



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **88026**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 11945**

(22) Дата подання заявки: **11.10.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.02.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.02.2014, Бюл.№ 4**

(72) Винахідник(и):

**Фільчаков Феодосій Вікторович (UA),
Шуміліна Катерина Станіславівна (UA),
Льон Ганна Даріївна (UA),
Кукушкіна Світлана Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ,
вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)**

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТРАНСФЕРФАКТОРНИХ ПОЛІПЕПТИДІВ З ПЕВНОЮ СПЕЦИФІЧНІСТЮ

(57) Реферат:

Спосіб отримання трансферфакторних поліпептидів з певною специфічністю включає використання низькомолекулярного екстракту лімфоцитів селезінки тварин, сенсibilізованих до клітин ксеногенної пухлини. Трансферфакторні поліпептиди отримують із клітин курячих ембріонів, в які попередньо вводять зразок пухлиноспецифічних трансферфакторних поліпептидів.

UA 88026 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до онкології, і може бути використана при отриманні препаратів для імунотерапії хворих онкологічного профілю.

Трансферфакторні поліпептиди (ТФП) являють собою низькомолекулярні поліпептиди (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 ТФП рестрикована молекулами головного комплексу гістосумісності, проте перенос антигенспецифічної імунореактивності за допомогою ТФП генетично необмежений [4]. Не виключено, що крім Т-лімфоцитів, ТФП можуть продукувати всі або майже всі імунокомпетентні клітини [5]. Клінічними дослідженнями із застосуванням ТФП доведено, що такий препарат може бути ефективним засобом імунотерапії хворих з широким спектром імунопатології, включаючи рецидивуючі та дисеміновані інфекції [6,7]. Дослідники, що вивчали ефективність ТФП в імунотерапії онкологічних хворих, застосовували як неспецифічні препарати, отримані з лейкомаси донорів [8] чи осіб, що перебували в контакті з онкохворими [9], так і специфічні, отримані з лейкоцитів онкологічних хворих [10]. Разом з тим, для проведення імунотерапії хворих дуже важливо мати достатню кількість ТФП визначеної антигенної специфічності.

За прототип вибрано спосіб отримання ТФП з лімфоцитів щурів [Патент на корисну модель № 43728, UA, МПК А61К 35/28. Спосіб отримання фактора переносу, специфічного до клітин ксеногенної пухлини / заявник та патентовласник ДУ "Національний інститут раку" (UA). - № u200903731; заявл. 29.04.2009; опубл. 25.08.2009, бюл №16], за яким низькомолекулярну речовину з лімфоцитів селезінки щурів, імунізованих внутрішньоочеревинним введенням живих ксеногенних пухлинних клітин мишачої карциноми легені Льюїс, отримували на 14-у добу після імунізації. 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 прототипі є розробка технології отримання ТФП, специфічних до клітин ксеногенної пухлини, що дає можливість отримати препарат ТФП проти конкретної пухлини для використання в імунотерапії.

Недоліком прототипу є неможливість отримання достатньої кількості препарату ТФП для проведення декількох курсів імунотерапії.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб отримання трансферфакторних поліпептидів з певною специфічністю шляхом їх виділення із клітин курячих ембріонів, в які попередньо були введені зразки пухлиноспецифічних ТФП, що дасть можливість отримати достатню кількість препарату ТФП, специфічних до конкретної пухлини для використання в імунотерапії онкологічного хворого.

Поставлена задача вирішується таким чином:

Інтактним щурам одноразово внутрішньоочеревинно вводять суспензію свіжовиділених клітин меланоми В16 (MB 16) в кількості 2×10^6 клітин/на тварину в об'ємі 0,2 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР). На 14-у добу після імунізації під ефірним наркозом тварин умертвляють та видаляють селезінку, тканину якої піддають механічній дезінтеграції та фільтрації крізь капронове сито. Еритроцити лізують 0,83 % розчином хлористого амонію впродовж 8 хв при 4 С. Після дворазового відмивання в ЗФР за допомогою центрифугування (200 g, 10 хв) осад лімфоцитів (5×10^8) ресуспендують в ЗФР та піддають п'ятиразовому замороженню/відтаюванню відповідно при мінус 20 °С/37 °С. Деполімеризацію всієї позаклітинної ДНК здійснюють за допомогою інкубації з панкреатичною ДНК-азою (1 мг/мл), активованою іонами магнію впродовж 30 хв. при 37 °С, після чого зразки центрифугують при 5000 g 20 хв і ультрафільтрують. Ультрафільтрацію проводять на конічних фільтрах "Centriflo-25" з номінальною відсічною молекулярною масою 25 кД ("Amicon", США) за допомогою центрифугування протягом 25 хв при 400 g. Після ультрафільтрації в кожній з фракцій визначають вміст загального білка за методом Бредфорда [12] для їх стандартизації. Отриману низькомолекулярну фракцію стерилізують за допомогою мікрофільтрації крізь мембрану з діаметром пор 0,22 мкм ("Millipore", США). Після цього в алантоїсний мішок яєць з 9-денними курячими ембріонами вводять 100 пг отриманого зразка пухлиноспецифічних ТФП в 100 мкл ЗФР. На 15-у добу ембріонального розвитку проводять механічну дезінтеграцію курячих ембріонів в стерильних умовах. Після дворазового відмивання в ЗФР за допомогою центрифугування (200 g, 10 хв) осад клітин ресуспендують в ЗФР, виходячи з пропорції 10 клітин/мл. Отримані від кожного ембріона клітини об'єднують в пул та заморожують при мінус 20 °С. Для руйнування клітин проводять п'ятиразове заморожування-відтаювання при мінус 20 °С/37 °С, відповідно. Деполімеризацію всієї позаклітинної ДНК проводять панкреатичною ДНК-азою (1 мг/мл) при 37 С упродовж 30 хв в присутності іонів магнію. Після цього зразок ТФП

центрифугують при 5000 g упродовж 20 хв та ультрафільтрують крізь мембрану Centriflo CF-25 ("Amicon", США).

В отриманому зразку ТФП досліджують концентрацію білка за методом Бредфорда [12], стерилізують за допомогою мікрофільтрації крізь мембрану з діаметром пор 0,22 мкм ("Millipore", США), заморожують та зберігають при мінус 20 °C для подальшого тестування.

Специфічність зразка ТФП щодо клітин MB 16, отриманого із клітин курячих ембріонів, в які попередньо було введено зразок пухлиноспецифічних ТФП, підтверджується реакцією проліферації лімфоцитів в присутності відповідного антигену після впливу на ці лімфоцити пухлиноспецифічного зразка ТФП в системі *in vitro* та *in vivo*.

Прикладом реалізації заявленого способу може вважатися результат отримання зразка ТФП із клітин курячих ембріонів, в які попередньо було введено зразок пухлиноспецифічних ТФП, та експериментальне підтвердження специфічності його дії.

I. Інтактним щурам одноразово внутрішньоочеревинно ввели суспензію свіжовиділених (отриманих шляхом механічної дезінтеграції) клітин MB 16 в кількості 2×10^6 клітин/на тварину в об'ємі 0,2 мл ЗФР. На 14-у добу після імунізації під ефірним наркозом тварин умертвили та видалили селезінку, тканину якої піддали механічній дезінтеграції та фільтрації крізь капронове сито. Еритроцити лізували 0,83 % розчином хлористого амонію впродовж 8 хв при +4 °C. Після дворазового відмивання в ЗФР за допомогою центрифугування (200 g, 10 хв) осад лімфоцитів (5×10^6) ресуспендували в ЗФР та піддали п'ятиразовому замороженню/відтаюванню відповідно при мінус 20 °C/37 °C. Деполімеризацію всієї позаклітинної ДНК здійснювали за допомогою інкубації з панкреатичною ДНК-азою (1 мг/мл), активованою іонами магнію впродовж 30 хв при 37 °C, після чого зразок центрифугували при 5000 g 20 хв і ультрафільтрували. Ультрафільтрацію проводили на конічному фільтрі "Centriflo-25" з номінальною відсічною молекулярною масою 25 кД ("Amicon", США) за допомогою центрифугування протягом 25 хв при 400 g. Після ультрафільтрації вміст загального білку складав 11,7 мкг/мл. Отриману низькомолекулярну фракцію стерилізували за допомогою мікрофільтрації крізь мембрану з діаметром пор 0,22 мкм ("Millipore", США). Після цього в алантоїсний мішок яєць з 9-денними курячими ембріонами вводили 100 пг отриманого зразка пухлиноспецифічних ТФП в 100 мкл ЗФР. На 15-у добу ембріонального розвитку механічно дезінтегрували курячі ембріони в стерильних умовах. Після дворазового відмивання в ЗФР за допомогою центрифугування (200 g, 10 хв) осад клітин ресуспендували в ЗФР, виходячи з пропорції 10 клітин/мл. Отримані від кожного ембріона клітини об'єднали в пул та заморозили при мінус 20 °C. Для руйнування клітин провели п'ятиразове заморожування-відтаювання при мінус 20 °C / 37 °C, відповідно. Позаклітинну ДНК деполімеризували панкреатичною ДНК-азою (1 мг/мл) при 37 °C упродовж 30 хв в присутності іонів магнію. Після цього зразок ТФП центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв та ультрафільтрували крізь мембрану Centriflo CF-25 ("Amicon", США).

В отриманому з клітин курячих ембріонів зразку ТФП концентрація білка склала 4,75 мкг/мл. Отриману низькомолекулярну фракцію стерилізували за допомогою мікрофільтрації крізь мембрану з діаметром пор 0,22 мкм ("Millipore", США), розфасували в стерильні ампули і зберігали при мінус 20 °C для подальшого тестування.

Специфічність зразка ТФП щодо клітин MB 16, отриманого із клітин курячих ембріонів, в які попередньо було введено зразок специфічних ТФП, підтверджується результатами реакції проліферації лімфоцитів в присутності відповідного антигену. В системі *in vitro* після внесення 10 пг пухлиноспецифічного зразка ТФП в змішану культуру лімфоцитів мишей лінії C57BL/6 і клітин MB 16 спостерігається суттєво активніша проліферація лімфоцитів: проліферативний індекс (ПІ) складає $(57,0 \pm 0,1) \%$ в порівнянні із дією неспецифічного зразка ТФП (ПІ складає $(26,5 \pm 0,3) \%$, $p < 0,05$).

Підтвердження специфічності отриманого зразка ТФП проведено в системі *in vivo*. Лімфоцити, отримані на 3-ю добу після введення специфічного зразка ТФП інтактним мишам C57BL/6, відповідають більш вираженою проліферацією в присутності клітин MB 16, ніж лімфоцити, отримані після введення неспецифічного зразка ТФП (відповідно ПІ складає $(44,2 \pm 2,2) \%$ та $(14,5 \pm 1,1) \%$, $p < 0,05$). Такий же ефект спостерігається на 7-у добу після введення зразків: специфічні до антигенів MB 16 ТФП сильніше індукують відповідь лімфоцитів на пухлинні клітини в порівнянні з неспецифічними (відповідно ПІ складає $(50,0 \pm 2,4) \%$ та $(15,4 \pm 1,1) \%$, $p < 0,05$).

Ці результати свідчать про те, що зразок ТФП, отриманий із клітин курячих ембріонів, в які попередньо було введено зразок пухлиноспецифічних ТФП, володіють високою імуноспецифічною активністю, яка проявляється в здатності переносити клітинно-опосередковані імунні реакції *in vitro* та *in vivo*, на відміну від неспецифічного зразка ТФП.

Таким чином, у описаному способі джерелом ТФП є клітини курячих ембріонів, в які попередньо було введено зразок специфічних ТФП. Висока імуноспецифічність отриманого зразка підтверджується експериментально в системі *in vitro* та *in vivo*. Подальше дослідження властивостей специфічного зразка ТФП дозволить в достатній кількості отримувати препарати для імунотерапії в післяопераційному періоді з метою профілактики рецидивів та метастазів у хворих онкологічного профілю.

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. 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.

7. 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.

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

9. 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.

10. A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer / G. Pizza, C De Vinci, D. Cuzzocrea [et al.] // *Biotherapy.*-1996. - V. 9, № 1-3.-P. 123-132.

11. Патент на корисну модель № 43728, UA, МПК А61К 35/28. Спосіб отримання фактора переносу, специфічного до клітин ксеногенної пухлини / заявник та патентовласник ДУ "Національний інститут раку" (UA). - № u200903731; заявл. 29.04.2009; опубл. 25.08.2009, бюл № 16. (прототип).

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання трансферфакторних поліпептидів з певною специфічністю, що включає використання низькомолекулярного екстракту лімфоцитів селезінки тварин, сенсibilізованих до клітин ксеногенної пухлини, який **відрізняється** тим, що трансферфакторні поліпептиди отримують із клітин курячих ембріонів, в які попередньо вводять зразок пухлиноспецифічних трансферфакторних поліпептидів.