

Винахід відноситься до галузі біотехнології і стосується одержання протипухлинних засобів, які можуть використовуватися у медицині, а саме в онкології для одержання специфічного протипухлинного імунітету.

Відомі способи одержання вакцин на основі генної інженерії з використанням рекомбінантних білків (1, 2) або нуклеїнових кислот (3). В більшості випадків вакцини, одержані такими способами, несуть лише одну або декілька антигенних детермінант, і тому пухлинні клітини, що позбавились такого антигену внаслідок мутацій, які супроводжують пухлинну прогресію, виходять з-під імунного нагляду. Це значною мірою знижує ефективність подібних вакцин.

Відомий також спосіб одержання протипухлинної вакцини шляхом обробки пухлинних клітин фільтратом культурального середовища мікроорганізму *Bacillus mesentericus* АБ-56 та інкубації суміші протягом 1-2 годин (4). Для одержання вакцини таким способом необхідно від 4 до 10 годин, при цьому як профілактична, так і лікувальна ефективність її невисока.

Відомий спосіб одержання протипухлинної вакцини шляхом обробки попередньо подрібненої пухлинної тканини поліпептидом кислоти природи з молекулярною масою 26500 дальтон, виділеним із фільтрату культуральної рідини мікроорганізму штаму *Bacillus mesentericus* АБ-56 з наступною інкубацією протягом 1-2 год (5).

Через недостатню очистку в кінцевому продукті при застосуванні цього способу залишається велика кількість баластних речовин - білків, нуклеїнових кислот, нуклеотидів, амінокислот і т.п., а також продуктів мікробного походження та культурального середовища, що може викликати алергічні реакції, явища інтоксикації та інші побічні ефекти після використання вакцини за зазначеним вище способом.

Найближчим за сукупністю ознак аналогом є спосіб одержання протипухлинної аутовакцини шляхом промивання пухлинної тканини сольовим розчином, її подрібнення, обробки пухлинних клітин протеолітичним ферментом, фракціонування одержаного протеолітичного гідролізату і концентрування глікопептидів з молекулярною масою 12-100 кДа (6). Ми обираємо його за прототип.

Цей спосіб дозволяє одержати антигенні структури, придатні для використання в якості активних імуногенів для вакцинотерапії онкологічних захворювань.

Однак, застосування вакцини, одержаної таким способом, не забезпечує досягнення достатньо високої імунної відповіді через не досить високу антигенність застосованого імуногену.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу удосконалити спосіб одержання протипухлинної вакцини шляхом попереднього модифікування пухлинної тканини з тим, щоб забезпечити підвищення імуногенності вакцини.

Це досягається шляхом попереднього глибокого заморожування пухлинної тканини з наступним відтаюванням, оскільки біологічні тканини, зокрема тканини пухлин, які попередньо піддають кріодеструкції, мають значно більшу імуногенність, порівняно з немодифікованими тканинами.

Суть запропонованого винаходу „Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини” полягає в наступному: пухлинну тканину за строго контрольованих умов піддають кріодеструкції шляхом глибокого заморожування її з наступним відтаюванням, промиту сольовим розчином і подрібнену пухлинну тканину обробляють протеолітичним ферментом за контрольованих умов, далі фракціонують одержаний протеолітичний гідролізат та очищають одержані глікопептиди, які й використовують у якості імуногена. Пухлину заморожують шляхом накладання аплікатора, через який пропускають холодоагент до повного глибокого заморожування. Після зняття аплікатора пухлину залишають при кімнатній температурі до повного розморожування.

Глибину протеолітичного гідролізу контролюють методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію. При цьому гідроліз припиняють при утворенні пептидних фрагментів розміром 50 кДа. З утвореної в'язкої суміші видаляють ДНК та низькомолекулярні продукти відомими методами. Одержаний розчин олігопептидів піддають фракціонуванню за допомогою сульфату амонію, а потім, після видалення сольового компонента методами рідинної хроматографії з нього виділяють фракції, що містять вуглеводневий компонент. Фракції глікопептидів тричі промивають етанолом, розфасовують у стерильні ампули і зберігають при температурі 4-6°C. Перед застосування суспензію глікопептидів відділяють від етанолу шляхом центрифугування, осад розчиняють у стерильному 0,85% розчині хлориду натрію і використовують для протипухлинної імунізації.

Винахід ілюструє приклад конкретного виконання способу, що заявляється.

Приклад. У мишей з перещепленою пухлиною молочної залози Ca755 на 20 добу росту проводять глибоке заморожування пухлинної тканини за допомогою аплікатора з використанням рідкого азоту (t° 196°C) протягом 20 хв. Після зняття аплікатора тварин залишають до повного розморожування пухлини (25-30 хв.). При цьому спостерігається збільшення кровонаповнення, почервоніння та набрякання пухлинної тканини. Через 30 хв. 1 г пухлинної тканини подрібнюють ножицями, тричі відмивають фізіологічним розчином, забуференим до pH 7,5 фосфатним буфером. Одержаний промитий осад заливають 10 мл 0,15 М фосфатного буферу pH 9,5, що містить 0,1 мг/мл кристалічного трипсину. Суспензію клітин вміщують у термостат при t° 37°C і витримують на протязі однієї години. При цьому суспензія перетворюється на густу в'язку рідину. Після видалення ДНК шляхом центрифугування проводять фракціонування одержаного гідролізату сульфатом амонію. Збирають фракцію, що осаджується в межах 40-80% насичення. Осад розчиняють у невеликій кількості 0,05 М фосфатного буферу і піддають фракціонуванню на колонці з ДЕАЕ-целюлозою. Відбирають фракції, що містять полісахаридний компонент. Їх концентрують, тричі промивають 95% етанолом і зберігають в скляних запаяних ампулах при 14-6°C. Перед вживанням етанол відділяють центрифугуванням, осад глікопептиду розчиняють у стерильному 0,85% розчині хлориду натрію і використовують для імунізації.

Мишам лінії C₅₇Black трикратно 1 раз на тиждень під шкіру вводять одержаний глікопептид, що відповідає дозі, еквівалентній 10⁵ пухлинних клітин в об'ємі 0,1 мл фізіологічного розчину. Через три тижні тваринам прищеплюють пухлину молочної залози Ca 755. Результати дослідження ілюструються таблицею.

Таблиця

Вплив імунізації глікопептидом, одержаним з пухлинної тканини, та з пухлинної тканини, попередньо підданої кріодеструкції, на ріст експериментальної меланоми молочної залози

	Контроль	Вакцина за способом-прототипом	Вакцина з модифікованої пухлини (кріодеструкція)
Об'єм пухлин мм	850	280	200
% тварин з пухлинами	100	85	60

Як видно з даних таблиці, у тварин яких імунізували глікопептидом, одержаним з пухлинної тканини, спостерігається гальмування пухлинного росту на 67%. У дослідях, коли вакцина була виготовлена за способом, що заявляється, тобто з попередньо кріомодифікованої пухлинної тканини відсоток гальмування досягає 76%. Крім того у серії дослідів, де вакцину одержували за методом- прототипом, кількість тварин без пухлин складала 15%. У серії дослідів, коли для виготовлення глікопептиду використана тканина пухлини, попередньо модифікована методом глибокого заморожування, кількість тварин у яких пухлини не розвинулися, сягала 40%. Одержані дані свідчать про доцільність використання глікопептидних вакцин, виготовлених з попередньо модифікованої пухлинної тканини методом глибокого заморожування.

Список літератури

1. Govindaswami R., Rao K., Dongxu Q. A novel and efficient method for synthetic carbohydrate conjugate vaccine preparation: synthesis of sialyl Tn-KLH conjugate using a 4-(4-N-maleimidomethyl)cyclohexane-l-carboxyl hydrazide (MMCCN) linker arm. Glycoconjugate J. 1998; 15: 217-21.
2. Hariharan K., Braslawsky G., Bamett RS. Tumor regression in mice following vaccination with human papillomavirus E7 recombinant protein in PRO VAX. Int J. Oncol. 1998; 12; 1229-35.
3. Дебабов В.Г. ДНК-вакцинация и генотерапия на основе транзientной экспрессии нуклеиновых кислот в соматических клетках человека и животных. Мол. биология 1997; 31:209-15.
4. Затула Д.Г. Канцерогенез и микроорганизмы В кн. «Канцерогенез и антиканцерогенез». Киев: Наукова думка, 1979, -С.326-396.
5. Патент України №1667 на винахід „Спосіб одержання протипухлинної вакцини". Бюл. №3, 25.10.94.
6. Патент України №57608 на винахід „Спосіб одержання протипухлинної автовакцини". Бюл. №6, 16.06.03.