

Группа изобретений относится к медицинским технологиям, а именно иммунотерапии онкологических больных, и может быть использована в медицине для терапии онкологических заболеваний и профилактики их рецидивов.

Ограниченные возможности лечения опухолевых заболеваний методами хирургии, химиотерапии и лучевой терапии делают актуальным поиск новых способов лечения онкологических больных. В частности, перспективным считается развитие методов иммунотерапии, принцип действия которой основывается на усилении противоопухолевой защиты, заложенной в иммунитете человека.

Одним из эффективных способов иммунотерапии считается вакцинация, эффективность которой зависит от силы иммунного ответа, вызванного опухолевыми антигенами, либо входящими в состав вакцины, либо требующихся на различных стадиях их производства (например, вакцины на основе антиидиотипических антител, дендритных клеток и т.д.). Таким образом, получение опухолевых антигенов является необходимым условием создания противоопухолевых вакцин.

Известны различные способы получения противоопухолевой вакцины.

Некоторые вакцины изготавливают на основе отдельных антигенов опухолевой клетки (далее ОК) - пептидов, белков теплового шока, полисахаридов и других веществ. В частности, известен способ получения пептидных опухолевых антигенов путем их синтеза. Так, вакцина, состоящая из синтезированного пептида длиной в 9 аминокислот показала хорошие результаты при клинических испытаниях на пациентах с миелоидной лейкемией (Williams R. "Harnessing the Immune System: The Promise and Potential of Cancer Vaccines", *Oncolog.*, 2005, v. 50, № 4). Другие пептиды показали неоднозначные результаты. К примеру, пептид из белка gp100 показавший хорошие предварительные результаты, не смог вызвать достаточного иммунного ответа, чтобы противостоять развитию опухоли у пациентов (Yu Z., Restifo N.P., "Cancer Vaccines: Progress Reveals New Complexities". *J. Clin. Invest.*, 2002, v. 110, 289-294).

Известен способ использования в качестве антигенов, вызывающих иммунный ответ, углеводных антигенов опухоли. Однако эффективность подобных антигенов была показана только при одиночных опухолевых клетках и ранних метастазах (Franco A. "CTL-Based cancer Preventive/Therapeutic Vaccines for Carcinomas: Role of Tumour-Associated Carbohydrate Antigens", *Scand. J. Immunol.*, 2005, v. 61, 391-397).

Следует отметить, что вакцины, основанные на определенных антигенах, имеют существенный недостаток. Помимо того что ОК характеризуются множественностью своих антигенов, повышенная их мутационность и постоянно действующий в организме механизм отбора клеток приводят к появлению новых и изменению уже существующих антигенов ОК. Таким образом, очевидно преимущество использования аутовакцин (вакцин на основе ОК самого пациента), которые содержат весь спектр антигенов, против которых вызывается иммунный ответ, в том числе индивидуальные и стадиоспецифические антигены, отличающие развитие опухолевого процесса у конкретного больного.

Известен способ получения антигенов опухоли на основе экзосом. Экзосомы - это нанометровые мембранные везикулы, секретируемые многими типами клеток, в том числе опухолевыми клетками (см., например, Wolfers J. et al. "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming". *Nat. Med.*, 2001, v. 7, 297-303), Т- и В-лимфоцитами ("B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles". *J. Exp. Med.*, 1996, v. 183, 1161-1172) и дендритными клетками (Zitvogel L. et al. "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes". *Nature Med.*, 1998, v. 4, 594-600).

Недостатком указанного способа является невысокий уровень обогащения экзосом поверхностными белками, являющимися потенциальными антигенами для иммунотерапии. Известно, что экзосомы содержат в основном цитозольные белки и белки эндосомальных компартментов (см., например, статью "Exosomes: composition, biogenesis and function", *Reviews Immunology*, 2002, v. 2, 569-579). Вторым известным недостатком способа является продолжительное время накопления экзосом, что требует нахождения ОК в ростовой среде и ведет к необходимости очищать полученные антигены от компонентов ростовой среды.

Известен способ получения противоопухолевой вакцины, который основан на введении в организм вместо антигенов опухоли кодирующей их ДНК. Антигенпредставляющие клетки поглощают ДНК, продуцируют опухолевый антиген и затем представляют его на клеточной поверхности в комплексе с главным комплексом гистосовместимости, уже способным активировать цитотоксические Т-лимфоциты. Так, хорошие результаты были получены на моделях животных, используя вакцины, основанные на вирусных векторах (см. более подробно, например, Yu Z., Restifo N.P. "Cancer Vaccines: Progress Reveals New Complexities". *J. Clin. Invest.*, 2002, v. 110, 289-294).

Недостатком указанного способа является вызываемая реакция иммунной системы на сами вирусные векторы, что приводит к отсутствию явно положительных результатов противоопухолевой вакцинации на людях.

Известен способ получения противоопухолевой вакцины, который предполагает использование в качестве антигенов целых опухолевых клеток, как от самого пациента (аутовакцины), так и от других пациентов (алловакцины). Клетки предварительно инактивируют ионизирующим излучением. Преимуществом данных вакцин является отсутствие необходимости идентификации и выделения конкретных антигенов. Так, клетки, смешанные с БСЖ в качестве адъюванта, были использованы против колорек-

тального рака, меланомы и карциномы почки (см. Armstrong A.C., Eaton D., Ewing J.C. "Cellular Immunotherapy for Cancer", Brit. Med. J., 2001, v. 3323, 1289-1293).

Недостатками указанного способа являются необходимость инактивации опухолевых клеток и плохая пригодность антигенов, расположенных на поверхности целых опухолевых клеток, для фагоцитирования и процессинга антигенпредставляющими клетками.

Из патента США US 6039941 (МПК C12N 15/09, A61K 31/00, опубл. 21.03.2000) известен способ получения противоопухолевой вакцины из ОК с повышенной иммуногенностью, полученной путем введения генно-инженерным способом генов, кодирующих поверхностные белки с иммуностимулирующей активностью.

Недостатками указанного способа являются, во-первых, необходимость инактивации опухолевых клеток, во-вторых, антигены на поверхности опухолевых клеток плохо пригодны для фагоцитирования и процессинга антигенпредставляющими клетками.

Из международной заявки WO 02053176 (МПК A61K 39/00; C12N 5/06; A61K 39/00; C12N 5/06 опубл. 11.07.2002) известен способ получения противоопухолевой вакцины на основе лизатов культивированных ОК. Преимуществом этих вакцин является то, что они не требуют инактивации облучением, а дезагрегированные антигены клеток более пригодны, нежели интактные ОК, для фагоцитирования и процессинга антигенпредставляющими клетками, что может приводить к более выраженному иммунному ответу.

Недостатком указанного способа является то, что основную массу лизата ОК составляют внутриклеточные белки, и вызываемый на них иммунный ответ не обладает противоопухолевой активностью, так как внутриклеточные белки опухолевых клеток недоступны для иммунной системы.

Наиболее близким аналогом заявленного способа является способ получения противоопухолевой вакцины, раскрытый в патенте США US 5993829 (МПК A61P 35/00, C07K 14/47, опубл. 30.11.1999). Аналогичные способы, включающие культивирование опухолевых клеток с выделением их поверхностных антигенов, также описаны в патентах US 6338853 (МПК A61P 35/00, C07K 14/47, опубл. 15.01.2002), US 5030621 (опубл. 09.07.1991), US 5635188 (опубл. 03.06.1997).

Известный способ предусматривает культивирование опухолевых клеток в бессывороточной ростовой среде и выделение из ростовой среды клеточных поверхностных антигенов, которые опухолевые клетки теряют в процессе своего культивирования. После очистки собранные антигены используют в качестве антигенов противоопухолевой вакцины. Преимуществом подобных вакцин является высокое содержание опухолевых антигенов с поверхности клеток, которые являются доступными (не спрятаны внутри клетки) для действия иммунной системы. Недостатками известного способа являются

низкая продуктивность получения антигенов ввиду спонтанной, без каких либо воздействий, потери их культивируемыми ОК;

получение материала с низким содержанием целевого продукта (антигенов) и большим количеством примесей, вследствие того, что процесс накопления антигенов предусматривает многочасовую инкубацию ОК в ростовой среде (например, инкубация в течение 3 ч в среде RPMI-1640 описана в патенте US 6338853), что подразумевает попадание антигенов в ростовую среду, содержащую более 40 компонентов (аминокислоты, соли, буфер, витамины, глюкоза и т.д.), а также продукты метаболизма и другие вещества, выделяемые ОК в процессе культивирования;

анализ состава получаемой смеси антигенов требует предварительной очистки препарата от компонентов ростовой среды и продуктов жизнедеятельности клеток;

получение необходимой для вакцинации дозы антигенов подразумевает размножение ОК продолжительным культивированием, что ведет к искажению состава получаемой антигенной смеси и снижению эффективности вакцинации;

достаточное для вакцинации количество антигенов по известному способу может быть получено только в процессе культивирования опухолевых клеток, т.е. получение антигенов из изолированных (без культивирования) клеток по данному способу невозможно;

высокая стоимость вакцины, которая определяется длительностью культивирования ОК и наличием стадии очистки поверхностных опухолевых антигенов.

Известны также различные противоопухолевые вакцины на основе смеси отдельных антигенов, антигенов и различных иммуностимулирующих веществ.

Из международной заявки WO 2004012685 (МПК A61K 39/00, опубл. 12.02.2004) известна противоопухолевая вакцина на основе поверхностных опухолевых антигенов теряемых клеткой в процессе культивирования. Изготовление известной вакцины подразумевает возможность ускорения процесса выделения клетками антигенов в ростовую среду различными воздействиями, что может несколько повысить эффективность создания вакцины. Однако данной вакцине также присущи недостатки вакцин, получаемые при культивировании ОК в бессывороточной ростовой среде.

Наиболее близким аналогом заявленной противоопухолевой вакцины является вакцина на основе поверхностных опухолевых антигенов, раскрытая в патенте США US 5993829 (МПК A61P 35/00, C07K 14/47, опубл. 30.11.1999). Аналогичные вакцины также описаны в патентах US 6338853 (МПК A61P 35/00, C07K 14/47, опубл. 15.01.2002), US 5030621 (опубл. 09.07.1991), US 5635188 (опубл. 3.06.1997).

Основным недостатком известной вакцины является ее высокая стоимость, которая определяется длительностью культивирования ОК и наличием стадии очистки антигенов, как уже было указано выше.

Известны также различные способы проведения противоопухолевой иммунотерапии.

Известны способы проведения противоопухолевой иммунотерапии моновалентными вакцинами, включающие введение в организм определенных опухолевых антигенов. К ним, например, относятся вакцины на основе синтетических пептидов, белков теплового шока, полисахаридов и других веществ. Указанные способы раскрыты, в частности, в патентах WO 2005083074 (МПК А61К 31/7088; А61Р 35/00; С07К 7/06, опубл. 09.09.2005) и RU 2271831 (А61К 39/385; А61К 39/39; А61К 51/00, опубл. 20.03.2006).

Недостатком указанных способов иммунотерапии является слабая специфичность получаемого противоопухолевого иммунитета ввиду того, что определенные антигены не являются специфичными для опухоли конкретного больного, так как были выявлены статистически в опухолях определенного вида.

Известен способ проведения противоопухолевой терапии, включающий введение в организм целых инактивированных опухолевых клеток, а также целых опухолевых клеток с повышенной иммуногенностью (см., например, патент US 6039941, МПК C12N 15/09, А61К 31/00, опубл. 21.03.2000).

Недостатком указанного способа иммунотерапии является слабая специфичность получаемого противоопухолевого иммунного ответа ввиду того, что антигены на поверхности целых опухолевых клеток мало пригодны для фагоцитирования и последующего процессинга антигенпредставляющими клетками. Также данный способ подразумевает размножение клеток *in vitro* для достижения необходимой для вакцинации дозы антигена, что ведет к изменению антигенного состава опухолевых клеток и снижению эффективности иммунотерапии.

Из международной заявки WO 02053176 (МПК А61К 39/00; C12N 5/06; А61К 39/00; C12N 5/06, опубл. 11.07.2002) известен способ проведения противоопухолевой иммунотерапии, включающий введение в организм клеточных лизатов опухолевых клеток.

Недостатком указанного способа вакцинации является слабая специфичность получаемого противоопухолевого иммунитета. В данном случае вакцина помимо поверхностных антигенов опухоли, отвечающих за специфичность иммунного ответа, содержит внутриклеточные белки, составляющие основную часть лизата. Таким образом, происходит иммунизация к массе балластных белков и "размывание" опухолеспецифичности иммунного ответа. Также данный способ подразумевает размножение клеток *in vitro* для достижения необходимой для вакцинации дозы антигена, что ведет к изменению антигенного состава опухолевых клеток и, как следствие, снижению эффективности иммунотерапии.

Известны способы на основе комбинации отдельных опухолевых антигенов, а также антигенов и различного рода иммуностимуляторов.

Наиболее близким аналогом заявленного способа проведения противоопухолевой иммунотерапии является способ, раскрытый в патенте США US 5993829 (МПК А61Р 35/00, С07К 14/47, опубл. 30.11.1999). Аналогичные способы также описаны в патентах US 6338853 (МПК А61Р 35/00, С07К 14/47, опубл. 15.01.2002), US 5030621 (опубл. 09.07.1991), US 5635188 (опубл. 03.06.1997), WO 2004012685 (МПК А61К 39/00, опубл. 12.02.2004). Способ включает введение в организм пациента вакцины, полученной из смеси антигенов, представляющих собой фрагменты поверхностных белков опухолевых клеток спонтанно потерянных клеткой в процессе культивирования в бессывороточной ростовой среде.

К недостатком известного способа можно отнести слабую специфичность получаемого противоопухолевого иммунитета. Данный способ подразумевает использование продолжительно культивируемых ОК, что приводит к изменению их антигенного состава и снижению эффективности вакцины. Вторым недостатком - это относительно высокая стоимость способа, определяемая временем культивирования клеток и необходимостью очистки получаемых антигенов от компонентов ростовой среды.

Технический результат, достигаемый при использовании патентуемой группы изобретений, заключается в повышении эффективности лечения онкологических заболеваний за счет усиления противоопухолевого иммунного ответа.

Данный технический результат обеспечивается при использовании противоопухолевой вакцины на основе поверхностных опухолевых антигенов. Согласно настоящему изобретению вакцина содержит смесь поверхностных опухолевых антигенов, представляющих собой аккумулялированные пептиды из поверхностных белков живых опухолевых клеток, полученных периодическим и витальным для клеток воздействием протеазы на первичную культуру живых опухолевых клеток.

В предпочтительном варианте реализации изобретения противоопухолевая вакцина может быть получена при воздействии трипсина, выбранного в качестве протеазы.

Указанный технический результат достигается также при реализации способа получения противоопухолевой вакцины, включающего культивирование опухолевых клеток с выделением поверхностных опухолевых антигенов. Согласно настоящему изобретению предварительно отмытую от ростовой среды первичную культуру живых опухолевых клеток подвергают витальному для клеток воздействию протеазы, отбирают высвободившиеся поверхностные опухолевые антигены, при этом обработку первичной культуры живых опухолевых клеток протеазой повторяют с интервалами, необходимыми для восстановления клетками поверхностных опухолевых антигенов, аккумулялируют поверхностные опухолевые анти-

гены до достижения их дозы, необходимой для вакцинации, контролируют состав полученных поверхностных опухолевых антигенов.

В предпочтительном варианте реализации изобретения в качестве протеазы используют трипсин.

Указанный технический результат достигается также при реализации способа проведения противоопухолевой иммунотерапии, включающего введение в организм пациента вакцины, полученной из смеси поверхностных опухолевых антигенов, представляющих собой пептиды, полученные из поверхностных белков опухолевых клеток. Согласно настоящему изобретению используют смесь поверхностных опухолевых антигенов, представляющих собой аккумулялированные пептиды из поверхностных белков живых опухолевых клеток, полученных периодически и витальным для клеток воздействием протеазы на первичную культуру живых опухолевых клеток.

В предпочтительном варианте реализации способа в качестве протеазы используют трипсин.

Для получения более специфичного иммунного ответа используют поверхностные опухолевые антигены опухолевых клеток самого пациента.

В других вариантах реализации изобретения используют поверхностные опухолевые антигены опухолевых клеток другого пациента.

В предпочтительном варианте реализации способа в составе противоопухолевой вакцины используют адьюванты.

Далее группа изобретений поясняется конкретными примерами реализации и прилагаемыми фигурами, на которых изображено следующее.

На фиг. 1 - схема осуществления способа получения противоопухолевой вакцины.

На фиг. 2 - масс-спектр поверхностных антигенов, полученных согласно второму варианту реализации изобретения с первичной культуры опухолевых клеток (А); масс-спектр поверхностных антигенов полученных с той же культуры клеток после полной репарации поверхностных антигенов и повторной их обработки протеазой (Б); масс-спектр поверхностных антигенов, полученных с той же культуры клеток после частичной репарации поверхностных антигенов после предшествующей обработки их протеазой (В).

На фиг. 3 - масс-спектры фрагментации поверхностных антигенов, полученных согласно данному изобретению.

На фиг. 3А, 3Б - спектры CID фрагментации углеводной части антигенов.

На фиг. 3В, 3Г - спектры CID фрагментации пептидной последовательности антигенов с определением b/y ионов.

На фиг. 4 - кривая выживаемости мышей с привитой опухолью H22 и вакцинированных пептидной смесью.

На фиг. 1 приведена общая схема способа получения противоопухолевой вакцины.

Ниже представлен первый пример реализации способа получения противоопухолевой вакцины против привитой мышам гепатомы человека H22. Для получения вакцины используется та же культура клеток H22.

1. Ростовую среду удаляют из флакона с культурой клеток H22 и трижды промывают монослой клеток стерильным физиологическим раствором, используя объем, равный половине ростовой среды. Промывку осуществляют не менее 3 раз до удаления остатков ростовой среды.

Следующим и ключевым этапом является обработка витальной для клеток концентрацией протеазы, в качестве которой выбирают трипсин (активность ~3000 ед./мг).

2. Добавляют к монослою клеток 0,0001% раствор трипсина, используя 1 мл раствора на 25 см² поверхности культурального флакона.

3. Инкубируют флакон при 37°C. Между 5 и 7 мин инкубации отбирают из флакона раствор трипсина, содержащий отщепленные от клеток поверхностные антигены.

4. К клеткам добавляют свежеприготовленную ростовую среду, содержащую сыворотку (обычно 10%), и продолжают их культивирование.

5. Для наработки массы антигенов с интервалом в сутки повторяют пп.2-4.

6. Для оценки пригодности нарабатываемых антигенов проводят их масс-спектрометрический анализ.

7. Нарботанные антигены используют для создания вакцины.

Масс-спектрометрический анализ проводят следующим образом. 140 мкл раствора антигенов смешивают со 140 мкл этанола, 720 мкл бутанола и добавляют 15 мкл сефарозы CL4В. Инкубируют при медленном перемешивании 45 мин. После инкубации сефарозу дважды промывают раствором с тем же содержанием спирта и бутанола и инкубируют 30 мин в 50% растворе этанола. Раствор этанола отбирают от сефарозы и высушивают на роторном испарителе. Полученный осадок растворяют в 10 мкл воды и анализируют времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрией. 2 мкл анализируемого раствора смешивают на масс-спектрометрической мишени в соотношении 1:1 с насыщенным раствором 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, содержащей 50% ацетонитрила и 0,5% трифторуксусной кислоты. Полученные на мишени капли проб высушивают на воздухе и проводят масс-спектрометрический анализ в диапазоне масс пептидов от 600 до 4000 Да.

Известно, что большинство опухолевых антигенов, представляющих интерес для получения вакцины, находятся на поверхности опухолевых клеток (см., например, обзор "Antitumor vaccination: where we stand", *Hematologica*, 2000, v. 85, 1172-1206). Обработка первичной культуры клеток витальным воздействием трипсина приводит к отщеплению фрагментов белков с поверхности клеток (см. Lokhov P.G., Archakov A.L., "Proteomic footprinting: a method for cells profiling by direct mass-spectrometry", тезисы HUPО 5th Annual World Congress, 2006, abstract №1201). Таким образом, согласно данному изобретению действие трипсина, как и других протеаз, приводит к высвобождению в раствор фрагментов поверхностных белков опухоли. Высвободившиеся под воздействием трипсина поверхностные опухолевые антигены (фрагменты поверхностных белков), к которым в основном и относятся пригодные для противоопухолевой иммунотерапии антигены, используют для вакцинации онкологических больных.

Следует отметить, что забор раствора трипсина, содержащего отщепленные от клеток пептиды, желательно осуществлять до момента открепления клеток от дна культурального флакона, что позволит предотвратить попадание клеток в пробу и избежать дополнительной стадии очистки пробы.

Условия обработки протеазой клеток определяют экспериментально для каждого типа опухолевых клеток и активности используемой протеазы и могут существенно варьировать от 0,0001 до 0,05% для концентрации протеазы и от 30 с до 10 мин для времени обработки клеток. В случае использования трипсина с другой активностью концентрацию его меняют прямо пропорционально увеличению или уменьшению активности.

Клетки при обработке витальными концентрациями протеазы не погибают, что дает возможность повторять процесс обработки первичной культуры клеток трипсином. Для получения необходимой для вакцинации дозы поверхностных опухолевых антигенов процесс обработки первичной культуры живых опухолевых клеток трипсином повторяют многократно с интервалами до суток. При этом в интервалах между воздействием трипсином клетки инкубируют согласно протоколу культивирования данных клеток (т.е. при 37°C в CO₂-инкубаторе, в ростовой среде с сывороткой и необходимыми добавками).

Аккумулированные поверхностные опухолевые антигены обрабатывают в соответствии с технологией получения конкретной вакцины, а именно их могут очищать, концентрировать, анализировать на предмет состава, а также модифицировать или смешивать с адьювантами для увеличения иммуногенности.

В других вариантах реализации изобретения процесс обработки клеток протеазой может быть сопряжен с процессом пассирования клеток.

Раствор трипсина можно готовить как на стерильном физиологическом растворе, так и на любом подходящем для этого солевом растворе.

Вместо трипсина могут быть использованы другие протеазы, например химотрипсин и т.д.

В случае использования суспензии опухолевых клеток необходимо перед забором антигенов клетки осадить на дно, например центрифугированием, или использовать любой другой подходящий способ.

Указанный анализ состава антигенов, полученных согласно первому варианту реализации изобретения, проводят по протоколу масс-спектрометрии гликозилированных пептидов (M. Tajiri et al. "Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment". *Glycobiology*, 2005, v. 15, 1332-1340). Это объясняется, с одной стороны, тем, что внеклеточные фрагменты белков, как правило, гликозилированы, с другой стороны, именно гликозилированные пептиды являются наиболее иммуногенными и представляют интерес в качестве антигенов вакцины (см., например, Franco A. "CTL-Based cancer Preventive/Therapeutic Vaccines for Carcinomas: Role of Tumour-Associated Carbohydrate Antigens". *Scand. J. Immunol.*, 2005, v. 61, 391-397).

Обессоливание и концентрирование гликозилированных пептидов для масс-спектрометрического анализа можно осуществлять любым подходящим для этого способом, в частности жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

В других вариантах реализации опухолевые клетки могут быть получены из биологических жидкостей, таких как кровь, моча, ликвор, лимфа, асцитная и плевральная жидкости.

Патентуемый способ получения противоопухолевой вакцины может применяться к любым типам культур опухолевых клеток, в частности прикрепленным, суспензионным, культивированным в матриксе и на подложках, ко всем вариантам совместного культивирования (сокультивирования) клеток, органо-типным культурам и клеточным агрегатам (гранулы, сфероиды), а также к свежевыделенным опухолевым клеткам и фрагментам опухолевой ткани.

Далее изобретение поясняется вторым примером противоопухолевой вакцины и способа ее получения с использованием прикрепленной первичной культуры опухолевых клеток рака толстого кишечника человека.

1. Фрагмент ткани опухоли толстого кишечника, полученный в результате хирургического удаления опухоли, переносят в стерильную пробирку со средой RPMI 1640, содержащую антибиотики, и транспортируют в лабораторию.

2. Переносят ткань опухоли в стерильных условиях в чашку Петри и механически удаляют участки некроза, сгустки крови, а также остатки жировой и соединительной ткани.

3. Осторожно ножницами размельчают ткань опухоли на маленькие фрагменты.

4. Диссоциируют фрагменты опухолевой ткани до мелких клеточных агрегатов энергичным пипетированием в 10 мл фосфатного буфера силана.

5. Дают оставшимся крупным фрагментам ткани осесть на дно пробирки.

6. Осторожно забирают пипеткой клеточные агрегаты, оставшиеся плавать в растворе, и переносят в новую пробирку.

7. Центрифугируют пробирку при 400 g в течение 5 мин и удаляют супернатант. Осадок, содержащий клеточные агрегаты, ресуспендируют в ростовой среде RPMI 1640 со следующими добавками: 20 мкг/мл инсулина, 10 мкг/мл трансферина, 50 нМ гидрокортизона, 1 нг/мл эпидермального ростового фактора, 10 мкМ этаноламина, 10 мкМ фосфотаноламина, 100 пМ трийодтиронина, 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 2 мМ глутамина и 0,5 мМ пирувата натрия, 5% фетальной бычьей сыворотки и затем переносят в 25 см флакон для дальнейшего культивирования клеток.

8. Культивируют при 37°C и 5% CO₂.

9. Для изоляции опухолевых клеток от стромальных клеток культуральный флакон несколько секунд прижимают к вибрационной мешалке. Опухолевые клетки ввиду плохих адгезивных способностей открепляются и переходят в ростовую среду.

10. Забирают пипеткой среду, содержащую плавающие в ней опухолевые клетки, и переносят в новый культуральный флакон для дальнейшего культивирования при 37°C и 5% CO₂.

11. При достижении опухолевыми клетками 80% конfluenceности удаляют из флакона ростовую среду и трижды промывают клетки 0,9% раствором хлорида натрия или фосфатным буфером силана, используя объем, равный не менее половины объема заливаемой в культуральный флакон ростовой среды. В результате промывки с клеток должны быть удалены следы сыворотки, содержащейся в ростовой среде.

12. Добавляют к клеткам 0,0001% раствор трипсина (активность ~3000 ед./мг), используя 1 мл раствора на 25 см² поверхности культурального флакона.

13. Инкубируют флакон при 37°C. Между 5 и 7 мин инкубации отбирают из флакона раствор, содержащий отщепленные от клеток поверхностные антигены. Опухолевые клетки в момент отбора раствора должны быть прикреплены ко дну культурального флакона. Если под воздействием трипсина часть клеток открепилась и стала свободно плавать, то раствор применяют при 400 g в течение 5 мин и используют супернатант, свободный от примеси клеток.

14. Для инактивации остатков трипсина в культуральном флаконе необходимо добавить во флакон свежеприготовленную культуральную среду, содержащую фетальную бычью сыворотку и продолжить культивирование клеток при 37°C и 5% CO₂.

15. Раствор, полученный в п.13, концентрируют на вакуумном концентраторе при 45°C. Предварительно раствор можно обессолить любым подходящим для этого способом, например обратно-фазовой хроматографией, гель-фильтрацией и т.д. Для удаления остатков трипсина также можно раствор предварительно отфильтровать через фильтр, пропускающий пептиды массой менее 4 кДа.

16. Пп.11-15 повторяют с интервалом в одни сутки для наработки необходимого для вакцинации количества антигенов. Пригодность нарабатываемых антигенов для вакцинации оценивают масс-спектрометрически.

Количество обработок клеток протеазой и длительность интервалов между ними контролируют анализом состава получаемой антигенной смеси. Если антигенный состав начинает меняться, и увеличение времени между обработкой клеток протеазой не позволяет получить изначальный, соответствующей свежeweделенным опухолевым клеткам, антигенный состав, то клетки считают непригодными для получения вакцины.

Контроль состава получаемой антигенной смеси осуществляют масс-спектрометрически, как описано выше для первого примера реализации способа.

Для выделения клеток из опухолевой ткани используют любой пригодный для этого способ. В случае использования протеазы для диссоциации ткани опухоли, с целью высвобождения опухолевых клеток, необходимо проводить масс-спектрометрический анализ поверхностных антигенов не раньше чем через сутки после инициации первичной опухолевой культуры.

Поверхностные опухолевые антигены, получаемые согласно данному изобретению, должны быть специфичны для опухоли донора клеток. Однако культивирование клеток существенно искажает фенотип первичной культуры по причине невозможности искусственного воссоздания *in vitro* условий, при которых росли опухолевые клетки в организме донора. Таким образом, состав получаемых антигенов подлежит обязательному контролю. Ниже представлен пример оценки качества антигенов, получаемых согласно второму варианту реализации изобретения.

Согласно полученным данным при повторном (контрольном) масс-спектрометрическом анализе антигенной смеси воспроизводится не менее 95 мас.% гликозилированных пептидов, что можно считать критерием идентичности двух сравниваемых антигенных смесей. Предлагается оценивать пригодность антигенов, нарабатываемых для вакцинации согласно данному изобретению по наличию не менее 90 мас.% гликозилированных пептидов общих со свежeweделенными опухолевыми клетками.

Из имеющихся экспериментальных данных известно, что культивирование клеток опухоли прямой кишки позволяет получать пригодные для вакцинации антигены только при использовании 1-го, изредка 2-го пассажа клеток, при условии проведения пассирования через 3-4 дня. При этом не исключается, что добавление в ростовую среду тех или иных ингредиентов, сохраняющих фенотип клеток, может увеличить количество пассажей, пригодных для получения антигенов вакцины.

В случае, если не удалось выделить из ткани опухоли достаточного количества клеток, необходимо их размножить культивированием до нужного количества, при этом обязательным является контроль изменчивости поверхностных антигенов в процессе культивирования клеток. Контроль антигенного состава в процессе культивирования проводят согласно данному изобретению, но без наработки их количества. Например, обработка витальными концентрациями трипсина и масс-спектрометрический анализ проводятся 1-2 раза в неделю в процессе культивирования клеток.

Идентичность антигенов опухоли и антигенов вакцины обеспечивает специфичность вызываемого вакциной иммунного ответа против опухоли. Сравнение масс-спектров антигенов исходной опухоли и нарабатываемых согласно данному изобретению антигенов позволяет контролировать подобную идентичность. На фиг. 2А представлен масс-спектр поверхностных антигенов исходной опухолевой культуры. На фиг. 2Б представлен масс-спектр пригодных для вакцинации и полученных согласно данному изобретению антигенов (спектры на фиг. 2А и 2Б идентичны). На фиг. 2В представлен масс-спектр антигенов, также полученных согласно данному изобретению, но не пригодных для вакцинации (спектры фиг. 2А и 2В существенно отличаются). Стрелками указаны массы, соответствующие исчезнувшим (на фиг. 2Б) и вновь появившимся (на фиг. 2В) антигенам. Таким образом, контролируя состав пептидов, можно нарабатывать необходимое для вакцинации количество антигенов, вызывающих специфичный иммунный противоопухолевый ответ.

Для подтверждения (не требуется для реализации изобретения) происхождения антигенов из поверхностных белков опухолевых клеток были получены спектры их фрагментации, примеры которых представлены на фиг. 3.

Для этого пробы, полученные в процессе инкубации клеток с трипсином, обессоливали, применяя наконечники для автоматических пипеток с обращенной фазой ZipTip_{C18} (Millipore Corp., США), в соответствии с протоколом производителя, и наносили на масс-спектрометрическую мишень с матрицей, как описано выше. Масс-спектры снимали в режиме фрагментации ионов. Идентификация белков осуществляли поисковой системой Mascot (MatrixScience, США) по таксону Homo sapiens базы белковых последовательностей NCBI (США) с использованием масс b и y ионов (sequence-tag метод) и/или установленным аминокислотным последовательностям (de novo метод).

На фиг. 3А и 3Б показаны примеры развалов углеводных частей гликозилированных пептидов с массами 1640 и 1480 Да с отщеплением фрагментов 162, 203, 291 Да, что соответствует гексозам (манноза, глюкоза или галактоза), ацетилглюкозамину и сиаловой кислоте соответственно. Фрагментация аминокислотной последовательности пептидов позволила по массам фрагментов идентифицировать в антигенной смеси пептиды из переменного и константного доменов тяжелой цепи иммуноглобулина (которые имеют большинство CD антигенов, комплексы гистосовместимости, Т-клеточный рецептор и молекулы адгезии клеток), рецептора липопротеидов низкой плотности, рецептора интерлейкина 1R-2, G-протеинсвязанного рецептора, главного комплекса гистосовместимости I и II. На фиг. 3В представлен пример фрагментов развала с указанием b-y ионов для двухзарядного пептида массой 857,4 Да с установленной аминокислотной последовательностью, соответствующей фрагменту G-протеинсвязанного рецептора

Ile Cys Cys Ala Cys Cys Leu Cys Arg Asn Asn Cys Cys Val Phe Arg
1 5 10 15

На фиг. 3Г представлен другой пример фрагментов развала однозарядного пептида массой 573,3 Да с указанием b-y ионов и с установленной аминокислотной последовательностью, соответствующей фрагменту главного комплекса гистосовместимости типа II:

Ala Val Leu Asn Arg
1 5

Таким образом, получаемые согласно изобретению антигены характеризуется тем, что:

1) состоят из водорастворимых, преимущественно гликозилированных, протеолитических (последовательность которых оканчивается на лизин или аргинин, в случае использования трипсина в качестве протеазы) пептидов массой от 1,2 до 4 кДа,

2) происходят из единого источника - экстрацеллюлярных (внеклеточных) фрагментов белков внешней плазматической мембраны опухолевых клеток,

3) получают путем воздействия на клетки протеазой в витальной для них концентрации.

Практическое применение смеси опухолевых антигенов, получаемой согласно данному изобретению, обусловлено идентичностью аминокислотных последовательностей и модификаций (гликозилиро-

вания) входящих в смесь пептидов с фрагментами белков, представленных на поверхности опухолевых клеток. Известно, что возникновение опухолевого заболевания является следствием неспособности иммунной системы уничтожать образующиеся в организме опухолевые клетки. Накопленные и очищенные антигены, смешанные с усиливающим иммунный ответ адьювантом, вводят в организм человека или животного. В результате клеточного и гуморального иммунного ответа организма на уничтожение введенных пептидов перекрестно уничтожаются имеющиеся и/или вновь возникающие в организме опухолевые клетки, что и определяет лечебный и профилактический эффект противоопухолевой вакцинации. Для получения полноценного иммунного ответа применяют повторные инъекции антигенов.

Для подтверждения противоопухолевой активности вакцины, полученной согласно данному изобретению, был поставлен модельный эксперимент на подопытных мышах, 20 самцах породы BALB/c примерно одного возраста и веса (10 животных в экспериментальной и 10 в контрольной группах).

Опухолевые антигены были получены способом согласно первому варианту реализации изобретения с культуры опухолевых клеток гепатомы H22. Полученные антигены были обессолены гель-фильтрацией на сефадексе G-10 и сконцентрированы на вакуумном концентраторе SpeedVac.

Инъекцию антигенов в количестве 150 мкг вводили подкожно, предварительно смешав в соотношении 1:1 (об./об.) с полным адьювантом Фрейнда. Повторные иммунизации проводили в течение 3 недель (по одной инъекции в неделю) с применением неполного адьюванта Фрейнда. Животным контрольной группы вводили в эквивалентном объеме и по той же схеме, как и в экспериментальной группе, смешанный с физиологическим раствором адьювант Фрейнда. После четвертой иммунизации мышам была привита опухоль подкожным введением 1 млн опухолевых клеток гепатомы H22. В течение трех месяцев отслеживали выживаемость животных в экспериментальной и контрольной группах. Полученная кривая выживаемости (см. фиг. 4) подтвердила наличие противоопухолевой активности антигенов, полученных согласно данному изобретению.

Следует отметить, что результаты модельного эксперимента не ограничивают успешное применение изобретения животными, ввиду идентичности механизма противоопухолевого иммунитета у животных и человека. Способ введения антигена и его доза в пересчете на 1 кг веса сохраняют силу в случае иммунотерапии опухоли у человека, однако схема лечения может быть индивидуальна для каждого больного ввиду тяжести протекания заболевания, стадии опухолевого заболевания, изменчивости опухолевых клеток, способности организма к выраженному иммунному ответу на введенный антиген и т.д.

Ниже приведен пример противоопухолевой вакцины и способа проведения противоопухолевой иммунотерапии на основе поверхностных опухолевых антигенов, изготовленной согласно второму варианту реализации изобретения, для проведения противоопухолевой иммунотерапии человека.

Вакцина состоит из 1 мг смеси опухолевых антигенов, полученных согласно второму варианту реализации изобретения, растворенных в 0,5 мл фосфатного буфера силана, смешанных с 1 мл адьюванта Монтанид ISA-51 (адьювант фирмы Syntex на основе водно-масляной эмульсии, содержащий сквален, Плуонорик L121, Твин 80).

Вакцину по одной дозе вводят пациенту подкожно в течение трех недель еженедельно и пяти месяцев ежемесячно.

Эффективность вакцинации оценивается по возникшей напряженности иммунитета в отношении вводимых опухолевых антигенов. На 2-3-й день после инъекции оценивают реакцию гиперчувствительности к введенным антигенам по размеру покраснения, возникшего в месте их введения. При этом за базовое значение берется размер покраснения после первой инъекции. Очевидное усиление реакции гиперчувствительности при повторных вакцинациях укажет на возникший противоопухолевый иммунный ответ.

В других вариантах реализации способа проведения противоопухолевой иммунотерапии возможно внутривенное или внутримышечное введение вакцины, а также введение вакцины без адьювантов.

Получение иммунного ответа при использовании заявленного изобретения обеспечивается за счет использования смеси опухолевых антигенов. Множественность пептидов, присутствующих в вакцине, обеспечивает возможность получения иммунного ответа ко всем клеткам, которые имеют на поверхности белки с теми же аминокислотными последовательностями.

Таким образом, настоящее изобретение позволяет многократно увеличить эффективность противоопухолевой иммунотерапии по сравнению с известными способами, в которых применяются моновалентные вакцины.

При использовании настоящей группы изобретений обеспечивается возможность проведения противоопухолевой иммунотерапии с использованием вакцины, обогащенной специфичными для опухоли антигенами, являющимися поверхностными антигенами опухолевых клеток.

Данная возможность создается за счет обработки опухолевых клеток протеазой в витальной для клеток концентрации. Использование витальных концентраций протеазы позволяет отделять только поверхностные антигены опухолевых клеток и избегать гибели клеток, влекущей за собой разрушение их плазматических мембран, что ведет к попаданию в вакцину содержимого цитоплазмы, в частности не представляющих интереса для вакцинации массы внутриклеточных белков. Данный факт приводит к снижению доли специфичных для опухоли антигенов в известных вакцинах, "размыванию" иммунного

ответа и, как следствие, к снижению его специфичности в отношении именно опухолевых антигенов.

Таким образом, использование вакцины, обогащенной опухолевыми антигенами, изготовленной согласно настоящему изобретению, позволяет повысить эффективность противоопухолевой иммунотерапии.

Кроме того, повышение эффективности иммунотерапии достигается за счет использования антигенов, полученных аккумулярованием с первичной культуры опухолевых клеток. Такой способ изготовления противоопухолевой вакцины позволяет получить при каждом воздействии протеазы антигены практически неизменного состава и накапливать с использованием первичной культуры клеток необходимое для вакцинации количество опухолевых антигенов. Включение в состав вакцины только специфичных для данной опухоли антигенов обеспечивается за счет возможности контроля состава полученных антигенов.

При этом исключается вероятность попадания в состав вакцины антигенов, не являющихся специфичными для данной опухоли. Такие антигены могут присутствовать в составе известных вакцин, изготовленных с использованием размноженных клеток, поскольку известно, что первичные культуры клеток при размножении *in vitro* меняют свой антигенный состав. Поэтому состав антигенов, отобранных от размноженных клеток, может быть отличен от состава смеси антигенов, полученных с изолированных (не культивированных) опухолевых клеток.

Вакцины, изготовленные согласно настоящему изобретению, могут представлять собой аутовакцины (полученные на основе опухолевых клеток самого пациента) или алловакцины (на основе опухолевых клеток другого пациента).

Иммунотерапия, проведенная согласно настоящему изобретению, эффективна в обоих случаях ввиду наличия на поверхностях опухолевых клеток различных пациентов пептидов, имеющих одинаковые последовательности аминокислот.

Вместе с тем при использовании аутовакцин, полученных согласно настоящему изобретению, эффект более выражен, поскольку в этом случае вакцина содержит индивидуальные и стадийспецифические антигены, отличающие развитие опухолевого процесса у конкретного больного.

Таким образом, изобретение позволяет получать опухолевые антигены на основе поверхностных клеточных антигенов и осуществлять на их основе иммунотерапию онкологических заболеваний, а именно вакцинацию.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противоопухолевая вакцина на основе поверхностных опухолевых антигенов, отличающаяся тем, что содержит смесь поверхностных опухолевых антигенов, представляющих собой аккумулярованные пептиды из поверхностных белков живых опухолевых клеток, полученных периодическим и витальным для клеток воздействием протеазы на первичную культуру живых опухолевых клеток.

2. Противоопухолевая вакцина по п.1, отличающаяся тем, что получена при воздействии трипсина, выбранного в качестве протеазы.

3. Способ получения противоопухолевой вакцины, включающий культивирование опухолевых клеток с выделением поверхностных опухолевых антигенов, отличающийся тем, что предварительно отмытую от ростовой среды первичную культуру живых опухолевых клеток подвергают витальному для клеток воздействию протеазы, отбирают высвободившиеся поверхностные опухолевые антигены, при этом обработку первичной культуры живых опухолевых клеток протеазой повторяют с интервалами, необходимыми для восстановления клетками поверхностных опухолевых антигенов, аккумуляруют поверхностные опухолевые антигены до достижения их дозы, необходимой для вакцинации, контролируют состав полученных поверхностных опухолевых антигенов.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что в качестве протеазы используют трипсин.

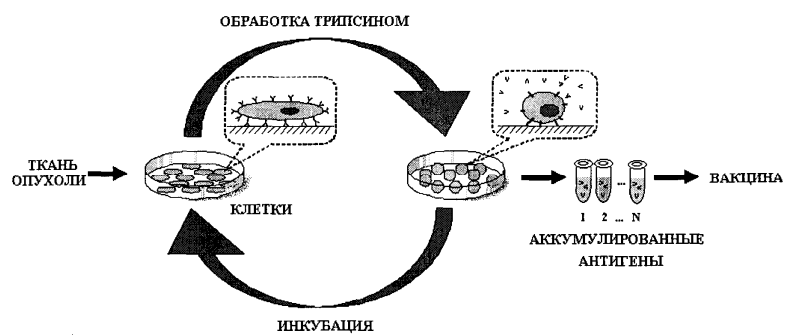
5. Способ проведения противоопухолевой иммунотерапии, включающий введение в организм пациента вакцины, полученной из смеси поверхностных опухолевых антигенов, представляющих собой пептиды, полученные из поверхностных белков опухолевых клеток, отличающийся тем, что используют смесь поверхностных опухолевых антигенов, представляющих собой аккумулярованные пептиды из поверхностных белков живых опухолевых клеток, полученных периодическим и витальным для клеток воздействием протеазы на первичную культуру живых опухолевых клеток.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что в качестве протеазы используют трипсин.

7. Способ по п.5, отличающийся тем, что используют поверхностные опухолевые антигены опухолевых клеток самого пациента.

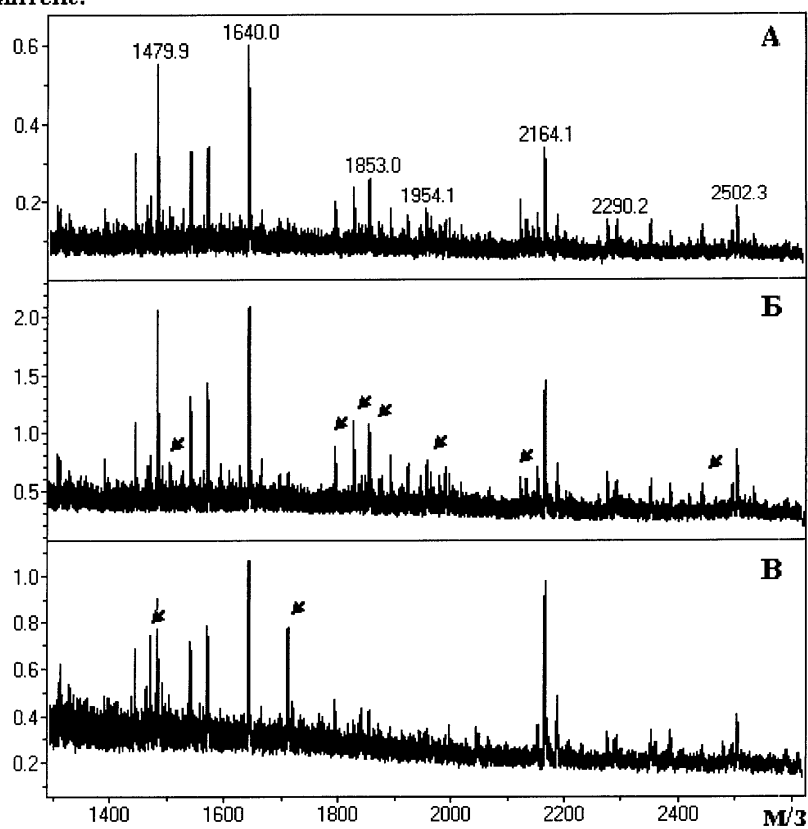
8. Способ по п.5, отличающийся тем, что используют поверхностные опухолевые антигены опухолевых клеток другого пациента.

9. Способ по п.5, отличающийся тем, что в составе противоопухолевой вакцины используют адьюванты.



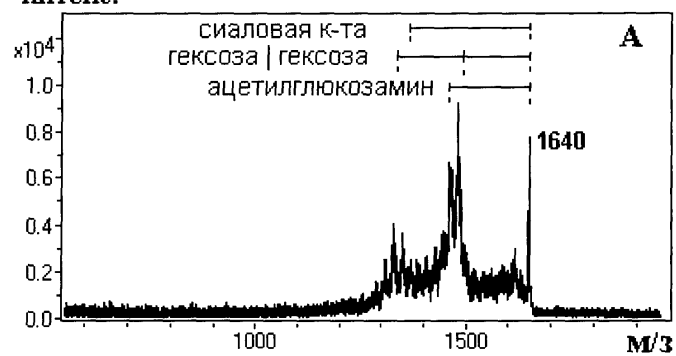
Фиг. 1

интенс.

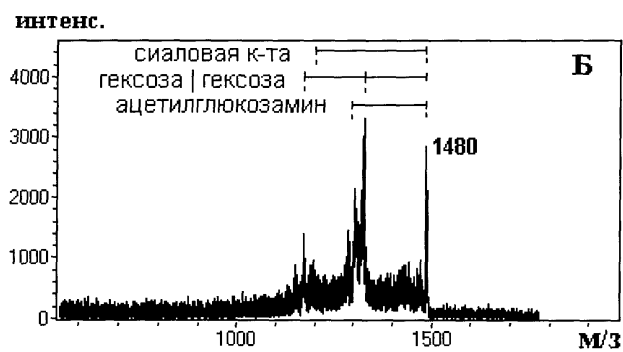


Фиг. 2

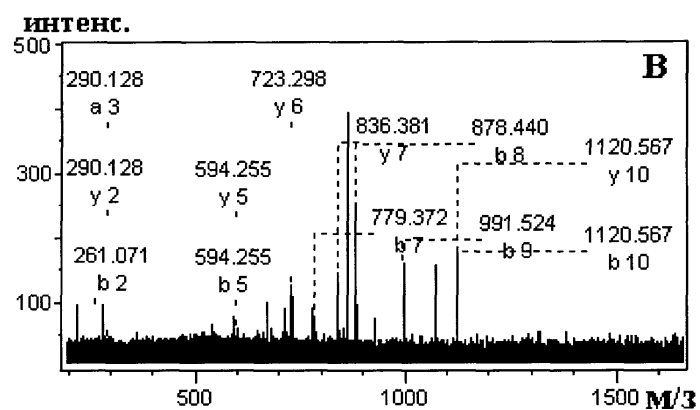
интенс.



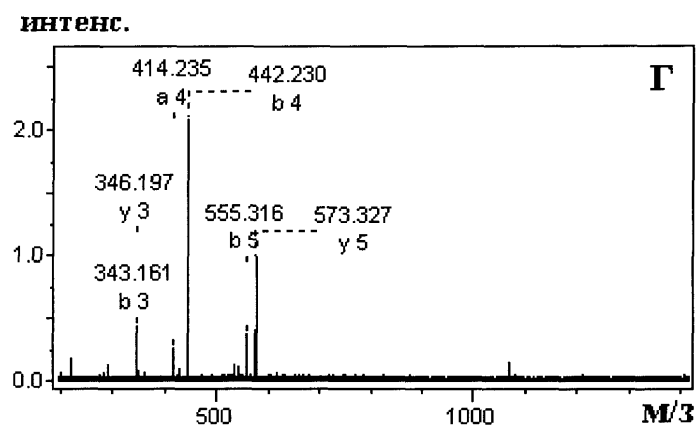
Фиг. 3. А



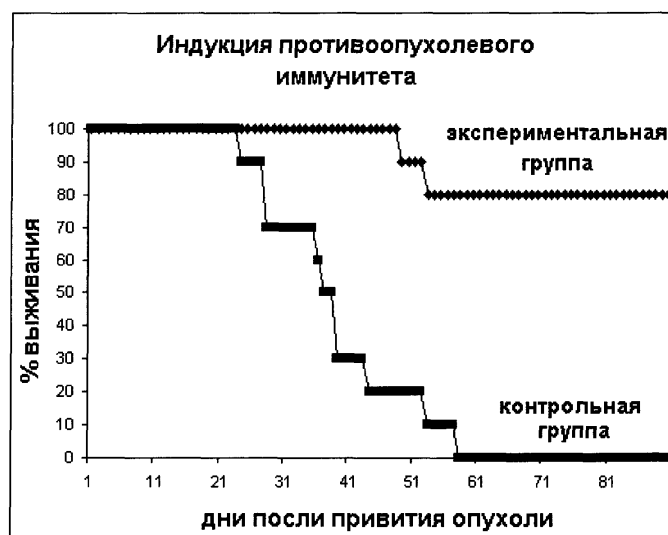
Фиг. 3 Б



Фиг. 3 В



Фиг. 3 Г



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6