



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16938 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61K 35/28МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПУХЛИНОСПЕЦИФІЧНОГО ФАКТОРА ПЕРЕНОСУ

1

2

(21) а200504315

(22) 06.05.2005

(24) 15.09.2006

(46) 15.09.2006, Бюл. № 9, 2006 р.

(72) Фільчаков Феодосій Вікторович, Бобро Леонід  
Іванович, Шуміліна Катерина Станіславівна, Гріне-  
вич Юрій Якимович(73) ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ  
НАУК УКРАЇНИ(57) Спосіб отримання пухлиноспецифічного пре-  
парату фактора переносу, що включає викорис-  
тання низькомолекулярного екстракту лімфоцитів  
селезінки (спленоцитів) тварин, який **відрізняєть-  
ся** тим, що джерелом для отримання фактора пе-  
реносу є неуразнені клітини щурячої селезінки, в  
яку попередньо за 7 днів трансплантовано пухлину.

Корисна модель відноситься до галузі меди-  
цини, зокрема до онкології і може бути використа-  
на при отриманні препаратів для імунотерапії хво-  
рих онкологічного профілю.

Фактор переносу (ФП), transfer factor являє со-  
бою низькомолекулярну речовину, яка здатна пе-  
реносити клітинно-опосередковану імунну реакцію  
на антиген від імунного донора до неімунного ре-  
ципієнта. Активним компонентом ФП є трансфер-  
факторні поліпептиди (ТФ-поліпептиди) з молеку-  
лярною масою 3,5-12кД [1], які здатні афінно  
зв'язуватись з гомологічним антигеном [2]. Здат-  
ність тварин продукувати ФП регулюється генети-  
чно, але перенесення гіперчутливості уповільнено-  
го типу за допомогою ФП є генетично  
необмеженим [3]. Клінічними дослідженнями до-  
ведено, що ФП може бути ефективним засобом  
імунотерапії хворих з широким спектром імунопатології,  
включаючи рецидивуючі та дисеміновані  
інфекції [4, 5, 6].

Вважається, що джерелом ФП є Т-лімфоцити;  
проте не виключено, що окрім Т-лімфоцитів його  
можуть продукувати всі чи, принаймні, більшість  
імунокомпетентних клітин.

Імунофармакологічні препарати ФП, що виро-  
бляються за кордоном під комерційними назвами:  
Imreg-1 та ISS (США), Transfer Faktor (Німеччина),  
RCTF-1 (Японія), HEBERTRANS (Куба), Аффіно-  
лейкін (Російська Федерація), отримують на основі  
донорської крові, лейкоцитарної маси, залишкових  
продуктів виробництва лейкоцитарного інтерфе-  
рону та лімфоїдної тканини. Більшість дослідників,  
що вивчали ефективність ФП в імунотерапії онко-  
логічних хворих, застосовували препарати ФП,

отримані з лейкомаси донорів [7, 8] чи лейкоцитів  
осіб, що перебували в контакт з хворими [9]. Про-  
те, ці препарати ТФ-поліпептидів володіли висо-  
кою імунофармакологічною активністю, яка, на  
відміну від пухлиноспецифічної активності, може  
бути небажаною, а її ефекти непрогнозованими  
при проведенні імунотерапії онкологічних хворих.

З метою дослідження властивостей та механі-  
змів дії ТФ-поліпептидів в експериментах на лабо-  
раторних тваринах препарати ФП, як правило,  
отримують з периферичної крові або клітин селе-  
зінки цих тварин [10].

За найближчий аналог корисної моделі обрано  
спосіб отримання ФП у мишей з метою досліджен-  
ня механізмів реалізації його дії [Alvarez-Thull L.,  
Kirkpatrick CH. Profiles of cytokine production in  
recipients of transfer factors //Biotherapy. -1996.- №9.  
-р.55-59]. Автори отримували ТФ-поліпептиди з  
клітин селезінки інтактних мишей (неспецифічний  
препарат). Для цього після евтаназії у мишей ви-  
лучали селезінку, яку протирали крізь сито, й  
отримували суспензію спленоцитів. Їх руйнували  
замороженням-відтаненням до завершення лізису  
клітин. Лізат піддавали діалізу з подальшою ліофі-  
лізацією. Ліофілізований матеріал відновлювали  
до концентрації  $10^8$  клітин/мл деіонізованою во-  
дою. Потім препарат заморожували до часу вико-  
ристання.

Позитивним в найближчому аналогові є вико-  
ристання як джерела ТФ-поліпептидів селезінки  
мишей, з якої можна отримати достатньо велику  
кількість лімфоцитів для виділення ФП.

(19) UA (11) 16938 (13) U

Недоліком найближчого аналогу є неможливість отримання з клітин селезінки інтактних мишей ФП із пухлиноспецифічними властивостями.

В основу корисної моделі покладено задачу створення способу отримання пухлиноспецифічного ФП шляхом його виділення з нетрадиційного джерела - неуражених клітин щурячої селезінки, в яку трансплантовано пухлину, що в перспективі дасть можливість отримати препарат, який може бути використаний в імунотерапії онкологічних хворих.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

В селезінку інтактним щурам трансплантують пухлину об'ємом  $1\text{мм}^3$ . На 7-25 добу після трансплантації під ефірним наркозом тварин умертвляють та видаляють неушкоджені пухлинним процесом частини селезінки. Їх піддають механічній дезінтеграції та фільтрації крізь капронове сито. Стандартну кількість лімфоцитів ( $5 \times 10^8$  клітин) в 0,5мл ізотонічного розчину NaCl піддають п'ятиразовому замороженню-відтаненню відповідно при  $-20^\circ\text{C}/+37^\circ\text{C}$ . В'язкість екстрактів клітин зменшують за допомогою інкубації з ДНК-азою, активованою іонами магнію на протязі 30хв при  $37^\circ\text{C}$ , після чого зразки центрифугують при 5000g 20 хвилин і ультрафільтрують. Ультрафільтрацію проводять на конічних фільтрах "Centriflo-25" з номінальною відсічною молекулярною вагою 25кД ("Amicon", Нідерланди) за допомогою центрифугування протягом 25 хвилин при 400g. Після ультрафільтрації в кожній з фракцій визначають вміст загального білку за методом Бредфорда [12] для їх стандартизації. Отриману низькомолекулярну фракцію стерилізують за допомогою мікрофільтрації крізь мембрану з діаметром пор 0,22мкм ("Millipor", США), розфасовують в стерильні ампули і зберігають при  $-20^\circ\text{C}$  для подальшого тестування.

За допомогою ФП, отриманого на 7 добу росту пухлини в селезінці (ФП-7), вдається перенести імунну реакцію на пухлинні клітини в системі *in vitro* та *in vivo*.

Прикладами реалізації заявленої корисної моделі можуть вважатися результати отримання ФП з клітин неураженої частини селезінки, в яку трансплантовано пухлину, та експериментальне підтвердження пухлиноспецифічності отриманого ФП.

І. В селезінку інтактним щурам під ефірним наркозом трансплантували шматочок пухлини карциноми Герена (КГ) об'ємом  $1\text{мм}^3$ . На 7, 14, 25-у добу після трансплантації під ефірним наркозом тварин умертвляли та видаляли неушкоджені пухлинним процесом частини селезінки (Протоколи №12-24). Їх піддавали механічній дезінтеграції та фільтрації крізь капронове сито. Стандартну кількість лімфоцитів ( $5 \times 10^8$  клітин) в 0,5мл ізотонічного розчину NaCl піддавали п'ятиразовому замороженню-відтаненню відповідно при  $-20^\circ\text{C}/+37^\circ\text{C}$ . В'язкість екстрактів клітин зменшували за допомогою інкубації з ДНК-азою, активованою іонами магнію протягом 30 хвилин при  $37^\circ\text{C}$ , після чого зразки центрифугували при 5000g 20 хвилин і ультрафільтрували. Ультрафільтрацію проводили на конічних фільтрах "Centriflo-25" з номінальною відсічною молекулярною вагою 25кД ("Amicon", Нідерланди) за допомогою центрифугування про-

тягом 25 хвилин при 400g. Після ультрафільтрації вміст загального білку складав: ФП-7 - 2мкг/мл; ФП, отриманий на 14 добу росту пухлини, (ФП-14) - 9мкг/мл; ФП, отриманий на 25 добу росту пухлини, (ФП-25) - 0,5мкг/мл. Отриману низькомолекулярну фракцію стерилізували за допомогою мікрофільтрації через мембрану з діаметром пор 0,22мкм ("Millipor", США), розфасовували в стерильні ампули і зберігали при  $-20^\circ\text{C}$  для подальшого тестування.

Підтвердження пухлиноспецифічної активності препаратів ФП по відношенню до алогенних клітин КГ в системі *in vitro* отримано в тесті інгібіції прилипання макрофагів (ІПМ) в присутності тест-антигену - пухлинних клітин КГ [13]. В системі *in vitro* проведено скринінг зразків ФП, отриманих від тварин-пухлиноносіїв в різні строки росту КГ в селезінці, в залежності від концентрації загального білку в цих препаратах. Показано, що стабільно позитивний результат в тесті ІПМ (гальмування адгезії більш, як на 20%) реєструється при оцінці зразків ФП-7 та ФП-14 (індекс прилипання (ІП) в присутності пухлинних антигенів складає 75% та 70% відповідно). Такий характер реакції є антиген-залежним, оскільки ці препарати за відсутності тест-антигену не впливають на рівень адгезії резидентних макрофагів. В той же час, макрофаги перитонеального ексудату (МФПЕ), оброблені ФП-25, проявляли стійку тенденцію до посилення адгезії в присутності тест-антигену (ІП склав 130-135%).

Ці результати свідчать про те, що зразки ФП, отримані до початку активного росту КГ в селезінці нелінійних щурів (до 14-ї доби), володіють імуноспецифічною активністю, яка проявляється в здатності переносити імунну реакцію на пухлинні антигени *in vitro*, на відміну від препаратів, що отримані на стадії генералізації пухлинного процесу, які такою здатністю не володіють.

На підтвердження цього також свідчать результати порівняльного аналізу імуноспецифічної активності ФП-7 та ФП-препарата, отриманого із селезінки інтактних щурів (ФП-Н). В системі *in vitro* показано, що в групі, де резиденти! МФПЕ були оброблені ФП-7, в 100% випадків зареєстровані позитивні відповіді (ІП склав 72-80%). Такі результати вірогідно відрізняються від групи, де резидентні МФПЕ були оброблені ФП-Н: ІП складає 77-95%, а частка позитивних відповідей дорівнює 15%.

В експерименті на лабораторних щурах отримано підтвердження можливості переносу імунної реакції на пухлинні антигени КГ за допомогою ФП в системі *in vivo*. Інтактним тваринам внутрішньовенно введено ФП, отриманий окремо від тварин із сильною та слабкою імунною відповіддю на пухлинні антигени КГ за тестом ІПМ, в дозі 1пг на 1г маси тварини. Дослідження показали, що в тесті ІПМ позитивна відповідь на пухлинні антигени (ІП=73-78%) реєструється у тих тварин, які отримували ФП від щурів із сильною імунною відповіддю, і вона відсутня (ІП=95-105%) у тварин, що отримували ФП від щурів зі слабкою імунною відповіддю.

Таким чином, у описаному способі джерелом ТФ-поліпептидів є клітини неураженої частини се-

лезінки щура, в яку трансплантована пухлина. Ріст пухлини в імунокомпетентному органі створює оптимальні умови для сенсibiliзації спленоцитів і найбільш повної реалізації продуктивної імунної відповіді, що надає можливість на початковій стадії пухлинного процесу отримати фактор, здатний переносити імунну реакцію на пухлинні антигени в системі *in vitro*. Це дає підставу стверджувати, що отримано пухлиноспецифічний ФП. Подальше дослідження властивостей пухлиноспецифічного ФП дозволить отримувати препарати для імунотерапії в післяопераційному періоді з метою профілактики рецидивів та метастазів у хворих онкологічного профілю.

Джерела інформації.

1. Lawrence H.S., Borkowsky W. Transfer Factor - current status and future prospects //Biotherapy. -1996.- №9. -p.1-5.
2. Dwyer J.M. Transfer factor in the age of molecular biology: A review //Biotherapy. -1996.- №9.- p.7-11.
3. Kirkpatrick C.H. Transfer factor //J. Allergy clin. Immunol. -1988.- V.81. -№5. -p.803-813.
4. Viza D. AIDS and transfer factor: Myths, certainties and realities //Biotherapy. -1996.- №9.- p.17-26.
5. Estrada - Parra S., Nagaya A., Serrano E. et al. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster //Int. J. Immunopharmacol. -1998.- V.20. -p.521-535.

6. Hana I., Vrabel J., Pekarek J., Cech K. The influence of age on transfer factor treatment of cellular immunodeficiency, chronic fatigue syndrome and/or chronic viral infections //Biotherapy. -1996.- №9. -p.91 -95.

7. Pilotti V., Mastroilli M., Pizza Y., De Vinci C. et al. Transfer factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy // Biotherapy. -1996. - №9. -p.117-121.

8. Whyte R.J., Schork M.A., Hoan A. et al. Adjuvant treatment using transfer factor for bronchogenic carcinoma: long-term follow-up //Ann. Thorac. -1992. -V.53. -№3. -p.391-396.

9. Fujisawa T., Yamaguchi Y., Kimura H. et al. Adjuvant immunotherapy of primary resected lung cancer with transfer factor //Cancer. -1984.- V.54. - p.663-669.

10. Petersen E.A., Yrunberg L.E., Manzara T., Kirpatrick C.H. Murine transfer factor. 1. Describing of the model and evidence for specificity //J. Immunol. - 1981. -V.126. -p.2480-2484.

11. Alvarez-Thull L., Kirkpatrick CH. Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors //Biotherapy. -1996.- №9. -p.5 5-59 (найближчий аналог).

12. Практическая химия белка: Пер. с англ. /Под ред. А. Дарбре. -М.: Мир, 1989.- 623с.

13. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. -М.: ВНИРО, -1995.- 219с.