



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57869 (13) C2

(51) 7 A61K35/12,38/01,38/17

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

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АУТОВАКЦИНИ

1

(21) 2001064158

(22) 15 06 2001

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. № 7, 2003 р.

(72) Потебня Григорій Платонович, Лісовенко Галина Степанівна, Черемшенко Надія Леонідівна, Танасієнко Ольга Андрівна, Чехун Василь Федорович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМЕНІ Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA 1667, 25 10 94

RU C1 2112547, 10 06 98

2

(57) 1 Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини шляхом промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення, обробки клітин продуктом метаболізму штаму мікроорганізму та інкубації суміші, який відрізняється тим, що клітини обробляють продуктами метаболізму штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7025, а суміш інкубують протягом 0,5-1,0 години

2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як продукти метаболізму використовують фільтрат культуральної рідини штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7025 в кількості 1мл або виділений з нього лектин в дозі 0,06-0,5 мг/мл на $0,9 \times 10^7$ - $1,1 \times 10^7$ пухлинних клітин

Винахід відноситься до медицини, а саме, до онколога і стосується технології одержання протипухлинних засобів

Підвищення ефективності лікування хворих злоякісними новоутвореннями - центральна проблема і мета експериментальної і клінічної онкології. Найбільш інтенсивно розробляються методи імунотерапії пухлин, які ґрунтуються на специфічній індукції протипухлинної резистентності організму шляхом імунізації протипухлинними вакцинами, що містять пухлиноасоційовані антигени регресії. Такі вакцини являють собою вбіти і модифіковані вірусами чи мікробами пухлинні клітини або їх фрагменти.

Переваги вакцин на основі пухлинних клітин, особливо з аутологічної пухлини, полягають в тому, що вони включають всі наявні антигени пухлини. Відпадає потреба в попередній ідентифікації антигенів пухлини, котрі будуть включені в вакцину.

Відомо, що практично всі специфічні протипухлинні вакцини діють ефективніше при використанні їх з ад'ювантами різного походження (RINSE, DETOX, БЦЖ та ін.)

Відомий спосіб одержання протипухлинної вакцини шляхом обробки пухлинних клітин нейрамінідазою холерного вібриона з наступним додаванням мітоміцину C [Rios A, Simmons R. Active specific immunotherapy of minimal residual tumor

Excision plus neurominidase - treated tumor cells, *Int J Cancer* 1974, 13(1) 71-81]. Проте даний спосіб не дозволяє досягти бажаного результату одержана цим способом вакцина має низьку профілактичну і терапевтичну ефективність, а на її приготування витрачають від 4 до 10 годин.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є приготування протипухлинної вакцини шляхом промивання пухлинної тканини фізіологічним розчином, її подрібнення та обробки пухлинних клітин фільтратом культуральної рідини штаму мікроорганізму *Bacillus subtilis* AB-56 [Затула Д.Г. Експериментальне обґрунтування практичного застосування специфічних протиракових вакцин. Вісник АН УРСР 1982, 11 51-62], або поліпептидом кислоти природи, виділеним з вищезгаданого фільтрату [Патент України №1667 МПК⁴ А 61К 35/12 від 15 10 93. Пріор 26 07 82, Бюл. №3, 1994 - прототип].

Характерними ознаками є те, що при виготовленні 1мл вакцини беруть $1,0 \times 10^7$ - $1,2 \times 10^7$ пухлинних клітин і обробляють 1мл фільтрату або 0,25-1,0мг/мл поліпептиду з м.в. 26 500 дальтон, суміш інкубують в термостаті протягом 1-2 годин, періодично струшуючи. Після закінчення інкубації вакцину досліджують на стерильність і на життєздатність пухлинних клітин.

Однак, одержана таким чином протипухлинна вакцина не забезпечує необхідну на сьогодні про-

(13) C2

(11) 57869

(19) UA

філактичну і терапевтичну ефективність. Крім того при одержанні ад'ювантної речовини - фільтрату чи поліпептиду використовують дороге поживне середовище. Тому у своїх дослідженнях ми надавали особливого значення пошукам ад'ювантної речовини, яка б проявляла цитотоксичну активність по відношенню до пухлинних клітин різного гистогенезу (саркома-37, рак Ерліха, лімфома NK/Ly, лімфосаркома ОН-2, плазмоцитома ОН-3, карцинома Льюїс), та була б значно дешевшою. Такими виявились фільтрат культуральної рідини штаму мікроорганізму *Bac subtilis* IMB B-7025 [Заявка на винахід №2001042565 від 17.05.2001. Штам бактерій *Bacillus subtilis* продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин], а також одержана з нього біологічно активна речовина - лектин, що проявляла необхідні властивості. Даний фільтрат і лектин *in vitro* не тільки девіталізували пухлинні клітини *in vitro*, але попередньо аглютинували і частково їх лізували, підсилючи при цьому імуногенність клітин. Ця синергічна дія продуктів метаболізму штаму мікроорганізму *B subtilis* IMB B-7025 і була використана при одержанні протипухлинної аутовакцини за новою технологією.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу удосконалення способу одержання протипухлинної аутовакцини шляхом обробки пухлинних клітин ад'ювантною, нешкідливою для організму речовиною з високою цитотоксичною активністю по відношенню до пухлинних клітин різного гистогенезу з тим, щоб забезпечити значне підвищення біологічної активності протипухлинної вакцини при зменшенні витрат на її приготування.

Поставлена задача вирішується тим, що пухлинні клітини обробляють продуктами метаболізму штаму *B subtilis* IMB B-7025, а суміш інкубують протягом 0,5-1,0 години. Спосіб характеризується тим, що $0,9 \times 10^7$ - $1,1 \times 10^7$ пухлинних клітин обробляють 1мл фільтрату культуральної рідини штаму вказаного мікроорганізму, або одержаним з нього лектином, з розрахунку 0,08-0,5мг/мл.

Удосконалення відомого способу полягає в застосуванні фільтрату культуральної рідини або лектину з вищою цитотоксичною активністю при виготовленні вакцини, які проявляють синергічну дію по відношенню до ракових клітин, що дозволяє підвищити її імуногенність, тобто підсилити протипухлинну резистентність і таким чином досягти значно вищої профілактичної і лікувальної ефективності, майже в 10 разів зменшити кількість ак-

тивної речовини, необхідної для одержання аутовакцини і у 2 рази скоротити інкубаційний період її приготування. Використання продуктів метаболізму штаму-продуцента, який культивують на дешевих поживних середовищах робить також значний вклад в зменшення витрат при виготовленні вакцини.

Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини здійснюють таким чином. Пухлинну тканину тричі промивають стерильним фізіологічним розчином, подрібнюють, клітини обробляють продуктом метаболізму штаму мікроорганізму *Bac subtilis* IMB B-7025, одержану суміш інкубують в термостаті при 37°C протягом 0,5-1,0 години, періодично струшуючи. Для приготування 1мл вакцини до $0,9 \times 10^7$ - $1,1 \times 10^7$ пухлинних клітин додають 1мл фільтрату культуральної рідини штаму вказаного мікроорганізму або 0,08-0,5мг/мл лектину, виділеного з цього фільтрату. Після закінчення інкубації вакцину перевіряють на стерильність та життєздатність пухлинних клітин.

Протипухлинну активність вакцини досліджували на експериментальних тваринах.

Суть способу пояснюють приклади конкретного виконання.

Приклад 1

Пухлинну тканину сингенної лінії мишей BALB/c з прищепленою солідною формою аденокарциноми Ерліха тричі промивають, стерильним фізіологічним розчином, подрібнюють. Для приготування 1мл вакцини $1,0 \times 10^7$ пухлинних клітин обробляють 1мл фільтрату культуральної рідини. Суміш інкубують в термостаті при 37°C 1 годину, періодично струшуючи. Після закінчення інкубації вакцину перевіряють на стерильність і життєздатність пухлинних клітин. Виготовлену вакцину досліджують на протипухлинну активність.

При дослідженні профілактичної ефективності вакциною імунізують мишей лінії BALB/c. Через 28 діб після імунізації мишам в черевну порожнину прищеплюють вірулентні пухлинні клітини Ерліха в кількості $1,2 \times 10^5$.

При дослідженні терапевтичної ефективності мишам лінії BALB/c прищеплюють $1,2 \times 10^5$ вірулентних пухлинних клітин Ерліха. Через 24 години починають лікування вакциною.

Протипухлинну резистентність мишей до аденокарциноми Ерліха при профілактичній і терапевтичній імунізації вакциною представлено в табл. 1.

Таблиця 1

Вакцина	Профілактична ефективність		Терапевтична ефективність	
	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %
Заявлена	1,2	90,0	1,2	60,0
Прототип	1,0	89,5	1,2	30,0

З даних табл. 1 видно, що навіть при збільшенні кількості прищеплених пухлинних клітин, профілактична ефективність аутовакцини забезпечує 100%-ну протипухлинну резистентність, а терапевтична ефективність збільшувалась вдвічі.

Приклад 2

Асцитні пухлинні клітини саркоми-37 від син-

генної лінії мишей BALB/c тричі промивають стерильним фізіологічним розчином. Для приготування 1мл вакцини суспензію пухлинних клітин в кількості $1,0 \times 10^7$ обробляють 1мл фільтрату культуральної рідини *B subtilis* IMB B7025.

Суміш інкубують в термостаті при 37°C 1 годину, періодично струшуючи. Після закінчення інку-

бації вакцину перевіряють на стерильність і життєздатність пухлинних клітин. Виготовлену вакцину досліджують на протипухлинну активність.

При дослідженні профілактичної ефективності вакциною імунізують мишей лінії BALB/c. Через 28 діб після імунізації мишам в черевну порожнину прищеплюють вірулентні пухлинні клітини саркоми-37 в кількості $1,5 \times 10^5$.

При дослідженні терапевтичної ефективності мишам лінії BALB/c прищеплюють $1,5 \times 10^5$ вірулентних пухлинних клітин саркоми-37. Через 24 години починають лікування вакциною.

Протипухлинну резистентність мишей до саркоми-37 при профілактичній і терапевтичній імунізації вакциною представлено в табл. 2.

Таблиця 2

Вакцина	Профілактична ефективність		Терапевтична ефективність	
	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %
Заявлена	1,5	95,0	1,5	80,0
Прототип	1,0	88,9	1,0	50,0

З даних табл. 2 видно, що профілактична і терапевтична ефективність аутовакцини, одержаної заявленим способом, вища навіть при збільшенні дози прищеплених пухлинних клітин в 1,5 рази.

Приклад 3

Пухлинну тканину сингенної лінії мишей BALB/c з прищепленою солідною формою аденокарциноми Ерліха тричі промивають стерильним фізіологічним розчином, подрібнюють. Для приготування 1 мл вакцини беруть $1,0 \times 10^7$ пухлинних клітин, обробляють 0,5 мг лектину. Суміш інкубують в термостаті при 37°C 0,5 години, періодично струшуючи. Після закінчення інкубації вакцину перевіряють на стерильність і життєздатність пухлинних клітин. Виготовлену вакцину досліджують

на протипухлинну активність.

При дослідженні профілактичної ефективності вакциною імунізують мишей лінії BALB/c. Через 28 діб після імунізації мишам в черевну порожнину прищеплюють вірулентні пухлинні клітини аденокарциноми Ерліха в кількості $2,5 \times 10^5$.

При дослідженні терапевтичної ефективності мишам лінії BALB/c підшкірно прищеплюють $5,0 \times 10^5$ вірулентних пухлинних клітин аденокарциноми Ерліха. Через 24 години починають лікування вакциною.

Протипухлинну резистентність мишей до аденокарциноми Ерліха при профілактичній і терапевтичній імунізації вакциною представлено в табл. 3.

Таблиця 3

Вакцина	Профілактична ефективність		Терапевтична ефективність	
	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %
Заявлена	3,0	100,0	5,0	80,0
Прототип	1,5	50,0	5,0	55,0

З даних табл. 3 видно, що профілактична і терапевтична ефективність аутовакцини, одержаної заявленим способом, збільшується в 2 рази.

Приклад 4

Асцитні пухлинні клітини саркоми-37 від сингенної лінії мишей BALB/c тричі промивають стерильним фізіологічним розчином. Для приготування 1 мл вакцини суспензію пухлинних клітин в кількості $1,0 \times 10^7$ обробляють лектином з розрахунку 0,06 мг/мл. Суміш інкубують в термостаті при 37°C 1 годину, періодично струшуючи. Після закінчення інкубації вакцину перевіряють на стерильність і життєздатність пухлинних клітин. Виготовлену вакцину досліджують на протипухлинну

активність.

При дослідженні профілактичної ефективності вакциною імунізують мишей лінії BALB/c. Через 28 діб після імунізації мишам в черевну порожнину інюкують вірулентні пухлинні клітини саркоми-37 в кількості $2,5 \times 10^5$.

При дослідженні терапевтичної ефективності мишам лінії BALB/c прищеплюють $1,5 \times 10^5$ вірулентних пухлинних клітин саркоми-37. Через 24 години починають лікування вакциною.

Протипухлинну резистентність мишей до саркоми-37 при профілактичній і терапевтичній імунізації вакциною представлено в табл. 4.

Таблиця 4

Вакцина	Профілактична ефективність		Терапевтична ефективність	
	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %	Кількість прищеплених клітин, $\times 10^5$	Кількість тварин без пухлин, %
Заявлена	2,5	100,0	1,5	80,0
Прототип	1,5	100,0	1,5	40,0

Дані табл. 4 підтверджують, що профілактична і терапевтична ефективність вакцини, одержаної

заявленим способом, зростає у 2 рази

Таким чином, запропонований спосіб одержання протипухлинної аутовакцини дозволяє одержати вакцину зі значно вищою протипухлинною активністю. Профілактична і терапевтична ефективність запропонованої вакцини вдвічі перевищує ефективність вакцини за способом - прототипом. При цьому скорочується термін приготування з 1-2 годин до 0,5-1,0 години. Значно зменшуються затрати на придбання поживного середовища, необхідного для одержання високоактивних продуктів метаболізму штаму-продуцента.

Спосіб не вимагає додаткового спеціального

обладнання і може широко застосовуватися при одержанні протипухлинних аутовакцин.

Важливо відмітити, що при дослідженні в експерименті одержана таким способом вакцина не чинила на організм тварин імунодепресивної дії та ніяких інших побічних ефектів. Отже, висока ефективність і нешкідливість одержаної заявленим способом вакцини створює експериментальне обґрунтування для рекомендації впровадження її в клінічну практику для лікування радикально оперованих хворих з метою профілактики рецидивів і метастазів.