



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **43728** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 35/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФАКТОРА ПЕРЕНОСУ, СПЕЦИФІЧНОГО ДО КЛІТИН КСЕНОГЕННОЇ ПУХЛИНИ

1

2

(21) u200903731

(22) 16.04.2009

(24) 25.08.2009

(46) 25.08.2009, Бюл. № 16, 2009 р.

(72) ФІЛЬЧАКОВ ФЕОДОСІЙ ВІКТОРОВИЧ, ШУМІЛІНА КАТЕРИНА СТАНІСЛАВІВНА, ЛЬОН ГАННА ДАРІЇВНА, ГРІНЕВИЧ ЮРІЙ ЯКИМОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ"

(57) Спосіб отримання фактора переносу, специфічного до клітин ксеногенної пухлини, що включає використання низькомолекулярного екстракту лімфоцитів селезінки (спленоцитів) тварин, який **відрізняється** тим, що імунізацію щурів проводять внутрішньоочеревинним введенням живих ксеногенних пухлинних клітин мишачої карциноми легені Льюїс, а препарат фактора переносу отримують на 14-у добу.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема - онкології, і може бути використана для імунотерапії хворих онкологічного профілю.

Фактор переносу (ФП) (transfer factor) представляє собою трансферфакторні поліпептиди (ТФ-поліпептиди) з низькою молекулярною масою (3-12 кД) [1] Т-клітинного походження, які здатні афінно зв'язуватись з гомологічним антигеном [2] і переносити клітинно-опосередковану імунну реакцію на антиген від імунного донора до неімунного реципієнта [3]. Здатність тварин синтезувати ТФ-поліпептиди рестрикована молекулами головного комплексу гістосумісності, проте перенос антиген-специфічної імунореактивності за допомогою ФП генетично необмежений [4]. Не виключено, що крім Т-лімфоцитів, ТФ-поліпептиди можуть продукувати всі або майже всі імункомпетентні клітини [5]. Клінічними дослідженнями із застосуванням ФП доведено, що такий препарат може бути ефективним засобом імунотерапії хворих з широким спектром імунопатології, включаючи рецидивуючі та дисеміновані інфекції [6-12]. Дослідники, що вивчали ефективність ФП в імунотерапії онкологічних хворих, застосовували препарати ФП, отримані з лейкомаси донорів [13, 14] чи лейкоцитів осіб, що перебували в контакт з онкохворими [15]. Але такі препарати не володіють пухлинно специфічною активністю, їх висока імунотерапевтична активність може бути небажаною і непрогнозованою при проведенні імунотерапії онкологічних хворих.

За найближчий аналог обрано спосіб отримання ФП з лімфоцитів щурів [Деклараційний па-

тент на корисну модель № 16938, UA. МПК А 61 К35/28. Спосіб отримання пухлинноспецифічного фактора переносу / Ін-т онкології АМН України. Ф.В. Фільчаков, Л.І. Бобро, К.С. Шуміліна, Ю.Я. Гріневич (UA). - Заявка № 2005 04315. Заявл. 06.05.2005. Опубл. 15.09.2006. - Бюл. № 9, 2006] [16], за яким низькомолекулярну речовину з лімфоцитів неуразеної частини щурячої селезінки отримували в період, що передують прогресивному росту попередньо трансплантованої в її паренхіму алогенної пухлини. Для цього в селезінку інтактних щурів трансплантували фрагмент карциноми Герена, після чого на 7-у добу під ефірним наркозом тварин умертвляли, видаляли неушкоджені пухлинним процесом частини селезінки, які піддавали механічній дезінтеграції та фільтрації крізь сито й отримували суспензію спленоцитів. Їх руйнували замороженням/відтаванням до завершення лізису клітин. Лізат піддавали ультрафільтрації та стандартизації за кількістю клітин та вмістом білка з подальшою стерилізацією за допомогою мікрофільтрації. Потім препарат заморожували і зберігали до часу використання. За допомогою цієї речовини авторам вдалося перенести імунну реакцію на пухлинні клітини в системі in vitro та in vivo.

Позитивним у найближчого аналога є створення умов для продукування пухлинноспецифічного ФП, а також використання в якості джерела ТФ-поліпептидів лімфоцитів селезінки щурів, з якої можна отримати їх достатню кількість.

Недоліком найближчого аналога є неможливість забезпечення достатньої сенсibiliзації лімфоцитів до антигенів пухлини ксеногенного похо-

(19) **UA** (11) **43728** (13) **U**

дження шляхом відтворення росту цієї пухлини в лімфоїдному органі тварин через відторгнення ксеногенного пухлинного трансплантату.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу отримання фактора переносу, специфічного до клітин ксеногенної пухлини, шляхом його виділення із лімфоцитів селезінки щурів, яким попередньо були внутрішньоочеревинно введені живі клітини ксеногенної пухлини - мишкої карциноми легені Льюїс, що дасть можливість отримати препарат ФП проти пухлини людини для використання в імунотерапії онкологічного хворого.

Поставлена задача вирішується таким чином:

Інтактним щурам одноразово внутрішньоочеревинно вводять суспензію свіжовиділених (отриманих шляхом механічної дезінтеграції) клітин карциноми Льюїс (КЛ) в кількості 2×10^6 клітин/на тварину в об'ємі 0,2мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР). На 14-у добу після імунізації під ефірним наркозом тварин умертвляють та видаляють селезінку. Її тканину піддають механічній дезінтеграції та фільтрації крізь капронове сито, еритроцити лізують 0,83% розчином хлористого амонію впродовж 8хв при +4°C. Після дворазового відмивання в ЗФР за допомогою центрифугування (200g, 10хв) осад лімфоцитів (5×10^8) ресуспендують в ЗФР та піддають п'ятиразовому замороженню/відтаюванню відповідно при -20°C/+37°C. Деполімеризацію всієї позаклітинної ДНК здійснюють за допомогою інкубації з панкреатичною ДНК-азою (1мг/мл), активованою іонами магнію впродовж 30хв при 37°C, після чого зразки центрифугують при 5000g 20хв і ультрафільтрують. Ультрафільтрацію проводять на конічних фільтрах "Centriflo-25" з номінальною відсічною молекулярною масою 25кД ("Amicon", США) за допомогою центрифугування протягом 25хв при 400g. Після ультрафільтрації в кожній з фракцій визначають вміст загального білку за методом Бредфорда [17] для їх стандартизації. Отриману низькомолекулярну фракцію стерилізують за допомогою мікрофільтрації крізь мембрану з діаметром пор 0,22мкм ("Millipore", США), розфасовують в стерильні ампули і зберігають при -20°C для подальшого тестування.

За допомогою ФП, отриманого із спленоцитів на 14-у добу після внутрішньоочеревинної імунізації щурів живими ксеногенними пухлинними клітинами (ФП14-І), вдається перенести протипухлинні імунні реакції на ці пухлинні клітини інтактним мишам в системі *in vivo*.

Прикладом реалізації заявленого способу може вважатися результат отримання ФП із лімфоцитів селезінки щурів, яким попередньо були внутрішньоочеревинно введені свіжовиділені клітини ксеногенної пухлини, та експериментальне підтвердження його пухлиноспецифічної дії.

І. Інтактним щурам одноразово внутрішньоочеревинно ввели суспензію свіже виділених (отриманих шляхом механічної дезінтеграції) клітин КЛ в кількості 2×10^6 клітин/на тварину в об'ємі 0,2мл ЗФР. На 7-, 14-, 60-у добу після імунізації під ефірним наркозом тварин умертвляли та видаляли селезінку. Її тканину піддавали механічній дезінтеграції та фільтрації крізь капронове сито, ерит-

роцити лізували 0,83% розчином хлористого амонію впродовж 8хв при +4°C. Після дворазового відмивання в ЗФР за допомогою центрифугування (200g, 10хв) осад лімфоцитів (5×10^8) ресуспендували в ЗФР та піддавали п'ятиразовому замороженню/відтаюванню відповідно при -20°C/+37°C. Деполімеризацію всієї позаклітинної ДНК здійснювали за допомогою інкубації з панкреатичною ДНК-азою (1мг/мл), активованою іонами магнію впродовж 30хв при 37°C, після чого зразки центрифугували при 5000g 20хв і ультрафільтрували. Ультрафільтрацію проводили на конічних фільтрах "Centriflo-25" з номінальною відсічною молекулярною масою 25кД ("Amicon", США) за допомогою центрифугування протягом 25хв при 400g. Після ультрафільтрації вміст загального білку складав: ФП, отриманий на 7-у добу після внутрішньоочеревинної імунізації щурів ксеногенними пухлинними клітинами, (ФП7-І) - 30мкг/мл; ФП14-І - 35мкг/мл; ФП, отриманий на 60-у добу після внутрішньоочеревинної імунізації щурів ксеногенними пухлинними клітинами, (ФП60-І) - 65мкг/мл. Отриману низькомолекулярну фракцію стерилізували за допомогою мікрофільтрації крізь мембрану з діаметром пор 0,22мкм ("Millipore", США), розфасовували в стерильні ампули і зберігали при -20°C для подальшого тестування.

Здатність ФП відтворювати клітинно-опосередковану імунну реакцію - гіперчутливість уповільненого типу до клітин КЛ підтверджується за допомогою теста інгібіції прилипання макрофагів (ІПМ). При одноразовому внутрішньоочеревинному введенні інтактним мишам С57BL/6 відповідних зразків ФП в дозі 100пг/тварину встановлено, що на 7-у добу після введення стабільно позитивний результат в тесті ІПМ (гальмування адгезії більш, як на 20%) реєструється при оцінці зразків ФП7-І та ФП14-І (індекс прилипання в присутності пухлинних антигенів складає 80% та 84% відповідно).

Підтвердження переносу протипухлинних імунних реакцій стосовно росту КЛ за допомогою препаратів ксеногенного ФП отримано на моделі пасивного метастазування КЛ у мишей С57BL/6. Для цього тваринам внутрішньоочеревинно введено відповідні зразки ФП в дозі 200пг/мишу. Через 5 діб внутрішньовенно були введені живі клітини КЛ (життєздатність 95%) в дозі $0,6 \times 10^6$ кл/мишу. На 16-у добу після введення пухлинних клітин дослідження показали, що в групі, тваринам якої попередньо вводили ФП14-І, метастази КЛ в легенях виявлені лише у 40% тварин, після введення ФП7-І - у 86%, після введення ФП60-І та ФП-препарата, отриманого із спленоцитів інтактних щурів (неспецифічний ФП (ФПН)) - у 100% тварин, як і в контрольній групі. Найбільший індекс пригнічення метастазування виявлено у тварин після профілактичного введення ФП14-І - 98%, найменший - після введення зразків ФП7-І та ФПН - 68%.

Ці результати свідчать про те, що зразки ФП, отримані із спленоцитів щурів на піку імунної відповіді (14-а доба) на внутрішньоочеревинну імунізацію живими пухлинними клітинами ксеногенного походження (клітинами КЛ), володіють найбільш

високою імуноспецифічною активністю, яка проявляється в здатності переносити протипухлинні імунні реакції, на відміну від неспецифічного ФП та зразка ФП, що отримані в період формування імунологічної пам'яті (60-а доба).

Таким чином, у описаному способі донорами ФП є щури, внутрішньоочередово імунізовані живими ксеногенними пухлинними клітинами. Внутрішньоочередово введення пухлинних клітин індукує імунну відповідь, на піку реалізації якої можливо отримати із спленоцитів фактор, здатний переносити протипухлинні імунні реакції до цих клітин, що свідчить про отримання ФП, специфічного до клітин ксеногенної пухлини.

Джерела інформації.

1. Rozzo S.J., Kirkpatrick C.H. Purification of transfer factors // *Mol. Immunol.* - 1992. - Vol. 29, № 2. - P. 167-182.

2. Kirkpatrick C.H. Transfer factor // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1988. -Vol. 81, №5.-P. 803-813.

3. Kirkpatrick C.H. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules // *Mol. Med.* - 2000. - Vol. 6, № 4. - P. 332-341.

4. Lawrence H.S., Borkowsky W. Transfer Factor - Current status and future prospects // *Biotherapy.* - 1996. - Vol. 9, № 1-3. - P. 1-5.

5. Биологические и клинические аспекты фактора переноса - В кн.: Иммунологическая инженерия / М.П. Арала-Чейвз, М. Хорсманхейлео, Дж.М. Гоуст и др.; Под ред. Д.У. Джирша: Пер. с англ. - М.: Медицина, 1982.-С. 53-104.

6. Levine P.H. The use of transfer factors in chronic fatigue syndrome: prospects and problems // *Biotherapy.* - 1996. - Vol. 9, № 1-3. - P. 77-79.

7. Masi M., De Vinci C., Baricordi O.R. Transfer factor in chronic mucocutaneous candidiasis // *Biotherapy.* - 1996. - Vol. 9, № 1-3. - P. 97-103.

8. Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV dis-

ease / A.A. Gottlieb, R.C. Sizemore, M.S. Gottlieb et al. // *Biotherapy.* - 1996. -Vol. 9, № 1-3. -P. 27-31.

9. Indications, usage, and dosage of the transfer factor / R. Berron-Perez, R. Chaves-Sanches, I. Estrada-Garcia et al. // *Rev. Alerg. Mex.* - 2007. - Vol. 54, №4.-P. 134-139.

10. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster / S. Estrada-Parra, A. Nagaya, E. Serrano et al. // *Int. J. Immunopharmacol.* -1998. - Vol. 20. - P. 521-535.

11. Immunotherapy with transfer factor of recurrent herpes simplex type I / S. Estrada-Parra, R. Chaves-Sanches, R. Ondarza-Aguilera et al. // *Arch. Med. Res.* - 1995. - Vol. 26. - P. 87-92.

12. Transfer factor in the treatment of moderate severe atopic dermatitis / S.G. Flores, V.J. Gomes, S.M. Orea et al. // *Rev. Alerg. Mex.* - 2005. - Vol. 52, № 6. -P. 215-220.

13. Transfer factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy / V. Pilotti, M. Mastroilli, Y. Pizza et al. // *Biotherapy.* - 1996. -Vol. 9, № 1-3. -P. 117-121.

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

15. Adjuvant immunotherapy of primary resected lung cancer with transfer factor / T. Fujisawa, Y. Yamaguchi, H. Kimura et al. // *Cancer.* - 1984. -Vol. 54. - P. 663-669.

16. Деклараційний патент на корисну модель № 16938, UA. МПК А 61К35/28. Спосіб отримання пухлиноспецифічного фактора переносу / Ін-т онкології АМН України. Ф.В. Фільчаков, Л.І. Бобро, К.С. Шуміліна, Ю.Я. Гріневич (UA). - Заявка № 2005 04315. Заявл. 06.05.2005. Опубл. 15.09.2006. - Бюл. № 9, 2006 (прототип).

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