

# Оценка препарата АНСС для модуляции иммунитета хозяина для устранения папилломавирусных инфекций человека высокого риска

Judith A. Smith<sup>1,2\*</sup>, Lata Mathew<sup>1</sup>, Anjali Gaikwad<sup>1</sup>, Barbara Rech<sup>3</sup>, Maryam N. Burney<sup>1</sup>, Jonathan P. Faro<sup>4</sup>, Joseph A. Lucci III<sup>1,2</sup>, Yu Bai<sup>5</sup>, Randall J. Olsen<sup>6</sup> and Teresa T. Byrd<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, UTHealth McGovern Medical School, Houston, TX, United States <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Memorial Hermann Cancer Center, Houston, TX, United States <sup>3</sup>UT Physicians Women's Center, Houston, TX, United States <sup>4</sup>Specialists in Obstetrics & Gynecology, Houston, TX, United States

<sup>5</sup>Department of Pathology, UTHealth McGovern Medical School, Houston, TX, United States <sup>6</sup>Department of Molecular Pathology, Institute for Academic Medicine, Houston Methodist Research Institute, Houston, TX, United States

## Edited by:

Charles A. Kunos, National Cancer Institute (NIH), United States

## Reviewed by:

Dayanidhi Raman, University of Toledo, United States  
Lisa Davis, University of Arizona, United States

## \*Correspondence:

Judith A. Smith  
judith.ann.smith@uth.tmc.edu

## Specialty section:

This article was submitted to Women's Cancer, a section of the journal *Frontiers in Oncology*

Received: 11 October 2018

Accepted: 27 February 2019

Published: 20 March 2019

## Citation:

Smith JA, Mathew L, Gaikwad A, Rech B, Burney MN, Faro JP, Lucci JA III, Bai Y, Olsen RJ and Byrd TT (2019)

From Bench to Bedside:

Evaluation of ANCC

Supplementation to Modulate

the Host Immunity to Clear

High-Risk Human

Papillomavirus Infections.

*Front. Oncol.* 9:173. doi:

10.3389/fonc.2019.00173

**Цель:** В настоящее время не существует эффективного лекарства или добавки для элиминации папилломавирусной инфекции высокого риска (HR-HPV). Мы использовали систематический подход к оценке потенциального использования добавки АНСС для поддержки элиминации инфекций HR-HPV. Основная цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить добавление АНСС к модулированию иммунной системы хозяина для устранения инфекций HR-HPV от лабораторного до больничного.

**Методы:** клетки рака шейки матки CaSki (HPV16+), HeLa (HPV18+), SiHa (HPV16/18+) и C-33A (HPV-) обрабатывали *in vitro* с помощью АНСС 0,42 мг/мл ежедневно x7 дней, затем наблюдали x7 дней с ежедневным отбором проб. Было проведено подтверждающее исследование на моделях мышей с раком шейки матки, SiHa (HPV16/18+) и C-33A (HPV-): мышей разделили на три группы на каждую клеточную линию, а затем им ввели дозу АНСС 50 мг/кг/сут (N = 10), или только носитель (N = 10), или без добавок (N = 10) в общей сложности в течение 90 дней с последующими 30 днями наблюдения. Опухоли измеряли 3 раза в неделю, а образцы крови собирали раз в две недели для оценки интерферона (IFN) альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) и гамма ( $\gamma$ ) и иммуноглобулина G (IgG) с помощью иммуноанализа. Опухоли оценивали на экспрессию HR-HPV с помощью ПЦР. Два пилотных исследования по 10 пациентов были проведены у женщин с подтвержденной персистирующей инфекцией HR-HPV+. В 1-м исследовании оценивали использование АНСС 3 г от 5 недель до 6 месяцев, а во 2-м исследовании оценивали АНСС 1 г < 8 месяцев. Статус ДНК ВПЧ высокого риска и иммунная панель контролировались при каждом посещении.

**Результаты:** Клиренс ВПЧ и ВПЧ высокого риска наблюдался *in vitro* и подтвердился в исследованиях на животных как стойкий ответ. У четырех из шести (66,7%) пациентов был подтвержден клиренс ВПЧ высокого риска после 3–6 месяцев приема АНСС 3г. Точно так же у 4 из 9 (44%) пациентов был подтвержден клиренс ВПЧ высокого риска после

7 месяцев приема АНСС 1г. Подавление  $IFN\beta < 25$  пг/мл наблюдалось у пациентов, избавившихся от инфекции HR-HPV.

**Заключение:** Доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали стойкое устранение инфекции HR-HPV. Предварительные данные двух пилотных исследований показали, что добавка АНСС поддерживает иммунную систему хозяина для успешного устранения инфекций HR-HPV. Продолжается подтверждающее рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование II фазы.

## Вступление

Во всем мире рак шейки матки является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований (четвертое место в мире) у женщин и основной причиной заболеваемости и смертности (1). На его долю приходится почти 10% всех видов рака, и ежегодно во всем мире от этого заболевания умирает около 265 700 женщин (1).

Выявлена и подтверждена этиология рака шейки матки, связанного с вирусом папилломы человека высокого риска (HR-HPV) (2–5). Вирус папилломы человека (ВПЧ) классифицируется как безоболочечный двухцепочечный ДНК-вирус, который поражает эпителиальный слой клеток, включая поверхности кожи и слизистых оболочек, и связан с доброкачественными бородавками, карциномой *in situ* и, в конечном счете, со злокачественными поражениями (6, 7).

Когда инфекции HR-HPV сохраняются в течение долгого времени, у пациентов повышается риск развития рака шейки матки (8).

Запатентованный стандартизированный экстракт культивируемого мицелия *Lentinula edodes*, АНСС (Amino Up Chemical Co. Ltd, Саппоро, Япония), был разработан в Японии в 1992 г. Несколько исследований сообщили о различных терапевтических эффектах, включая антиоксидантную и противораковую активность и улучшение иммунного ответа (9, 10).

В исследованиях на животных препарат АНСС продемонстрировал способность лечить и предотвращать рак, а также модулировать иммунную систему для предотвращения инфекционных процессов (9–11). Профессор Гао и его коллеги продемонстрировали иммуномодулирующие эффекты добавки АНСС в исследовании, которое показало усиленную антигенную (Ag) активацию CD4 (+) и CD8 (+) Т-клеток, а также повышенную частоту опухолевого Ag-специфического  $IFN$ -гамма, продуцирующего CD8 (+) Т-клетки, как а также увеличение числа клеток НК-клеток и гамма-дельта Т-клеток. В клинических исследованиях АНСС продемонстрировал преимущества в снижении риска инфекции и облегчении

симптомов инфекций (9–11, 13). Поскольку исследования показали, что АНСС индуцирует апоптоз (12–14), возможно, что АНСС может также предотвращать/задерживать рост опухоли независимо от роли HR-HPV.

В этой рукописи представлено более десяти лет различных исследований от лабораторных до практических, чтобы проверить гипотезу о том, что АНСС будет модулировать иммунную систему хозяина для эффективного устранения хронических, стойких инфекций HR-HPV.

В настоящее время нет лекарства от персистирующих инфекций вируса HR-HPV. Следовательно, подтверждение доклинических результатов было необходимо, прежде чем сообщать об этих научных данных, чтобы продемонстрировать их перенос на людей.

Цели первого доклинического исследования заключались в том, чтобы оценить, будет ли добавление АНСС устранять экспрессию HR-HPV в моделях рака шейки матки *in vitro* и *in vivo* на мышах, а также определить механизм устранения инфекций HR-HPV с помощью добавки АНСС. В первоначальных пилотных исследованиях цели состояли в том, чтобы оценить, будет ли добавка АНСС модулировать иммунную систему хозяина для устранения инфекций вируса папилломы человека у женщин с подтвержденными персистирующими инфекциями, определить продолжительность приема добавок АНСС, необходимых для устранения инфекций ВПЧ, и подтвердить устойчивость ответа.

## Материалы и методы

### Доклинические исследования

#### *Химикаты и реагенты*

АНСС был щедро предоставлен компанией Amino Up Chemical Co, Ltd. (Саппоро, Япония). Фетальную бычью сыворотку (FBS) и трипсин-ЭДТА приобретали у GIBCO Invitrogen Co. (Carlsband). Бромид 3-(4,5-диметилтиазол)-2,5-дифенилтетразолия и диметилсульфоксид (ДМСО) были приобретены у Sigma-Aldrich Co. (Сент-Луис, Миссури).

Готовые к использованию сэндвич-наборы ELISA для обнаружения мышинового IFN-альфа/бета, IFN-гамма были приобретены у eBioscience (Сан-Диего, Калифорния). Набор ELISA для обнаружения мышинового IgG1 был приобретен у GenWay Biotech, Inc. (Сан-Диего, Калифорния).

### Культура клеток

Все линии клеток рака шейки матки человека C-33A (отрицательные по ВПЧ) и CaSKi (положительные по ВПЧ 16), HeLa (положительные по ВПЧ 18) и SiHa (положительные по ВПЧ 16 и ВПЧ 18) были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Клеточные линии плоскоклеточной карциномы SiHa, аденокарциномы HeLa и карциномы C-33A размножали в среде, состоящей из EMEM с 2 mM L-глутамина и BSS Эрла, доведенного до содержания 1,5 г/л бикарбоната натрия, 0,1 mM заменимых аминокислот, 1,0 mM пируват натрия и 10% FBS. Клеточная линия эпидермоидной карциномы CaSKi размножалась в среде, состоящей из RPMI 1640 с 2 mM L-глутамина, доведенного до содержания 1,5 г/л карбоната натрия, 4,5 г/л глюкозы, 10 mM HEPES, 1,0 mM пирувата натрия и 10% FBS. Все клеточные линии выращивали в культуральных флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> в 5% CO<sub>2</sub> на воздухе при 37°C до 90% слияния.

Линии клеток, использованные для этого исследования, сохраняли в течение <15 пассажей, чтобы предотвратить серьезные изменения характеристик клеточной линии.

### Лекарственные решения

Исходный раствор АНСС 40 мг/мл готовили путем растворения 600 мг порошка АНСС в 15 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и фильтров, стерилизованных шприцевым фильтром 0,2 мкм.

Все дополнительные разведения выполняли по мере необходимости с использованием соответствующих культуральных сред для каждой клеточной линии. Исходный раствор МТТ готовили путем растворения 54 мг МТТ в 20 мл PBS до достижения конечной концентрации 0,3 мг/мл. Для каждого эксперимента готовили свежие стандарты и разведения.

АНСС (mg/mL)	C-33A	SiHa	HeLa	CaSKi
IC <sub>20</sub>	0.48	0.82	0.77	0.75
IC <sub>50</sub>	3.3	2.3	4.0	3.8

**ТАБЛИЦА 1**

Резюме цитотоксичности *in vitro*: четыре линии клеток рака шейки матки были дополнены АНСС.

### Исследование АНСС *in vitro* для оценки клиренса

#### ВПЧ:

Анализы ингибирования роста проводили, как описано ранее (12). Рассчитывали IC 20 (ингибирующая концентрация для достижения 20% гибели клеток) и IC 50 для АНСС и каждой клеточной линии (таблица 1).

Во время разработки и планирования этого доклинического исследования достижимые данные о системной концентрации АНСС в плазме человека недоступны исследователям. Основываясь на текущей рекомендуемой дозе 3 грамма общей суточной дозы, как указано производителем препарата, предполагая 100% биодоступность и используя расчетный общий объем крови среднего взрослого человека в семь литров, максимально достижимая концентрация в плазме будет 0,42 мг/мл. Концентрация IC20 не оказывала цитотоксического действия на клеточные линии. Следовательно, для всех исследований *in vitro* в качестве оценки клинически значимой концентрации была выбрана концентрация 0,42 мг/мл. Все опыты проводились в четырехкратной повторности. Пять миллионов клеток SiHa (положительные на ВПЧ 16/18) и C-33A (отрицательные на ВПЧ) обрабатывали в колбах T25 однократно АНСС (0,42 мг/мл) в течение 72 ч (таблица 1).

Концентрация IC20 была выбрана для поддержания жизнеспособности клеток, при этом концентрация АНСС была достаточно высокой для излечения от инфекции HR-HPV. Необработанные клетки служили контролем. Клетки собирали через 24, 48 и 72 часа. Тот же самый эксперимент повторяли в течение 7 дней с добавлением свежего АНСС (0,42 мг/мл) каждые 24 часа, затем наблюдали еще в течение 7 дней. Необработанные клетки так же до сих пор служили контролем. Клетки собирали один раз каждые 24 часа в течение 14 дней во время фазы добавления и наблюдения в исследовании. ДНК экстрагировали из всех образцов и использовали для ПЦР, как описано ниже.

## *Мышиные модели рака шейки матки человека*

В настоящее время не существует идеальной мышинной модели для оценки только инфекции HR-HPV. Модель рака шейки матки была выбрана как лучший суррогат для оценки элиминации инфекций HR-HPV, поскольку линия клеток рака шейки матки человека SiHa экспрессирует как ВПЧ 16, так и ВПЧ 18. Модель опухоли C33 была выбрана в качестве отрицательного контроля HR-HPV для исследования. Протокол был рассмотрен и одобрен институциональным комитетом по благополучию животных (AWC) до начала какой-либо работы с животными. Для этого исследования 70 самок бестимусных мышей/мышей с подавленным иммунитетом в возрасте 6-8 недель были получены от Harlan Laboratories (Хьюстон, Техас). Все мыши весили около 22–26 г; их содержали по пять на клетку в специальной барьерной комнате, свободной от патогенов (SPF), с температурой  $22 \pm 3$  и  $45 \pm 3^\circ\text{C}$  RH%. Был свободный доступ к пище автоклавированной и обратноосмотической автоклавной воде. Процедуры эксперимента и обращение с мышами строго соответствовали руководству по уходу и использованию лабораторных животных. Была группа здоровых контрольных животных, в которой было 10 бестимусных мышей/мышей с подавленным иммунитетом, их не лечили на протяжении всего исследования, им не вводили какие-либо линии раковых клеток, и они служили контролем для мониторинга иммунных маркеров. Оставшихся мышей разделили на три группы по 10 особей для каждой клеточной линии ( $N = 60$  для двух клеточных линий). В этом исследовании было три группы: группа с добавками АНСС ( $N = 10$ ), контрольная группа без добавок ( $N = 10$ ) и контрольная группа с носителем (автоклавированной воды) ( $N = 10$ ). В контрольной группе, не получавшей добавок, не проводилось никакого исследовательского вмешательства; Следуя традиционным моделям химической профилактики рака, группа, принимающая добавки АНСС, получала пероральную дозу (50 мг/кг, в 0,25 мл, через желудочный зонд), а группа, контрольная группа с носителем, получала пероральную дозу автоклавированной воды (0,25 мл, через желудочный зонд) в день, начиная с первого дня и продолжая до завершения исследования (90-й день), чтобы оценить, играет ли АНСС роль в предотвращении роста рака. Доза препарата АНСС была выбрана на основе текущей предполагаемой максимальной рекомендуемой дозы 3 г общей суточной дозы в соответствии с инструкциями производителя, при условии 100% биодоступности и с

использованием предполагаемого общего объема крови взрослого человека весом 60 кг. Эта же доза использовалась в предыдущих исследованиях препарата АНСС в сочетании с химиотерапией. Клетки SiHa ( $0,5 \times 10^6$ ) и клетки C33A ( $0,5 \times 10^6$ ) диспергировали в PBS с 20% матригелем и вводили подкожно самкам бестимусных мышей/мышей с подавленным иммунитетом на 8-й день после 1 недели приема добавок АНСС. У каждой мыши выросла одна опухоль на спинной поверхности. Измерения опухоли проводились три раза в неделю с электронными штангенциркулями (Mitutoyo, Utsunomiya, Japan). Мышей ежедневно контролировали на наличие признаков/симптомов заболеваемости, включая, помимо прочего, вялость, потерю веса, анорексию или сутулость. Мышей умерщвляли путем ингаляции  $\text{CO}_2$  с последующим смещением шейных позвонков, когда диаметр опухоли составлял  $>15$  мм<sup>2</sup> и если в течение периода исследования обнаруживалось снижение массы тела на 10% или более. Каждая группа была разделена на две группы А и В. Образец крови 1% от массы тела у всех мышей всех групп собирали из их лицевой вены каждые 14 дней в пробирку, содержащую ЭДТА, для проведения анализа на экспрессию различных иммунных маркеров в конце исследования. Кровь центрифугировали; отделенные сыворотки собирали в пробирку и хранили при отрицательной температуре  $20^\circ\text{C}$  в морозильной камере. Сыворотки подгруппы А тестировали на IgG1 и IFN  $\gamma$ , а сыворотки подгруппы В тестировали на IFN $\alpha/\beta$ . В конце исследования всех оставшихся мышей забивали, образцы крови собирали пункцией сердца, сыворотки отделяли и хранили при минус  $20^\circ\text{C}$ . Опухоли собирали в криопробирки и хранили при отрицательной температуре 80 градусов по Цельсию для дальнейшего изучения с помощью ПЦР для оценки статуса HR-HPV, как описано ниже.

### *ПЦР-анализ ДНК ВПЧ (16 или 18):*

Экстракцию ДНК проводили из обработанных и необработанных образцов клеток, а также образцов опухоли мыши с использованием наборов для выделения ДНК Promega (Madison, WI) в соответствии с протоколом производителя. Для обнаружения экспрессии гена вируса папилломы человека (ВПЧ) использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в соответствии с протоколом производителя с использованием набора Promega-Master Mix Kit (Madison, WI). Анализы проводили на 500 нг очищенной ДНК обработанных и необработанных образцов клеток и опухолей, как описано ниже. Реакция ПЦР содержала 500 нг ДНК, 4 мкл Master Mix и

ПЦР содержала 500 нг ДНК, 4 мкл Master Mix и 4 мкл каждого консенсусного праймера (MY11, MY09, обратный  $\beta$ -актин и прямой  $\beta$ -актин). Тридцать циклов начальной денатурации (95°C, 4 мин), денатурации (94°C, 1 мин), отжига (55°C, 1 мин) и удлинения (72°C, 1,5 мин) проводили на термодиклере BioRad.

$\beta$ -актин использовали в качестве контроля загрузки ДНК. После завершения реакции по 10 мкл каждого из всех продуктов ПЦР разделяли на 1,5% агарозном геле с бромистым этидием против ДНК-лестницы длиной 100 п.н.

Изображение было получено при УФ-освещении с использованием Kodak Imaging Station. Последовательность праймера MY11 представляет собой ДНК с 5' по 3'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG, а MY09 представляет собой ДНК с 5' по 3'-CGT CCM ARR GGA WAG TGA TC. Последовательность прямого праймера  $\beta$ -актина представляет собой AAC TGG GAC GAC ATC GAG AA, а последовательность обратного праймера  $\beta$ -актина представляет собой AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA.

### *ИФА для обнаружения иммунных маркеров*

После соответствующих режимов приема добавок в момент времени: исходный уровень, 2-я неделя, 4-я неделя, 6-я неделя и конечная временная точка, у мышей брали образцы крови, отделяли сыворотку и хранили при -20 °C для анализов ELISA для обнаружения IgG, IFN $\alpha/\beta$  и IFN $\gamma$ . Для каждой серии определений иммунных маркеров строили стандартную кривую с известными концентрациями этих маркеров согласно протоколу производителя. Сэндвич-ИФА для определения общего IgG, IFN  $\alpha/\beta$  и IFN  $\gamma$  проводили в соответствии с протоколом производителя.

Концентрации этих трех маркеров в сыворотке рассчитывали по стандартным графикам и сравнивали с исходными значениями линейные концентрации. Рассчитывали процент увеличения и/или снижения концентрации IgG, IFN $\alpha/\beta$  и IFN $\gamma$ .

## **Клинические исследования**

Пилотные исследования и поправки к исследованию (HSC-MS-12-0851) были одобрены Институциональным наблюдательным советом Центра медицинских наук Техасского университета в Хьюстоне.

Было проведено два пилотных исследования с участием женщин старше 30 лет с документально подтвержденной персистирующей инфекцией ВПЧ высокого риска в течение более 2 лет, все лабораторные показатели были в пределах нормы, нормальная гистология до CIN2, как задокументировано в

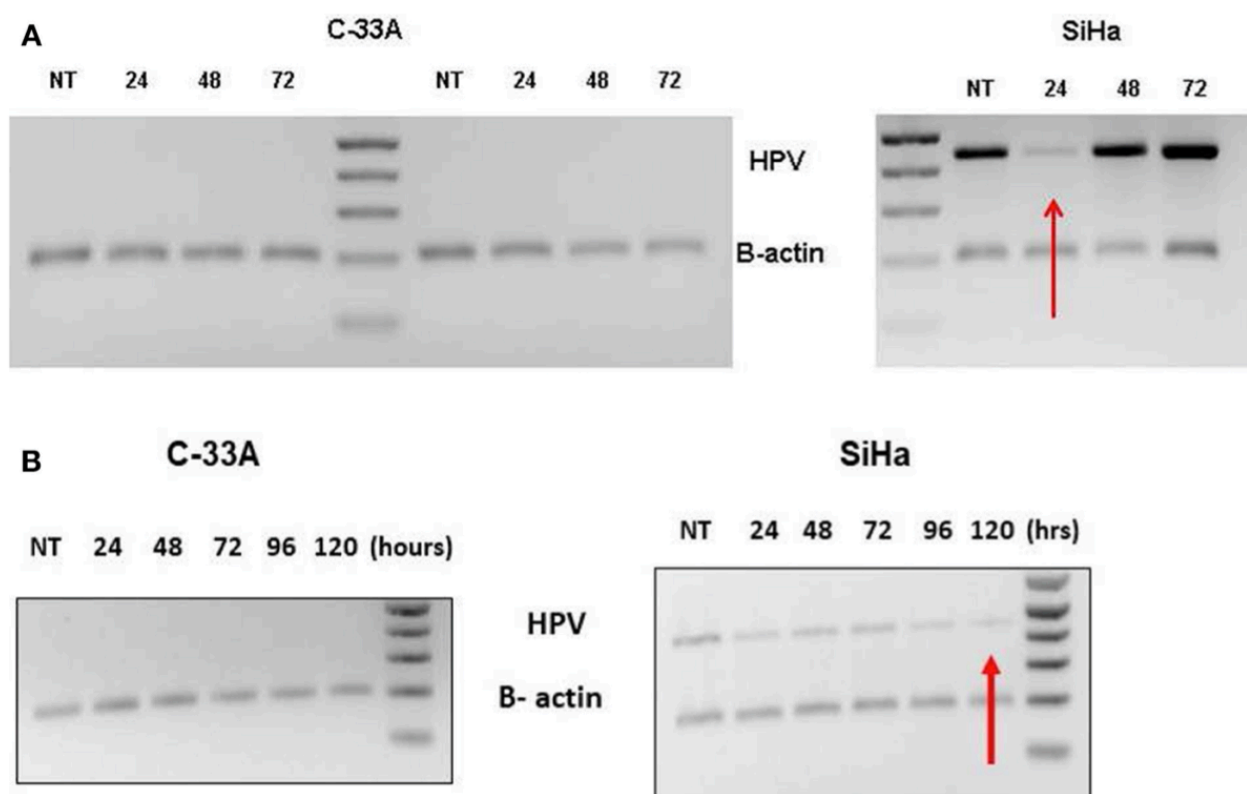
записях лечащего гинеколога. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в каждом из соответствующих пилотных исследований.

Была собрана демографическая информация о пациентах, включая: количество сексуальных партнеров в течение жизни, методы контрацепции и периодические тесты на беременность на протяжении всего исследования. Участники получали либо АНСС 1г перорально один раз в день натошак в течение от 6 месяцев до 8 месяцев, либо АНСС 3г перорально один раз в день натошак в течение 5 недель до 6 месяцев для лечения от HR-HPV. Тестирование на ВПЧ было завершено тестом ДНК ВПЧ Cervista (APTIMA, Hologic, Бедфорд, Массачусетс) в исследовании АНСС 3г. В исследовании АНСС 1г образцы пациентов сначала тестировали с помощью теста на РНК ВПЧ Е6/Е7 (APTIMA, Hologic, Бедфорд, Массачусетс), а затем подтверждали все отрицательные результаты на РНК ВПЧ или тестировали ДНК ВПЧ COBAS (Roche Molecular Systems, INC, Бранчбург, штат Нью-Джерси). Длительный ответ определяли на оставшихся отрицательных по HR-HPV как с помощью ДНК ВПЧ, так и с помощью методов РНК ВПЧ в течение не менее 3 месяцев в течение периода наблюдения после прекращения приема добавок АНСС. В обоих исследованиях иммунные маркеры, включая IgG и IFN  $\alpha/\beta/\gamma$ , контролировали с помощью анализов ELISA, как описано выше.

## **Данные и статистический анализ**

### *Доклинические исследования*

Метод «уравнения ресурсов» применялся для оценки размера выборки в исследованиях на животных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826013/>). Вкратце, рассчитывается E-значение, равное количеству животных минус количество групп, и обеспечивается его значение в диапазоне от 10 до 20. В этом исследовании было проведено независимое сравнение статуса HR-HPV, а также иммунного ответа между группой 1 (здоровые контроль) против 2 (АНСС), 1 против 3 (автоматизированный контроль) и 1 против 4 (без контроля добавок), таким образом,  $E = (10 \times 2) - 2 = 18$ , что находится в пределах диапазона. Анализ t-критерия Стьюдента использовался для оценки различий между исследуемыми группами, которые ответили, по сравнению с теми, которые не ответили, при этом р-значения меньше или равные 0,05 считались значимыми.



## РИСУНОК 1

(А) К клеточным линиям рака шейки матки человека C-33A (HPV-) и SiHa (HPV 16/18+) *in vitro* добавляли однократную дозу АНСС 0,42 мг/мл, а затем инкубировали в течение 72 часов. Исследование проводили в двух повторностях, как описано в материалах и методах. В то время как HR-HPV подавлялся в течение 24 часов, экспрессия через 48 и 72 часа не устраняла его. NT, контроль без лечения. (В) К клеточным линиям рака шейки матки человека C-33A (HPV-) и SiHa (HPV16/18+) *in vitro* добавляли ежедневную свежую дозу АНСС 0,42 мг/мл один раз каждые 24 часа в течение 5 дней (120 часов), как описаны в материалах и методах. NT, контроль без лечения. Это позволило устранить экспрессию HR-HPV в клеточной линии SiHa.

### Клиническое исследование

Первичным результатом для этого исследования был показатель успешного приема пищевых добавок у женщин, у которых не было инфицирования ВПЧ через 6 месяцев после начала приема пищевых добавок.

В этой популяции пациентов, женщин с персистирующей инфекцией HR-HPV, ожидаемый клиренс инфекции HR-HPV сам по себе составляет от 0 до 10% (15).

Персистентную инфекцию определяли как постоянный положительный результат на HR-HPV в течение > 2 лет, что подтверждалось тремя или более последовательными положительными результатами тестов на HR-HPV с интервалом не менее 6 месяцев в течение более 2 лет. Поскольку в настоящее время не существует активных добавок для элиминации инфекции HR-HPV, клинически любое улучшение ответа/излечения инфекции HR-HPV у этих женщин с персистирующими инфекциями будет клинически значимым.

Для этого пилотного исследования наш целевой показатель успеха добавок составлял 25% или более. При доверительном уровне 0,05 определяли размер выборки и связанную с ней статистическую мощность. Ожидаемый прирост составлял минимум 10 пациентов и максимум 25 пациентов в этом исследовании, а затем наблюдение за пациентами в течение 1 месяца (28 дней) после завершения приема добавок. Пациенты с положительным результатом после 6 месяцев приема добавок считались неудачными. Анализ Стьюдента был использован для оценки различий между пациентами, которые ответили, и теми, кто не ответил, с р-значениями, меньшими или равными 0.05, которые считались значимыми.



## Полученные результаты

В исследованиях ингибирования роста добавление АНСС в течение 72 часов не приводило к ингибированию роста клеток ни в одной из четырех клеточных линий рака шейки матки, протестированных при клинически значимой концентрации 0,42 мг/мл. Тем не менее, потенциальная прямая цитотоксичность наблюдалась при концентрации, обеспечивающей 50% ингибирование роста (IC50), для АНСС колебалась от 2,3 до 4 мг/мл в четырех клеточных линиях рака шейки матки человека, однако это значительно выше клинически достижимых системных концентраций. Эти результаты обобщены в таблице 1.

Добавление АНСС 0,42 мг/мл однократно в течение 72 часов инкубации, подавление экспрессии HR-HPV с первых 24 часов, но затем экспрессия HR-HPV восстанавливалась к 48 часам. Результаты для клеточных линий C33a (отрицательный контроль) и SiHa (положительные HPV16 и HPV18) суммированы на рисунке 1А. Добавление АНСС в дозе 0,42 мг/мл один раз каждые 24 часа в течение семи последовательных дней с последующим 7-дневным наблюдением без добавок приводило к исчезновению экспрессии HR-HPV во всех четырех клеточных линиях HR-HPV+ шейки матки. Репрезентативные результаты для SiHa (HPV16+/18+) по сравнению с отрицательным контролем C33a HPV представлены на рисунке 1В. В подтверждающих исследованиях *in vivo* на мышах прием АНСС в дозе 50 мг/кг перорально один раз в день в течение 90 дней ассоциировался с исчезновением экспрессии HR-HPV, которое сохранялось после 30-дневного перерыва в приеме добавок. Эти результаты суммированы на фиг. 2. Поскольку опухоли были инфицированы HR-HPV, а не мышью, уровни интерферона-бета, которые обычно повышены при хронических инфекциях, были нормальными. Влияние ежедневного приема АНСС в исследованиях на мышах было сосредоточено на уровнях IFN  $\gamma$  и IgG, которые представляли интерферон типа II, и иммунный ответ, усиливающийся со временем и коррелирующий с успешным устранением инфекций HR-HPV в модели рака шейки матки человека у мышей. Эти результаты обобщены на рисунках 3А, В. В первом пилотном исследовании АНСС 3 г первоначально включенные в исследование пациенты получали АНСС 3 г один раз в день натощак в течение 5 недель, возвращаясь раз в неделю для тестирования на ВР-ВПЧ и исследования образцов крови на иммунные маркеры. Как только они дали отрицательный результат, АНСС был остановлен, и тестирование HR-HPV

было повторено после прекращения приема АНСС. На основании анализа данных план приема добавок был изменен для продолжения приема 3 г АНСС один раз в день натощак с ежемесячным тестированием на ВПЧ и забором крови с обязательным минимумом в течение 1 месяца приема добавок АНСС после первого отрицательного результата. Основываясь на данных об иммунном ответе, протокол был снова изменен, чтобы требовать минимум 3 месяца и до 6 месяцев непрерывного приема АНСС, и по-прежнему требовалось не менее 1 месяца АНСС после первого отрицательного результата. Всего в исследование было включено 10 женщин с положительным ВПЧ высокого риска, которые ежедневно получали 3 г АНСС. У всех участников была подтверждена инфекция HR-HPV в течение > 2 лет, и она была подтверждена снова во время регистрации. Типирование специфического штамма HR-HPV было невозможно с финансовой точки зрения в пилотных исследованиях. Демографические данные пациентов приведены в таблице 2. Два пациента получали 3 г АНСС ежедневно натощак в течение 5 недель без отрицательного ответа на HR-HPV, и в соответствии с первоначальным дизайном протокола они были исключены из исследования, которое проводилось до изменений протокола, когда минимальная добавка АНСС была продлена до 3 месяцев в зависимости от иммунного ответа. Два пациента получали АНСС по 3 г в день натощак в течение 2 месяцев без отрицательного ответа на HR-HPV и были исключены из исследования до достижения уровня IFN $\beta$  <25 пг/мл. На основании данных об иммунном ответе продолжительность приема АНСС была увеличена до 6 месяцев. Остальные шесть пациентов получали АНСС по 3 г один раз в день натощак в течение как минимум 3 месяцев и до 6 месяцев (= за 1 час до еды или через 2 часа после). Из этих шести пациентов четыре (66,7%) смогли добиться устойчивого ответа, представленного снижением уровня IFN- $\beta$ , а затем оставшимся <25 пг/мл, и подтвердили отсутствие ДНК HR-HPV в течение >30 дней после прекращения приема добавок ( $p < 0,05$ ). Иммунный ответ IFN- $\beta$  резюмирован на фигуре 4А, где показано, что уровни IFN- $\beta$  ниже уровня 25 пг/мл связаны с успешным и стойким устранением персистирующих инфекций HR-HPV. Все пациенты хорошо переносили 3 г АНСС в день натощак без каких-либо сообщений о побочных эффектах. Было начато отдельное пилотное исследование АНСС 1 г, чтобы определить, будет ли эффективна более низкая доза добавки АНСС. Пациенты получали АНСС по 1 г в день натощак в течение не менее 6 и до 8 месяцев. В исследование были включены десять женщин с

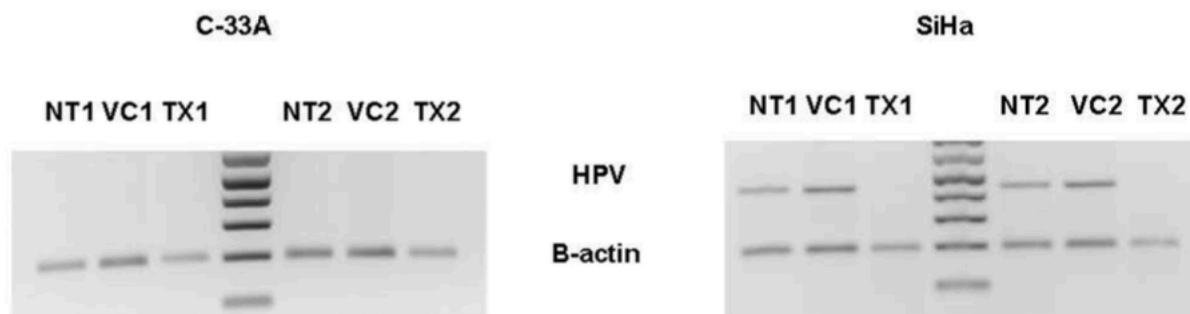
подтвержденной персистирующей инфекцией HR-HPV в течение >2 лет. Демографические данные пациентов приведены в таблице 2. Один пациент был исключен из исследования из-за несоблюдения протокола исследования, из оставшихся девяти пациентов, завершивших исследование, у 4 из 9 (44%) пациентов был подтвержден клиренс ВПЧ после 7 месяцев

приема АНСС по 1 г в день. натошак. Снова супрессия  $IFN\beta < 25$  пг/мл была подтверждена как маркер успешного устранения инфекции HR-HPV. (Рисунок 4В) Все пациенты хорошо переносили прием 1 г АНСС в день натошак без каких-либо сообщений о побочных эффектах.

Демография	АНСС 3гр пилотное исследование (N=10)	АНСС 1гр пилотное исследование (N=10)
Возраст	44.6 лет ( $\pm 8.8$ лет)	44.9 лет ( $\pm 12.6$ лет)
Раса	Все белые	Темнокожий (1) Латино (1) Белых (6) Азиатов (3)
Этнос	Латино (8) Испано (2)	Латино (9)
ИМС	26.6 ( $\pm 4.5$ )	21.3 ( $\pm 3.5$ )
Кол-во половых партнёров	20 ( $\pm 28$ )	9 ( $\pm 7.2$ )

**ТАБЛИЦА 2**

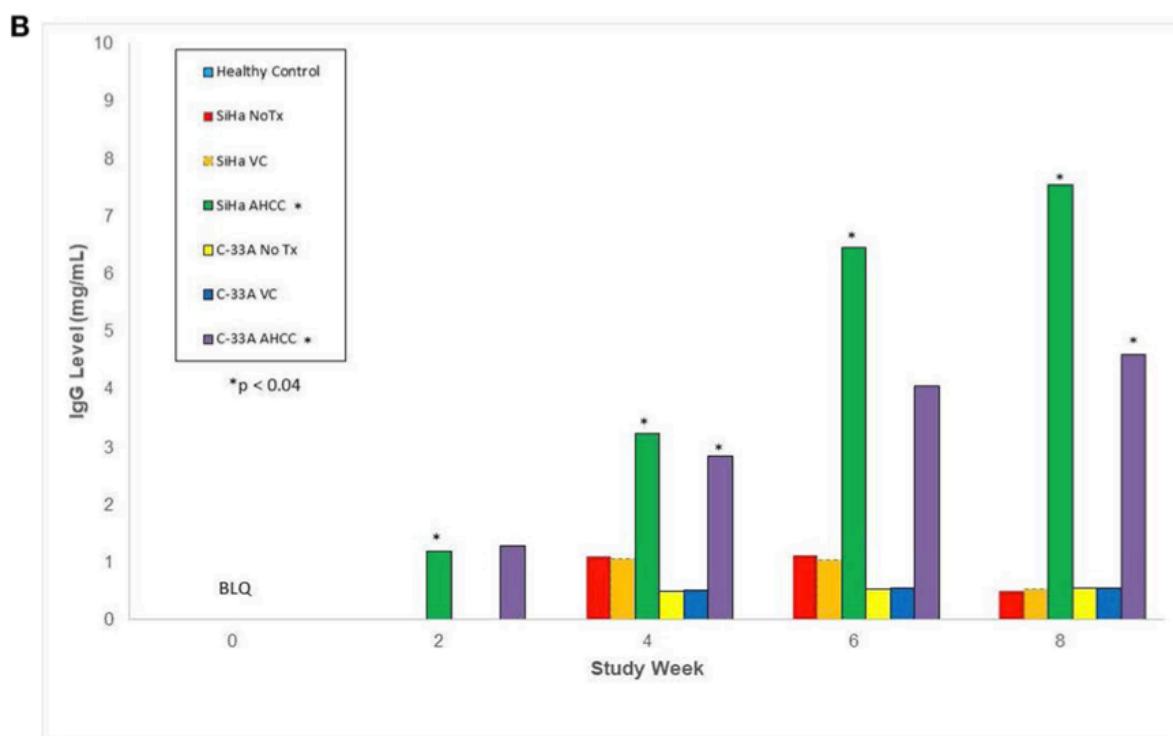
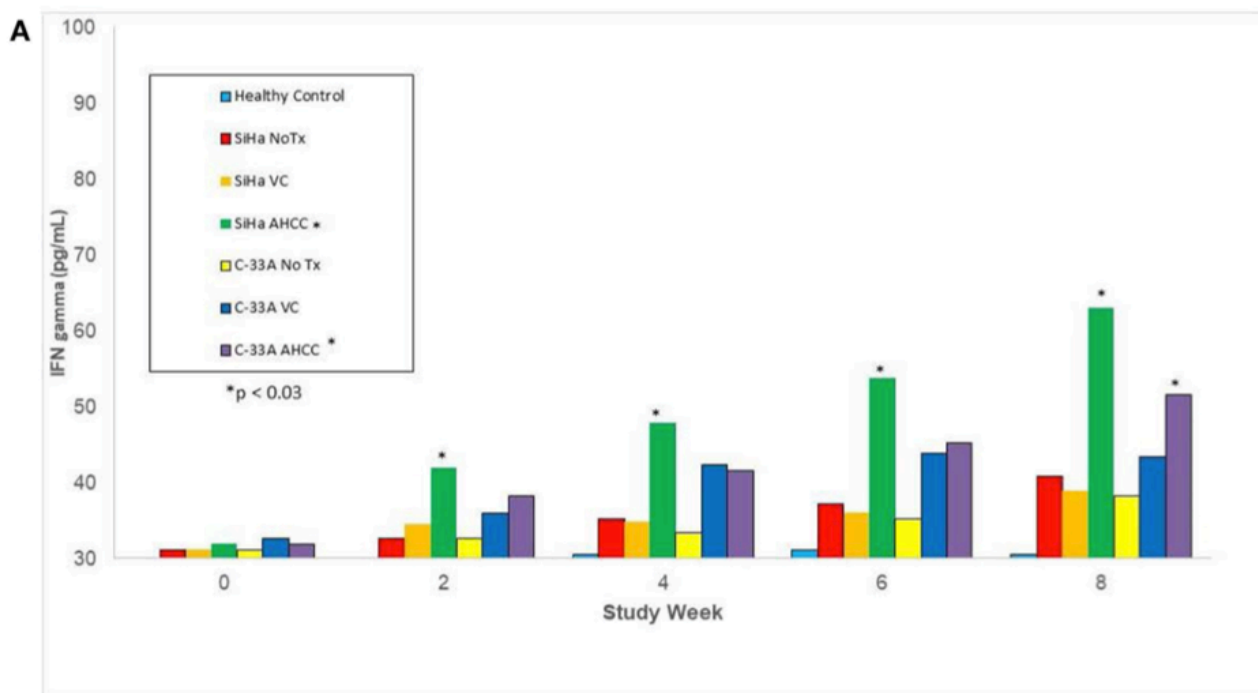
Резюме демографических данных пациентов для пилотных исследований АНСС



**РИСУНОК 2**

В исследовании на животных было три группы: группа с добавками АНСС (N = 10), контрольная группа без добавок (N = 10) и контрольная группа с носителем (автоклавированная вода) (N = 10). Группа, принимающая добавки АНСС, получала пероральную дозу (50 мг/кг, в 0,25 мл, через желудочный зонд); контрольная группа без добавок не подвергалась никакому исследовательскому вмешательству, а контрольная группа с носителем получала пероральную дозу автоклавированной воды (0,25 мл, через желудочный зонд) в день, начиная с нулевого дня, и продолжала до завершения исследования (день 90). TX1 представляет собой конец лечения, а TX2 представляет собой 90-й день исследования, то есть через 30 дней после прекращения приема добавок АНСС. Отсутствие HR-HPV в клеточных линиях SiHa при TX1 и TX2 подтверждает клиренс HR-HPV. NT, контроль без лечения; VC, контроль носителя/плацебо.





### РИСУНОК 3

Это представляет данные иммунных маркеров из исследований на животных, включая IFN- $\gamma$ , интерферон типа II, связанный с устранением вирусных инфекций, и IgG, антитела, связанные с иммунным ответом на вирусные инфекции, уровни после 30 дней приема добавки АНСС 50 мг/кг один раз в день в моделях на мышах, как описано в методах и материалах. Ежедневное добавление АНСС на уровни IFN- $\gamma$  и IgG увеличивалось со временем и коррелировало с успешным устранением инфекций HR-HPV в модели мышей SiHa (HPV 16/18+). (А) Уровень IFN- $\gamma$  (ПРИМЕЧАНИЕ: ось Y начинается с 30 пг/мл)  $p < 0,03$  (В) Уровень IgG1,  $p < 0,04$ .

## Обсуждение

Представленное лабораторное исследование предоставляет пошаговые данные, подтверждающие гипотезу о том, что добавки АНСС модулируют иммунную систему хозяина, в частности, путем подавления повышенных уровней  $IFN\beta$ , для эффективного устранения хронических, персистирующих инфекций HR-HPV. После наблюдения за элиминацией HR-HPV *in vitro* в группе клеточных линий рака шейки матки человека были завершены исследования на животных, которые также продемонстрировали успешную и устойчивую элиминацию HR-HPV после завершения приема добавок АНСС. Наконец, в двух пилотных исследованиях «доказательства концепции» ежедневного приема добавок АНСС была достигнута успешная элиминация HR-HPV, что было стойким ответом. Данные, полученные как на животных, так и на людях, предполагают, что механизм, при котором добавка АНСС поддерживает иммунную систему хозяина в борьбе с ВПЧ-инфекцией, объясняется модуляцией экспрессии и передачи сигналов  $IFN\beta$ , которые, как известно, повышены при хронических вирусных инфекциях (16, 17). В предыдущих исследованиях на мышах CMV было показано, что  $IFN\beta$ , интерферон типа I, связан с вирулентностью инфекции со значительно повышенными уровнями при хронических/персистирующих вирусных инфекциях (16, 17). Повышенные уровни  $IFN\beta$  подавляют высвобождение/продукцию интерферона типа II ( $IFN\gamma$ ), необходимого для устранения вирусных инфекций (16, 17). Следовательно, подавление  $IFN\beta$  приводило к исчезновению ЦМВ-инфекции (16, 17). HR-HPV, как и многие вирусы, такие как CMV, развили стратегии противодействия сигнальным путям интерферона (IFN). В частности, регуляторные факторы интерферона (IRF) могут способствовать клеточному иммунитету, а также способствовать пути онкогенеза в ответ на различные внеклеточные сигналы (18, 19). В частности, было показано, что IRF-2 активирует экспрессию генов E6/E7 HR-HPV и способствует пути онкогенеза (20). Однако в конечном итоге при персистирующих инфекциях  $IFN\alpha/\beta$  также индуцируют IRF-1, который помогает поддерживать персистентную экспрессию вирусных генов (21, 22). Лейс и др. подтвердили, что повышенные уровни  $IFN\beta$  будут индуцировать IRF-1 и IRF-2, способствующие персистентным инфекциям HPV16 (23). Недавно две независимые исследовательские группы, оценивающие персистирующие инфекции, вызванные вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), продемонстрировали,

что подавление хронической передачи сигналов  $IFN\beta$  может сбрасывать иммунитет хозяина и обеспечивать контроль и устранение персистирующих вирусных инфекций (16, 17). Это исследование, представленное здесь, является первым, которое определило, что именно этот механизм подавления  $IFN\beta$  (интерферон типа I) с помощью АНСС привел к усилению регуляции  $IFN\gamma$  (интерферон типа II) и окончательному устранению персистирующих инфекций HR-HPV. Имеются некоторые ограничения на представленные данные. Во-первых, в доклинических условиях не существует установленной животной модели HR-HPV, что также было проблемой при доклинической разработке вакцин против ВПЧ. В качестве суррогата была использована опухоль человека, инфицированная HR-HPV, чтобы определить, может ли инфекция HR-HPV быть излечена с помощью добавки АНСС и была ли длительная реакция после прекращения приема добавки АНСС.

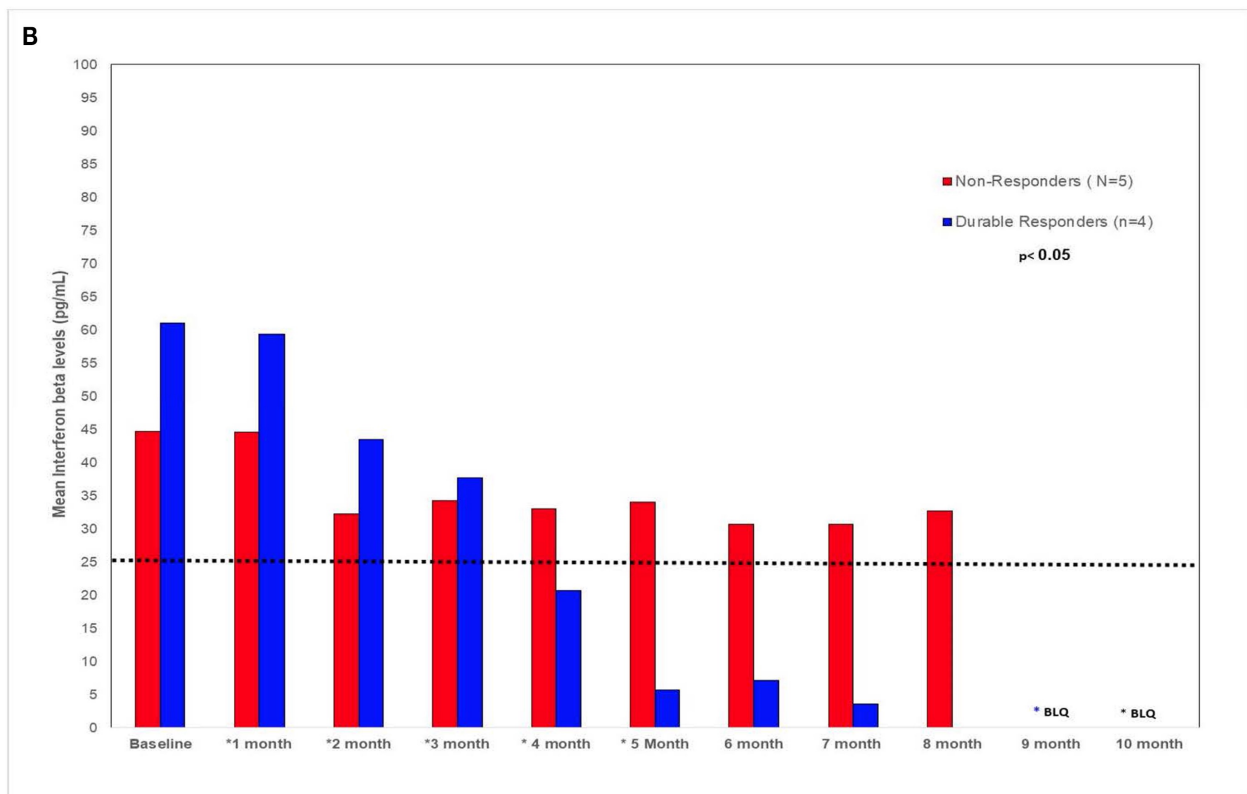
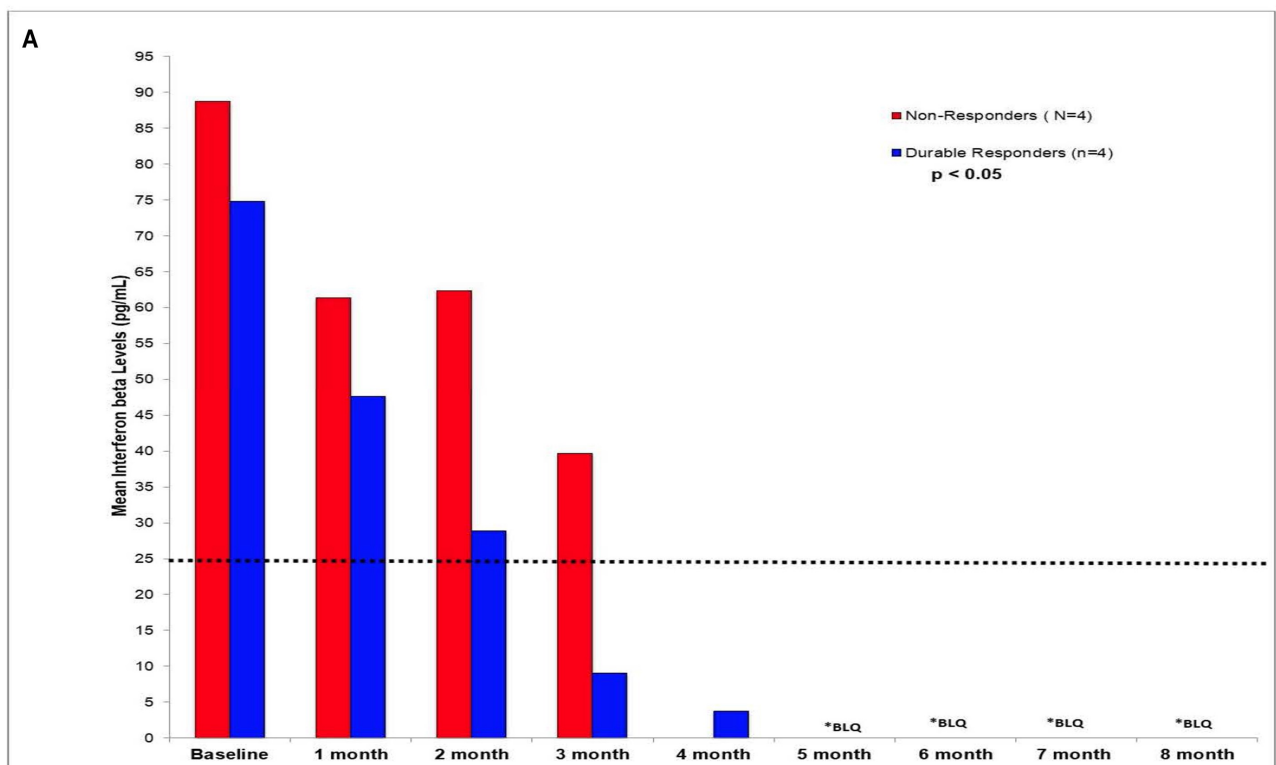
Кроме того, как в доклинических, так и в клинических исследованиях было бы идеально подтвердить эрадикацию с помощью количественных методов ПЦР, а также оценить другие иммунные маркеры, такие как CD8+ Т-клетки или естественные киллеры (NK), но из-за ограниченного финансирования и предварительное исследование, исчерпывающая оценка иммунной панели не мог быть завершен. Тем не менее, в рамках продолжающегося подтверждающего исследования фазы II эти исследования оцениваются.

Существует ограниченное количество эффективных вариантов лечения инфекций, вызываемых ВПЧ высокого риска; Большинство методов местного лечения заключается в облегчении симптомов и удалении симптоматических поражений, которые часто повторяются.

К счастью, большинство инфекций HR-HPV излечиваются в течение 6–18 месяцев самостоятельно без вмешательства; только около 10% женщин будут страдать персистирующей инфекцией ВПЧ (15, 24).

На сегодняшний день не существует общедоступных эффективных системных вмешательств для устранения инфекции HR-HPV.

В настоящее время профилактика инфекций HR-HPV с помощью девятивалентного продукта вакцины против HPV до воздействия ВПЧ продемонстрировала наилучший потенциал для устранения инфекций HR-HPV. Однако эти вакцины малоэффективны для тех, кто уже инфицирован инфекциями HR-HPV.



**РИСУНОК 4**

(А) Добавка АНСС 3 г (В) Добавка АНСС 1 г. IFN-β представляет собой IFN типа 1, часто связанный с вирулентностью хронических вирусных инфекций. Хронические вирусные инфекции часто связаны с высоким уровнем IFN-β, что приводит к подавлению продукции IFN-γ и NK/T-клеточного цитотоксического клеточного иммунитета. В обоих пилотных исследованиях наблюдалось подавление АНСС-добавок уровней IFN-β хозяина ниже уровня 25 пг/мл, что приводило к модулированию цитотоксического клеточного иммунитета для успешного и стойкого устранения стойких инфекций высокого риска HR-HPV.

## Наличие данных

Наборы данных, созданные для этого исследования, доступны по запросу соответствующему автору.

## Авторский вклад

JS участвовал в концептуализации, обработке данных, формальном анализе, привлечении финансирования, расследовании, методологии, управлении проектом, контроле, написании — первоначальном черновике и редактировании. LM и AG участвовали в обработке данных, исследовании, форм.анализе, методологии, проверке, написании — первоначальном проекте, обзоре и редактировании. BR и MB внесли свой вклад в сбор данных, исследование, написание, обзор и редактирование. JF участвовал в методологии, расследовании, написании, обзоре и редактировании. JL и ТВ участвовали в расследовании, написании, обзоре и редактировании. YB и RO внесли свой вклад в методологию, руководство, написание, обзор и редактирование.

## Финансирование

Это исследование было частично поддержано неограниченным исследовательским грантом от Amino Up Chemical Company; Ларри С. Гилстрап, доктор медицинских наук, Центр исследований перинатального и женского здоровья; и благотворительные фонды исследовательской программы WHIM; Национальный институт здравоохранения 1R03CA212935.

## REFERENCES

1. American Cancer Society. *Global Burden of Cancer in Women: Current Status, Trends, and Interventions*. Available online at: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/global-cancer-facts-and-figures/global-burden-of-cancer-in-women.pdf> (Accessed July 9, 2018).
2. Lombard I, Vincent-Salomon A, Zafrani B, de la Rochefordiere A, Clough K, Favre M, et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol*. (1998) 16:2613–9. doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2613
3. Harris RWC, Brinton LA, Cowdell RH, Skegg DC, Smith PG, Vessey MP, et al. Characteristics of women with dysplasia or carcinoma *in situ* of the cervix uteri. *Br J Cancer*. (1980) 42:359–69. doi: 10.1038/bjc.1980.246

Furumoto H, Irahara M. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. *J Med Invest*. (2002) 49:124–33.

4. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herreor R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. (2003) 348:518–27. doi: 10.1056/NEJMoa021641

5. Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, DeClercq E. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol Res*. (1998) 10:523–31.

6. Andrei G, Snoeck R, Schols D, De Clercq E. Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV)-positive cells. *Oncol Res*. (2000) 12:397–408. doi: 10.3727/096504001108747855

7. Schiffman M, Wheeler CM, Castle PE. Human papillomavirus DNA remains detectable longer than related cervical cytologic abnormalities. *J Infect Dis*. (2002) 186:1169–72. doi: 10.1086/343816

8. Uno K, Kosuna K, Sun B, Fujii H, Wakame K, Chikumaru S, et al. Active Hexose Correlated Compound (AHCC) improves immunological parameters and performance status of patients with solid tumors. *Biotherapy*. (2000) 14:303–9.

9. Gao Y, Zhang D, Sun B, Fujii H, Kosuna K, Yin Z. Active hexose correlated compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptive immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. (2006) 55:1258–66. doi: 10.1007/s00262-005-0111-9

11. Hirose A, Sato E, Fujii H, Sun B, Nishioka H, Aruoma OI. The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. (2007) 222:152–8. doi: 10.1016/j.taap.2007.03.031

12. Hunter RJ, Fujii H, Wakame K, Gaikwad A, Wolf JK, Smith JA. Evaluation of active hexose correlated compound (AHCC) in combination with PEGylated liposomal doxorubicin for treatment of ovarian cancer. *Int J Appl Res Nat Prod*. (2011) 4:6–11. Available online at: <http://www.doaj.org/doaj?fun=openurl&issn=19406223&genre=journal>

13. Matsui Y, Uhara J, Satoi S, Kaibori M, Yamada H, Kitade H, et al. Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J Hepatol.* (2002) 37:78–86. doi: 10.1016/S0168-8278(02)00091-0 investigation, writing—review and editing. JF contributed to methodology, investigation, writing—review and editing. JL and TB contributed to investigation, writing—review and editing. YB and RO contributed to methodology, supervision, writing—review and editing. FUNDING This research was partially supported by an unrestricted research grant from Amino Up Chemical Company; *Larry C. Gilstrap M.D.* Center for Perinatal and Women's Health Research; and WHIM Research Program philanthropic funds; NIH 1R03CA212935.
14. Kawaguchi Y. Improved survival of patients with gastric cancer or colon cancer when treated with active hexose correlated compound (AHCC): effect of AHCC on digestive cancer. *Nat Med J.* (2009) 1:1–6.
15. Doorbar J. Host control of human papillomavirus infection and disease. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol.* (2018) 47:27–41 doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.001
16. Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, et al. Blockage of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science.* (2013) 340:202–7. doi: 10.1126/science.1235208
17. Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, et al. Persistent LCMC infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science.* (2013) 340:207–11. doi: 10.1126/science.1235214
18. Fujita T, Kimura Y, Miyamoto M, Barsoumain EI, Taniguchi T. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature.* (1989) 337:270–2. doi: 10.1038/337270a0
19. Honda K, Tanguchi T. Toll-like receptor signaling and IRF transcription factors. *IUBMB Life.* (2006) 58:290–5. doi: 10.1080/15216540600702206
20. Lace MJ, Anson JR, Haugen TH, Turek LP. Interferon regulatory factor (IRF)- 2 activates the HPV-16 E6-E7 promoter in keratinocytes. *Virology.* (2010) 399:270–9. doi: 10.1016/j.virol.2009.12.025
21. Kimura T, Nakayama K, Penninger J, Kitagawa M, Harada H, Matsuyama Tet al. Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science.* (1994) 264:1921–4. doi: 10.1126/science.8009222
22. Kano A, Haruyama T, Akaike T, Watanabe Y. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* (1999) 257:672–7. doi: 10.1006/bbrc.1999.0276
23. Lace MJ, Anson JR, Klingelutz AJ, Harada H, Taniguchi T, Bossler AD, et al. Interferon-beta treatment increases human papillomavirus early gene transcription and viral plasmid genome replication by activating regulatory factor (IRF)-1. *Carcinogenesis.* (2009) 30:1336–44. doi: 10.1093/carcin/bgp150
24. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 338:423–8. doi: 10.1056/NEJM199802123380703







