помощью керамических бус, готовили разведения и высевали на плотные питательные среды Левенштейна-Иенсена для определения титра КОЕ БЦЖ.

В таблице 1 представлены результаты анализа титра КОЕ БЦЖ, полученные с помощью высева гомогенатов клеток RT-4, обработанных различными иммунобиологическими средствами на основе БЦЖ, отличающимися концентрациями ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря.

Таблица 1

		Концентрация гиалуронидазы (УЕ/дозу)							
		0	1	10	100	1000	10000	100000	1000000
Концентрация нейраминидазы (МЕ/дозу)	0	100	110	150	450	3000	5000	7000	10000
	0,001	100	110	145	500	3000	5000	7000	10000
	0,01	100	110	160	500	3000	5200	7000	10000
	0,1	120	150	200	650	3200	5500	7800	10500
	1	300	350	400	1000	4000	6000	8500	11000
	10	700	900	1500	2000	5700	8000	10000	12000
	100	1600	2100	2000	2400	6800	10000	12000	14000
	1000	2800	2900	3400	4100	7600	11000	13000	15000

Для наглядности полученные данные представлены также в виде трехмерной гистограммы (см. фиг. 1), где ось ординат - титр КОЕ БЦЖ, ось абсцисс - концентрация гиалуронидазы (УЕ/дозу), ось аппликат - концентрация нейраминидазы (МЕ/дозу).

Как видно из представленных данных, эффективность проникновения БЦЖ в опухолевые клетки рака мочевого пузыря человека RT-4 значительно выше при использовании иммунобиологического средства на основе БЦЖ в диапазоне концентраций гиалуронидазы от 100 до 1000000 УЕ/дозу и нейраминидазы от 1 до 1000 МЕ/дозу, чем при использовании стандартной вакцины БЦЖ.

#### Пример 2

Определение эффективных доз БЦЖ в составе разрабатываемого иммунобиологического средства на основе БЦЖ.

Целью данного эксперимента являлось определение эффективных доз БЦЖ в составе разрабатываемого иммунобиологического средства. Для этого были использованы

клетки рака мочевого пузыря человека RT-4, т.к. известно, что эти клетки обладают весьма выраженным гликокаликсом, сходным по своему составу и структуре с секретом слизистого слоя мочевого пузыря. Клетки культивировали на минимальной ростовой среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и в присутствии необходимого количества заменимых и незаменимых аминокислот, при температуре 37°C и содержании CO<sub>2</sub> 5%. Далее клетки помещали на 48-луночный планшет в концентрации 4×10<sup>4</sup> клеток/лунку и инкубировали 16 часов (до конфлюентности 70-80%). Для исследования были выбраны дозы ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, которые лежат в середине исследованного в примере 1 рабочего диапазона концентраций: гиалуронидаза - 10000 УЕ/дозу, нейраминидаза - 10 УЕ/дозу.

Далее был получен ряд иммунобиологических средств на основе вакцины БЦЖ (в следующих концентрациях: 10<sup>3</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>4</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>5</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>6</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>7</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>8</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>9</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>10</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>11</sup> КОЕ/дозу), гиалуронидазы (10000 УЕ/дозу) и нейраминидазы (10 МЕ/дозу). В качестве контроля использовали вакцину БЦЖ в концентрациях: 10<sup>3</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>4</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>5</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>6</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>7</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>8</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>9</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>10</sup> КОЕ/дозу, 10<sup>11</sup> КОЕ/дозу. Под дозой понимается количество препарата, предназначенное для единовременного (за 1 инсталляцию) введения в мочевой пузырь. Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевой пузырь, составляет 50 мл (инструкции к препаратам «Иммурон-вак», «Уро-БЦЖ медак»). Поскольку иммунобиологическое средство содержит живые бактериальные клетки, для разведения можно использовать любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае нами использовался физиологический раствор.

После разведения иммунобиологического средства и вакцины БЦЖ, 20 мкл из каждого образца было добавлено в соответствующие лунки планшета. Через три часа после добавления иммунобиологического средства клетки промывали трижды ростовой средой, чтобы избавиться от неприкрепившихся бактерий, и заливали свежей ростовой средой.

Далее клетки инкубировали 18 часов. Затем клетки снимали с планшета, гомогенизировали с помощью керамических бус, готовили разведения и высевали на плотные питательные среды Левенштейна-Иенсена для определения титра КОЕ БЦЖ. В таблице 2 представлены результаты анализа титра КОЕ БЦЖ, полученные с помощью высева гомогенатов клеток RT-4, обработанных различными иммунобиологическими средствами на основе БЦЖ, отличающимися концентрациями БЦЖ.

40

45

Таблица 2

Концентрация БЦЖ, КОЕ/дозу	Титр КОЕ БЦЖ	
	Иммунобиологическое средство	Вакцина БЦЖ
	$10^3$	0
$10^4$	2	0
$10^5$	10	0
$10^6$	90	2
$10^7$	850	15
$10^8$	7 500	100
$10^9$	89 000	900
$10^{10}$	420 000	3 800
$10^{11}$	610 000	9 200

Как видно из представленных в таблице 2 данных, эффективность проникновения БЦЖ в опухолевые клетки рака мочевого пузыря человека RT-4 значительно выше при использовании иммунобиологического средства на основе БЦЖ в диапазоне концентраций БЦЖ от  $10^4$  до  $10^{11}$  КОЕ/дозу, чем при использовании стандартной вакцины БЦЖ.

### Пример 3

Оценка способности БЦЖ проникать в клетки мочевого пузыря в условиях *in vivo*.

Целью данного эксперимента являлось определение способности БЦЖ в составе иммунобиологического средства проникать в подслизистый слой мочевого пузыря, обработанного ферментами, расщепляющими секрет слизистого слоя мочевого пузыря, в условиях *in vivo*. Для этого были использованы мыши линии BALB/c, самки, весом 18-20 г. Для исследования были выбраны иммунобиологические средства на основе БЦЖ, содержащие ферменты, расщепляющие секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в дозах, которые лежат в середине исследованного в примере 1 рабочего диапазона концентраций: гиалуронидаза - 10000 УЕ/дозу, нейраминидаза - 10 УЕ/дозу; а также БЦЖ в дозе, которая находится в середине исследованного в примере 2 рабочего диапазона концентраций -  $10^8$  КОЕ/дозу. В качестве контроля использовалась стандартная вакцина БЦЖ в следующих концентрациях:  $10^8$  КОЕ/дозу,  $10^9$  КОЕ/дозу,  $10^{10}$  КОЕ/дозу,  $10^{11}$  КОЕ/дозу.

Все животные были катетеризованы по стандартной методике (С. Hung, К. Dodson, S. Hultgren, A murine model of urinary tract infection, Nature protocols, 4, 1230-1243, 2009). Далее все животные были разделены на семь групп, которым вводили

- 1) БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу.
- 2) БЦЖ в количестве  $10^9$  КОЕ/дозу.
- 3) БЦЖ в количестве  $10^{10}$  КОЕ/дозу.
- 4) БЦЖ в количестве  $10^{11}$  КОЕ/дозу.

5) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), при этом оно включает фермент гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу.

6) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), при этом оно включает фермент нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу.

7) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), при этом оно включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу.

Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевого пузыря, составляет 50 мл (инструкции к препаратам «Иммурон-вак», «Уро-БЦЖ медак»). Поскольку иммунобиологическое средство содержит живые бактериальные клетки, для разведения может быть использован любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае нами использовался физиологический раствор.

После разведения исследуемые образцы вводились мышам в мочевого пузыря в объеме 50 мкл с помощью катетера. Через 18 часов животные были усыплены.

Далее с помощью керамических бус были подготовлены гомогенаты мочевых пузырей. Для определения количества БЦЖ были приготовлены серии разведений гомогенатов мочевых пузырей и далее высеваны на скошенные среды Левенштейна-Йенсена. Косяки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 72 дней. Учет количества БЦЖ велся один раз в неделю.

В таблице 3 представлены результаты анализа титра КОЕ БЦЖ, полученные с помощью высевов гомогенатов мочевых пузырей мышей, обработанных различными иммунобиологическими средствами на основе БЦЖ.

Таблица 3

Группа	Титр БЦЖ в мочевом пузыре (КОЕ/мг)
БЦЖ в количестве $10^8$ КОЕ/дозу	11
БЦЖ в количестве $10^9$ КОЕ/дозу	160
БЦЖ в количестве $10^{10}$ КОЕ/дозу	1400
БЦЖ в количестве $10^{11}$ КОЕ/дозу	11600
Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$ КОЕ/дозу), при этом оно включает фермент гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу	10000
Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$ КОЕ/дозу), при этом оно включает фермент нейраминидазу в количестве 10МЕ/дозу	920
Иммунобиологическое средство на основе	12500

5	вакцины БЦЖ ( $10^8$ КОЕ/дозу), при этом оно включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу
---	---

Как видно из результатов эксперимента, представленных в таблице 3, ферменты, разрушающие секрет слизистого слоя в мочевом пузыре, повышают эффективность проникновения БЦЖ, поскольку количество БЦЖ в гомогенатах мочевых пузырей мышей, получавших иммунобиологическое средство на основе БЦЖ и ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, превышает количество БЦЖ в гомогенатах мочевых пузырей мышей, получавших вакцину БЦЖ, от 81 до 1136 раз. Сравнимый эффект достигается при введении дозы стандартной вакцины БЦЖ, в 1000 раз превышающей дозу разработанного иммунобиологического средства на основе БЦЖ. При этом специалисту среднего уровня очевидно, что высокие концентрации вакцины БЦЖ ( $10^{11}$  КОЕ/дозу и более) являются токсичными.

#### Пример 4

Оценка иммуностимулирующих свойств иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ.

Целью данного эксперимента являлось исследование иммуностимулирующих свойств разработанного иммунобиологического средства в сравнении со стандартной вакциной БЦЖ по способности индуцировать выброс цитокинов. Для этого была выбрана модель культуры клеток рака мочевого пузыря человека RT-4, обладающая выраженным гликокаликсом, сходным по своему строению с секретом слизистого слоя мочевого пузыря.

Для оценки уровня экспрессии цитокинов были выбраны тест-системы фирмы eBioscience (BMS822FF, BMS821FF) для мультиплексного анализа, которые позволяют одновременно измерять уровень экспрессии 19 цитокинов и хемокинов.

Клетки пассировались на  $25 \text{ см}^2$  культуральных матрасах. Клетки линии RT-4 культивировали на минимальной ростовой среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и в присутствии необходимого количества заменимых и незаменимых аминокислот, при температуре  $37^\circ\text{C}$  и содержании  $\text{CO}_2$  5%. Для проведения анализа клетки были рассеяны на 96 луночный планшет в количестве  $10^5$  клеток на лунку. После посева клеток планшет инкубировали при  $+37^\circ\text{C}$  в присутствии 5%  $\text{CO}_2$  в течение 24 часов.

Через сутки к клеткам были добавлены исследуемые образцы, которые представляли собой

1) БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу.

2) БЦЖ в количестве  $10^{11}$  КОЕ/дозу.

3) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), отличающееся тем, что она включает фермент гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу.

4) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), отличающееся тем, что она включает фермент нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу.

5) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу),

отличающееся тем, что она включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/ дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу.

Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевой пузырь, составляет 50 мл (инструкции к препаратам «Иммурон-вак», «Уро-БЦЖ медак»).

5 Поскольку исследуемые образцы содержат живые бактериальные клетки, для разведения рекомендуется использовать любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае нами использовался физиологический раствор.

10 После разведения исследуемых образцов 10 мкл из каждого образца было добавлено в соответствующие лунки планшета.

Далее клетки инкубировали 18 часов. Затем определяли уровень экспрессии цитокинов с помощью коммерческого набора. Полученные результаты представлены на фиг. 2, где

ось ординат - концентрация цитокинов, пг/мл

15 ось абсцисс: 1 - ИЛ-2, 2 - ИЛ-6, 3 - ИЛ-8, 4 - ИЛ-13, 5 - ФИО альфа, 6 - гамма интерферон.

 - Фосфатный буфер

 - БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу

20  - БЦЖ в количестве  $10^{11}$  КОЕ/дозу

 - Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу),

отличающееся тем, что она включает фермент гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/ дозу

25  - Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу),

отличающееся тем, что она включает фермент нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу

 - Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу),

30 отличающееся тем, что она включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/ дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу

Было показано, что разработанные иммунобиологические средства для терапии рака мочевого пузыря на основе БЦЖ по сравнению с прототипом (вакциной БЦЖ) вызывают более сильную индукцию ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-13, ФИО альфа, ИФНгамма.

35 Сравнимый эффект достигается при введении дозы вакцины БЦЖ, в 1000 раз превышающей дозу разрабатываемого иммунобиологического средства на основе БЦЖ. При этом специалисту среднего уровня очевидно, что высокие концентрации вакцины БЦЖ ( $10^{11}$  КОЕ/дозу и более) являются токсичными.

Пример 5

40 Оценка токсичности иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ.

Целью данного исследования являлось определение безопасности и потенциальных токсических эффектов иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ.

Исследование токсичности проводили на клетках эмбриональной почки человека НЕК293. Клетки пассировались на  $25 \text{ см}^2$  культуральных флаконах в ростовой среде DMEM с 10% эмбриональной сывороткой. Для проведения анализа клетки были 45 рассеяны на 96 луночный планшет в количестве  $10^5$  клеток на лунку. После посева клеток планшет инкубировали при  $+37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 24 часов. Далее к клеткам

были добавлены иммунобиологические средства на основе БЦЖ с теми же концентрациями действующих веществ, как и в примере 1: БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), гиалуронидаза (в следующих концентрациях: 0 УЕ/дозу, 1 УЕ/дозу, 10 УЕ/дозу, 100 УЕ/дозу, 1000 УЕ/дозу, 10000 УЕ/дозу, 100000 УЕ/дозу, 1000000 УЕ/дозу) и нейраминидаза (в следующих концентрациях: 0 МЕ/дозу, 0,001 МЕ/дозу, 0,01 МЕ/дозу, 0,1 МЕ/дозу, 1 МЕ/дозу, 10 МЕ/дозу, 100 МЕ/дозу, 1000 МЕ/дозу); а также иммунобиологические средства на основе БЦЖ с теми же концентрациями действующих веществ, как и в примере 2: БЦЖ (в следующих концентрациях:  $10^3$  КОЕ/дозу,  $10^4$  КОЕ/дозу,  $10^5$  КОЕ/дозу,  $10^6$  КОЕ/дозу,  $10^7$  КОЕ/дозу,  $10^8$  КОЕ/дозу,  $10^9$  КОЕ/дозу,  $10^{10}$  КОЕ/дозу,  $10^{11}$  КОЕ/дозу), гиалуронидазы (10000 УЕ/дозу) и нейраминидазы (10 МЕ/дозу). В качестве контроля использовали вакцину БЦЖ в концентрациях:  $10^3$  КОЕ/дозу,  $10^4$  КОЕ/дозу,  $10^5$  КОЕ/дозу,  $10^6$  КОЕ/дозу,  $10^7$  КОЕ/дозу,  $10^8$  КОЕ/дозу,  $10^9$  КОЕ/дозу,  $10^{10}$  КОЕ/дозу,  $10^{11}$  КОЕ/дозу.

Под дозой понимается количество препарата, предназначенное для одновременного (за 1 инсталляцию) введения в мочевого пузырь. Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевого пузырь, составляет 50 мл. Поскольку исследуемые образцы содержат живые бактериальные клетки, для разведения рекомендуется использовать любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае был использован физиологический раствор.

После разведения исследуемых образцов 10 мкл из каждого образца было добавлено в соответствующие лунки планшета. Через сутки после добавления исследуемых образцов был произведен анализ количества живых клеток методом МТТ-теста. В среду к клеткам добавляли 1/10 объема концентрированного МТТ (10х МТТ, 5 мг/мл). Инкубировали три часа в  $CO_2$ -инкубаторе при  $37^\circ C$ , затем отбирали всю среду, лизировали клетки в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и измеряли оптическую плотность при 540 нм и 630 нм. Затем рассчитывали истинное значение оптической плотности ( $OD_{ист}$ ) по формуле:

$OD_{ист} = OD_{540нм} - OD_{630нм}$ ,  
 где  $OD_{540нм}$  - оптическая плотность, измеренная при длине волны 540 нм, а  $OD_{630нм}$  - оптическая плотность, измеренная при длине волны 630 нм.

Далее процент выживших клеток рассчитывали по формуле:  
 Количество выживших клеток (%) =  $(OD_{ист.исслед.} / OD_{ист.контр.}) * 100\%$ ,

где  $OD_{ист.исслед.}$  - истинная оптическая плотность клеток, обработанных иммунобиологическим средством, а  $OD_{ист.контр.}$  - истинная оптическая плотность контрольных клеток.

Затем рассчитывали коэффициент токсичности образца Т:  
 $T = (\text{количество выживших контрольных клеток, \%}) - (\text{количество выживших клеток в исследуемом образце, \%})$ .

При этом  $T=0$  означает, что препарат не токсичен и не влияет на выживаемость данной клеточной культуры, а  $T=100\%$  означает, что препарат токсичен и в лунке планшета нет живых клеток.

Результаты исследования токсичности иммунобиологических средств, отличающихся концентрациями ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, представлены в таблице 4. Результаты исследования токсичности иммунобиологических средств, отличающихся концентрациями БЦЖ, представлены в

таблице 5.

Таблица 4

		Концентрация гиалуронидазы (УЕ/дозу)							
		0	1	10	100	1000	10000	100000	1000000
Концентрация нейраминидазы (МЕ/дозу)	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	0,001	0	0	0	0	0	0	0	8
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	12
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	15
	1	0	0	0	0	0	0	0	18
	10	0	0	0	0	0	0	5	23
	100	0	0	0	0	0	2	7	34
	1000	1	4	9	15	17	20	25	38

Таблица 5

		Токсичность	
		Иммунобиологическое средство	Вакцина БЦЖ
Концентрация БЦЖ, КОЕ/дозу	$10^3$	0	0
	$10^4$	0	0
	$10^5$	0	0
	$10^6$	0	0
	$10^7$	0	0
	$10^8$	0	0
	$10^9$	0	0
	$10^{10}$	5	15
	$10^{11}$	22	24

Как видно из результатов, представленных в таблице 4, Иммунобиологические средства на основе БЦЖ, содержащие гиалуронидазу в концентрации 1000000 УЕ/дозу и нейраминидазу в концентрации 100 МЕ/дозу, обладали наибольшей токсичностью. Другие иммунобиологические средства на основе БЦЖ, содержащие только гиалуронидазу (1-1000000 УЕ/дозу) или нейраминидазу (0,001-1000 МЕ/дозу), а также иммунобиологические средства, содержащие гиалуронидазу (1-100000 УЕ/дозу) и нейраминидазу (0,001-100 МЕ/дозу), либо не имели токсического эффекта, либо обладали незначительной токсичностью. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что данные концентрации ферментов могут быть использованы для создания иммунобиологического средства на основе БЦЖ.

Как видно из результатов, представленных в таблице 5, наибольшей токсичностью обладало иммунобиологическое средство, содержащее БЦЖ в количестве  $10^{11}$  КОЕ/

дозу. Другие иммунобиологические средства на основе БЦЖ, содержащие БЦЖ в количестве от  $10^3$  до  $10^{10}$  КОЕ/дозу либо не обладали токсичностью, либо имели незначительный токсический эффект. Также следует заметить, что введение вакцины БЦЖ в дозах, превышающих рекомендованные ( $10^{10}$  КОЕ/дозу и более), приводит к увеличению токсичности, коррелирующей с увеличением дозы. Исходя из результатов, представленных в таблице 5, можно сделать вывод о том, что указанные концентрации БЦЖ ( $10^3$  до  $10^{10}$  КОЕ/дозу) могут быть использованы для создания иммунобиологического средства на основе БЦЖ.

Далее было проведено исследование токсичности иммунобиологического средства на основе БЦЖ, содержащей максимальные концентрации действующих веществ, которые по отдельности либо не обладают токсичностью, либо обладают минимальной токсичностью.

Исследование токсичности проводили на клетках эмбриональной почки человека НЕК293. Клетки пассировались на  $25\text{ см}^2$  культуральных флаконах в ростовой среде DMEM с 10% эмбриональной сывороткой. Для проведения анализа клетки были рассеяны на 96 луночный планшет в количестве  $10^5$  клеток на лунку. После посева клеток планшет инкубировали при  $+37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 24 часов.

Далее был получен ряд иммунобиологических средств на основе вакцины БЦЖ, содержащих БЦЖ (в концентрациях:  $10^9$  КОЕ/дозу,  $10^{10}$  КОЕ/дозу), гиалуронидазу (в концентрациях: 100000 УЕ/дозу, 1000000 УЕ/дозу) и нейраминидазу (в концентрациях: 100 МЕ/дозу, 1000 МЕ/дозу). Под дозой понимается количество препарата, предназначенное для одновременного (за 1 инсталляцию) введения в мочевой пузырь. Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевой пузырь, составляет 50 мл. Поскольку исследуемые образцы содержат живые бактериальные клетки, для разведения рекомендуется использовать любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае был использован физиологический раствор.

После разведения исследуемых образцов 10 мкл из каждого образца было добавлено в соответствующие лунки планшета. Через сутки после добавления исследуемых образцов был произведен анализ количества живых клеток методом МТТ-теста, описанного выше.

Результаты исследования токсичности иммунобиологического средства на основе БЦЖ, содержащей максимальные концентрации действующих веществ, которые по отдельности либо не обладают токсичностью, либо обладают минимальной токсичностью, представлены в таблице 6.

Таблица 6

Концентрация нейраминидазы (МЕ/дозу)	Концентрация БЦЖ (КОЕ/дозу)			Концентрация гиалуронидазы (УЕ/дозу)
	$10^9$	$10^{10}$		
100	7	9	100000	
	36	42	1000000	
1000	28	30	100000	
	40	46	1000000	

Как видно из результатов, представленных в таблице 6, наибольшей токсичностью обладало иммунобиологическое средство, содержащее гиалуронидазу в количестве 1000000 УЕ/дозу или нейраминидазу в количестве 1000 МЕ/дозу. Другие иммунобиологические средства на основе БЦЖ, содержащие БЦЖ в количестве от  $10^9$  до  $10^{10}$  КОЕ/дозу, а также гиалуронидазу в количестве 100000 УЕ/дозу и нейраминидазу в количестве 100 МЕ/дозу обладали незначительной токсичностью.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о том, что для создания иммунобиологического средства на основе БЦЖ могут быть использованы следующие концентрации действующих веществ:

БЦЖ - от  $10^3$  до  $10^{10}$  КОЕ/дозу,  
 Гиалуронидаза - от 1 до 100000 УЕ/дозу,  
 Нейраминидаза - от 0,001 до 100 МЕ/дозу.

Пример 6.

Оценка противоопухолевой активности иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ.

Целью данного эксперимента являлось изучение противоопухолевой эффективности иммунобиологического средства на основе БЦЖ. Исследование проводили на модели рака мочевого пузыря мышей на основе клеток МВ49 (рак мочевого пузыря мыши).

Схема эксперимента представлена на фиг. 3. По оси абсцисс указано время от начала эксперимента (дни), А - введение клеток рака мочевого пузыря мыши МВ49, В - введение стандартной вакцины БЦЖ, С - введение иммунобиологического средства на основе БЦЖ, отличающейся тем, что в качестве фермента используется гиалуронидаза, Д - введение иммунобиологического средства на основе БЦЖ, отличающейся тем, что в качестве фермента используется нейраминидаза, Е - введение иммунобиологического средства на основе БЦЖ, отличающейся тем, что в качестве фермента используется гиалуронидаза и нейраминидаза, F - введение физиологического раствора.

В эксперименте были использованы мыши линии С57ВL/6, самки, весом 18-20 грамм и линия клеток рака мочевого пузыря мыши МВ49. Клетки пассировались на  $75\text{ см}^2$  культуральных флаконах в ростовой среде DMEM с 10% эмбриональной сывороткой. В 0 день эксперимента клетки снимали с флаконов трипсином, затем после открепления ингибировали трипсин, промывали трижды в фосфатно-солевом буфере и готовили суспензии, содержащие  $2 \times 10^7$  живых клеток/мл.

Затем животных катетеризовали по стандартной методике (С. Hung, K. Dodson, S. Hultgren, A murine model of urinary tract infection, Nature protocols, 4, 1230-1243, 2009). Всем животным вводили внутривезикулярно раствор поли-L-лизина (50 мкл, концентрация 0,1 мг/мл). Через полчаса мочевые пузыри животных опустошали и вводили суспензию клеток МВ49 в объеме 50 мкл ( $10^6$  клеток/мышь).

Для исследования были выбраны иммунобиологические средства на основе БЦЖ, содержащие ферменты, расщепляющие секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в дозах, которые лежат в середине исследованного в примере 1 рабочего диапазона концентраций: гиалуронидаза - 10000 УЕ/дозу, нейраминидаза - 10 УЕ/дозу; а также БЦЖ в дозе, которая находится в середине исследованного в примере 2 рабочего диапазона концентраций -  $10^8$  КОЕ/дозу. В качестве контроля использовали вакцину БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу. Под дозой понимается количество препарата, предназначенное для единовременного (за 1 инстилляцию) введения в мочевой пузырь. Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевой пузырь,

составляет 50 мл. Поскольку исследуемые образцы содержат живые бактериальные клетки, для разведения рекомендуется использовать любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае был использован физиологический раствор.

5 На пятый день от начала эксперимента все животные были разделены группы, которым вводили:

1) БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу.

2) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), отличающееся тем, что она включает фермент гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/10 дозу.

3) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), отличающееся тем, что она включает фермент нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу.

4) Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$  КОЕ/дозу), отличающееся тем, что она включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/15 дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу.

5) Физиологический раствор

Исследуемые образцы после разведения в физиологическом растворе вводили в мочевой пузырь мышей с помощью катетеров в терапевтической дозе в объеме 50 мкл 20 на пятый, десятый и пятнадцатый день от начала эксперимента. Затем анализировали выживаемость мышей в течение 2 месяцев от начала эксперимента.

Результаты представлены на фиг. 4. По оси абсцисс указано время от начала эксперимента (дни), по оси ординат - выживаемость животных (%),

25 1 - БЦЖ в количестве  $10^8$  КОЕ/дозу,

2 - иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, при этом в качестве фермента используется гиалуронидаза,

3 - иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, при этом в качестве фермента используется нейраминидаза,

30 4 - иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, при этом в качестве фермента используются гиалуронидаза и нейраминидаза, 5 - физиологический раствор.

Как видно из представленных данных, выживаемость мышей, получавших иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, в два раза превышает выживаемость мышей, получавших вакцину БЦЖ. Таким образом, иммунобиологическое средство 35 обладает выраженной противоопухолевой активностью, большей чем вакцина БЦЖ.

Пример 7

Оценка влияния схем введения иммунобиологического средства на эффективность проникновения БЦЖ в клетки мочевого пузыря в условиях *in vivo*.

40 Целью данного эксперимента являлось оценка влияния различных схем введения иммунобиологического средства на эффективность проникновения БЦЖ в клетки мочевого пузыря. В частности, была разработана схема, согласно которой сначала в мочевой пузырь вводят раствор ферментов на 30 минут, затем мочевой пузырь опустошают и вводят иммунобиологическое средство или вакцину БЦЖ.

Для этого были использованы мыши линии BALB/c, самки весом 18-20 г. Все 45 животные были катетеризованы по стандартной методике (С. Hung, К. Dodson, S. Hultgren, A murine model of urinary tract infection, Nature protocols, 4, 1230-1243, 2009). Затем все животные были разделены на четыре группы, которым вводили иммунобиологическое средство и вакцину БЦЖ в разных схемах.

Схемы введения представлены на фиг. 5. По оси абсцисс указано время (минуты)

введения препаратов,

А - введение стандартной вакцины БЦЖ,

В - введение иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ, при этом она включает ферменты гиалуронидазу и нейраминидазу,

5 С - введение смеси ферментов гиалуронидазы и нейраминидазы.

Для исследования были выбраны иммунобиологические средства на основе БЦЖ, содержащие ферменты, расщепляющие секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в дозах, которые лежат в середине исследованного в примере 1 рабочего диапазона концентраций: гиалуронидаза - 10000 УЕ/дозу, нейраминидаза - 10 УЕ/дозу; а также  
10 БЦЖ в дозе, которая находится в середине исследованного в примере 2 рабочего диапазона концентраций -  $10^8$  КОЕ/дозу. Также для исследования были выбраны концентрации ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в тех же дозах, что представлены в исследуемом иммунобиологическом средстве:

15 Далее для исследования была подготовлена смесь ферментов в указанных концентрациях.

Объем препарата, рекомендованный для одной инсталляции в мочевой пузырь, составляет 50 мл (инструкции к препаратам «Иммурон-вак», «Уро-БЦЖ медак»). Поскольку исследуемые образцы содержат живые бактериальные клетки, для разведения  
20 рекомендуется использовать любой изотонический растворитель надлежащего фармацевтического качества. В данном случае нами использовался физиологический раствор.

После разведения препараты вводились мышам в мочевой пузырь в объеме 50 мкл с помощью катетера согласно указанным схемам. Через 18 часов животные были  
25 усыплены.

Далее с помощью керамических бус были подготовлены гомогенаты мочевых пузырей. Для определения количества БЦЖ были приготовлены серии разведений гомогенатов мочевых пузырей и далее высеяны на скошенные среды Левенштейна-Йенсена. Косяки инкубировали при 37°C в течение 72 дней. Учет количества БЦЖ велся  
30 один раз в неделю.

В таблице 7 представлены результаты анализа титра КОЕ БЦЖ, полученные с помощью высева гомогенатов мочевых пузырей мышей, обработанных иммунобиологическими средствами на основе БЦЖ при различных схемах введения.

35

40

45

Таблица 7

Схема введения	Титр БЦЖ в мочевом пузыре (КОЕ/мг)
БЦЖ в количестве $10^8$ КОЕ/дозу	13
Иммунобиологическое средство на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$ КОЕ/дозу), при этом она включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу	11700
Введение смеси ферментов гиалуронидазы 10000 УЕ/дозу и нейраминидазы 10 МЕ/дозу, через 30 минут введение БЦЖ в количестве $10^8$ КОЕ/дозу	7500
Введение смеси ферментов гиалуронидазы 10000 УЕ/дозу и нейраминидазы 10 МЕ/дозу, через 30 минут введение иммунобиологического средства на основе вакцины БЦЖ ( $10^8$ КОЕ/дозу), при этом она включает ферменты гиалуронидазу в количестве 10000 УЕ/дозу и нейраминидазу в количестве 10 МЕ/дозу	14500

Как видно из представленных результатов, введение ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, до введения иммунобиологического средства способствует увеличению проникновения БЦЖ в клетки мочевого пузыря.

Специалисту среднего уровня очевидно, что последовательное использование ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, и вакцины БЦЖ также приводит к увеличению проникновения БЦЖ в клетки мочевого пузыря, что также может быть использовано для увеличения иммуностимулирующих и противоопухолевых свойств вакцины БЦЖ при лечении рака мочевого пузыря.

#### Пример 8

Иммунобиологическое средство может быть представлено в виде лиофильно высушенного препарата, который включает БЦЖ, композицию ферментов, расщепляющих секрет слизистого слоя мочевого пузыря, и компоненты буфера.

Иммунобиологическое средство может быть представлено в виде лиофильно высушенных препаратов, находящихся в двух отдельных флаконах, которые растворяются и смешиваются непосредственно перед использованием. При этом в одном флаконе содержится лиофилизат БЦЖ и компоненты буфера, а в другом флаконе содержится лиофилизат композиции ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, и компоненты буфера.

Иммунобиологическое средство может быть представлено в виде лиофильно высушенных препаратов, находящихся в двух отдельных флаконах, которые

растворяются непосредственно перед использованием и вводятся отдельно. При этом в одном флаконе содержится лиофилизат БЦЖ или лиофилизат БЦЖ, композиции ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, и компоненты буфера, а в другом флаконе содержится лиофилизат композиции ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, и компоненты буфера.

В качестве буферного раствора, в котором лиофильно высушен препарат, может выступать любой раствор, не токсичный для человека и содержащий все необходимые компоненты, обеспечивающие жизнеспособность БЦЖ и активность ферментов.

#### Пример 9

Способ использования иммунобиологического средства на основе БЦЖ для лечения рака мочевого пузыря.

Специалисту среднего уровня очевидно, что иммунобиологическое средство на основе БЦЖ, включающее фермент, расщепляющий секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, может быть использовано в терапевтически эффективных количествах для лечения рака мочевого пузыря, в частности для лечения переходного клеточного рака мочевого пузыря, плоскоклеточного рака мочевого пузыря и аденокарциномы мочевого пузыря.

Более того, специалисту среднего уровня очевидно, что заявленное иммунобиологическое средство может быть использовано как самостоятельное средство для лечения рака мочевого пузыря у пациента, так и в составе комплексного лечения, включающего этап трансуретальной резекции рака мочевого пузыря у пациента до введения иммунобиологического средства.

Специалисту среднего уровня очевидно, что иммунобиологическое средство может быть использовано для лечения рака мочевого пузыря как самостоятельно, когда ферменты, расщепляющие секрет слизистого слоя мочевого пузыря, вводятся одновременно с БЦЖ, так и в сочетании с дополнительным введением ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, которое осуществляется до введения иммунобиологического средства.

Приведенные примеры показывают, что задача, поставленная в данном изобретении, а именно создание иммунобиологического средства для терапии рака мочевого пузыря на основе БЦЖ, которое способно высокоэффективно проникать в уротелий мочевого пузыря через секрет слизистого слоя, в то же время иммунобиологическое средство должно обладать высокой иммуностимулирующей активностью, решена в данном изобретении.

Было показано, что разработанные иммунобиологические средства для терапии рака мочевого пузыря на основе БЦЖ по сравнению с прототипом (вакциной БЦЖ) вызывают более сильную индукцию ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-13, ФНО альфа, ИФНгамма.

Приведенные примеры также подтверждают промышленную применимость иммунобиологического средства для терапии рака мочевого пузыря на основе БЦЖ и показывают эффективность способа использования созданного иммунобиологического средства

#### Формула изобретения

1. Иммунобиологическое средство для лечения рака мочевого пузыря на основе БЦЖ,

отличающееся тем, что оно дополнительно содержит фермент или ферменты с обеспечением расщепления секрета слизистой оболочки мочевого пузыря и буфер, взятые в терапевтически эффективном соотношении.

2. Иммунобиологическое средство по п. 1, отличающееся тем, что в качестве фермента используют гиалуронидазу.

3. Иммунобиологическое средство по п. 1, отличающееся тем, что в качестве фермента используют нейраминидазу.

5 4. Иммунобиологическое средство по п. 1, отличающееся тем, что в качестве фермента используют гиалуронидазу и нейраминидазу.

5. Иммунобиологическое средство по п. 1, отличающееся тем, что в дозе на одну инстилляцию в мочевого пузыря содержится:

10 БЦЖ - от  $10^3$  КОЕ/дозу до  $10^{10}$  КОЕ/дозу;

Фермент, расщепляющий секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, а именно: гиалуронидазы от 1 до 100000 единиц/дозу;

или нейраминидазы от 0,001 до 100 единиц/дозу;

или их смесь в любых соотношениях;

Буфер - остальное.

15 6. Способ использования иммунобиологического средства для лечения рака мочевого пузыря, заключающийся во введении иммунобиологического средства по п. 1 в мочевого пузыря.

7. Способ по п. 6, где в мочевого пузыря вводится только иммунобиологическое средство.

20 8. Способ по п. 6, где в мочевого пузыря предварительно вводится фермент или ферменты, расщепляющий(ие) секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, в заявленном для иммунобиологического средства количестве, а затем иммунобиологическое средство.

25 9. Способ по п. 6, где указанный способ используется у пациента, страдающего раком мочевого пузыря.

10. Способ по п. 9, где указанный способ используют для лечения пациента, страдающего раком мочевого пузыря, самостоятельно, без хирургического вмешательства.

30 11. Способ по п. 9, где указанный способ используют для лечения пациента, страдающего раком мочевого пузыря, после трансуретальной резекции рака мочевого пузыря.

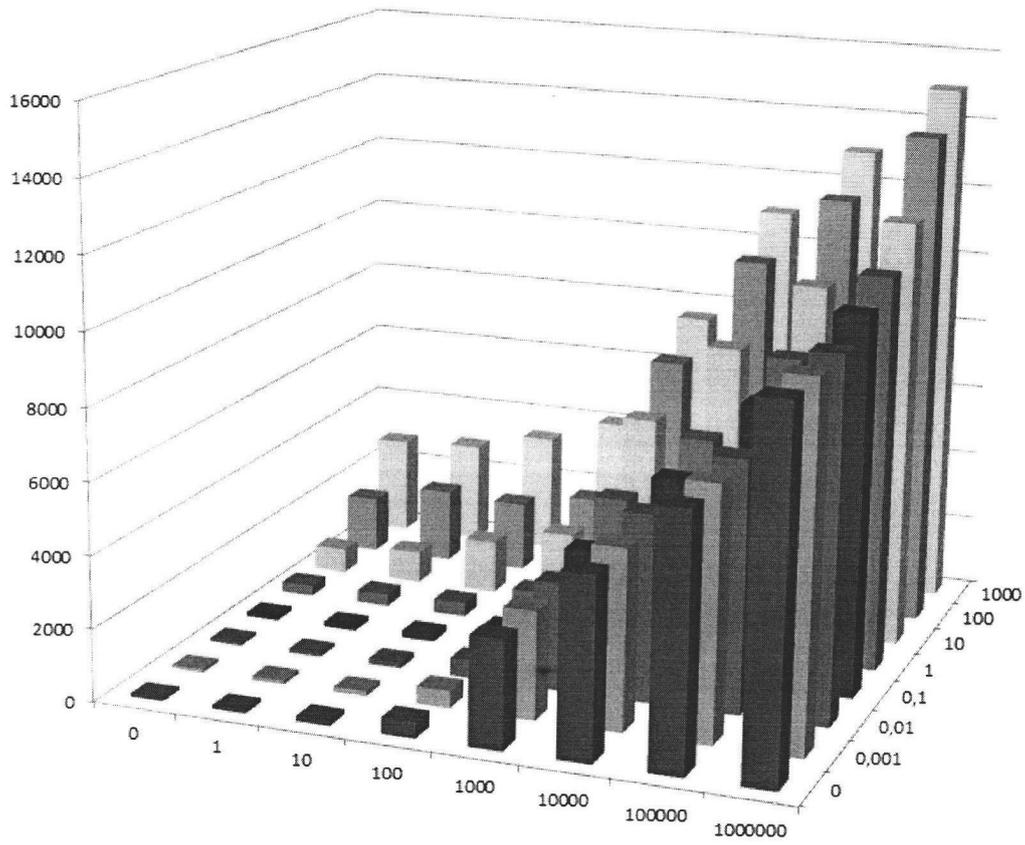
12. Способ по п. 8, отличающийся тем, что в качестве фермента, расщепляющего секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, используют гиалуронидазу.

35 13. Способ по п. 8, отличающийся тем, что в качестве фермента, расщепляющего секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, используют нейраминидазу.

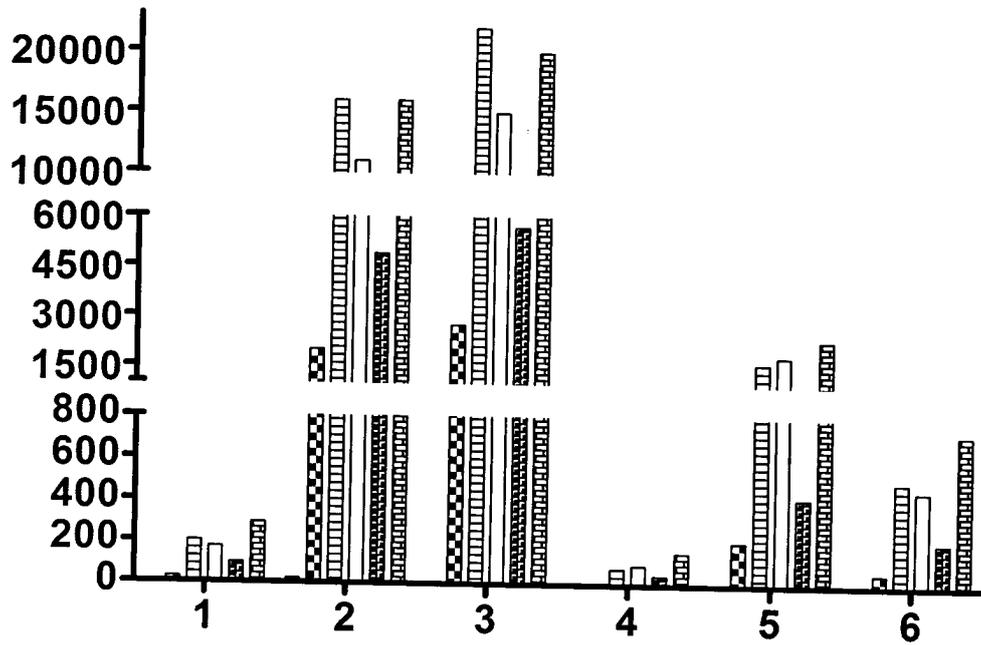
14. Способ по п. 8, отличающийся тем, что в качестве ферментов, расщепляющих секрет слизистой оболочки мочевого пузыря, используют гиалуронидазу и нейраминидазу.

40

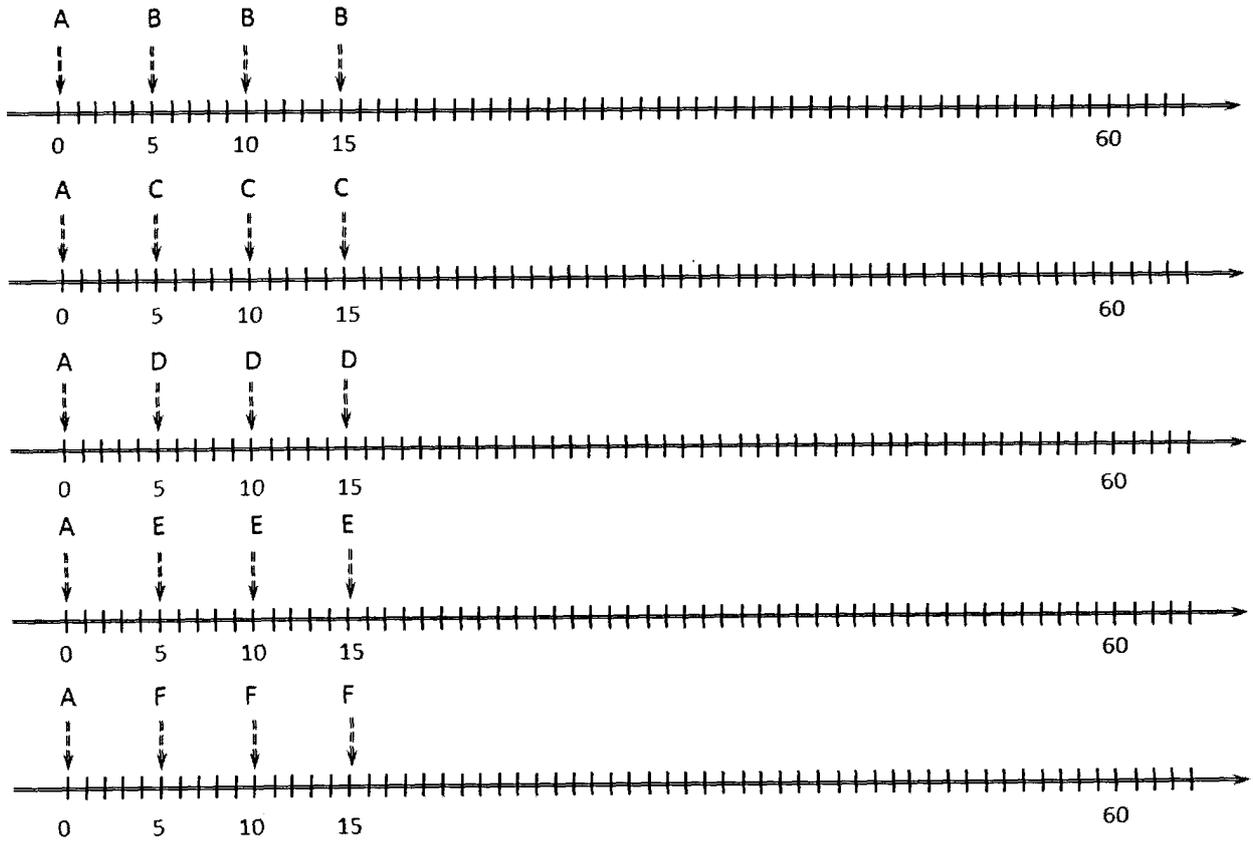
45



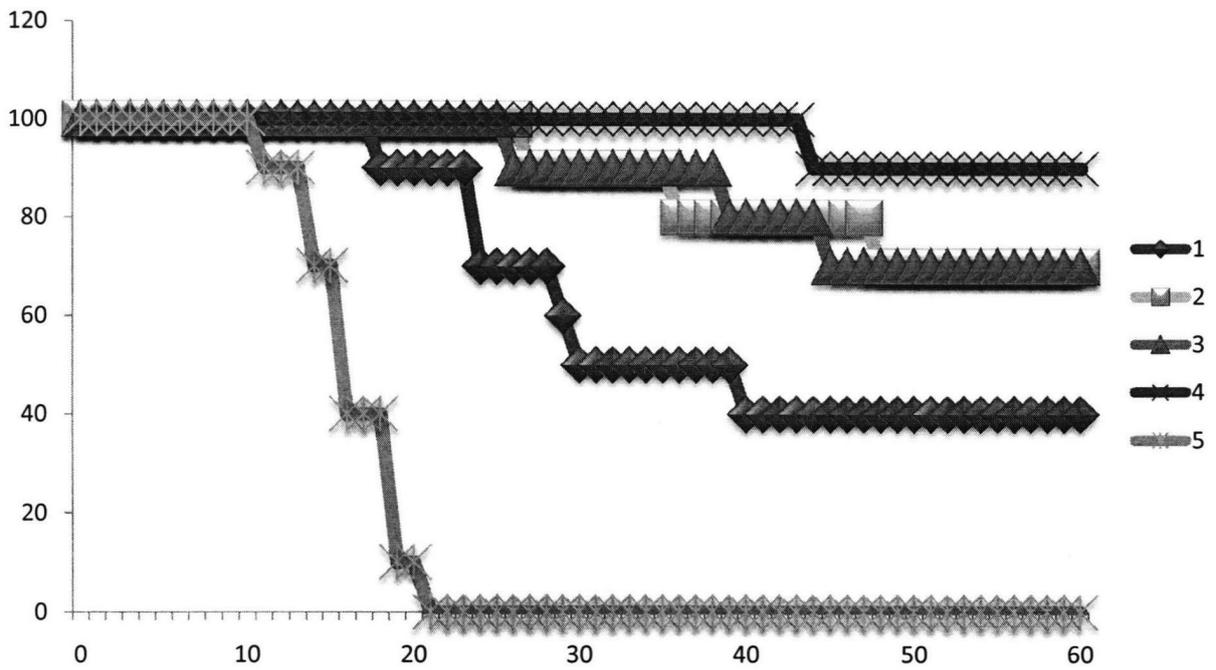
ФИГ. 1



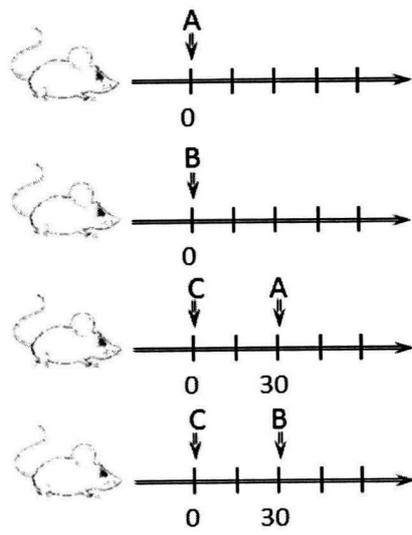
ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5