

(19)



(10) **LT 2015 506 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **2015 506** (51) Int. Cl. (2015.01): **A61K 35/00**
C12N 5/00
- (22) Paraiškos padavimo data: **2015-09-16**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2016-03-25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (71) Pareiškėjas:
Adas DARINSKAS, Turniškių g. 13-8, LT-10104 Vilnius, LT
- (72) Išradėjas:
Adas DARINSKAS, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Gediminas PRANEVIČIUS, Advokatų kontora VARUL, Konstitucijos pr. 7, LT-09308 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Dendritinių ląstelių (DL) gavimo iš periferinio kraujo, kaulų čiulpų arba aferezės produkto būdas ir jų panaudojimas

- (57) Referatas:

Išradimas skirtas medicinos sričiai, konkrečiai - dendritinių ląstelių (DL) gavimui iš žmogaus periferinio kraujo, kraujo aferezato arba kaulų čiulpų aspirato ir jų panaudojimui imunoterapijoje, gydant tokias patologijas kaip įvairūs onkologiniai susirgimai, nepriklausomai nuo ligos stadijos ir tipo, autoimuniniai susirgimai, alerginiai susirgimai, kitos imuninės sistemos ligos. Periferinis kraujas arba kraujo aferezatas arba kaulų čiulpų aspiratas yra separuojamas, išskiriant tik mononuklearinių ląstelių frakciją, ši frakcija yra išsėjama ląstelių auginimo terpėje ant ląstelių kultūrų flakonų ir inkubuojama dvi valandas. Po inkubacijos flakonai plaunami druskos tirpalu, neprilipusios ląstelės yra pašalinamos, prilipusios ląstelėms jau esamais flakonais yra toliau kultivuojamos specialioje terpėje. Po trijų dienų flakone yra keičiama nuo pusės iki 85 % terpės nauja DL brandinimo terpe su antigenais ir adjuvantais. Ląstelės kultivuojamos šešias valandas ir vykdomas jų nuėmimas specialiai tam skirtais standartiniais tirpalais. Ląstelės plaunamos, filtruojamos per 100 μm filtrą ir šaldomos dozėmis po 5 milijonus ląstelių šaldymo terpėje su autologiniu paciento serumu.

DENDRITINIŲ LAŠTELIŲ (DL) GAVIMO IŠ PERIFERINIO KRAUJO, KAULŲ ČIULPŲ ARBA AFEREZĖS PRODUKTO BŪDAS IR JŲ PANAUDOJIMAS

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas skirtas medicinos sričiai, konkrečiai – dendritinių ląstelių išgavimui iš periferinio kraujo arba kaulų čiulpų arba audinių monocitų, jų brandinimui, užkrovimui antigenu ir panaudojimui imunoterapijoje, siekiant indukuoti specifinį imuninį atsaką pagal naudojamą antigeną.

TECHNIKOS LYGIS

Prieš daugiau nei du dešimtmečius, įrodžius, kad imuninė sistema gali atpažinti ir eliminuoti vėžines ląsteles, didelis dėmesys skirtas imuninių ląstelių tyrimams, mėginant išsiaiškinti kokį poveikį jos turi vėžio genezei. Dabar jau yra žinoma, kad su vėžiu kovoja tiek įgimtas, tiek įgytas imunitetas [Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: An equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84: 988-93.]. Nepaisant didelės kovojančių ląstelių įvairovės, vėžys, pasitelkdamas savo gynybinius mechanizmus, išvengia sunaikinimo [Dunn GP, Old LJ, and Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 2004a; 22: 329–60].

Dėl imuninės sistemos spaudimo, vėžys, norėdamas išlikti, įgyja savybių, mažinančių jo imunogeniškumą, ir/arba slopina imuninės sistemos komponentus [Chen DS and Mellman I. *Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle*. *Immunity* 2013; 39: 1-10.]. Pastebėjus, kad geresnę prognozę turi pacientai, kuriems dėl infekcijos buvo sužadinta imuninė sistema, pradėta taikyti imunoterapija [Cann SAH, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: A place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal* 2003; 79: 672-80.], kurios tikslas yra aktyvinti imunines ląsteles ar tikslingai jas nukreipti į vėžinių ląstelių sunaikinimą.

Imunoterapija turi didelį pranašumą prieš tradicinius gydymo metodus, kadangi yra didesnio specifiškumo ir nesukelia sveikų ląstelių žūties [Eggermont LJ, Paulis LE, Tel J, Figdor CG. Towards efficient cancer immunotherapy: Advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends in Biotechnology* 2014; 32 (9): 456-65]. Vienas iš imunoterapijos gydymo metodų yra vakcinacija autologinėmis vakcinomis, kurios gali būti ruošiamos iš autologinio naviko lizato ar gaminamos dendritinių ląstelių pagrindu,

kurių funkcija yra pateikti antigenus naivioms T ląstelėms. Jau yra atlikta daug tyrimų su įvairiomis priešvėžinėmis vakcinomis ir, nors yra pasiekiamas geresnis imuninės sistemos atsakas į naviką, tikėtino gydymo efekto dar nepasiekta [Kim J and Mooney DJ. In vivo modulation of dendritic cells by engineered materials: Towards new cancer vaccines. *Nano Today* 2011; 6: 466-77].

Tiriama, kokį su vėžiu susijusių antigenų pateikimo metodą panaudoti, kokį adjuvantą pasirinkti, kad vakcinosis būtų dar efektyvesnės: labiau sustiprintų imuninį atsaką, įveiktų imunosupresinę naviko aplinką. Tobulinami dendritinių ląstelių brandinimo metodai, kadangi nuo to priklauso, kokią funkciją atliks šios ląstelės. Yra žinoma, kad nesubrendusios dendritinės ląstelės sukelia imunotoleranciją, o subrendusios aktyvina citotoksines T ląsteles, kurios yra svarbiausios specifinio imuninio atsako komponentės, kovojančios prieš piktybines ląsteles [Palucka K and Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 2013; 39: 38-48].

Dendritinės ląstelės (DL) – tai profesionalios antigeną pateikiančios ląstelės, kurios apjungia įgimtą ir įgytą specifinį imunitetą ir atlieka svarbų vaidmenį, naikinant vėžines ląsteles [Kim SK, Yun CH, Han SH. Enhanced anti-cancer activity of human dendritic cells sensitized with gamma-irradiation-induced apoptotic colon cancer cells. *Cancer Letters* 2013; 335: 278-88]. Šios ląstelės yra išsidėsčiusios audiniuose ir endocitozės bei pinocitozės būdu gaudo antigenus. Toliau pagautus antigenus DL kartu su MHC I klasės ir MHC II klasės molekulėmis limfiniuose mazguose pateikia naiviems T helperiams, kurie savo ruožtu aktyvina citotoksinius T limfocitus. Aplinka, kurioje buvo "pagauti" antigenai, nulemia, ar DL sukels priešnavikinį imunitetą ar imunotoleranciją [Chen DS and Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39: 1-10.; Harris TJ and Drake CH. Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2013; 1: 12]. Nesubrendusios DL, pagavusios antigeną periferiniuose audiniuose, įprastai sukelia imunotoleranciją, kadangi jų membranuose nėra kostimuliuojančių molekulių. DL brandimas susijęs su tam tikrais pokyčiais, pvz.: sumažėja antigenų "gaudymo" efektyvumas, ląstelių paviršiuje padidėja MHC II klasės ir kostimuliacinių molekulių ekspresija, įgyja receptorius, kurie nukreipia jų migraciją, įgyja citokinų sekrecijos funkciją. Vienas iš DL išskiriamų citokinų IL-12 skatina T ląstelių diferenciaciją į efektorines T ląsteles [Palucka K and Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 2013; 39: 38-48]. Be to, kadangi dendritinės ląstelės veikia kaip

APL, jos ir pačios gali tiesiogiai eliminuoti vėžines ląsteles per mirties signalus, tokius kaip TRAIL (su TNF susijusį apoptozę indukuojantį ligandą) ar Fas ligandą [Kim SK, Yun CH, Han SH. Enhanced anti-cancer activity of human dendritic cells sensitized with gamma-irradiation-induced apoptotic colon cancer cells. *Cancer Letters* 2013; 335: 278-88].

Nepaisant didelės pažangos moksle, naujų vaistų sukūrimo ir naviko biologijos pažinimo, vėžys vis dar išlieka viena iš pagrindinių mirties priežasčių ne tik tarp besivystančių, bet ir išsivysčiusiose šalyse. Šiuo metu svarbiausi vėžio gydymo metodai yra trys: chirurgija (naviko pašalinimas), chemoterapija (vaistų vartojimas) ir radioterapija (spindulinis gydymas). Kiekvienas būdas turi apribojimų ar pašalinių poveikių, pvz.: chirurginis gydymas gali būti taikomas tik šalinant kietą, apčiuopiamą naviką, o problemų kyla dėl nepašalintų pradinio naviko liekanų ar metastazių. Chemoterapija yra grįsta sparčiai besidalijančių ląstelių naikinimu įvairiais citostatikais, tačiau organizme greitai proliferuoja ne tik vėžinės ląstelės, bet ir plaukų folikulų, žarnyno epitelio, kaulų čiulpų ląstelės ir kt. [Aly HAA. Cancer therapy and vaccination. *Journal of Immunological Methods* 2012; 382: 1-23]. Imuninės sistemos ląstelės, pvz.: makrofagai, gali slopinti chemoterapijos efektyvumą priklausomai nuo naviko rūšies. Vienas pirmųjų tyrimų, siekiant išsiaiškinti makrofagų įtaką chemoterapijai parodė, kad vėžio gydymui skiriamas preparatas doksorubicinas, pelėse susargdintose leukemija ar limfoma, sustiprina priešvėžinį makrofagų poveikį. Kitas pavyzdys yra B ląstelės, kurios netiesiogiai skatina ortotopinės epitelinio audinio karcinomos progresavimą. Chemoterapija, neinhibuojant B ląstelių yra neveiksminga. Tik kartu su anti-CD20 antikūnais, vaistas paklitakselis yra veiksmingas prieš šios rūšies vėžį [Coffelt SB and de Visser KE. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. *Trends in Immunology* 2015; 36 (4): 198-216].

Norint pasiekti geresnių rezultatų, yra taikomas kombinuotas kelių metodų gydymas. Gydymas tradiciniais chemoterapijos metodais yra kenksmingas, kadangi yra pažeidžiamos ir sveikos ląstelės, todėl tikimasi didelių pasiekimų, pradėjus plačiai taikyti imunoterapiją, specifiskai nukreiptą prieš vėžines ląsteles. Imunoterapija – vėžio gydymo metodas, kuomet imuninės sistemos komponentai yra aktyviai arba pasyviai suaktyvinami ir nukreipiami piktybinių ląstelių sunaikinimui. Dėl didesnio specifiskumo yra išvengiama pašalinių poveikių, kuriuos sukelia įprasti gydymo metodai [Eggermont LJ, Paulis LE, Tel

J, Figdor CG. Towards efficient cancer immunotherapy: Advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends in Biotechnology* 2014; 32 (9): 456-65].

Pirmosios imunoterapijos užuomazgos siekia XIX a. pabaigą, kai W. Coley pastebėjo, kad pacientas, pasiekęs visišką naviko remisiją, prieš tai persirgo ūmia streptokokų sukelta infekcija. Vėliau, sukūręs vakciną iš negyvų *Streptococcus pyogenes* ir *Serratia marcescens* bakterijų, pradėjo gydyti neoperuotinu vėžiu (dažniausiai sarkoma) sergančius žmones. Vakcinos paskirtis buvo sužadinti imuninę sistemą [Cann SAH, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: A place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal* 2003; 79: 672-80; Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. *Immunology and Cell Biology* 2003; 81: 106-13]. Maždaug tuo pat metu, R. Pearl pranešė, kad tuberkuliozė turi priešvėžinį poveikį, todėl sugalvota vėžio gydymui panaudoti vakciną, taikomą tuberkuliozės gydymui – BCG (baccille Calmette-Guérin). BCG vakcina šiuo metu yra vienintelė bakterinės kilmės vakcina, taikoma imunoterapijoje neinvazinio šlapimo pūslės vėžio gydyme [Mayer G. Immunology – chapter one: innate (non-specific) immunity. *Microbiology and Immunology On-Line Textbook*. University of South Carolina School of Medicine. <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm> [cituota 2015 05 01].; Cann SAH, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: A place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal* 2003; 79: 672-80]. Plaučių vėžio imunoterapijoje BCG yra taikoma tik kaip adjuvantas imuninės sistemos stimuliavimui [Raez LE, Fein S, Podack ER. Lung Cancer Immunotherapy. *Clinical Medicine & Research* 2005; 3 (4): 221-8].

Antigenų, susijusių su naviku (TAA), atradimas paskatino specifinės imunoterapijos vystymą [Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. *Immunology and Cell Biology* 2003; 81: 106-13; Wayteck L, Breckpot K, Demeester J, De Smedt SC, Raemdonck K. A personalized view on cancer immunotherapy. *Cancer Letters* 2014; 352: 113-25], kurios tikslas yra sužadinti imuninės sistemos atsaką į naviką [Bluestone JA, Small EJ. The future of cancer treatment: Will it include immunotherapy? *Cancer Cell* 2012; 22: 7-8], žinant, kad efektyvus imuninis atsakas neišsivysto dėl sumažėjusio imuninių ląstelių atpažinimo, silpno naviko imunogeniškumo ir imunosupresinės naviko aplinkos [Kumar S and Mason M. Principles of cancer treatment by immunotherapy. *Surgery* 2012; 30 (4): 198-202].

Pagal veikimą naviko imunoterapija yra skirstoma į pasyviają ir aktyviają. Pasyvioji imunoterapija apima visas imunologiškai aktyvias medžiagas, imunomoduliuojančias ląsteles ir nepriklauso nuo paties paciento imuninės sistemos funkcionavimo, kadangi jam yra pateikiamos ląstelės, pasižyminčios priešvėžiniu poveikiu [Aly HAA. Cancer therapy and vaccination. *Journal of Immunological Methods* 2012; 382: 1-23]. Toliau pasyviają imunoterapiją galima smulkiau suskirstyti į terapiją monokloniniais antikūnais, stimuliuojančiais citokinais ir adoptyviomis T ląstelėmis [Wayteck L, Breckpot K, Demeester J, De Smedt SC, Raemdonck K. A personalized view on cancer immunotherapy. *Cancer Letters* 2014; 352: 113-25]. Pagal kito šaltinio skirstymą prie pasyviosios imunoterapijos dar yra priskiriama kaulų čiulpų transplantacija [Zavala VA and Kalergis AM. New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology* 2015].

Aktyviajai imunoterapijai yra būtina tinkamai funkcionuojanti paciento imuninė sistema, kadangi gydymo metu kovai su vėžinėmis ląstelėmis yra sužadinami recipiento imuniniai mechanizmai. Aktyviajai imunoterapijai yra priskiriamos įvairios vakcinos: BCG, peptidinės, DNR, dendritinių ląstelių ir kt., kurios turėtų būti kiek galima mažiau toksiškos organizmui, galėtų sukelti priešvėžinį imuninį atsaką ne tik prieš pirminį naviką, bet ir prieš metastazes, kurių poveikyje susidarytų imuninė atmintis, apsauganti nuo ligos atsinaujinimo [Moingeon P. Cancer vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 1305-26.; Yannelli JR and Wroblewski JM. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 2004; 23: 97-113].

Dendritinių ląstelių vakcinos

1973 metais R. M. Steinman kartu su Z. Cohn pristatė darbą apie naujai atrastas ląsteles, kurioms dėl citoplazminių ataugų suteikė dendritinių ląstelių (DL) pavadinimą [Rowley DA and Fitch FW. The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman. *Cellular Immunology* 2012; 273: 95-8]. Dėl DL gebėjimo pagauti ir pristatyti antigenus T ląstelėms, jas aktyvuoti, jos tapo svarbiu ginklu, kuriant priešvėžines vakcinas [Vasaturo A, Verdoes M, de Vries J, Torensma R, Figdor CG. Restoring immunosurveillance by dendritic cell vaccines and manipulation of the tumor microenvironment. *Immunobiology* 2015; 220: 243-8]. Taip pat, vėžys, ypač pat, pažengusioje stadijoje, yra sietinas su sumažėjusiu DL skaičiumi ir atlieka ne imunostimuliacinę, tačiau imunosupresinę funkciją, todėl pacientams, sergantiems vėžiu, yra svarbu atstatyti DL kiekį ir funkciją. Yra du DL vakcinų tipai, paruoštos *ex vivo* ir *in*

vivo [Strioga MM, Darinskas A, Pasukoniene V, Mlynska A, Ostapenko V, Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: To use or not to use? *Vaccine* 2014; 32: 4015-24.].

Autologinės *ex vivo* DL vakcinės dažniausiai yra ruošiamos iš funkciškai nepaliestų monocitų, kurie yra įkraunami naviko antigenais, brandinami *ex vivo* ir suleidžiami atgal pacientui [Strioga MM, Darinskas A, Pasukoniene V, Mlynska A, Ostapenko V, Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: To use or not to use? *Vaccine* 2014; 32: 4015-24.]. DL brandinimas yra svarbus etapas, kadangi nesubrendusios ląstelės sukelia imunotoleranciją, pasireiškiančią citotoksinių T ląstelių pašalinimu ir reguliacinių T ląstelių ekspansija [Palucka K and Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 2013; 39: 38-48.; Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 2014; 27: 26-32]. Subrendusios, įkrautos DL keliauja į limfinius mazgus, kur aktyvina CTL, galinčius eliminuoti vėžines ląsteles.

Terapeutinių vakcinų tyrimai, kurie atliekami jau daugiau nei 10 metų, parodė, kad DL pagrindu paruoštos vakcinės yra saugios, padidina cirkuliuojančių T ląstelių helperių ir CTL specifinių naviko antigenams kiekį [Palucka K and Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12: 265-77] ir yra tinkamos daugeliui navikų gydyti [Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 2014; 27: 26-32]. Tačiau, nors tokių vakcinų efektyvumas yra įrodytas ikiklinikiniais ir klinikiniais tyrimais, gydymo rezultatai galėtų būti geresni. Todėl ypatingas dėmesys šiuo metu skiriamas pačių DL vakcinų brandinimo metodikoms tobulinti ir papildomų adjuvantų paieškai.

In vivo DL vakcinės, be to, kad nereikalauja manipuliacijų su organizmo ląstelėmis už jo ribų, turi ir kitą pranašumą. *Ex vivo* atveju DL vakcinės gamybai įprastai naudojama tik viena DL populiacija, dažniausiai kilusi iš monocitų, o *in vivo* yra pasitelkiami įvairūs mieloidinių ir plazmacitoidinių DL potipiai, kurie skiriasi lokalizacija, migracijos keliais, funkcijomis ir poveikiu specifiniam imuniniam atsakui [Strioga MM, Darinskas A, Pasukoniene V, Mlynska A, Ostapenko V, Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: To use or not to use? *Vaccine* 2014; 32: 4015-24]. Pastarosios vakcinacijos metu antigenai yra tiesiogiai pateikiami DL *in vivo*. Antigenų šaltiniais gali būti apšvitintos vėžinės ląstelės, naviko

lizatas, DNR plazmidės su naviko antigenais ir kiti [Strioga MM, Schijns V, Powell DJ, Pasukoniene V, Dobrovolskiene NT, Michalek J. Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immunity* 2013; 19 (1): 98-111]. Toks specifinių antigenų pateikimas dendritinėms ląstelėms sukelia stiprų CD4⁺ ir CD8⁺ ląstelių atsaką. Yra svarbu ir tai, kad be DL brendimo signalų tokia vakcinacija sukelia toleranciją [Palucka K and Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12: 265-77], kadangi pagrindinė DL funkcija yra tolerancijos palaikymas, kuris yra būtinas, nes ne visos autoreaktyvios T ląstelės yra sunaikinamos selekcijos metu. O pažeidus audinį ar vykstant uždegiminei reakcijai, DL vienu metu pateikia tiek savus, tiek svetimus antigenus, todėl tolerancijos palaikymas prieš savus baltymus leidžia T ląstelėms susitelkti kovai tik prieš svetimus, tuo pačiu išvengiant autoimuninių ligų [Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194: 769-80].

Priešvėžinių vakcinų efektyvumo didinimui labai svarbūs yra tam tikri komponentai, kurie papildomai aktyvina imuninį atsaką. Dažniausia tam naudojami bakterijų fregmentai, baltymai ar kt. produktai, nes būtent prieš bakterinius antigenus vystosi greičiausias bei aktyviausias atsakas. Adjuvantai – tai medžiagos, sustiprinančios antigenams specifinį imuninį atsaką. Jie yra svarbūs terapeutinių vakcinų komponentai, kadangi padidina silpnų antigenų imunogeniškumą ir taip pat padeda įveikti naviko imunosupresinę aplinką ir sužadinti CTL atsaką [Dubensky TW and Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in Immunology* 2010; 22: 155-61]. Adjuvantai gali būti naudojami skirtingiems tikslams pasiekti [Petrovsky N and Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology* 2004; 82: 488-96]: padidinti antigenų imunogeniškumą, kadangi „negyvų“ vakcinų antigenai yra silpnai imunogeniški; sumažinti antigenų kiekį ar imunizacijų skaičių, reikalingų sukelti tinkamą imuninį atsaką; pagerinti vakcinų efektyvumą pacientuose su nusilpusia imunine sistema; pristatyti antigenus.

Medžiagos, išskirtos iš bakterijų dėl savo imunostimuliacinių savybių, gali būti naudojamos kaip adjuvantai. Gramneigiamų bakterijų lipopolisacharidas, leidžiamas kartu su antigenais, sukelia imuninį atsaką nepaisant to, kad pats LPS nėra labai imunogeniškas. Toks adjuvantas, aktyvuodamas TLR receptorius, kurie palaiko pavojaus signalus, aktyvina imuninę sistemą. LPS nėra plačiai naudojamas žmonių gydyme dėl savo

pirogeninio poveikio [Petrovsky N and Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology* 2004; 82: 488-96]. Taip pat adjuvantais gali būti ir kitos medžiagos/antigenai, kurios pagal savo kilmę gali aktyvuoti skirtingus TLR receptorius:

TLR-1: bakteriniai lipoproteinai ir peptidogliukanai

TLR-2: bakteriniai peptidogliukanai

TLR-3: dvigrandė RNR (virusai)

TLR-4: lipopolisacharidai

TLR-5: bakterijų žiuželiai

TLR-6: bakterijų lipoproteinai

TLR-7: viengrandė RNR

TLR-8: viengrandė RNR turtinga G seka

TLR-9: CpG ir DNR

TLR-10: nežinoma

TRUMPAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Skirtingai nuo analogų, kuriuose kalbama apie klasikinius dendritinių ląstelių išgavimo ir brandinimo metodus, mūsų išradimas pasižymi greita (trys dienos) monocitų tranzicija į nesubrendusias dendritines ląsteles ir greitu (šešios valandos) jų subrandinimu, naudojant specialų brandinimo mišinį ir sąlygas.

Periferinis kraujas arba kraujo aferezatas arba kaulų čiulpų aspiratas yra separuojamas, išskiriant tik mononuklearinių ląstelių frakciją, ši frakcija yra išsėjama ląstelių auginimo terpėje ant ląstelių kultūrų flakonų ir inkubuojama dvi valandas. Po inkubacijos flakonai plaunami druskos tirpalu (PBS arba fiziologiniu), neprilipusios ląstelės yra pašalinamos, prilipusios ląstelės su jau esamais flakonais yra toliau kultivuojamos specialioje terpėje. Po trijų dienų flakone yra keičiama nuo pusės iki 85% terpės nauja DL brandinimo terpe su antigenais ir adjuvantais. Ląstelės kultivuojamos šešias valandas ir vykdomas jų nuėmimas specialiai tam skirtais standartiniais tirpalais. Ląstelės plaunamos, filtruojamos per 100 μm filtrą ir šaldomos dozėmis po 5 milijonus ląstelių šaldymo terpėje su autologiniu paciento serumu. Atliekamas sterilumo tyrimas ir kiti privalomi tyrimai.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

I. Mononuklearinių ląstelių išskyrimas iš kraujo, aferezato, kaulų čiulpu aspirato

Kraujas skiedžiamas hidroetilkrakmolo tirpalu, skirtu infuzijoms kaip plazmos pakaitalas, skiedžiama santykiu 1:1. Sumaišytas tirpalas paliekamas nusistovėti kambario temperatūroje 20-40 min., per tiek laiko paprastai išsiskiria du sluoksniai: apatinis, turtingas eritrocitais, ir viršutinis, kuriame yra eritrocitų, plazmos bei branduolinių kraujo elementų. Viršutinis sluoksnis yra surenkamas į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojamas prie 1000-1500G 5-15 min. kambario temperatūroje, po centrifugavimo supernatantas yra nupilamas, o nuosėdos suspenduojamos druskos tirpale arba likusiame viršutiniame kraujo/hidroksietilkrakmolo tirpalo mišinyje. Paprastai, esant 150-300 ml kraujo, centrifugatas yra skiedžiamas iki 40 ml baigtinio tūrio. Jeigu kraujo yra daugiau, atitinkamai proporcingai yra skiedžiamas ir centrifugatas. Tuomet į 15 arba 50 ml mėgintuvėlius yra pripilama fikolo arba perkolo tirpalo, kurio tankis yra nuo 1,0 iki 1,12 g/ml. Tirpalo pilama ne daugiau kaip 1/3 mėgintuvėlio tūrio. Ant šio tirpalo pipete iš lėto, palenkus mėgintuvėlį, kuo gulsčiau atsargiai pilamas skiestas ląstelių centrifugatas iki mėgintuvėlio viršaus. Mėgintuvėliai centrifuguojami prie 1100-1500 G 10-20 min. kambario temperatūroje, stabdis nenaudojamas. Po centrifugavimo mėgintuvėliuose matomos trys frakcijos: apačioje – eritrocitų frakcija, virš eritrocitų – mononuklearų sluoksnis, plaukiojantis aukščiau fikolo skaidraus sluoksnio, virš mononuklearų sluoksnio – trombocitai kartu su praskiesta hidroksietilkrakmolu plazma. Pipete atsargiai yra surenkamas mononuklearų sluoksnis ir supilamas į naujus mėgintuvėlius, kuriuose yra įpilta druskos tirpalo arba ląstelių auginimo terpės. Vyksta ląstelių plovimo nuo gradiento medžiagos (fikolo arba perkolo) etapas. Ląstelės gerai išmaišomos ir centrifuguojamos prie 500-850 G 10-20 min. kambario temperatūroje. Stabdis nenaudojamas. Procedūra gali būti kartojama kelis kartus. Po plovimo ląstelės suskaičiuojamos ir išsėjamos į ląstelių auginimo flakonus tokiu santykiu 175 cm² ploto / 100-120 milijonų ląstelių ir 10 ml terpės, skirtos T limfocitams arba dendritinėms ląstelėms auginti. Flakonai yra inkubuojami ląstelių kultūroms skirtuose inkubatoriuose 37°C temperatūroje ir 5-15% CO₂ aplinkoje 2 valandas. Po inkubacijos flakonai yra plaunami tris kartus PBS arba druskos tirpalu, pašalinamos neprilipusios ląstelės. Jos yra išsėjamos atskirai tam, kad vėliau būtų galima atlikti MLR testą (jis nėra šio patento dalis). Ląstelės, likusios flakonuose, užpilamos 20 ml specialia monocitų diferenciacijos terpe, kuri sudaryta iš Interferono alfa (60 000 IU) (5μl iš darbinio tirpalo, kuris daromas iš 6 mln. interferono alfa, skiedžiant 0,5 ml terpės) ir 200

µl GM-CSF 1000 U/ml (darbinis tirpalas 100 000 U/ml) bei 1% autologinio paciento serumo.

II. Monocitų diferenciacija į dendritines ląsteles

Užpylus diferenciacinės terpės, flakonai yra kultivuojami tris dienas. Yra įmanoma papildomos dienos funkcija, bet tuomet antrą kultivavimo dieną turi būti pripilama 30% naujos diferenciacinės terpės. Flakonuose esančios ląstelės tokiose auginimo sąlygose yra nuo 50-75% dendritinės ląstelės.

III. Dendritinių ląstelių brandinimas, antigeno pateikimas

Trečią arba ketvirtą kultivavimo dieną atliekamas DL brandinimas bei antigeno užkrovimas.

Į flakoną yra pilama 10-18 µg/ml antigeno pagal baltymo koncentraciją, kartu yra ruošiamas diferenciacijos kokteilis ir antigenas baigtiniam užkrovimui. 10-18 µg/ml koncentracijos antigenas yra sumaišomas su adjuvantu (100-200 U LPS ir 50-100 U CpG arba Poly I:C, arba ampligeno, arba Poly ApU). Mišinys inkubuojamas vieną valandą 37°C temperatūroje maišant/vartant. Paruošiama antigeno užkrovimo ir brandinimo terpė. Sudėtis ir kiekiai vienam flakonui: 10 ml terpės, 200 µl GM-CSF (2000 U/ml), 5 µl IFN-alfa (6000 U/ml), 1000 U/ml IFN-gamma, 1% autologinės plazmos arba serumo. Po valandinės inkubacijos antigenas su adjuvantu yra sumaišomas su antigeno užkrovimo ir brandinimo terpe, terpė, esanti flakonuose, yra surenkama, ląstelės centrifuguojamos ir, palikus iki 10% senos terpės, ląstelės yra suspenduojamos antigeno užkrovimo ir brandinimo terpėje (jau sumaišius su antigenu ir adjuvantais). Viskas yra išsėjama atgal į auginimo flakonus, ląstelės yra dar 6 valandas laikomos inkubatoriuje. Po inkubacijos laiko yra stebima ženkliai ląstelių morfologijos kaita, jos tampa pailgos, išsidriekusios. Tai byloja apie sėkmingą antigeno opsonizaciją ir DL aktyvaciją į imunogeniškas ląsteles.

IV. DL nuėmimas ir šaldymas

Po 6 valandų inkubavimo su antigenu ir antigeno užkrovimo ir brandinimo terpe ląstelės yra nuimamos ir šaldomos.

Terpė surenkama į mėgintuvėlius, ant flakonų yra užpilama PBS/EDTA tirpalo (PBS standartas EDTA koncentracija nuo 0.02-4%). Laikoma šiltai iki 15 min. arba šaltai +4°C temperatūroje iki 2 val.

Ląstelės surenkamos, flakonai praskalaujami 2 kartus PBS arba druskos tirpalu, viskas surenkama į mėgintuvėlius ir centrifuguojama 450-800 G 10 min. +4°C temperatūroje. Nucentrifuguotos ląstelės prakošiamos per 100 µm nailoninį filtrą ir skaičiuojamos.

Ląstelės šaldomos koncentracijoje nuo 5-10 mln. ląstelių/ml. Šaldymo terpė sudaryta iš 10% DMSO (dimetilsulfoksidas) autologinio paciento serumo arba plazmos. DMSO niekada nėra įmaišomas kaip grynas tirpalas į ląstelių suspensiją, jis maišomas tik praskiestas su serumu. Tirpalai maišant su DMSO kaista. Su šaldymo terpe sumaišytos ląstelės yra išpilstomos į šaldymo mėgintuvėlius, kurie dedami į šaldymo dėžutę ir šaldomi pagal standartinį protokolą patalpinant juos į -80°C temperatūrą porai valandų.

V. DL atšildymas ir suleidimas

Užšaldytas mėgintuvėlis ištraukiamas iš šaldymo vietos ir nedelsiant yra patalpinamas į indą su šiltu +37°C temperatūros vandeniu. Atšildoma iki kol ledas visiškai ištirps ir pripilamas toks pats tūris fiziologinio skysčio arba autologinio serumo. Vakcinės sutraukimui į švirkštą naudojama ne plonesnė nei 28G, geriausiai – 21G adata, vakcinės suleidimui į paodį – 27-29G adata.

DL taikymo indikacijos ir gydymo pavyzdžiai

Indikacijos procedūrai atlikti:

- a) Visų tipų ir stadijų onkologiniai susirgimai;
- b) Autoimuniniai susirgimai (išsėtinė sklerozė, reumatoidinis artritas, raudonoji vilkligė, psoriazė)

Ligoniams taikyto gydymo dendritinėmis ląstelėmis pavyzdžiai ir jų rezultatai

Ligonė R.N. IV stadijos metastazuojanti melanoma, gydymas chemoterapija netaikomas, paciento išgyvenamumo prognozė – 2-3 mėn. Taikytas gydymas autologinėmis DL nuo 2013 metų. Atlikti trys DL kursai po septynių vakcinų, iš viso

pacientas per du metus gavo 21 DL vakciną. Pacientas yra stabilioje būsenoje, liga neprogresuoja.

Ligonė E.R., 2009 m. diagnozuotas krūties vėžys, taikytas chirurginis gydymas, chemoterapija, 2011 metais navikas metastazavo į plaučius ir kepenis, prognozė skurdi, 2012 metais pradėta taikyti autologinė DL vakcinacija (trys kursai po 5 vakcinas), pacientės liga stabilizavosi, sustojo metastazavimo procesas, metastazės kalcinavosi (inaktyvacija). Pacientė išlieka stabili.

Ligonė T.K., 2009 metais diagnozuotas kiaušidžių vėžys, IV stadija su metastazėmis į pilvaplėvę. Taikytas operacinis gydymas, pašalinant pilvaplėvės audinius su metastazėmis, taikyta chemoterapija. 2011 metais taikytas gydymas autologine DL vakcina, atliktas vienas vakcinacijos kursas, iš viso – 8 vakcinas. Liga neprogresuoja, pacientės būklė išlieka stabili.

Ligonis J.S., 2010 metais diagnozuota inkstų karcinoma, IV stadija, metastazės plaučiuose ir kepenyse. Taikytas gydymas chemoterapija, pabaigus du iš šešių chemoterapijos kursų dėl paciento netolerancijos šiam gydymui buvo skirtas gydymas autologine DL vakcina, nuo 2011 metų atlikti keturi vakcinacijos kursai po šešias vakcinas, leidžiant pagal standartinę schemą. Paciento pirminis navikas ir metastazės yra išnykę, pacientas laikomas pilnai pasveikusių.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Dendritinių ląstelių (DL) gavimo iš periferinio kraujo, aferezės produkto ar kaulų čiulpų aspirato būdas, apimantis dendritinių ląstelių išgavimą ir brandinimą, besiskiriantis tuo, kad:
 - a) išskiria tik mononuklearinių ląstelių frakciją, separuojant periferinį kraują arba kraujo aferezatą arba kaulų čiulpų aspiratą,
 - b) šią frakciją išsėja ląstelių auginimo terpėje į ląstelių kultūrų flakonus ir inkubuoja dvi valandas,
 - c) po inkubacijos flakonus praplauna druskos tirpalu, pašalina neprilipusias ląsteles, prilipusias ląsteles su jau esamais flakonais toliau kultivuoja specialioje terpėje,
 - d) po trijų dienų flakone pakeičia nuo pusės iki 85% terpės nauja DL brandinimo terpe su antigenais ir adjuvantais, ląsteles kultivuoja šešias valandas ir jas nuima specialiai tam skirtais standartiniais tirpalais,
 - e) ląsteles praplauna, perfiltruoja per 100 µm filtrą ir užšaldo naudojimui paruoštomis dozėmis šaldymo terpėje su autologiniu paciento serumu,
 - f) prieš naudojimą, užšaldytą mėgintuvėlį patalpina į indą su šiltu +37°C temperatūros vandeniu, atšildo iki ledas visiškai ištirps ir pripila tokį patį tūrį fiziologinio skysčio arba autologinio serumo; vakcinos sutraukimui į švirkštą naudoja ne plonesnę nei 28G, geriausiai – 21G adatą, vakcinos suleidimui į paodį – 27-29G adatą.

2. Būdas pagal 1 punkto stadiją a), besiskiriantis tuo, kad
 - praskiedžia kraują hidroetilkrakmolo tirpalu santykiu 1:1 ir palieka nusistovėti kambario temperatūroje 20-40 min., kol išsiskiria du sluoksniai: apatinis, turtingas eritrocitais, ir viršutinis, kuriame yra eritrocitų, plazmos bei branduolinių kraujo elementų;
 - viršutinį sluoksnį surenka į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguoja prie 1000-1500 G 5-15 min. kambario temperatūroje, po centrifugavimo susidariusį supernatantą nupila, o nuosėdos suspenduoja druskos tirpale arba likusiame viršutiniame kraujo/hidroksietilkrakmolo tirpalo mišinyje, 150-300 ml kraujo praskiedžiant iki 40 ml tūrio;
 - į 15 ml arba 50 ml mėgintuvėlius pripila fikolo arba perkolo tirpalo, kurio tankis yra 1,0-1,12 g/ml tirpalo pilama ne daugiau kaip 1/3 mėgintuvėlio tūrio;

- ant šio tirpalo pipete iš lėto, palenkus mėgintuvėlį, kuo gulsčiau pila skiestą ląstelių centrifugatą iki mėgintuvėlio viršaus;
 - mėgintuvėlius centrifuguoja prie 1100-1500 G 10-20 min. kambario temperatūroje, nenaudojant stabdžio;
 - atsargiai pipete surenka mononuklearų sluoksnį, po centrifugavimo susidariusį tarp apatinio eritrocitų sluoksnio ir viršutinio trombocitų sluoksnio, ir supila į naujus mėgintuvėlius, kuriuose yra įpilta druskos tirpalo arba ląstelių auginimo terpės;
 - praplauna ląsteles nuo gradiento medžiagos, gerai išmaišo ir centrifuguoja prie 500-850 G 10-20 min. kambario temperatūroje, nenaudojant stabdžio;
 - procedūrą, reikalui esant, kartoja kelis kartus.
3. Būdas pagal 1 punkto stadiją b), **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad
- praplautas ląsteles suskaičiuoja ir išsėja į ląstelių auginimo flakonus santykiu 175 cm² ploto / 100-120 mln ląstelių ir 10 ml terpės, skirtos T limfocitams arba dendritinėms ląstelėms auginti;
 - flakonus inkubuoja ląstelių kultūroms skirtuose inkubatoriuose 37°C temperatūroje ir 5-15% CO₂ aplinkoje 2 valandas.
4. Būdas pagal 1 punkto stadiją c), **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad
- po inkubacijos flakonus praplauna tris kartus PBS arba druskos tirpalu, pašalina neprilipusias ląsteles, o ląsteles, likusias flakonuose, užpila 20 ml specialia monocitų diferenciacijos terpe, sudaryta iš Interferono alfa 60 000 IU ir 200 µl GM-CSF 1000 U/ml bei 1% autologinio paciento serumo, ir flakonus, užpildus diferenciacine terpe, kur 50-75% ląstelių sudaro dentritinės ląstelės, kultivuoja tris dienas.
5. Būdas pagal 1 punkto stadiją d), **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad
- į flakoną pripila 10-18 µg/ml koncentracijos antigeno pagal baltymo arba RNR koncentraciją, antigeną sumaišo su adjuvantu santykiu 100-200 U LPS ir 50-100 U CpG arba Poly I:C, arba ampligeno, arba Poly ApU, gautą mišinį inkubuoja vieną valandą 37°C temperatūroje maišant/vartant;
 - paruošia antigeno užkrovimo ir brandinimo terpę tokios sudėties ir kiekiais vienam flakonui: 10 ml terpės, 200 µl GM-CSF (2000 U/ml), 5 µl IFN-alfa (6000 U/ml), 1000 U/ml IFN-gamma, 1% autologinės plazmos arba serumo;

- po valandinės inkubacijos antigeną su adjuvantu sumaišo su antigeno užkrovimo ir brandinimo terpe, terpę, esančią flakonuose, surenka, ląsteles centrifuguoja ir, palikus iki 10% senos terpės, ląsteles suspenduoja antigeno užkrovimo ir brandinimo terpėje, jau sumaišytoje su antigenu ir adjuvantais;
- viską išsėja atgal į auginimo flakonus, ląsteles dar 6 valandas išlaiko inkubatoriuje, kol stebima ženkli ląstelių morfologijos kaita, jos tampa pailgos, išsidriekusios, kas byloja apie sėkmingą antigeno opsonizaciją ir dendritinių ląstelių aktyvaciją į imunogeniškas ląsteles.

6. Būdas pagal 1 punkto stadiją e), besiskiriantis tuo, kad

- surenka terpę į mėgintuvėlius, ant flakonų užpila PBS/EDTA tirpalo (PBS standartas EDTA koncentracija nuo 0,02 iki 4%) ir laiko šiltai iki 15 min. arba šaltai +4°C temperatūroje iki 2 val.;
- ląsteles surenka, flakonus praskalauja du kartus PBS arba druskos tirpalu, viską surenkama į mėgintuvėlius ir centrifuguoja 450-800 G 10 min. +4°C temperatūroje;
- išcentrifuguotas ląsteles perkošia per 100 µm nailoninį filtrą, suskaičiuoja ir užšaldo naudojimui paruoštomis dozėmis po 5 milijonus ląstelių/ml šaldymo terpės, sudarytos iš 10% DMSO (dimetilsulfoksido) autologinio paciento serumo arba plazmos;
- ląsteles, sumaišytas su šaldymo terpe, išpilsto į šaldymo mėgintuvėlius, kurie dedami į šaldymo dėžutę ir šaldomi, patalpinant juos į -80°C temperatūrą porai valandų.

7. Dendritinės ląstelės, gautos būdu pagal 1-6 punktus, skirtos panaudoti imunoterapijoje visų tipų ir stadijų onkologinių susirgimų ir autoimuninių susirgimų, tokių kaip išsėtinė sklerozė, reumatoidinis artritas, raudonoji vilkligė, psoriazė, gydymui.