



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18627 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61K 35/26

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ АКТИВОВАНИХ ЛІМФОЦИТІВ

1

2

(21) u200605469

(22) 19.05.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Гріневич Юрій Якимович, Фільчаков Феодосій Вікторович, Шуміліна Катерина Станіславівна, Смоланка Іван Іванович, Процик Володимир Семенович

(73) ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання активованих лімфоцитів, що включає культивування лімфоцитів з регіонарних лімфатичних вузлів онкологічних хворих в системі *in vitro*, який відрізняється тим, що як активаційний стимул для лімфоцитів використовують автологічні пухлинні клітини в присутності низьких доз інтерлейкіну-2.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема до онкології, і може бути використана з метою отримання автологічних активованих лімфоцитів для імунотерапії хворих онкологічного профілю.

Адоптивна імунотерапія (АІТ), що заснована на переносі живих, активованих поза організмом автологічних лімфоцитів з вираженою протипухлинною активністю, на даний час вважається одним з найбільш перспективних методів лікування хворих на солідні злоякісні новоутворення [1]. Активация *in vitro* імунокомпетентних клітин сприяє посиленню їх цитотоксичності і при введенні в організм дозволяє модифікувати функції інших клітин-ефекторів (КЕ) імунної системи, що підвищує протипухлинну резистентність організму. Метод активації *in vitro* полягає, насамперед, у можливості одержання достатньої кількості КЕ для терапевтичного використання за рахунок створення оптимальних умов індукції протипухлинної активності лімфоцитів в контрольованій системі. Перенос цих клітин в організм пухлиноносія дозволяє елімінувати не просто будь-які клітини, що активно проліферують, як це має місце при проведенні променевої чи хіміотерапії, а виключно пухлинні. Для одержання активованих КЕ в лабораторних умовах використовують декілька методичних прийомів. Один з них - генерація лімфокінактивованих кілерів (ЛАК) з популяції лімфоцитів периферичної крові, активованих в культурі *in vitro* інтерлейкінами (ІЛ) [2, 3].

Іншим варіантом є використання в якості КЕ лімфоцитів, що інфільтрують пухлину. Це дозво-

ляє протягом декількох місяців культивування накопичити велику кількість клітин, які володіють спрямованою цитотоксичною активністю щодо автологічних пухлинних клітин (ПК) [4].

За прототип корисної моделі обрано спосіб генерації в культурі *in vitro* ЛАК-клітин [Development of a new culture system for human lymphokine-activated killer cells /M. Murata, T. Yano, M. Togami et al. //J. Immunological Methods. -1990. -Vol.129, №1. -P.89-95]. Автори отримували лімфоцити з лімфатичних вузлів (ЛВ) хворих на рак легені під час оперативного втручання. ЛВ піддавали гомогенізації, фільтрували крізь капроновий фільтр та відмивали розчином Хенкса. Надалі клітини кожного хворого окремо вміщували у флакон для культури клітин, додавали ІЛ-2 в концентрації 1000 од/мл і культивували в повному культуральному середовищі у вологій камері. По закінченні терміну культивування клітини відбирали з флакону, відмивали і концентрували для введення хворому.

Позитивним в прототипі є використання для АІТ онкологічних хворих автологічних лімфоцитів, що значно зменшує вірогідність ускладнень, а також культивування їх у контрольованих умовах *in vitro*.

Недоліком прототипу є неможливість отримання лімфоцитів із пухлиноспецифічною дією (Лак-клітини володіють неспецифічною цитотоксичною дією), що обумовлює необхідність введення великої кількості таких клітин.

В основу корисної моделі покладено задачу створити спосіб отримання активованих лімфоци-

(19) UA (11) 18627 (13) U

тів шляхом їх культивування з аутологічними пухлинними клітинами в системі *in vitro*, що дасть можливість їх ефективного використання для імунотерапії онкологічних хворих з метою профілактики рецидивів та метастазів після проведення хірургічного лікування.

Поставлена задача вирішується таким чином.

Лімфоцити отримують з регіонарних ЛВ, які одержують під час оперативного втручання у хворих онкологічного профілю. ЛВ вміщують в охолоджений до 4°C розчин Хенкса і тричі промивають, щоб позбутися домішок крові. Потім видаляють жирову клітковину, капсулу і механічно дезагрегуєють орган. Отриману суспензію клітин фільтрують крізь капроновий фільтр. Клітини двічі відмивають охолодженим розчином Хенкса за допомогою центрифугування (400g) протягом 10 хвилин. Потім осад клітин ресуспендують в культуральному середовищі (КС) і підраховують їхню кількість у гемоцитометрі. Для довгострокового культивування використовують КС RPMI 1640 („Serva”, Німеччина) з додаванням 2мМ L-глутаміна, 10% аутологічної сироватки чи плазми крові донорів групи АВ (інактивована, тестована на контамінацію вірусом гепатиту і ВІЛ), 40мкг/мл гентаміцина.

Суспензію життєздатних аутологічних свіжовиділених пухлинних клітин (ПК) одержують за допомогою механічної і ферментативної дезагрегації тканини пухлини згідно описаного методу [6]. Після цього ПК обробляють мітоміцином С („Serva”, Німеччина) у кінцевій концентрації 25мкг/мл протягом 30 хвилин при 37°C з метою позбавлення їх проліферативного потенціалу. Надалі клітини тричі відмивають охолодженим середовищем RPMI 1640 шляхом центрифугування при 400g протягом 10 хвилин. Спільне культивування ПК і лімфоцитів ЛВ здійснюють в співвідношенні 1:30 протягом 6-8 діб у 250 - мілілітрових флаконах для культивування в термостаті при 37°C у вологій камері при вмісті в повітрі 5% CO<sub>2</sub>. У роботі використовують препарат рекомбінантного ІЛ-2 людини (Ронколейкін, „Біофарма”, Україна) в концентрації 200Од/мл, який вносять в КС на 2-у і 5-у добу культивування суспензії клітин.

Приготування суспензії лімфоцитів та ПК здійснюють при суворому дотриманні правил асептики. Усі реагенти для культури клітин стерилізують за допомогою мікрофільтрації (мембрани з розміром пор 0,22мкм, «Millipore», США).

Прикладами реалізації заявленої корисної моделі можуть вважатися результати отримання активованих лімфоїдних клітин в аутологічній системі *in vitro*.

I. У хворій Ш-к (21 рік, рак язика з проростанням в нижню щелепу, Т3N0M0, історія хвороби №964) лімфоцити виділені з регіонарних ЛВ, які одержані під час оперативного втручання. ЛВ вміщували в охолоджений до 4°C розчин Хенкса і тричі промивали, щоб позбутися домішок крові. Потім видаляли жирову клітковину, капсулу і механічно дезагрегували орган. Отриману суспензію клітин фільтрували крізь капроновий фільтр. Клітини двічі відмивали охолодженим розчином Хенкса за допомогою центрифугування (400g) протягом 10 хвилин. Потім осад клітин ресуспендували в КС і підраховували їхню кількість у гемоцитомет-

рі; виділена кількість лімфоцитів склала  $2,8 \times 10^7$  клітин. Для довгострокового культивування використовували КС RPMI 1640 („Serva” Німеччина) з додаванням 2мМ L-глутаміна, 10% аутологічної сироватки, 40мкг/мл гентаміцина.

Суспензію аутологічних ПК одержували за допомогою механічної і ферментативної дезагрегації тканини пухлини згідно описаного методу [6]. Після цього ПК обробляли мітоміцином С („Serva”, Німеччина) у кінцевій концентрації 25мкг/мл протягом 30 хвилин при 37°C з метою позбавлення їх проліферативного потенціалу. Надалі клітини тричі відмивали охолодженим середовищем RPMI 1640 шляхом центрифугування при 400g протягом 10 хвилин. Виділено  $9 \times 10^5$  клітин. Спільне культивування ПК і лімфоцитів ЛВ здійснювали в співвідношенні 1:30 протягом 7 діб у 250-мілілітрових флаконах для культивування в термостаті при 37°C у вологій камері при вмісті в повітрі 5% CO<sub>2</sub>. У роботі використовували препарат рекомбінантного ІЛ-2 людини (Ронколейкін, „Біофарма”, Україна) в концентрації 200Од/мл, який вносили в КС на 2-у і 5-у добу культивування суспензії клітин. Кількість лімфоцитів на 7 добу культивування склала  $5,2 \times 10^7$  клітин.

Визначення цитотоксичної активності лімфоцитів по відношенню до клітин-мішеней (клітини К-562, чутливі до цитотоксичної дії природних кілерів, та клітини Daudi, резистентні до цитотоксичної дії природних кілерів) за методом [7] показало, що низький вихідний індекс цитотоксичності (1% та 0% відповідно) до 7-ї доби збільшився до 24,4% та 13,1% відповідно.

II. У хворій О-вої (45 років, рак лівої молочної залози, ст. ІІІВ, кл. гр.ІІ, історія хвороби №3129) лімфоцити виділені з регіонарних ЛВ, які одержані під час оперативного втручання. ЛВ вміщували в охолоджений до 4°C розчин Хенкса і тричі промивали, щоб позбутися домішок крові. Потім видаляли жирову клітковину, капсулу і механічно дезагрегували орган. Отриману суспензію клітин фільтрували крізь капроновий фільтр. Клітини двічі відмивали охолодженим розчином Хенкса за допомогою центрифугування (400g) протягом 10 хвилин. Потім осад клітин ресуспендували в КС і підраховували їхню кількість у гемоцитометрі; виділена кількість лімфоцитів склала  $4 \times 10^7$  клітин. Для довгострокового культивування використовували КС RPMI 1640 („Serva”, Німеччина) з додаванням 2мМ L-глутаміна, 10% аутологічної сироватки, 40мкг/мл гентаміцина.

Суспензію аутологічних ПК одержували за допомогою механічної і ферментативної дезагрегації тканини пухлини згідно описаного методу [6]. Після цього ПК обробляли мітоміцином С („Serva”, Німеччина) у кінцевій концентрації 25мкг/мл протягом 30 хвилин при 37°C з метою позбавлення їх проліферативного потенціалу. Надалі клітини тричі відмивали охолодженим середовищем RPMI 1640 шляхом центрифугування при 400g протягом 10 хвилин. Виділено  $3 \times 10^6$  клітин. Спільне культивування ПК і лімфоцитів ЛВ здійснювали в співвідношенні 1:30 протягом 7 діб у 250-мілілітрових флаконах для культивування в термостаті при 37°C у вологій камері при вмісті в повітрі 5% CO<sub>2</sub>.

У роботі використовували препарат рекомбінантного ІЛ-2 людини (Ронколейкін, „Біофарма”, Україна) в концентрації 200Од/мл, який вносили в КС на 2-у і 5-у добу культивування суспензії клітин. Кількість лімфоцитів на 7 добу культивування склала  $5,16 \times 10^7$  клітин.

Визначення цитотоксичної активності лімфоцитів по відношенню до клітин-мішеней (клітини K-562, чутливі до цитотоксичної дії природних кілерів, та клітини Daudi, резистентні до цитотоксичної дії природних кілерів) за методом [7] показало, що низький вихідний індекс цитотоксичності (2,7% та 0% відповідно) до 7-ї доби збільшився до 21,8% та 16,4% відповідно.

Таким чином, у описаному способі показана можливість генерації цитотоксичної активності лімфоїдних клітин з регіонарних ЛВ онкологічних хворих в системі *in vitro* з метою їх використання для проведення АІТ. Перспективність використання такого підходу обумовлена не просто активацією лімфоцитів ІЛ, як це має місце при генерації ЛАК, а індукцією специфічної протипухлинної активності у попередників цитотоксичних лімфоцитів, які накопичуються в регіонарному лімфоїдному колекторі, що дрениє пухлину. Крім того, експансія активованих лімфоїдних клітин в системі *in vivo* не має потреби у введенні високих доз екзогенного ІЛ-2, тому що стимулом для їхньої проліферації є ПК. Вищенаведене обумовлює ефективність і доступність цього засобу не тільки для імунотерапії онкологічних хворих, але й для профілактики рецидивів та метастазів після проведення хірургічно-

го лікування.

Джерела інформації:

1. Rosenberg S.A. The immunotherapy and gene therapy of cancer //J. Clin. Oncol. -1992. -Vol.10, №2. -P.180-200.
2. Use of human leukocyte antigen-mismatched allogeneic lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 in the adoptive immunotherapy of patients with malignancies /Y. Kimoto, T. Tanaka, Y. Tanji et al. //Biotherapy. -1994. - Vol.8, №1.- P.41-50.
3. Successful engraftment after autologous transplantation of 10-day cultured bone marrow activated by interleukin-2 in patients with acute lymphoblastic leukemia /F. Beaujean, F. Bemaudin, M. Kuentz et al. //Bone Marrow Transplantation. - 1995. -Vol.15, №5. -P.691-696.
4. Whiteside T. Tumor-infiltrating lymphocytes as antitumor effector cells //Biother. -1992. -Vol.5. -P.47-61.
5. Development of a new culture system for human lymphokine-activated killer cells /M. Murata, T. Yano, M. Togami et al. //J. Immunological Methods. - 1990. -Vol.129, №1. -P.89-95 (прототип)
6. Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Мороз И.А. Получение опухолевых клеток из тканей рака легкого человека с целью клонирования. //Лаб. дело. -1991. -№2. -С.28-30.
7. Микроскопический вариант метода определения цитотоксической активности лимфоцитов /Ф.В. Фильчаков, Т.П. Малиновская, Ю.А. Гриневич, И.А. Близнюк. //Лаб. Диагностика. -1998. -№1. -С.28-30.