



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48555

(13) A

(51) 6 A61K38/19

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТРАНСФЕРФАКТОРНОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ІМУНОТЕРАПІЇ ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ

1

2

(21) 2001106890

(22) 10 10 2001

(24) 15 08 2002

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.

(72) Фільчаков Феодосій Вікторович, Гриневич
Юрій Якимович, Кірклевський Станіслав Ігорович,
Крахмальов Павло Серпійович(73) ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ(57) Спосіб отримання трансферфакторного пре-
парату для імунотерапії онкологічних хворих, що
включає використання діалізованого екстракту
лейкоцитів донорів, який **відрізняється** тим, що
джерело фактора переносу - лейкоцити, одержані
з ексудату післяопераційної хірургічної рани онко-
логічних хворих

Винахід відноситься до галузі медицини, зокрема до онкології.

Фактор переносу (ФП) являє собою низькомолекулярну речовину, здатну переносити клітинно-опосередковану імунну реакцію на антиген, так звану гіперчутливість сповільненого типу (ГСТ), від імунного донора до неімунного реципієнта. Феномен такого переносу був відкритий двічі спочатку Л. Дейтчем у лабораторії І. І. Мечникова [1], а потім Г. Лоуренсом [2].

Вважається, що джерелом ФП є Т-лімфоцит. Проте невиключно, що окрім Т-лімфоцитів його можуть продукувати всі, чи принаймні більшість імунокомпетентних клітин. Спроби встановити які ж саме клітини продукують цей ендогенний фактор призвели до вивчення діалізованих екстрактів з різних імунокомпетентних клітин, об'єднаних під назвою діалізовані екстракти лейкоцитів (ДЕЛ). З'ясувалося, що ДЕЛ мають властивості притаманні ФП. Особливо цікаві ефекти викликають ендогенні речовини отримані з суміші лейкоцитів.

Насьогодні відомо, що трансферфакторні білки (ТФ-білки) являють собою невеликі поліпептиди з молекулярною вагою від 3,5 кД до 12 кД [3], які здатні афінно зв'язуватися з молекулами антигену [4]. Здатність тварин продукувати ФП регулюється генетично, але перенесення ГСТ за допомогою ФП генетично не обмежено [5]. Клінічні дослідження показали, що ФП може бути ефективним засобом імунотерапії хворих з широким спектром імунопатології, включно рецидивуючі та дисеміновані інфекції [6, 7], злоякісні новоутворення [8].

Імунофармакологічні препарати ТФ-білків, що

виробляються за кордоном під комерційними назвами Imreg-1 та ISS (США), Transfer Faktor (Німеччина), RCTF-I (Японія), HEBERTRANS (Куба) Аффінолейкін (Росія) отримують на основі донорської крові, лейкоцитарної маси, залишкових продуктів виробництва лейкоцитарного інтерферону та лімфоїдної тканини. Слід визначити, що на сьогодні відсутні загальноприйнятий метод стандартизації препаратів ТФ-білків за імуноспецифічною активністю. Звичайно застосовують умовні одиниці, які відповідають клітинному еквіваленту вихідної сировини. Частіше за 1 одиницю приймають активність препарату, отриманого з 5×10^8 лейкоцитів, яку можливо виділити з стандартної упаковки донорської крові 0,4 л.

У переважній кількості робіт, що вивчали ефективність ФП в імунотерапії онкологічних хворих були застосовані препарати ТФ-білків, отримані з лейкомаси донорів [8,9,10] чи лейкоцитів осіб, які перебували у контакті з хворими [11]. Однак, ці препарати ТФ-білків володіли високою фармакологічною активністю, яка, на відміну від пухлиноспецифічної активності, може бути небажаною та непередбачуваною при проведенні імунотерапії онкологічним хворим. У деяких випадках вдається виділити пухлиноспецифічні ТФ-білки безпосередньо з крові онкологічних хворих [12]. Однак, цей підхід обмежений неможливістю отримання великої кількості лейкоцитів з крові онкологічних хворих для подальшого виділення достатньої активності ФП, що необхідна для проведення імунотерапії.

Прототипом винаходу може вважатися одне з перших клінічних досліджень, яке продемонстру-

(13) A

(11) 48555

(19) UA

вало можливість переносу клітинно-опосередкованої імунної реакції на пухлинні клітини за допомогою ФП [Levin A S, Byers V S, Fudenberg H H, Wybran T, Tohnstan T O, Hackett A T Osteogenic sarcoma, immunologic parameters before and during immunotherapy with tumor specific transfer factor // J Clin Inv - 1975 - V 55 - P 48 - 497] Ці автори виділяли ФП з крові хворих на остеогенну саркому, лімфоцити яких виявляли цитотоксичність проти аутологічних пухлинних клітин, і вводили його іншим хворим з цією патологією. Лімфоцити хворих, яким вводили ФП набували цитотоксичностіпо відношенню до аутологічних пухлинних клітин у тесті in vitro. Це є дуже важливим аргументом, який свідчить про індукцію специфічної протипухлинної клітинно-опосередкованої імунної реакції у реципієнтів ФП. Однак, суттєвого покращення клінічного ефекту у порівнянні з комбінованим лікуванням автори не спостерігали.

Позитивним у прототипі є отримання специфічного ФП з лейкоцитів онкологічних хворих.

Недоліком прототипу є те, що отримати велику кількість лейкоцитів з крові онкологічних хворих (а це 10^9 /л- 10^{11} /л) для виділення необхідної активності ФП, достатньої для проведення імунотерапії не завжди можливо.

В основу винаходу покладено задачу створити спосіб для отримання пухлиноспецифічного ФП шляхом його виділення з нетрадиційного джерела - лейкоцитів екссудату хірургічної рани (EXR), який може бути використаний в імунотерапії онкологічних хворих.

Дана задача вирішується розробкою технології отримання ДЕЛ з EXR, який збирали у стерильні ємкості на 1-у і 2-у доби після операції. За звичай при торакотомії вдається отримати від 200,0мл до 450,0мл екссудату у 1-шу добу і до 150,0мл у 2-гу. Після заповнення ємності EXR центрифугують при 200g протягом 15хв, надосад видаляють, осаджені клітини ресуспендують в охолодженному (4°C) гемолітичному буфері з експонуванням 8хв для звільнення від еритроцитів. Лейкоцити, що залишилися, двічі відмивають ізотонічним розчином хлориду натрію центрифугуванням при 200g протягом 10хв. Отриманий осад клітин ресуспендують у тому ж розчині. Кількість лейкоцитів підраховують у гемоцитометрі і щільність клітин доводять до концентрації 1×10^8 кл/мл. При такій схемі отримання лейкоцитів з EXR вдається виділити від $1,8 \times 10^9$ до $8,0 \times 10^{10}$ життєздатних клітин.

Вивчення клітинного складу EXR проводили за допомогою мікроскопування цитологічних мазків, пофарбованих за Романовським, та в тесті Е-розеткоутворення, після виділення мононуклеарів з EXR на градієнті щільності фікол-верографіну ($d=1,077$ /см³). У наших дослідженнях біля 90% клітин EXR були представлені поліморфноядерними нейтрофілами і 10% - лімфоцитами. На градієнті щільності вдається виділити від $3,5 \times 10^7$ до $3,6 \times 10^8$ мононуклеарів, з яких Т-лімфоцити склали 13,43%, що в перерахунок на кількість мононуклеарів складає від $0,94 \times 10^7$ до $7,7 \times 10^7$ Т-клітин.

Як видно, клітинний склад EXR мало чим відрізняється від аналогічного у периферійній крові.

Подальше отримання ДЕЛ проводили таким чином. Стандартну кількість клітин (5×10^8 кл) в

5,0мл ізотонічного розчину хлориду натрію піддавали п'ятиразовому замороженню - відтаненню при -20°C/+37°C, відповідно. В'язкість екстрактів клітин зменшували за допомогою інкубації з ДНК-азою, активованою іонами магнію на протязі 30хв при 37°C, після чого всі зразки центрифугували при 5000g 20хв і ультрафільтрували. Ультрафільтрацію проводили на конічних фільтрах "Centriflo-25" з номінальною відсічкою молекулярною вагою 25кД ("Amicon", Голландія) за допомогою центрифугування протягом 15хв при 400g. Після ультрафільтрації в кожній з фракцій визначали вміст загального білку за методом Lowry і співавт. Для їх стандартизації. Отриману низькомолекулярну фракцію стерілізували за допомогою мікрофільтрації через мембрану з діаметром пор 0,22мкм ("Millipor", США), розфасовували в стерильні ампули і зберігали при -20°C, для подальшого тестування.

Прикладами реалізації заявленого винаходу можуть вважатись результати отримання ФП з клітин EXR хворих на рак стравоходу.

Хворий С 69 років (історія хвороби AI-0429) знаходився у січні-березні 2001 року у відділенні пухлин органів грудної порожнини Інституту онкології АМН України з приводу раку стравоходу (T3N1M0). При патогістологічному обстеженні підтверджено плоскоклітинний рак. Було проведено передопераційне опромінення за розробленою методикою 26.02.2001р. хворому було виконано операцію Льюїса. У плевральну порожнину було встановлено дренаж, що приєднувався до 3-х ампульної системи, яка призначена для створення негативного тиску у прооперованій плевральній порожнині та для збирання EXR. У ємність для накопичення EXR було введено одразу після операції 0,5мл розчину гепарину. Через добу після операції було отримано - 250,0мл EXR, з якого виділено - $1,74 \times 10^9$ лейкоцитів. На градієнті щільності фікол-верографіну отримано 8×10^7 мононуклеарів, з яких Т-лімфоцити склали - 37% ($2,96 \times 10^7$ клітин).

Хворий Б 52 роки (історія хвороби AI-1236) знаходився у лютому-квітні 2001 року у відділенні пухлин органів грудної порожнини Інституту онкології АМН України з приводу раку стравоходу (T3N1M0). При патогістологічному обстеженні підтверджено плоскоклітинний рак. Було проведено передопераційне опромінення за розробленою методикою 18.04.2001р. хворому виконано операцію Льюїса. Під час операції у плевральну порожнину було встановлено дренаж, для збирання EXR, як наведено вище. Через добу після операції було отримано - 400,0мл EXR, з якого виділено - $1,8 \times 10^9$ лейкоцитів. На градієнті щільності фікол-верографіну отримано - $1,5 \times 10^8$ мононуклеарів, з яких Т-лімфоцити склали - 41% ($6,15 \times 10^7$ клітин).

Хворий Ф 47 років (історія хвороби AI-1841) знаходився у березні-травні 2001 року у відділенні пухлин органів грудної порожнини Інституту онкології АМН України з приводу раку стравоходу (T3N1M0). При патогістологічному обстеженні підтверджено плоскоклітинний рак. Було проведено передопераційне опромінення за розробленою методикою 18.04.2001р. хворому

було виконано операцію Льюїса. Під час операції у плевральну порожнину було встановлено дренаж, для збирання ЕХР, як наведено вище. Через добу після операції було отримано - 400,0мл ЕХР, з якого виділено - $6,6 \times 10^9$ лейкоцитів. На градієнті щільності фікоп-верографіну отримано - $3,5 \times 10^7$ мононуклеарів, з яких Т-лімфоцити склали - 27% ($9,45 \times 10^6$ клітин).

Таким чином, у описаному способі, донором лейкоцитів є сам організм пухлиноносія, а джерелом ФП безпосередньо лейкоцити, які отримують після оперативного втручання з ЕХР. На першу і другу доби після операції вдається виділити достатню кількість життєздатних лейкоцитів, склад яких мало чим відрізняється від такого у периферичній крові. Використання лейкоцитів з ЕХР значно розширює можливості отримання пухлиноспецифічного ФП (аутологічного, чи алогенного), які можуть бути використані в адаптивній імунотерапії онкологічних хворих.

Джерела інформації

- 1 Мечников И И // Академ собрн соч - М - 1953 - Т 8 - 253с
- 2 Lawrence H S The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes // J Clin Inv - 1955 - V 34 - P 219 - 232
- 3 Lawrence H S, Borkowsky W Transfer-Factor - current status and future prospects // Biotherapy - 1996 - N9 - P 1 - 5
- 4 Dwyer J M Transfer factor in the age of molecular biology A review // Biotherapy - 1996 - N9 - P 7 - 11
- 5 Kirkpatrick C H Transfer factor // J Allergy

Clin Immunol - 1988 - V 81 - N5 - P 803 - 813

- 6 Viza D AIDS and transfer factor Myths, certainties and realities // Biotherapy - 1996 - N9 - P 17 - 26

- 7 Мац А Н, Перепечкина Н П, Райхер И И и соавт. Аффинолейкин - биофармацевтический препарат для инструктивной противоинойфекционной иммунотерапии при недостаточности клеточного иммунитета // Ж Микробиол - М - 1998 - N2 - С 78 - 83

- 8 Pilotti V, Mastroioli M, Pizza G, De Vinci C et al

Transfer factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy//Biotherapy - 1996 - N9 - P 117 - 121

- 9 Fujisawa T, Yamaguchi Y, Kimura H, Anta M, Baba M, Shiba M Adjuvant immunotherapy of primary resected lung cancer with transfer factor // Cancer - 1984 - V 54 - P 663 - 669

- 10 Whyte R J, Schork M A, Sloan H, Orringer M B, Kirsh M M Adjuvant treatment using transfer factor for bronchogenic carcinoma long-term follow-up // Ann Thorac - 1992 - V 53 - N3 - P 391 - 396

- 11 Levin A S, Byers V S, Fudenberg H H, Wybran J, Johnston J O, Hackett A J Osteogenic carcinoma immunologic parameters before and during immunotherapy with tumour specific transfer factor // J Clin Inv - 1975 - V 55, - P 487 - 497 (прототип)

- 12 Pizza G, Viza D, Boucheix C, Corrado F Effect of in vitro produced transfer factor on the immune response of cancer patients // Eur J Cancer - 1977 - V 13 - N9 - P 917 - 923

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71