

Корисна модель відноситься до галузі медицини та імунології, зокрема до способу одержання протипухлинних вакцин в експериментальних моделях з використанням тварин і може застосовуватись в клінічній онкології.

В цій галузі прийнято використовувати такі терміни і скорочення:

- імуногенність - здатність викликати імунну відповідь;
- ад'ювант - сполука, яка при введенні в організм викликає неспецифічне посилення імунної відповіді і тим самим підвищує здатність організму реагувати на будь-який імуноген;
- аутологічні пухлинні клітини - клітини пухлини видаленої з організму реципієнта;
- гомогенат клітин - суспензія субклітинних компонентів дезінтегрованих клітин;
- кріодеструкція - дезінтеграція з використанням низьких температур;
- ПГ-пептидоглікан.

Відомий спосіб одержання протипухлинних вакцин на основі аутологічних пухлинних клітин з використанням в якості ад'юванта імуномодуючого препарату бластолену, який включає промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення і обробку. Згідно цього способу, проводять обробку 10^7 пухлинних клітин 1мл фільтрату культуральної рідини *B.subtilis* або 10^7 пухлинних клітин в 1мл розчину комплексного препарату з концентрацією 0,15мг/мл, який виділяли з фільтрату культуральної рідини, з наступним комбінованим почерговим введенням вакцинного препарату та бластолену, що виготовлений на основі плазматичних мембран молочнокислих бактерій *L.Delbrueckii* [Потебня Г.П., Лісовенко С.Г., Мосієнко В.С., Лісовенко В.Г. Ефективність комплексного застосування протипухлинної вакцини та імуномодуючого препарату бластолен. // Український хіміотерапевтичний журнал 2002 - №2 (14) - С.60].

Недоліками вказаного способу є: низька терапевтична ефективність, двократні ін'єкції гомогенату пухлинних клітин та бластолену, а також висока вартість бластолену.

Відомий спосіб одержання протипухлинної аутовакцини, який включає промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення, обробку пухлинних клітин продуктом метаболізму та інкубацію отриманої суміші. Згідно способу, клітини обробляють продуктами метаболізму штаму *B.subtilis* 1MB B-7025, а суміш інкубують протягом 0,5-1 години. Як продукти метаболізму використовують фільтрат культуральної рідини штаму *B.subtilis* 1MB B-7025 в кількості 1мл або виділений з нього лектин в дозі 0,06-0,5мг/мл на $0,9 \times 10^{-1}$, $1,1 \times 10^7$ пухлинних клітин. [Опис до патенту України №57869, МПК⁸ А61К35/12, 2003].

Недоліком вказаного способу є: тривалий термін виготовлення препарату; відносно низька терапевтична ефективність отриманого препарату, обумовлена слабкою імуномодуляторною дією бактеріальних лектинів [Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів: Монографія / за ред. Позура В.К. - К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет» 2003. - 305с.].

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу одержання протипухлинної аутовакцини шляхом обробки пухлинних клітин ад'ювантною, нешкідливою для організму речовиною з потужною імуностимулюючою активністю, пептидогліканом (ПГ) *Staphylococcus aureus*, що забезпечить значне підвищення її терапевтичної ефективності при скороченні терміну виготовлення.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання протипухлинної аутовакцини, який включає промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення, обробку і інкубацію, згідно корисної моделі, пухлинні клітини обробляють пептидогліканом *Staphylococcus aureus* Wood 46, котрий попередньо гомогенізують ультразвуком при 22Гц, протягом 1хв. для отримання суспензії з максимальною імуностимуляторною активністю, а одержану суміш піддають кріодеструкції при температурі $\leq -20^\circ\text{C}$.

Використання запропонованого способу забезпечує: одержання протипухлинної аутовакцини з високою терапевтичною ефективністю, обумовленою потужною імуностимулюючою здатністю пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46; некротичну загибель пухлинних клітин, експозицію пухлинних антигенів і підвищення імуногенності вакцини. Крім того, дозволяє скоротити термін одержання препарату за рахунок скорочення тривалості стадії інкубації пухлинних клітин.

Можливість здійснення корисної моделі ілюструється таким прикладом, який не обмежує обсяг правової охорони.

Приклад

Пухлинну тканину сингенної лінії мишей C57/Bl з прищепленою карциномою легені Льюїс тричі промивають стерильним фізіологічним розчином, подрібнюють. Для приготування 1мл вакцини $1,0 \times 10^7$ пухлинних клітин обробляють 1мл суспензії ПГ *S.aureus* з концентрацією 500мкг/мл, котру попередньо гомогенізують шляхом ультразвукової обробки при 22Гц протягом 1хв. Використання такого режиму ультразвукової гомогенізації дозволяє отримати суспензію пептидоглікану з максимальною стимулюючою дією по відношенню до клітин імунної системи, які приймають участь у розпізнаванні антигенів аутологічних пухлинних клітин і активації специфічної протипухлинної імунної відповіді (табл.1).

Таблиця 1

Режим ультразвукової гомогенізації пептидоглікану протягом 1хв. (Гц)	22	25	28	31	34	37	40
Стимуляція функціональної активності макрофагів (%)	27	24	13	13	22	21	24

Отриману суміш інкубують в термостаті при 37°C протягом 15-30хв., після чого мікроскопічно перевіряють токсичність ПГ *S.aureus* по відношенню до пухлинних клітин шляхом підрахунку мертвих пухлинних клітин. За результатами проведених досліджень встановлено, що пептидоглікан не чинить токсичної дії по відношенню до клітин карциноми легені Льюїс.

Потім вакцину піддають кріодеструкції при температурі $\leq -20^\circ\text{C}$. Це призводить до некротичної загибелі пухлинних клітин, внаслідок чого відбувається експозиція пухлинних антигенів і підвищується імуногенність

протипухлинної аутовакцини. Проведення процедури при температурах, вищих ніж -20°C знижує ефективність деструкції на 10-15%.

Після проведення кріодеструкції досліджують терапевтичну ефективність протипухлинної аутовакцини. При дослідженні терапевтичної ефективності мишам лінії C57/Bl перещеплюють карциному легені Льюїс підшкірно в область крижового відділу по 0,2мл суспензії пухлинних клітин в концентрації 4×10^4 . Вакцинний препарат вводять підшкірно в область крижового відділу в об'ємі 0,3мл 5 разів, з інтервалом 2 доби, починаючи з наступного дня після перещеплення пухлини. Терапевтичну ефективність препарату оцінюють за об'ємом пухлини, а також за середньою тривалістю життя дослідних тварин. Дані приведені в таблиці 2 та 3 відповідно.

Таблиця 2

Групи тварин	Середній об'єм пухлин, см ³
Контрольні тварини-пухлиноносії	5,7±0,9
Тварини-пухлиноносії, що отримали вакцину, доповнену лектином B.subtilis IMB B-70-25 (прототип)	5,0±0,8
Тварини-пухлиноносії, що отримали вакцину, доповнену ПГ S.aureus	3,6±0,3

У тварин, що отримали вакцину, доповнену ПГ S.aureus, розміри первинної пухлини менші на 37%, в порівнянні з контрольними пухлиноносіями, і на 28%, в порівнянні з тваринами, які отримали вакцину доповнену лектином B.subtilis IMB B-70-25 (прототип), що свідчить про підвищення терапевтичної ефективності приготованого вище зазначеним способом вакцинного препарату. Зважаючи на те, що пептидоглікан не чинить токсичної дії по відношенню до клітин пухлини, терапевтична ефективність отриманих вакцинних препаратів цілком обумовлена опосередкованою пептидогліканом активацією протипухлинного імунітету.

Таблиця 3

Групи тварин	Вживаність, %
Контрольні тварини-пухлиноносії	75
Тварини-пухлиноносії, що отримали вакцину, доповнену лектином B.subtilis IMB B-70-25 (прототип)	100
Тварини-пухлиноносії, що отримали вакцину, доповнену ПГ S.aureus	100

Таким чином, запропонований спосіб одержання протипухлинної вакцини дозволяє одержати вакцину зі значно вищою протипухлинною активністю. Терапевтична ефективність запропонованої вакцини в 1,4 рази перевищує ефективність вакцини, виготовленої за способом-прототипом. При цьому скорочується термін її приготування з 0,5 години до 15хв, за рахунок скорочення тривалості стадії інкубації пухлинних клітин.

Важливо відмітити, що при дослідженні в експерименті одержана таким способом вакцина не чинила на організм тварин імунодепресивної дії, натомість призводила до стимулювання як природного так і адаптивного імунітету та не мала шкідливих побічних ефектів.

Отже, висока ефективність і нешкідливість одержаної заявленим способом вакцини створює експериментальне обґрунтування для рекомендації впровадження її в клінічну практику для лікування радикально оперованих хворих з метою профілактики рецидивів і метастазів.