



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48694 (13) U  
(51) МПК (2009)  
C12N 15/863МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ПРОТИПУХЛИННА ВАКЦИНА НА ОСНОВІ МІЦЕЛЯРНОГО КОМПЛЕКСУ ГЛІКОПЕПТИД -СРG-ДНК

1

2

(21) u200911136

(22) 02.11.2009

(24) 25.03.2010

(46) 25.03.2010, Бюл.№ 6, 2010 р.

(72) ШЛЯХОВЕНКО ВОЛОДИМИР ОЛЕКСІЙОВИЧ,  
ОЛІШЕВСЬКИЙ СЕРГІЙ ВАЛЕРІЙОВИЧ, ЯНІШ  
ЮРІЙ ВАДИМОВИЧ, МІЛІНЕВСЬКА ВІРА ОЛЕК-  
САНДРІВНА, КОЗАК В'ЯЧЕСЛАВА ВАДИМІВНА  
(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛО-  
ГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬ-  
КОГО НАН УКРАЇНИ(57) Протипухлинна вакцина на основі міцелярного  
комплексу глікопептид – СрG-ДНК, яка **відрізня-  
ється** тим, що являє собою переважно міцелярний  
комплекс глікопептидної фракції з молекулярною  
масою 50 кДа, ізольованої з пухлинних клітин, яка  
містить пухлиноасоційовані антигени та СрG-ДНК  
бактеріального походження з неметильованим  
цитозином, отриману з культуральної рідини  
Bacillus subtilis GP1-807-03, яка є потужним приро-  
дним ад'ювантом, що підсилює протипухлинний та  
антиметастатичний ефекти вакцини.

Корисна модель стосується галузі медицини,  
зокрема - онкології, а саме - експериментальної  
онкології.

Розроблена лабораторна технологія отриман-  
ня глікопептидної вакцини в комплексі з бактеріа-  
льною ДНК певного складу, яка продемонструвала  
виражену протипухлинну та антиметастатичну дію  
при лікуванні перещеплюваної меланоми В-16  
мишей.

Найближчим аналогом даної корисної моделі є  
розроблена в Інституті експериментальної пато-  
логії, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН  
України протипухлинна автовакцина [1]. Суттєвою  
відмінністю між комплексною вакциною, що заяв-  
ляється, та вакциною-найближчим аналогом є та  
обставина, що вакцина-найближчий аналог де-  
монструє найкращу лікувальну дію за присутності  
ад'ювантів, які підсилюють її, тоді як сполука, опи-  
сана далі в якості корисної моделі, містить в своє-  
му складі вже вбудований ад'ювант-фрагмент мо-  
лекули бактеріальної ДНК з неметильованими  
цитизиновими залишками.

Стандартний штамп меланоми В-16 був одер-  
жаний з Національного банку культур тканин ІЕ-  
ПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Пухлину  
трансплантували шляхом введення 250-300тис.  
живих клітин у м'язи гомілки, згідно загальноприй-  
нятої методики.

Перебіг пухлинного процесу характеризували  
за стандартними показниками [2]:

- частотою виникнення (прищеплюваності) пу-  
хлин;

- середнім об'ємом ( $\text{мм}^3$ ) та масою (г) пухлин-  
ного вузла;

- частотою метастазування (% мишей у кожній  
групі, які мали метастази в легенях);

- інтенсивністю метастазування (середньою кі-  
лькістю метастазів на одну тварину);

- швидкістю росту метастазів (за середнім  
об'ємом метастазів у  $\text{мм}^3$  на одну тварину).

При визначенні об'єму метастазів форму мет-  
тастатичних вузлів приймали за сферичну. Розра-  
хунки проводили після вимірювання діаметра (d)  
кожного метастазу за формулою:

$$V=0,52d^3.$$

Об'єм пухлини (у  $\text{мм}^3$ ) розраховували за на-  
ступною формулою:

$$V=6\pi \times A \times B^2$$

де А - довжина, В - ширина пухлинного вузла.

ДНК-вмісна фракція з культуральної рідини  
Bacillus subtilis GP1-807-03 була отримана за ста-  
ндартною схемою виділення плазмідної ДНК із  
застосуванням преципітації у поліетиленгліколі  
6000 з подальшою преципітацією у 70% етанолі  
[3,4].

Технологія отримання міцелярного комплексу  
на основі глікопептидних антигенів пухлинних клі-  
тин і СрG-ДНК бактеріального походження.

Міцелярний комплекс на основі глікопептидів  
пухлинних клітин і бактеріальної ДНК, збагаченої  
на неметильовані СрG-мотиви, був отриманий з  
метою підвищення імуногенності пухлинних анти-  
генів та, як наслідок, підвищення ефективності  
протипухлинної вакцини в цілому. В основу техно-

(13) U  
48694  
(11) UA  
(19)

логії отримання даного міцелярного комплексу була покладена здатність двох по-різному заряджених біомолекул взаємодіяти між собою з утворенням так званих міцел.

Глікопептидні антигени з молекулярною масою 50кДа (gp50) були отримані з клітин меланоми В-16 згідно методики, описаної у [5]. Кількість пухлинних клітин, з яких виготовлена gp50 - так званий клітинний еквівалент - визначали за вмістом ДНК, що вивільняється з операційного матеріалу після протеолітичного руйнування пухлинних клітин. Після проведення етапу осадження за допомогою сульфату амонію антигенів пухлинного походження до суспензії останніх додавали неметильовану CpG-ДНК, отриману описаним вище способом з культуральної рідини *Bacillus subtilis* GP1-807-03 у співвідношенні 20мкг ДНК до 1млн. екв. пухл. клітин. Такий вибір співвідношення складових комплексу зумовлений результатами попередніх досліджень, які вказують, що окреме чи поєднане застосування даних компонентів у вказаних вище дозах є оптимальним і характеризується високими показниками ефективності. Після 15хв інкубації за кімнатної температури проводили осадження за звичайною схемою.

Ідентифікацію отриманого міцелярного комплексу здійснювали за допомогою електрофорезу у вертикальних пластинах поліакриламідного гелю (ПААГ), у системі буферів Laemmli, з використанням 0,1% додецилсульфату натрію.

Схема вакцинації міцелярним комплексом вакцина-ДНК

Комплекс вакцина-ДНК тричі вводили мишам у дозі 1млн. екв. пухл. клітин/20мкг в об'ємі 0,2мл ізотонічного розчину хлориду натрію, з інтервалом у 3 доби, починаючи на 3-ї доби після трансплантації пухлини.

В якості препарату порівняння було використано аналогічно отриманий комплекс на основі глікопептидів пухлинних клітин і ДНК з еритроцитів курчати (ЕК), вміст неметильованих CpG-мотивів в якій значно нижчий, ніж у ДНК бактеріального походження.

Отримані результати проілюстровано Фіг.1, 2 та таблицею.

Застосування gp 50 і CpG ДНК окремо та у вигляді міцелярного комплексу вакцина-ДНК на моделі меланоми В-16 виявило, що введення тваринам окремих компонентів не відзначається вираженим гальмівним впливом на ріст пухлини (у випадку ДНК з еритроцитів курчати чи її комплексу з вакциною можна відмітити навіть певну тенденцію до виявлення стимуляції пухлинного росту (Фіг.1, 2). Як при аналізі показників динаміки росту пухлини (Фіг.1), так і у випадку показників маси пухлини (Фіг.2) лише при застосуванні комплексу gp50-CpG ДНК було виявлено статистично достовірне ( $p<0,05$ ) гальмування росту пухлини (Фіг.2).

Результати, наведені в таблиці, демонструють виражену антиметастатичну активність CpG-ДНК окремо та її міцелярного комплексу з gp50, застосування яких суттєво відображається як на частоті метастазування у мишей з перещепленою меланою В-16, так і на рості та поширенні метастазів.

Таблиця

Вплив застосування міцелярного комплексу ДНК-вакцина на показники метастазування у мишей з трансплантованою меланою В-16

Група	Частота метастазування, %	Середня кількість метастазів	Середній об'єм метастазів, мм <sup>3</sup>
Контроль	70,0	39,8±12,5	137,4±29,0
gp50	40,0	27,0±10,0	117,5±17,3
ДНК з ЕК	60,0	51,5±25,8	347,6±59,4*
gp50-ДНК з ЕК	100,0	63,4±24,0	628,8±18,8*
CpG ДНК	50,0	25,5±11,8	50,4±25,1**
gp50-CpG ДНК	50,0	15,2±4,5**	9,9±17,5**

\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  відносно контролю

Слід відмітити, що при застосуванні gp50 окремо спостерігалось значне зниження показника частоти метастазування (до 40%) у порівнянні з 70% в контрольній групі. Однак інші досліджувані показники у мишей цієї групи не відзначалися статистично достовірною різницею від таких для контрольних тварин. При застосуванні лише CpG-ДНК спостерігається помітний вплив на частоту метастазування (зниження до 50%), а також ріст метастазів, тоді як при введенні тваринам міцелярного комплексу на основі CpG-ДНК з вакциною можна відмітити суттєве і статистично достовірне зниження всіх досліджуваних показників, які характеризують процес метастазування.

Таким чином, отримані результати свідчать, що застосування міцелярного комплексу ДНК-вакцина у мишей з трансплантованою меланою В-16 є більш ефективним у порівнянні із застосуванням окремих складових компонентів даного комплексу. Крім того, імунотерапевтична ефективність міцелярного комплексу ДНК-вакцина, безумовно, залежить від походження ДНК у його складі (вірніше - від вмісту в ній неметильованих CpG-мотивів), про що свідчать результати, отримані при застосуванні ДНК з еритроцитів курки.

Окремо було досліджено вплив застосування міцелярного комплексу вакцина-ДНК на деякі імунологічні показники, зокрема виявлено, підвищення метаболічної активності перитонеальних мак-

рофагів у НСТ-тесті, а також стимуляцію цитолітичного потенціалу лімфоцитів з природною кілерною активністю.

Міцелярний комплекс глікопептидна вакцина - CpG-ДНК, який пропонується, має вбудовану молекулу ад'юванта - фрагмент плазмідної ДНК *Bacillus subtilis* і являє собою ефективний протипухлинний та антиметастатичний засіб лікування тварин з модельними перещеплюваними пухлинами, зокрема - меланою В-16 мишей. В разі виділення глікопептидної фракції з операційного матеріалу онкологічних пацієнтів, вакцина на основі міцелярного комплексу цієї фракції та бактеріальної CpG-ДНК може бути застосована в клінічній практиці.

Джерела інформації:

1. Шляховенко В.О., Потебня Г.П., Мосієнко В.С., Козак В.В., Яніш Ю.В., Загоруйко Л.І., Міліневська В.О., Чехун В.Ф. Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини. - Патент України №576008 від 16.06.2003. Бюл. №6.

2. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. - Москва: Практическая медицина, 2005. - 270с.

3. Шляховенко В.О., Мосієнко В.С., Козак В.В., Яніш Ю.В., Ольшевський С.В., Мазур О.В., Артамонова Г.Б. Протипухлинна аутовакцина на основі

глікопептидів пухлинних клітин //Онкологія. - 2004. - Т.6, №3. - С.180-184.

4. Маниатис Т, Фриг Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - Москва: Мир, 1984. - 479с.

5. Olishovsky S., Kozak V., Yanish Yu., Potebnya G., Lisovenko G., Olexienko I., Mazur O., Rybalko S., Shlyakhovenko V. Characteristics of extracellular DNA containing unmethylated CpG motifs isolated from *Bacillus subtilis* culture medium filtrate // Exp. Oncol. - 2004. - V.26, N4. - P.265-270.

Перелік фігур.

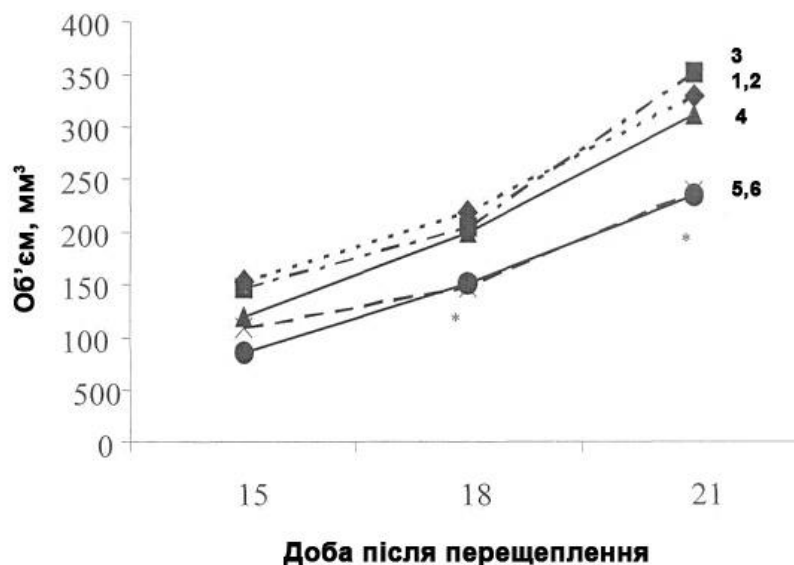
Фіг.1. Динаміка росту меланоми В-16 у мишей після імунотерапевтичного застосування міцелярного комплексу вакцина-ДНК

\* -  $p < 0,05$  відносно контролю

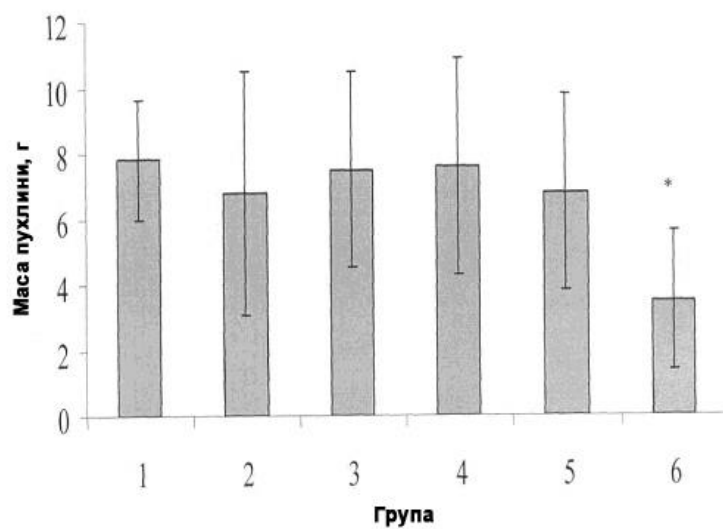
1. контроль
2. gp50
3. ДНК з ЕК
4. gp50 - ДНК з ЕК
5. CpG ДНК
6. gp50 - CpG ДНК

Фіг.2. Ефективність імунотерапевтичного застосування міцелярного комплексу вакцина-ДНК на моделі меланоми В-16 (на 25-ту добу після трансплантації пухлини)

\* -  $p < 0,05$  відносно контролю.



Фіг.1



Фіг.2