



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57608 (13) C2

(51) 7 A61K38/01,38/17,35/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АВТОВАКЦИНИ

1

2

(21) 2000020797

(22) 14 02 2000

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Шляховенко Володимир Олексійович, Потебня Григорій Платонович, Мосієнко Володимир Сергійович, Козак Вячеслава Вадимівна, Загоруйко Лідія Іллівна, Яніш Юрій Вадимович, Миліневська Віра Олександрівна, Чехун Василь Федорович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(56) UA 1667, 25 10 1994

WO 98/42855, 01 10 98

(57) Спосіб одержання протипухлинної автовакцини шляхом промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення з наступною обробкою клітин протеолітичним ферментом, який відрізняється тим, що протеолітичний гідролізат фракціонують і концентрують глікопептиди з молекулярною масою 12-100 кДа

Винахід відноситься до галузі біотехнології і стосується одержання протипухлинних засобів та може 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, що 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.

Найближчим за сукупністю ознак аналогом є 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 годин [5].

Цей спосіб ми обрали прототипом. Причини, що перешкоджають досягненню результату, який одержують при використанні заявленого винаходу є відсутність етапу фракціонування протеолітичного гідролізату пухлинних клітин, в результаті чого залишається велика кількість баластних речовин - білків, нуклеїнових кислот, нуклеотидів, амінокислот і т.п., а також продуктів мікробного походження та культурального середовища, які вводяться під час імунізації з використанням вакцини за способом - прототипом, що може викликати алергічні реакції, явища інтоксикації та інші побічні ефекти. Відомо, що фільтрати культурального середовища мають непостійний склад, і неоднакову ферментативну активність. Крім того, наявність великої кількості складників не дозволяє відрізнити явища специфічного протипухлинного імунітету від неспецифічних реакцій, що супроводжуються зростанням протипухлинної резистентності.

В основу винаходу поставлено задачу розробити такий спосіб одержання протипухлинної вакцини шляхом часткового протеолізу пухлинних клітин з наступним фракціонуванням протеолітичного гідролізату, який забезпечить одержання з пухлинних клітин антигенних структур, придатних для використання в якості активних імуногенів. Оскільки культуральне середовище мікроорганізму *Bac. mesentericus* АБ-56 виявляє високу протеолітичну активність і містить декілька протеолітичних ферментів, що руйнують пухлинні клітини, було розроблено методику одержання імуногену на

(13) C2

(11) 57608

(19) UA

основі пептидів, що утворюються внаслідок протеолітичного гідролізу пухлинних клітин

Це досягається шляхом обробки суспензії пухлинних клітин протеолітичним ферментом за строго контрольованих умов з наступним фракціонуванням продуктів протеолізу та концентруванням пептидів, що несуть на собі вуглеводневий компонент

Суть запропонованого винаходу "Спосіб одержання протипухлинної автовакцини" полягає в наступному: пухлинну тканину промивають сольовим розчином, подрібнюють і обробляють пухлинні клітини протеолітичним ферментом за строго контрольованих умов, далі одержаний протеолітичний гідролізат фракціонують і концентрують глікопептиди з молекулярною масою 12 - 100 кДа

Глибину гідролізу контролюють методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію. При цьому основна маса утворених продуктів має знаходитись у межах 12 - 100 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 компоненту, методами рідинної хроматографії з нього виділяють фракції, що містять вуглеводневий компонент. Фракцію глікопептидів тричі промивають етанолом, розфасовують у стерильні ампули і зберігають при температурі 4 - 6°. Перед застосуванням суспензію глікопептидів відділяють від етанолу шляхом центрифугування, осад розчиняють у стерильному 0,85% розчині хлориду натрію і використовують для протипухлинної імунізації.

Винахід ілюструють приклади

#### Приклад 1

1 г пухлинної тканини подрібнюють ножицями, тричі відмивають фізіологічним розчином, забуференим до pH 7,5 фосфатним буфером. Одержаний промитий осад заливають 10 мл 0,15M 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 1 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 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 ампулах при t 4 - 6°C. Перед вживанням етанол відділяють центрифугуванням, осад глікопептиду розчиняють у стерильному 0,85% розчині хлориду натрію і використовують для імунізації.

#### Приклад 2

Мишам лінії C<sub>57</sub>Black трикратно 1 раз на тиждень під шкіру вводять одержаний глікопептид у дозі, еквівалентній 10<sup>5</sup> пухлинних клітин. Через 3 тижні тваринам прищеплюють пухлину молочної залози Ca 755. Динаміка росту пухлини проілюстрована на фіг 1.

Як видно з наведених даних, у тварин, імунізованих глікопептидним комплексом, спостерігається гальмування росту пухлин (крива 3), виражене значно більше, ніж при імунізації гідролізатом клітин (крива 2).

#### Приклад 3

Мишам-самкам, вагою 20 - 25 г, проводять імунізацію глікопептидним комплексом, одержаним з клітин меланоми В 16 у зростаючих дозах, еквівалентних 1 x 10<sup>5</sup> - 4 x 10<sup>5</sup> клітин з інтервалом між введеннями в один тиждень.

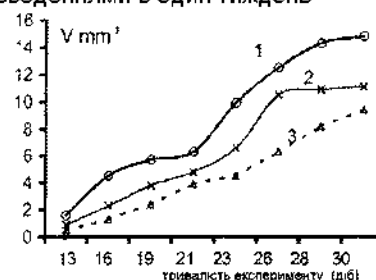


Рис. 1. Вплив імунізації глікопептидним комплексом та гідролізатом пухлинних клітин на ріст експериментального раку молочної залози Ca 755. 1 - контроль, 2 - гідролізат пухлинних клітин, 3 - глікопептидний комплекс.

Через три тижні після останньої імунізації мишам прищеплюють меланому В 16 в кількості 3 x 10<sup>5</sup> пухлинних клітин на одну мишу. Тварин забивають через 21 день після перещеплення. Об'єм пухлин та їх вага наведені у таблиці 1.

Як видно з даних таблиці, у тварин, яких імунізували глікопептидним комплексом, спостерігається гальмування пухлинного росту. Крім того, у групі вакцинованих мишей у 30% тварин пухлини не розвинулися.

Таблиця 1

Вплив імунізації глікопептидним комплексом на ріст експериментальної меланоми В 16 мишей

Середній об'єм пухлин	Контроль	Вакцина	Різниця %
	826,8 мм³	281,6 мм³	69
Середня маса пухлин	4,6 г	2,4 г	47,8
Відсоток тварин з пухлинами	100	70	30

Одержані дані свідчать про доцільність використання глікопептидного комплексу, одержаного з пухлинних клітин, як імуногену для вакцинотерапії пухлинного росту.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 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 -1-carboxyl hydrazide (MMCH) linker arm Glycoconjugate J 1998, 15 217-21

2 Hariharan K, Braslawsky G, Barnett RS Tumor regression in mice following vaccination with human papillomavirus E7 recombinant protein in PROVAX Int J Oncol 1998, 12 1229-35

3 Дебабов В Г ДНК-вакцинация и генотерапия на основе транзистентной 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 Наук, думка, 1979, с 326-396

5 Патент України №1667 на винахід "Спосіб одержання протипухлинної вакцини", Бюл №3, 25 10 94