

(19)



(10) **LT 2014 112 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **2014 112** (51) Int. Cl. (2016.01): **A61K 39/00**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2014-09-26**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2016-04-25**
- (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:
UAB „INNOVITA RESEARCH”, Laisvės pr. 125A, Vilnius, LT
- (72) Išradėjas:
Victor I. SELEDTSOV, RU
Galina V. SELEDTSOVA, RU
Adas DARINSKAS, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Otilija KLIMAITIENĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Iš normalių audinių gautos ksenogeninės vakcinos, skirtos pažeisti imuninės sistemos su navikais susijusių antigenų toleravimą

- (57) Referatas:

Aprašoma priešnavikinė vakcina, apimanti sėklidžių ir iš fetalinių audinių kilusius komponentus. Ląstelių preparatai yra ruošiami iš normalių audinių, paimtų tiesiogiai iš gyvūnų. Tokios vakcinos gali būti naudojamos įvairių vėžio tipų gydymui ir prevencijai. Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad vakcina, susidedanti iš gliutaraldehidu paveiktų ląstelių, paruoštų iš avies sėklidžių ir fetalinių plaučių, yra efektyvi sukeltant priešnavikines ląstelines reakcijas bei pailginant plaučių vėžį turinčių pelių išgyvenimo trukmę.

IŠRADIMO SRITIS

Šis išradimas yra susijęs su ksenogeninėmis poliantigeninėmis priešnavikinėmis vakcinomis, ir tiksliau su vakcinomis, apimančiomis tiek bendruosius, tiek ir audiniui būdingus, diferenciacijos antigenus, kilusius iš normalių (nenavikinių) audinių. Vakcinos gali būti naudingos vėžio gydymui ir prevencijai.

IŠRADIMO TECHNIKOS LYGIS

Iki šiol, sisteminis vėžio gydymas yra daugiausia paremtas chemoterapijos panaudojimu. Tačiau daugeliu atvejų chemoterapija nėra radikalus gydymas. Jau iš pat pradžių nustatytuose navikuose egzistuoja ląstelės, kurios dėl savo biocheminių savybių yra atsparios toksiniam vaisto poveikiui. Be to, tokių ląstelių proporcija gydymo metu progresyviai didėja, nes jų augimui atsiranda išskirtiniai privalumai prieš citotoksiniam vaistui jautrias ląsteles. Taip pat reikėtų paminėti, kad priešneoplazminių vaistų citotoksinis poveikis nėra atrankus: vaistai veikia ne tik navikines, bet taip pat ir normalias ląsteles. Taigi, išlieka poreikis vaistų, turinčių atrankų citotoksinį aktyvumą.

Navikinės ląstelės skiriasi nuo normalių kiekybine ir kokybine potencialiai imunogeninių struktūrų (antigenų) ekspresija ant jų paviršiaus. Yra bendrai priimta manyti, kad šių struktūrų sukeltos imuninės reakcijos gali sąlygoti navikinių ląstelių destruktiją ir kad imuninės sistemos atsakas gali apspręsti ligos baigtį. Visi su naviku susiję antigenai (tumor-associated antigens (TAA)) gali būti suskirstyti į dvi grupes: viena grupė apima diferenciacijos antigenus, kurie gali būti ekspresuojami ne tik navikinėse, bet ir normaliose ląstelėse, tuo tarpu antra grupė apima mutuotų arba virusų genų produktus, kurie gali būti ekspresuojami išimtinai piktybinėse ląstelėse. Didžioji dalis TAA priklauso pirmajai grupei. Kai kurie iš šios grupės TAA, pavyzdžiui vėžio/sėklidžių antigenai (cancer/testis antigens (CTA)), dėl bendrų viduląstelių mechanizmų, susijusių su įvairių tipų ląstelių supiktybėjimu, gali būti ekspresuojami daugelyje įvairių navikų. Kiti TAA (pavyzdžiui onkofetaliniai antigenai) yra apspręsti naviko tipo ir dažniausiai būna iš audiniui būdingų diferenciacijos antigenų (apžvelgta Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V. et. al. *Vaccine*. 2014; 32:4015-4024). Suaugusiame organizme CTA normaliai yra ekspresuojami tik imuniniu požiūriu privilegijuotuose organuose, įskaitant sėklides ir placentą, bet gali nenormaliai tapti ekspresuojami vėžinėse ląstelėse. Pavyzdžiui, suaugusiame organizme MAGE, BAGE, GAGE ir kai

kurių kitų genų šeimų produktai yra daugiausia ekspresuojami sėklidėse, nei kituose audiniuose ir organuose. Kita vertus, daugelis navikų tipų gali ekspresuoti šiuos CTA (apžvelgta Fratta E., Coral S., Covre A. et. al. *Mol Oncol.* 2011; 5:164-82). CTA turi didelį imunogeninį potencialą, nes jie imuninei sistemai yra „nežinomi“ ir todėl nėra toleruojami. Onkofetaliniai antigenai gali būti natūraliai ekspresuojami normaliuose audiniuose labai mažais kiekiais (pavyzdžiui, alfa-fetoproteinas kepenyse), tačiau gali būti superekspresuojami kai kurių vėžio tipų atvejais arba esant įvairioms nepiktybinėms patologijoms. Superekspresuojami onkofetaliniai antigenai yra mažiau imunogeniški, nei CTA (Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V. et. al. *Vaccine.* 2014; 32:4015-4024).

Reikia pažymėti, kad imunizuojant vienu arba keliais su naviku susijusiais antigeniniais peptidais dažnai nepavyksta kontroliuoti bendro naviko vystymosi ir taip sukuriama sąlyga, palankios augimui tų navikinių ląstelių klonų, kurie neturi vakcininių determinantų. Dar daugiau, dėl vėžinio genomo didelio labilumo, netgi tarp tos pačios kilmės navikinių ląstelių egzistuoja didelė antigeninė įvairovė (apžvelgta Khong H.T., Restifo N.P. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005).

Kadangi pilnos navikinės ląstelės ekspresuoja daugybę įvairių TAA ir gali sukelti platų imuninių reakcijų spektrą, jos galėtų būti geriau pritaikomos vėžio vakcinų konstravimui lyginant su pavieniais ar vos keletu antigeninių peptidų. Dar daugiau, antigeninės ląstelinės dalelės paprastai yra daug labiau imunogeniškos lyginant su tirpiaisi antigeniniais peptidais, nes gali būti pilnai fagocituojamos specializuotų, antigenus prezentuojančių ląstelių, galinčių prezentuoti identiškus ląstelinės kilmės peptidus kartu su pagrindinio audinių suderinamumo kompleksu (major histocompatibility complex (MHC)) molekulėmis tokiu tankiu, kuris yra pakankamas sukelti T ląstelių reaktyvumą.

Yra sukurti įvairūs vakcinų tipai, paremti navikinių ląstelių panaudojimu. Specifinėms priešnavikinėms imuninėms reakcijoms sukelti buvo naudotos autologinės (pagamintos iš to paties individo navikinių ląstelių) ir alogeninės (pagamintos iš kito tos pačios rūšies individo navikinių ląstelių) pilnos ląstelės vakcinos bei dendritinių ląstelių pagrindu sukurtos vakcinos (de Grujil T.D., van den Eertwegh A.J., Pinedo H.M., Scheper R.J. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57:1569-77). Deja, imunizuojant nemodifikuotomis homologinėmis (autologinėmis arba alogeninėmis) navikinėmis ląstelėmis vėžiu sergančius pacientus jų gydymo sėkmė buvo ribota. Yra dvi pagrindinės priežastys, kurios lemia žemą homologinių ląstelių vakcinų imunogeniškumą. Visų pirma, kaip jau minėta aukščiau, daugumą TAA sudaro savi antigenai, kurie nėra iš prigimties imunogeniški. Antra, antigeną prezentuojančios ląstelės neatpažįsta homologiškų navikinių ląstelių,

kaip potencialiai patogeniškų taikinių, kuriuos reikėtų įsisavinti (internalizuoti), o jų antigenus suskaidyti (Khong H.T., Restifo N.P. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005). Taigi, TAA imuninio toleravimo įveikimas yra esminė vėžio imunoterapijos užduotis.

Tam tikros priemonės, paremtos vakcininių ląstelių genetinėmis modifikacijomis, įgalinančiomis jas ekspresuoti kostimuliacines molekules ir/arba sekretuoti imunitetą stimuliuojančius citokinus, buvo taikomos siekiant padidinti autologinių ar alogeninių vėžio vakcinų imunogeniškumą (de Grujil T.D., van den Eertwegh A.J., Pinedo H.M., Scheper R.J. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57:1569-77; Andersen M.H., Sørensen R.B., Schrama D., et al. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1735–43). Tačiau, visos šio tipo modifikacijos klinikinėje praktikoje yra sunkiai pasiekiamos, nes navikinių ląstelių modifikacija yra techniškai komplikauta ir užima daug laiko (apžvelgta Parmiani G., Pilla L., Maccalli C., Russo V. *Cancer J*. 2011;17:331-336).

Imuniteto saviems homologiniams TAA toleravimui įveikti buvo pasiūlytas ksenogenų TAA panaudojimas. Iš tikrųjų, daugelis genų yra evoliuškai labai konservatyvūs, turintys įvairaus laipsnio panašumą tarp skirtingų rūšių. Nepaisant to, maži tarprūšiniai struktūriniai skirtumai gali lemti padidintą ksenobaltymų imunogeniškumą ir suteikti žymų kryžminį imuninį reaktyvumą, nukreiptą prieš jiems homologiškus atitikmenis. Faktiškai, ksenoantigenai potencialiai gali reikšti “pakitusius savo”, turinčius pakankamai skirtumų nuo savų antigenų, kad jie taptų imunogeniški, bet turinčius ir pakankamai panašumą, kad leistų reaktyvioms T ląstelėms išlaikyti jų atpažinimą, kaip savo (apžvelgta Seledtsov V.I., Shishkov A.A., Seledtsova G.V. In: Ozdemir O, editor. *Current cancer treatment – novel beyond conventional approaches*. InTech. 2011; 415–428; Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V. et. al. *Vaccine*. 2014; 32:4015-4024). Yra duomenų, kad ksenoepitopai gali surišti šeimininko MHC molekules stipriau, nei epitopai, kilę iš natūralių homologiškų baltymų, susidarant labiau ilgalaikiams ksenogeninių peptidų/MHC kompleksams. Tai neišvengiamai veda prie stipresnių ksenoantigenų sukeltų T ląstelių atsakų, kryžmiškai reaguojančių su iš savų baltymų kilusiais TAA (Overwijk W.W., Tsung A., Irvine K.R. et. al. *J Exp Med*. 1998;188 :277–286).

Dauguma ksenogeninių vakcinų tyrimų buvo atlikta su gyvūnais, turinčiais melanomą – naviką, kuris ekspresuoja daug potencialiai imunogeniškų antigenų. Yra įtikinamų įrodymų, kad indukuojant priešnavikinį imuninį atsaką pelėms ksenogeniniai su melanoma susiję antigenai yra daug efektyvesni už analogiškus graužikų antigenus. Pavyzdžiui, yra skelbtų duomenų, kad daugkartinės pelių imunizacijos žmogaus glikoproteinais gp75 ir gp-100 buvo efektyvios norint sustabdyti singeninių melanomos ląstelių, ekspresuojančių atitinkamus pelių baltymų analogus,

augimą (Overwijk W.W., Tsung A., Irvine K.R. et al. *J Exp Med.* 1998;188 :277–286; Weber L.W., Bowne W.B., Wolchok J.D. et al. *J Clin Invest.* 1998;102):1258–1264). Imunogeniniai ir priešnavikiniai ksenovakcinavimo efektai taip pat buvo aprašyti eksperimentiniuose hepatokarcinomos, gliomos, neuroblastomos, storosios žarnos vėžio ir plaučių karcinomos modeliuose. Aptikta, kad terapiniai vakcinavimai geba generuoti navikui būdingus CD4+ ir CD8+ T limfocitus bei priešnavikinius antikūnus (apžvelgta Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V. et al. *Vaccine.* 2014; 32:4015-4024.).

Taip pat kaupiasi duomenys, rodantys priešnavikinių ksenovakcinavimų tarapinį potencialą žmonėms. Pavyzdžiui, yra skelbta, kad vakcina, susidedanti iš graužikų melanomos ir karcinomos ląstelių bei kiaulės sėklidžių ląstelių, buvo imunologiškai ir kliniškai efektyvi pacientams, sergantiems melanoma ir storojo žarnyno vėžiu (RU2192884C2 patentas). Skelbti rezultatai rodo, kad ksenogeninės vakcinos yra saugios vartoti, pajėgios indukuoti apčiuopiamus ląstelinius ir humoralinius imuninius atsakus pacientams ir gali tarnauti, kaip efektyvios priemonės melanomos, inkstų vėžio, virškinimo sistemos navikų, plaučių vėžio ir prostatos vėžio gydymui (Seledtsov V.I., Shishkov A.A, Seledtsova G.V. In:Ozdemir O, editor. *Current cancer treatment – novel beyond conventional approaches.* InTech. 2011; 415–428).

Svarbu pažymėti, kad visi žmonės turi natūralius, iš anksto esančius, antikūnus (antibodies – Abs), kurie apsprendžia ūmų bet kokių neprimatų ląstelių atmetimą ir funkcijonuoja, kaip pagrindinis barjeras gyvūnų organų transplantacijai žmonėms. Didžiąją dalį šių Abs atstovauja IgG, specifiniai alfa-gal epitopai, kurio gausiai esama ant neprimatų žinduolių ir naujojo pasaulio beždžionių (plačianosių beždžionių) glikoproteinų ir glikolipidų (Galili U. *Immunol Today* 1993;14:480-482). Oponizuojant ksenogenines ląsteles, natūralūs Abs pradeda antigeninės medžiagos internalizavimą antigenus prezentuojančiose ląstelėse (antigen-presenting cells (APC)) per Fcg receptoriaus tarpininkaujamą mechanizmą ir labai padidina antigeninių peptidų kryžminį imunogeninį prezentavimą antigenui specifiniams CD4+ ir CD8+T limfocitams (Galili U. *Immunol Today* 1993;14:480-482; Platzer B., Stout M., Fiebiger E. *Front Immunol.* 2014; 5:140). Šis teiginys sutampa su skelbtais rezultatais, rodančiais, kad alfa-Gal turinčių navikinių ląstelių atmetimas gali efektyviai paskatinti imuninį atsaką prieš kitus su naviku susijusius antigenus, esančius alfa-Gal neturinčiose navikinėse ląstelėse (Rossi G.R., Unfer R.C., Seregina T., Link C.J. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54: 999-1009).

Ksenogeninių ląstelių pagrindu sukurtos vakcinos paprastai būna pilnų navikinių ląstelių arba jų lizatų formoje (Seledtsov V.I., Shishkov A.A, Seledtsova G.V. In:Ozdemir O, editor. *Current*

cancer treatment – novel beyond conventional approaches. InTech. 2011; 415–428). Tačiau naudoti navikinių ląstelių kultūras yra gana brangu ir jos ne visada gali būti padauginamais TAA šaltiniais. Taip pat svarbu žinoti, kad nors ksenogeninėse vakcinose naudojamos navikinės ląstelės ir nėra gyvos, tokios vakcinos vis dar gali turėti tokių komponentų, kurie galėtų dalyvauti sukeliant navikus.

Kaip jau buvo minėta, didžioji dauguma TAA priklauso diferenciacijos antigenams, kurių gausiai yra organų morfogenezeje dalyvaujančiose ląstelėse. Tai suteikia galimybę gauti ksenogeninius vakcininius antigenus iš normalių audinių, kuriuose jie yra gausiai ekspresuojami. Pavyzdžiui, vėžio/sėklidžių antigenai (CTA), priklausantys taip vadinamiems bendriesiems TAA, gali būti lengvai gaunami iš normalių sėklidžių audinių ir galėtų vėliau būti panaudojami, kaip universalūs priešnavikiniai antigenai. Pagal skelbtus duomenis (apžvelgta Lim S.H., Zhang Y., Zhang J. Am J Blood Res. 2012; 2:29-35), imuninės reakcijos, nukreiptos prieš CTA, gali apspręsti naviko destruciją nepažeidžiant normalių audinių ir organų. Normalūs fetaliniai (iš embrionų gauti) audiniai gali būti tinkamais onkofetalinių vakcininių antigenų šaltiniais. Taip pat yra gerai žinoma, kad ir placenta gamina visą spektrą diferenciacijos antigenų, įskaitant tuos, kurių yra skirtingo tipo augliuose įskaitant melanomą (Zhong Z., Kuznierzuk K.P., Popov I.A. et.al., J Transl Med. 2006; 4:22).

Nepaisant to, kas pasakyta aukščiau, išlieka poreikis tokios vėžio vakcinos, kuri būtų kliniškai efektyvi, lengvai pagaminama, padauginama ir nebrangi. Taip pat būtų labai pageidautina, kad vėžio vakcina pagrįsta technologija būtų pritaikoma daugiau, nei vieno vėžio tipo gydymui ir prevencijai arba jos specifiškumą būtų galima lengvai pakeisti. Iš normalių audinių kilusios ksenogeninės vakcinos galbūt gali tenkinti visus šiuos reikalavimus.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Figūra 1. Rodo naviko leukocitų infiltraciją kontrolinėse ir vakcinuotose pelėse, kur "***" šiame ir kituose paveiksluose žymi $P < 0,05$, lyginant su kontrole.

Figūra 2. Rodo LLC antigeno sukeltą IL-2 gamybą blužnies ląstelėse, išskirtose iš kontrolinių ir vakcinuotų pelių.

Figūra 3. Pateikta kontrolinių ir vakcinuotų pelių išgyvenimo trukmės mediana.

IŠRADIMO ESMĖ

Šis išradimas yra nukreiptas įveikti iš anksto egzistuojantį su navikais susijusių diferenciacijos antigenų imuninį toleravimą. Pateikiamos vakcinos, kurios apima komponentus, kilusius iš normalaus audinio, paimto iš vienos rūšies žinduolio ir yra skirtos kitos rūšies žinduolio navikų prevencijai arba gydymui. Šio išradimo objektai yra vakcininės kompozicijos, apimačios ksenogenines sėklidžių ląsteles ir ksenogenines iš kitų audinių kilusias ląsteles. Siūloma, kad tokios vakcininės kompozicijos gali būti naudingos daugelio vėžių tipų gydymui ir turi akivaizdžių pranašumų, lyginant su visomis kitomis anksčiau aprašytais vakcinomis. Jos yra daug labiau imunogeniškos lyginant su autologiškais ar alogeniniais analogais. Jos sukelia poliklonines imunines reakcijas ir todėl yra efektyvesnės naviko augimo slopinimui, lyginant su peptidinėmis vakcinomis, galinčiomis sukelti tik oligoklonines imunines reakcijas.

Labai svarbus šio išradimo ksenogeninių normalių audinių kilmės vakcinų privalumas yra neribotų ir atsinaujinančių šaltinių panaudojimas jų gamybai. Gausūs sėklidžių ir kitų audinių kilmės ląstelių kiekiai gali būti gaunami iš pasirinkto žinduolio, kaip jų šaltinio. Geriausia, kai minėtas žinduolis yra avis, kiaulė, katė arba pelė. Geriausiai tinkamas gyvūnas yra avis.

Vakcininės kompozicijos paprastai turėtų apimti sėklidžių ir fetalinių audinių kilmės ląsteles iš tos pačios ksenogeninės rūšies; tačiau, kai kuriais atvejais, gali būti naudojamos vienos ksenogeninės rūšies sėklidžių ląstelės ir kitos ksenogeninės rūšies audinių kilmės ląstelės, pavyzdžiui, sėklidžių ląstelės iš avies ir audinių kilmės ląstelės iš kiaulės arba atvirkščiai.

Vakcininės kompozicijos komponentų kiekiai bus aiškūs patyrusiam asmeniui. Geriausias sėklidžių ląstelių ir audinių kilmės ląstelių santykis vakcininėje kompozicijoje yra nuo 1:10 iki 10:1; dar geresnis santykis yra nuo 1:5 iki 5:1; geriausias santykis yra 1:1.

Šis išradimas suteikia galimybę pagaminti daug vakcinų, tinkamų skirtingų vėžio tipų gydymui. Kiekviena specializuota vakcina yra gaunama derinant bendruosius ir audiniui būdingus TAA. Pavyzdžiui, vakcininė kompozicija plaučių vėžiui gali apimti sėklidžių ląsteles ir iš plaučių audinio gautas ląsteles; vakcininė kompozicija inkstų vėžiui gali būti sudaryta iš sėklidžių ląstelių ir iš fetalinių inkstų kilusių ląstelių; ir taip toliau. Geriausia, kai vakcininė kompozicija yra skirta plaučių vėžiui. Reikia pažymėti, kad gyvūnų fetaliniai audiniai gali būti ne tik audiniui būdingų bet taip pat ir bendrų diferenciacijos antigenų šaltiniai.

Kai kuriais atvejais, minėta vakcininė kompozicija yra aprašoma, kaip heterologinis antigenų mišinys, prezentuojamas pilnų audinio ląstelių, kurios buvo paveiktos glutaraldehidu.

Ląstelių fiksavimui ir konservavimui gali būti naudojamos ir kitos medžiagos, tokios kaip formaldehidai ir alkoholis. Vakcinos taip pat gali būti naudojamos intaktinių (pilnų) arba liofilizuotų ląstelių lizatų formoje.

Šis išradimas pateikia farmacinę kompoziciją, apimančią terapiškai efektyvų ksenogeninių sėklidžių ląstelių ir ksenogeninių iš fetalinių audinių kilusių ląstelių kiekį. Farmacinės kompozicijos gali būti skirtos naudoti žmogui arba gyvūnui žmogaus arba veterinarinėje medicinoje.

PAVYZDŽIAI

Medžiagos ir metodai

Pelės. C57BL/6 (B6; H-2^b) pelės buvo veisiamos mūsų nuosavoje bazėje. Pelės buvo patinėliai, kurių amžius svyravo ribose tarp 4 ir 6 mėnesių. Jos gaudavo autoklavuotą maistą ir virintą vandenį.

Navikinių ląstelių linija. B6 (H-2^b) kilmės LLC karcinomos ląstelių linija buvo gauta iš Rusijos Medicinos mokslų akademijos Maskvos Onkologinio mokslinio centro ir buvo palaikoma RPMI 1640 terpėje, papildytoje 10% FCS, 2 mM l-glutaminu ir antibiotikais.

Navikinių ląstelių lizatų gamyba imunoreaktyvumo testui. LLC ląstelės buvo surinktos, gausiai praplautos fosfato buferiniu tirpalu (phosphate-buffered saline (PBS)) ir toliau saugomos -20 °C iki naudojimo.

Vakcininių komponentų gamyba. Sėklidės buvo paimtos iš suaugusio avies individo. Išimtas iš kapsulių spermatogeninis audinys buvo susmulkintas žirkklėmis ir tada suspenduotas stiklinio homogenizatoriaus pagalba švelniai spaudžiant audinio fragmentus šaltame PBS. Ląstelių suspensija paliekama 7 min. kad nusėstų dideli agregatai. Perkėlus iš homogenizatoriaus į mėgintuvėlį, ląstelės buvo praplautos šaltu PBS. Po to, dalis ląstelių 20 minučių buvo inkubuojama 0,1% glutaraldehyde (v/v) prie 37 °C ir tada intensyviai praplauta, kad būtų gautas vakcininių ląstelių preparatas. Kita ląstelių dalis buvo užšaldoma ir atitirpinama tris kartus ir tada nucentrifuguojama taip gaunant supernatantą, turintį tirpius sėklidžių antigenus.

Plaučiai buvo išskirti iš nuo 3 iki 4 mėnesių amžiaus avies embrionų. Išskirti plaučiai buvo gausiai praplauti dideliame tūryje šalto PBS ir tada susmulkinti su žirkklėmis. Ląstelės buvo švelniai

išspaustos iš plaučių fragmentų į šaltą PBS ir perneštos į mėgintuvėlį. Vakcininės gliutaraldehidu paveiktos plaučių ląstelės ir supernatantas, turintis tirpius plaučių antigenus, buvo paruošti iš esmės taip pat, kaip aprašyta aukščiau.

Naviko implantacija ir vakcinavimo procedūros. Buvo sudarytos penkios B6 pelių patinėlių grupės, kurių kiekviena susidėjo iš 15 gyvūnų. Visoms pelėms 0 dieną buvo padarytos LLC ląstelių injekcijos (2×10^5 ląstelių pelei) po oda (s.c.).

1. Kontrolinė grupė. Pelės nepatyrė jokios imunizacijos.
2. Grupė, vakcinuota su ksenogeninėmis sėklidžių ląstelėmis. Pelės buvo imunizuotos 3, 7 ir 11 dieną suleidžiant po oda gliutaraldehidu paveiktas sėklidžių ląsteles, atitinkamai 2×10^6 , 4×10^6 ir 6×10^6 ląstelių pelei.
3. Grupė, vakcinuota su ksenogeninėmis plaučių ląstelėmis. Pelės buvo imunizuotos gliutaraldehidu paveiktomis plaučių ląstelėmis 3, 7 ir 11 dieną, atitinkamai 2×10^6 , 4×10^6 ir 6×10^6 ląstelių pelei.
4. Grupė, vakcinuota su ksenogeninėmis sėklidžių ir plaučių ląstelėmis. Pelės buvo imunizuotos gliutaraldehidu paveiktomis sėklidžių ir plaučių ląstelėmis 3, 7 ir 11 dieną, atitinkamai 1×10^6 , 2×10^6 ir 3×10^6 kiekvienos rūšies ląstelių pelei.
5. Grupė, vakcinuota su ksenogeniniais tirpiaisi sėklidžių ir plaučių antigenais. Pelės tris kartus buvo imunizuotos sėklidžių ir plaučių tirpių produktų mišiniu kiekiais, atitinkančiais vakcininių ląstelių kiekius, naudotus ketvirtai pelių grupei.

Imunoreaktyvumo analizė. 18 dieną po naviko implantacijos buvo tiriamas penkių pelių iš kiekvienos grupės imunoreaktyvumas LLC karcinomos antigenams. Histologiniams tyrimams, nuo 5 iki 7 μm storio mikroskopiniai pjūviai buvo fiksuojami hematoksilinu-eozinu. Leukocitų infiltracijos laipsnis buvo skaičiuojamas nuo 0 iki 5. T ląstelių reaktyvumo tyrimui blužnis buvo suspenduotos stiklinio homogenizatoriaus pagalba. Ląstelių suspensijos paliekamos 7 min kad nusėstų dideli agregatai ir pavienių ląstelių suspensijos tada buvo perkeliamos iš homogenizatoriaus į mėgintuvėlį. Gausiai praplovus šalta terpe blužnies ląstelės buvo 3 dienas kultivuojamos terpėje be serumo 96 apvaliadugnių šulinėlių plokštelėje 2×10^5 /šulinėlyje su LLC ląstelių lizatais (kiekvieno 5×10^4 /šulinėliui) arba be jų - kontrolėje. Interleukino-2 (IL-2) kiekiai kultūrų supernatantuose buvo įvertinami naudojant komerciškai prieinamus imunofermentinės analizės testus (enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)). Stimuliavimo indeksas buvo apskaičiuotas taip: bandinio IL-2 lygis/kontrolės IL-2 lygis.

Išgyvenimo registravimas. Pelės buvo stebimos kiekvieną dieną, ar išgyveno ir kritę gyvūnai buvo išskrosti. Akivaizdūs navikai buvo gausiai aptikti su aiškiai matomu metastazės procesu.

Statistics. Duomenų statistinės reikšmės buvo nustatytos naudojant Stjudento testą. P reikšmė $<0,05$ buvo laikoma statistiškai reikšminga. Kaplane-Meier metodas buvo naudotas bendram išgyvenimo įvertinimui.

1 pavyzdys

Vakcinavimai su ksenogeninėmis audinių kilmės ląstelėmis stimuliuoja naviko infiltraciją leukocitais

Uždegiminė reakcija ties naviko kraštu buvo vertinama suskaičiuojant vienabranduoles ir granulocitines ląsteles dešimtyje didelio galingumo (40x objektyvu) laukų. Kaip galima matyti 1 paveiksle, naviką turinčių pelių ksenovakcinavimai su sėklidžių arba plaučių ląstelėmis, taip pat, kaip ir šių ląstelių mišiniu sukėlė ženkliai naviko leukocitų infiltraciją, tuo tarpu, kai vakcinavimas su tirpiaisiais ksenogeniniais antigenais neturėjo tokio efekto. Aptiktos uždegiminės reakcijos susidėjo iš eozinofilų (netoli 20%), neutrofilų (40%), limfocitų (30%) ir makrofagų (10%). Ląstelėmis vakcinuotų pelių uždegiminės reakcijos skiriasi nuo kontrolinių pelių navikuose stebimų reakcijų naviko kraštuose esančia ryškia navikinio audinio eozinofilija. Yra parodyta, kad su naviku susijęs eozinofilinis infiltratas yra palankus prognostinis indikatorius storjo žarnyno karcinomos ir stemplės plokščiojo epitelio ląstelių ankstyvosios karcinomos atvejais (Fernandez-Acerno M.J., et al. Cancer 2000; 88: 1544-48; Ohashi Y., et al. Anticancer Res. 2000; 20: 3025-30). Nustatyta, kad aktyvuoti eozinofilai arba jų kultūrų supernatantai pajėgia žymiai slopinti žmogaus prostatos vėžio ląstelių augimą (Furbert-Harris P. et al. Prostate 2003; 57:165-175). Galimas eozinofilų vaidmuo ląstelinio ksenovakcinavimo sukeltam apsauginiam imuniniam atsakui gali egzistuoti mūsų eksperimentuose.

2 pavyzdys

Vakcinavimai su ksenogeninėmis audinių kilmės ląstelėmis sukelia imuninį reaktyvumą į naviko ląsteles.

Šis pavyzdys demonstruoja, kad imunizacija su ksenogeninėmis iš audinių kilusiomis ląstelėmis gali sukelti priešnavikinį T reaktyvumą, kurį akivaizdžiai rodo interleukino-2 (IL-2) gamyba. IL-2 yra gerai žinomas ilgalaikio adaptacinio imuniteto suformavimo mechanizmo mediatorius. Kaip pavaizduota 2 paveiksle, tirpūs ksenogeniniai (sėklidžių plius plaučių) antigenai negalėjo sukelti T ląstelių reaktyvumo LLC antigenams naviką turinčiose pelėse. Pasirodo, tam, kad tirpūs ksenogeniniai antigenai galėtų sukelti pastebimo efektyvumo imunines reakcijas yra reikalingi adjuvantai. Priešingai tirpiems antigenams, ir sėklidžių, ir plaučių ląstelės pajėgė sukelti pastebimą priešnavikinį reaktivumą ($p < 0,05$ lyginant su kontrole). Verta pažymėti, kad kombinuoti vakcinavimai su sėklidžių ir plaučių ląstelėmis buvo šiuo požiūriu daug efektyvesni, palyginus su vakcinavimais vien sėklidžių arba vien plaučių ląstelėmis.

3 pavyzdys

Vakcinavimai su ksenogeninėmis audinių kilmės ląstelėmis pailgina naviką turinčių pelių išgyvenimo trukmę.

Kaip galima matyti 3 paveiksle, LLC turinčių pelių, vakcinuotų ksenogenių sėklidžių ir plaučių ląstelių deriniu, išgyvenimo trukmės mediana buvo žymiai didesnė ($P < 0,05$), nei kontrolinių LLC turinčių pelių. Vakcinavimai vien sėklidžių arba vien plaučių ląstelėmis gana nežymiai pailgina LLC turinčių pelių išgyvenimo trukmę. Ksenogeniniai tirpūs antigenai šiuo požiūriu buvo neefektyvūs. Iš šių duomenų galima padaryti išvadas, kad 1) nesant imunoadjuvantų iš ksenogeninių audinių kilusios ląstelės, kaip vėžio vakcinos, yra daug efektyvesnės, nei tos pačios kilmės tirpūs ksenogeniniai antigenai; ir 2) priešnavikiniai klinikiniai atsakai gali būti labai sustiprinami derinant vakcinines ląsteles, ekspresuojančias bendruosius (pavyzdžiui, sėklidžių) ir fetalinius audiniui būdingus (pavyzdžiui, fatalinius plaučių) antigenus, kurie gali ekspresuoti navikinėse ląstelėse.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V. et. al. *Vaccine*. 2014; 32:4015-4024.
2. Fratta E., Coral S., Covre A. et. al. *Mol Oncol*. 2011; 5:164-82.
3. Khong H.T., Restifo N.P. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005.
4. de Gruijl T.D., van den Eertwegh A.J., Pinedo H.M., Scheper R.J. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57:1569-77.
5. Itoh K., Yamada A., Mine T., Noguchi M. *Jpn J Clin Oncol* 2009; 39: 73–80.
6. Parmiani G., Pilla L., Maccalli C., Russo V. *Cancer J*. 2011;17:331-336.
7. Andersen M.H., Sørensen R.B., Schrama D., et al. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1735–43.
8. Seledtsov V.I., Shishkov A.A., Seledtsova G.V. In: Ozdemir O, editor. *Current cancer treatment – novel beyond conventional approaches*. InTech. 2011; 415–428.
9. Overwijk W.W., Tsung A., Irvine K.R. et. al. *J Exp Med*. 1998;188 :277–286.
10. Weber L.W., Bowne W.B., Wolchok J.D. et al. *J Clin Invest*. 1998;102):1258–1264.
11. Galili U. *Immunol Today* 1993;14:480-482.
12. Platzter B., Stout M., Fiebiger E. *Front Immunol*. 2014; 5:140.
13. Rossi G.R., Unfer R.C., Seregina T., Link C.J. *Cancer Immunol Immunother*. 2005; 54: 999-1009.
14. Lim S.H., Zhang Y., Zhang J. *Am J Blood Res*. 2012; 2:29-35.
15. Zhong Z., Kusznierek K.P., Popov I.A. et.al., *J Transl Med*. 2006; 4:22.
16. Fernandez-Acerno M.J., et al. *Cancer* 2000; 88: 1544-48.
17. Ohashi Y., et al. *Anticancer Res*. 2000; 20: 3025-30.
18. Furbert-Harris P. et al. *Prostate* 2003; 57:165-175.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima ksenogenines sėklidžių ląsteles ir ksenogenines iš fetalinių audinių kilusias ląsteles ir yra skirta naudoti pacientams navikų gydymui arba prevencijai.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtos kompozicijos specifiškumas navikui yra apsprendžiamas ksenogeninių iš fetalinių audinių kilusių ląstelių komponento.
3. Kompozicija pagal 2 punktą, skirta naudoti plaučių naviko gydymui arba prevencijai, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji apima iš fetalinių plaučių audinio kilusias ląsteles.
4. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojamos intaktinės pilnos ląstelės.
5. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojamos fiksuotos pilnos ląstelės.
6. Kompozicija pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ląstelės yra fiksuotos glutaraldehidu.
7. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojami intaktiniai ląstelių lizatai.
8. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojami liofilizuoti ląstelių lizatai.
9. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtos ląstelės yra kilę iš žinduolio.
10. Kompozicija pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas žinduolis yra avis, kiaulė, katė arba pelė.
11. Kompozicija pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas žinduolis yra avis.

12. Kompozicijos pagal 1 punktą panaudojimas gamyboje medikamento, skirto pacientų navikų gydymui arba prevencijai.

13. Kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima ksenogenines sėklidžių ląsteles ir ksenogenines iš fetalinių audinių kilusias ląsteles.

14. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojamos intaktinės pilnos ląstelės.

15. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojamos fiksuotos pilnos ląstelės.

16. Kompozicija pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ląstelės yra fiksuotos glutaraldehidu.

17. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojami intaktiniai ląstelių lizatai.

18. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra naudojami liofilizuoti ląstelių lizatai.

19. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtos ląstelės yra kilę iš žinduolio.

20. Kompozicija pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas žinduolis yra avis, kiaulė, katė arba pelė.

21. Kompozicija pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas žinduolis yra avis.

22. Kompozicijos pagal 13 punktą panaudojimas gamyboje medikamento, skirto pacientų navikų gydymui arba prevencijai.

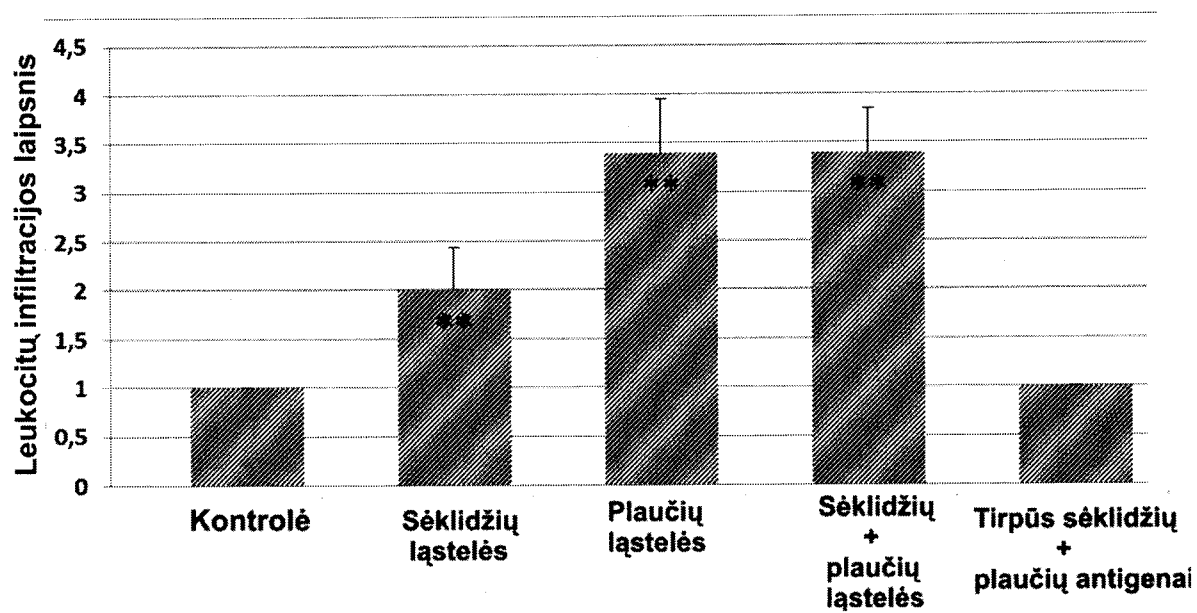


Fig. 1

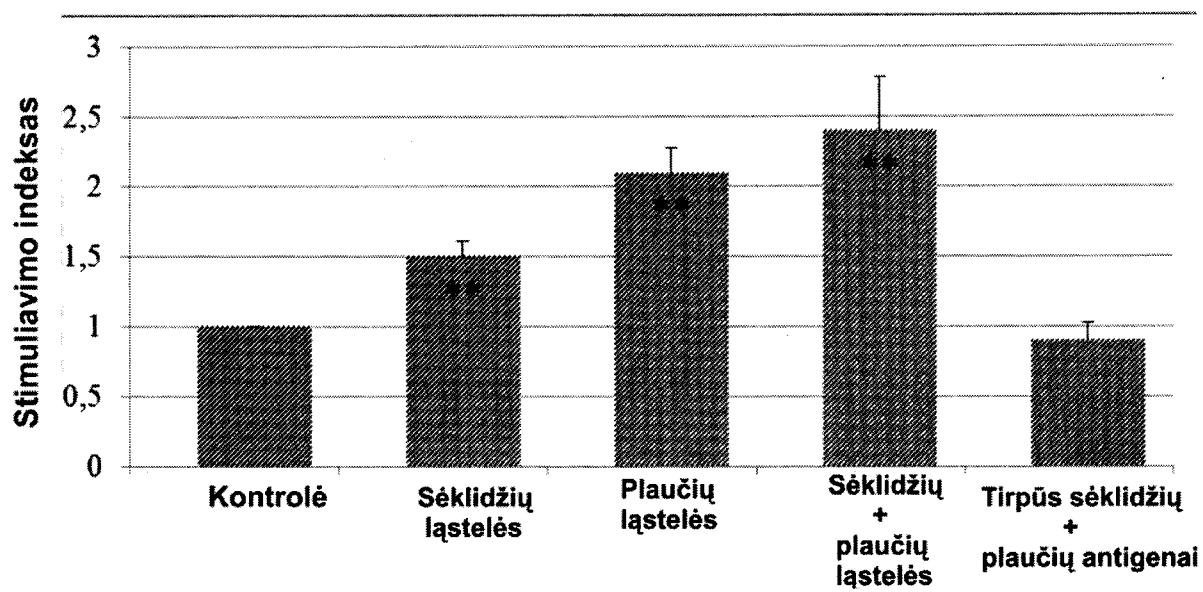


Fig. 2

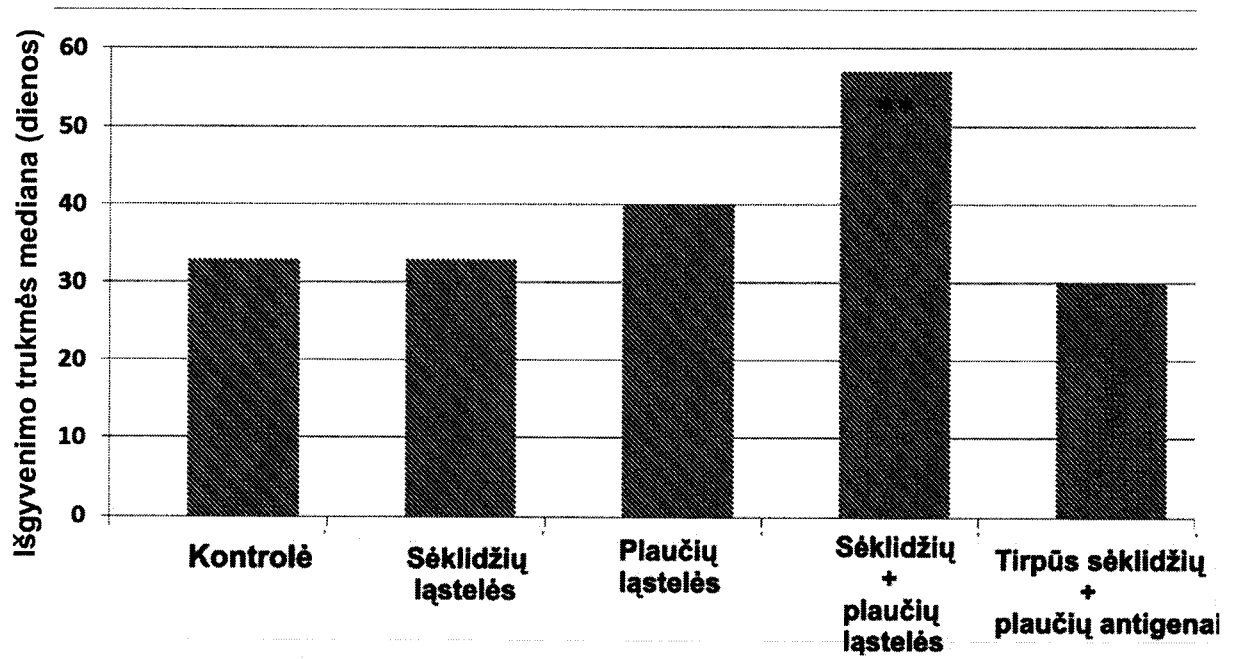


Fig. 3