



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83120** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 35/66 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 03123	(72) Винахідник(и): Потебня Григорій Платонович (UA), Болюх Ірина Анатоліївна (UA), Діденко Геннадій Васильович (UA), Кузьменко Олександр Петрович (UA), Шпак Євгеній Григорович (UA), Лісовенко Галина Степанівна (UA), Чехун Василь Федорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.03.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2013, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)

(54) СПОСІБ КОНСТРУЮВАННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ ВАКЦИНИ

(57) Реферат:

Спосіб конструювання протипухлинної вакцини шляхом одночасного використання комплексів білків теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа з ксеногенними ембріональними білками курки і аутологічними пухлинними антигенами.

UA 83120 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, зокрема до онкології, і стосується технології одержання протипухлинних засобів.

Одним з важливих механізмів, що дозволяють протистояти появі злоякісних новоутворень, є імунний нагляд. Адекватний рівень імунного захисту здебільшого визначає успіх протипухлинного лікування. Створення протипухлинних вакцин (ПВ), які використовуються для формування специфічної імунної відповіді на пухлинні антигени, суттєво підвищує ефективність лікування онкологічних хворих. Проте, для активного впровадження таких вакцин у клінічну практику потрібно позбутися ряду існуючих недоліків (слабка імуногенність, вузька специфічність тощо). Однією з успішних стратегій підвищення ефективності вакцинотерапії пухлин є поєднане застосування у ПВ імуноотропних речовин природного і синтетичного походження - так званих ад'ювантів.

В сучасній біотерапії раку використовують комплексні ПВ, які складаються з пухлинних клітин, які попередньо піддавали тепловому шоку, та дендритних клітин. Введення таких вакцин призводить до розвитку протипухлинної імунної відповіді за участю CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитів [1]. Недоліками цього способу є складність і наявність трудомістких технологічних прийомів, що пов'язані з виділенням й очищенням аутологічних дендритних клітин, крім того, при їх використанні ймовірний розвиток побічних ефектів у вигляді аутоімунних реакцій.

Відомо спосіб одержання аутологічної ПВ, яка складається з виділених з пухлинної тканини пацієнта пухлинних антигенів в комплексі з шаперонами [2]. Перед вакцинацією пацієнту вводять атенуйований вірус хвороби Ньюкасла як ад'юванту. Недоліками способу є високе антигенне навантаження за рахунок введення вірусних білків та можливість виникнення побічних запальних проявів.

Вибраний як показник рівня техніки і водночас як прототип спосіб одержання ПВ шляхом модифікації ксеногенних ембріональних білків курки ад'ювантом бактеріального походження [3]. Цей спосіб є найбільш близьким по технічній суті до способу, що заявляється, і полягає у використанні для створення ПВ ембріональних ксеногенних протеїнів та як ад'юванту - цитотоксичного білокумісного метаболіту *Bacillus subtilis* IMBB-7025 з молекулярною масою 70 кДа.

Однак, одержана таким чином ПВ не в повній мірі забезпечує протипухлинний ефект в зв'язку з тим, що ксеногенні ембріональні протеїни не активують специфічну ланку імунної системи, крім того, вакцина, одержана за відомим способом, містить значну кількість ксеногенних білків, тобто має високе антигенне навантаження, при цьому можливе виникнення побічних запальних проявів.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу конструювання ПВ, здатної залучати неспецифічну і специфічну ланки імунної системи зі зниженням ризику виникнення побічних запальних процесів.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі конструювання ПВ використовують білки теплового шоку (БТШ), а саме: одночасно БТШ з ксеногенних ембріональних тканин курки і БТШ з аутологічних пухлинних клітин, що забезпечує залучення обох ланок імунної системи і покращує ефективність заявленої вакцини. Використання аутологічних (з пухлинної тканини) та виділених з ембріональної тканини курки БТШ з чітко визначеною молекулярною масою (70 кДа), які утворюють комплекси з пухлиноасоційованими антигенами (БТШ-пептидні комплекси), дозволяє забезпечити оптимальну кількість антигенних пептидів і зменшити, таким чином, антигенне навантаження на організм.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом корисної моделі наступний.

Множинність функцій БТШ обумовлена їх здатністю зв'язуватись з іншими пептидами і у вигляді таких комплексів приймати участь у різноманітних клітинних процесах [4]. БТШ спроможні багаторазово підвищувати імуногенність антигенних пептидів, пов'язаних з ними [5]. Крім того, БТШ є сильними ендогенними ад'ювантами і можуть використовуватись як в асоціації із синтетичними антигенами, так і у вигляді комплексу БТШ-антиген, отриманого безпосередньо з поверхні пухлинних клітин.

Вплив високої температури на пухлинні клітини (42-44 °C) призводить до підвищення експресії в них БТШ і, як наслідок, підвищення імуногенності пухлинних антигенів. Це стало основою для використання БТШ у різних технологіях виготовлення ПВ [6].

Одним з аналогів пухлинного матеріалу є ембріональні клітини. Вони подібні між собою завдяки експресії цілого ряду білків - онкофетальних антигенів, ростових факторів, факторів ангіогенезу, їх рецепторів тощо. Оскільки більшість пухлиноасоційованих антигенів чи білків-учасників канцерогенезу (фактори росту і ангіогенезу) представлена еволюційно консервативними молекулами, то наслідком цього є високий ступінь гомології між цими білками

людини і тварин. З іншого боку, саме ці невеликі міжвидові структурні відмінності можна успішно використовувати при конструюванні ПВ [7].

Курячі ембріональні білки є зручним об'єктом при створенні ПВ завдяки доступності матеріалу, відсутності вірусів патогенних для людини та підвищеного вмісту БТШ з молекулярною масою 70 кДа (БТШ 70). Застосування ксеногенних БТШ-пептидних комплексів, отриманих з ембріональної тканини курки, здатне подолати імунологічну толерантність до антигенів пухлини.

Для виготовлення вакцин використовують лише збагачені БТШ фракції білкових екстрактів, що зменшує антигенне навантаження на організм, при цьому БТШ підвищують імуногенність пухлинних антигенів, а використання ксеногенних БТШ-пептидних комплексів призводить до посилення протипухлинної активності вакцини за рахунок стимуляції неспецифічної ланки імунної системи та використовується як додатковий ад'ювант.

Лабораторна технологія конструювання ПВ, що заявляється.

Індукцію БТШ у пухлинній тканині проводили шляхом прогрівання пухлини (до 1 см в діаметрі) при температурі $43,0 \pm 0,30$ °C з експозицією 1 год. на експериментальному генераторі (434 МГц, "Istok", Російська Федерація). Пухлини видаляли через 24 год. після гіпертермії (оптимальний термін накопичення БТШ в тканині).

Для виділення білкових екстрактів з ембріональної та пухлинної тканин використовували метод висолювання білків сульфатом амонію; для поділу отриманих білкових екстрактів на окремі складові використано методи колонкової хроматографії на Sephacryl S-100 [8] та йонообмінної хроматографії з використанням ДЕАЕ-целюлози [9]. Білковий склад фракцій оцінювали за допомогою SDS-електрофорезу (метод Леммлі). Відбір фракцій здійснювали за наявності в них БТШ з молекулярною масою 70 кДа, вміст даних білків підтверджували методом імуно-блот тесту з використанням моноклональних антитіл до БТШ-70 фірми ENZO (США).

У стерильний флакон вносять 1 мл БТШ-пептидного комплексу з ембріональної тканини курки в концентрації 0,3 мг/мл по білку, додають 1 мл БТШ-пептидного комплексу з аутологічних пухлинних клітин в концентрації 0,3 мг/мл по білку, та 1 мл білоквмісного метаболіту *B. subtilis* B-7025 70 кДа у концентрації 0,6 мг/мл по білку. Після цього одержану суміш струшують на шейкері 15 хв. та проводять інкубацію в термостаті при 38 °C протягом 1 години. Після закінчення інкубації вакцину перевіряють на стерильність та зберігають при $t^{\circ} -20$ °C.

Ефективність ПВ, сконструйованої на основі очищених БТШ-пептидних комплексів, отриманих з пухлинної та ембріональної тканин, і метаболіту *B. subtilis* B-7025 з молекулярною масою 70 кДа як ад'юванту – (вакцина заявлена) порівнювали з такою ПВ, що виготовлена за допомогою вказаного ад'юванту на основі курячих ембріональних білків (вакцина відома). Як модельну пухлину використовували метастазуючу карциному легені Льюїс (КЛЛ) [10].

Пухлинні клітини (КЛЛ) перещеплювали в праву задню кінцівку тварин із розрахунку 10^6 /тварину по стандартній методиці. Вакцини починали вводити на 2 добу після перещеплення, вакцинотерапію проводили 4-разово (2, 5, 12 та 19 доба). Вакцину, виготовлену на основі БТШ-пептидних комплексів (вакцина заявлена), вводили підшкірно (концентрація по білку 0,3 мг/мл, по 0,3 мл/тварину на 1 ін'єкцію). Вакцину на основі курячих ембріональних білків (вакцина відома) готували із розрахунку по білку 0,3 мг/мл, на 1 мг/мл розчину білоквмісного метаболіту *B. subtilis* B-7025 і вводили підшкірно по 0,2 мл/тварину на 1 ін'єкцію.

Порівняння впливу ПВ на перебіг пухлинного процесу та основні реакції протипухлинного захисту оцінювали за показниками активності цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) та макрофагів (Мф). Для характеристики перебігу пухлинного процесу визначали гальмування розвитку метастазів. Розраховували індекси інгібіції метастазування (ІІМ) в порівнянні з відповідним контролем.

Приклади практичного застосування корисної моделі.

Приклад 1. Антиметастатична активність вакцин, сконструйованих на основі ксеногенних ембріональних білків (вакцина відома) та БТШ-пептидних комплексів з ксеногенних ембріональних та аутологічних пухлинних тканин (вакцина заявлена).

Частота метастазування КЛЛ у легені після використання вакцини відомої зменшувалась до 30,0 %. Відповідні показники для вакцини заявленої були суттєво кращими і складали 17,5 % ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Частота метастазування КЛЛ після застосування вакцини з ксеногенних ембріональних білків (вакцина відома) та БТШ-пептидних комплексів (вакцина заявлена)

Група	Частота метастазування КЛЛ, %	Кількість метастазів КЛЛ
Вакцина відома	30,0	1,2±0,4
Вакцина заявлена	17,5	0,8±0,2
Контроль (фізіологічний розчин хлориду натрію)	100,0	34,1±4,9
Примітка. * - $p < 0,05$ при порівнянні з контролем.		

Аналіз даних середньої кількості метастазів КЛЛ після проведення вакцинотерапії свідчить, що застосування вакцин, як на основі курячих ембріональних білків (вакцина відома), так і БТШ-пептидних комплексів (вакцина заявлена), призводило до суттєвого зменшення кількості метастазів порівняно з контролем (табл. 1), при цьому індекс інгібіції метастазування після використання вакцини заявленої був вищим (95,9 % і 89,4 % відповідно). Таким чином вакцина, сконструйована на основі БТШ-пептидних комплексів та білковмісного метаболіту *B. subtilis* B-7025 70 кДа (вакцина заявлена), характеризується статистично вірогідним гальмуванням кількості та частоти метастазування КЛЛ.

Приклад 2. Імуномодуючий вплив вакцин на основі ксеногенних білків (вакцина відома) та БТШ-пептидних комплексів (вакцина заявлена).

Імунологічні показники визначали в терапевтичному експерименті при застосуванні вакцини, створеної на основі БТШ-пептидних комплексів та білковмісного метаболіту *B. subtilis* B-7025 з молекулярною масою 70 кДа (вакцина заявлена), та ПВ, виготовленої за допомогою даного ад'юванту на основі курячих ембріональних білків (вакцина відома).

Показники протипухлинної антитілозалежної цитотоксичної активності (АЦТА) лімфоцитів (клітини-мішені - КЛЛ) у мишей, які одержували вакцину, що заявляється, (табл. 2) були вище, ніж показники у групі мишей, яким проводили терапію вакциною, виготовленою на основі ембріональних білків (вакцина відома). Оцінка впливу аутологічних сироваток крові мишей на ЦТЛ за індексом потенціювання показала більш значне зростання потенціюючого впливу при застосуванні вакцин на основі БТШ-пептидних комплексів (47,61 %). Цей ефект перевищував такий від застосування вакцини відомої.

Таблиця 2

Протипухлинна цитотоксична активність лімфоцитів при застосуванні вакцини з ксеногенних ембріональних білків (вакцина відома) та БТШ-пептидних комплексів (вакцина заявлена)

Група	ЦТА Лц, (ЦІ, %)	АЗЦЛ, (ЦІ, %)	Потенціювання сироваткою ЦТА Лф, (ІП, %)
Вакцина відома	36,03±1,26*	46,36±1,27*	28,67
Вакцина заявлена	23,24±3,09	43,62±3,27*	47,61
Контроль (фізіологічний розчин хлориду натрію)	24,84±0,64	24,26±0,35	-2,32

Примітка. * - $p < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Аналіз даних цитотоксичності перитонеальних Мф свідчить, що введення відомої вакцини та заявленої вакцини майже однаково впливало на цитотоксичність Мф (табл. 3). Потенціювання сироваткою крові цитотоксичності Мф призводило до негативної реакції в "контролі прищеплення" (ІП=-38,95 %). При застосуванні вакцини на основі БТШ-пептидних комплексів потенціювання сироваткою ЦТА Мф було більш виражено (ІП=12,14 %) порівняно з таким при застосуванні відомої вакцини (ІП=8,84 %), що корелює з позитивним протипухлинним ефектом.

Таблиця 3

Протипухлинна цитотоксичність перитонеальних макрофагів у мишей з КЛЛ після застосування вакцини з ксеногенних ембріональних білків (вакцина відома) та БТШ-пептидних комплексів (вакцина заявлена)

Група	ЦТА Мф, (ЦІ, %)	АЗЦ Мф, (ЦІ, %)	Потенціювання сироваткою ЦТА Мф, (ІП, %)
Вакцина відома	35,76±2,11*	38,92±2,71*	8,84
Вакцина заявлена	32,82±2,17*	37,71±2,32*	12,14
Контроль (фізіологічний розчин хлориду натрію)	25,73±1,19	15,71±2,35	-38,95

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

- 5 Отримані дані вказують на те, що в сироватці крові мишей накопичуються специфічні антитіла, які блокують поверхневі білки пухлинних клітин-мішеней. При застосуванні вакцини заявленої показники рівня високо- та середньомолекулярних ЦІК були нижчі за показники контролю (табл. 4). Зменшення рівня ЦІК призводить до зниження імунологічного тиску на організм та є позитивним прогностичним показником при пухлинному процесі.

Таблиця 4

Рівень циркулюючих імунних комплексів після застосування вакцини з ксеногенних ембріональних білків (вакцина відома) та БТШ-пептидних комплексів (вакцина заявлена)

Група	Високомолекулярні, опт.од.	Середньомолекулярні, опт.од.
Вакцина відома	0,04±0,007	0,016±0,006
Вакцина заявлена	0,03±0,004	0,012±0,001
Контроль (фізіологічний розчин хлориду натрію)	0,06±0,006	0,04±0,004

Примітка. * - $p < 0,05$ при порівнянні з контролем прищеплення.

- 10 Таким чином, використання сконструйованої заявленим способом протипухлинної вакцини на основі БТШ-пептидних комплексів з ксеногенної ембріональної та аутологічної пухлинної тканини забезпечує значне пригнічення процесу метастазування. Одержана таким способом вакцина не чинить на організм тварин імунодепресивної дії та інших побічних ефектів.
- 15 Імуномодулюючий вплив заявленої вакцини проявляється у стимуляції прямої та антитілозалежної цитотоксичної активності лімфоцитів і макрофагів та зменшенні вмісту циркулюючих імунних комплексів. Заявлена вакцина забезпечує більш повноцінну імунну відповідь і, як результат, кращий протипухлинний ефект порівняно з відомою вакциною, що підтверджує дієвість способу, що заявляється.

- 20 Отже, висока ефективність та нешкідливість одержаної заявленим способом вакцини надає експериментальне обґрунтування для рекомендації впровадження її в клінічну практику з метою попередження розвитку метастазів. Використання білків теплового шоку при конструюванні протипухлинних вакцин значно розширює арсенал вакцин для лікування онкологічних хворих.

Використані джерела:

- 25 1. Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Оникиенко С.Б., Маргулис Б.А. Молекулярные шапероны и бактериальный полисахарид как иммуномодулирующие факторы в противоопухолевой терапии новообразований головного мозга // Нейрохирургия и неврология детского возраста. -2011. - № 2. – С. 73-84.
2. Кешелева В.В., Ляшенко А.А. Патент на изобретение № 2379055 RU. Способ лечения онкологических заболеваний. Опубл 20.01.10.
- 30 3. Патент на корисну модель № 77647 UA. Спосіб одержання протипухлинної вакцини / Потєбня Г.П., Діденко Г.В., Кузьменко О.П., Шпак Є.Г., Лісовенко Г.С., Черемшенко Н.Л., Симчич Т.В., Чехун В.Ф.; опубл. 25.02. 2013, бюл. № 4.

4. Чиркова О.В. Белки теплового шока: физиологическая роль, методики определения и клиническое значение // Вестник новых медтехнологий.-2006. - Т. 13, - № 3. - С. 45-48.

5. Schreiber T.H., Raez L., Rosenblatt J.D., Podack E.R. Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art // Semin. Immunol.-2010. - Vol. 22, № 3. - P. 105-112.

6. Шевцов М.А., Хачатрян В.А. Маргулис Б.А. Применение белков теплового шока в клинической онкологии // Современная онкология.-2012. - Т. 14, - № 1. - С. 63-68.

7. Патент № 93431 UA. Спосіб підвищення ефективності протипухлинної вакцини / Потебня Г.П., Танасієнко О.А., Тітова Г.П., Рудик М.П., Чехун В.Ф.; опубл. 10.02.2011, бюл. № 3.

10. 8. Скоупс Р. Методы очистки белков / Скоупс Р. - М.: Мир.-1985.-358 с.

9. Barnard E.A. Hexokinase from yeast / E.A. Barnard // Meth. Enzymol.-1975. - № 42. - P. 6-20.

10. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. Софьиной З.П., Сыркина А.В. - М: Медицина.-1980.-79 с.

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб конструювання протипухлинної вакцини, що включає використання ембріональних білків курки, який **відрізняється** тим, що для забезпечення оптимальної кількості антигенних пептидів і зменшення антигенного навантаження на організм одночасно використовують комплекси білків теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа з ксеногенними ембріональними білками курки і аутологічними пухлинними антигенами.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601