РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 361 598** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 36/03 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61K 31/734 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2008106205/15, 18.02.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.02.2008

(45) Опубликовано: **20.07.2009** Бюл. № **20**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Реферат базы данных PubMed: Kim-MH et al. Immuno-stimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. Immunol. Lett. 2008 lan 29; 115(2):138-43 [on line] PMID: 18077003 [найдено 23.09.2008]. RU 2005121256 A, 10.02.2006. Реферат базы данных PubMed: Alekseyenko TV et al. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated** (см. прод.)

Адрес для переписки:
690022, г.Владивосток, пр-т 100-лет Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, зав. патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):
Звягинцева Татьяна Николаевна (RU),
Ермакова Светлана Павловна (RU),
Кусайкин Михаил Игоревич (RU),
Шевченко Наталья Михайловна (RU),
Федоров Сергей Николаевич (RU),
Квак Янг Йонг (KR)

(73) Патентообладатель(и):
ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СРЕДСТВО, ИНДУЦИРУЮЩЕЕ СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, конкретно к онкологии, и касается веществ, стимулирующих созревание дендритных клеток (DC). Предложено применение фукоидана из Fucus evanescens или полисахаридной композиции из Fucus evanescens, состоящей из фукоидана в количестве 60-80% и полиманнуроновой кислоты в количестве 20-40%, в качестве средства, обладающего способностью индуцировать созревание дендритных клеток. Показано повышение функциональной активности DC под действием заявленных веществ. Заявленные препараты фукоидана имеют стандартизированный состав и, следовательно, оказывают направленное биологическое действие. Они сохраняет свои свойства длительное время (3 года). 8 ил.

(56) (продолжение):
polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea Fucus evanescens brown alga. Bull. Exp. Biol. Med. 2007 Jun; 143(6): 730-2 [on line] PMID: 18239813 [найдено 23.09.2008]. JP 10033142 A, 10.02.1998. Реферат [on line] [найдено 23.09.2008] Найдено из Esp@cenet. JP 2006306897 A, 09.11.2006. Реферат [on line] [найдено 23.09.2008] Найдено из Esp@cenet). БУРМЕСТЕР Г.-Р. и др. Наглядная иммунология. - М.: БИНОМ, 2007, с.54. Cumashi A et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. Glycobiology. 2007 May; 17(5): 541-52.

RU 2361598 C1

RU 2361598 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) RU (11) 2 361 598 (13) C1

(51) Int. Cl.
A61K 36/03 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61K 31/734 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2008106205/15, 18.02.2008**

(24) Effective date for property rights:
18.02.2008

(45) Date of publication: **20.07.2009 Bull. 20**

Mail address:
690022, g.Vladivostok, pr-t 100-let Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav. patentnym otdelom N.I. Stadnichenko

(72) Inventor(s):
Zvjagintseva Tat'jana Nikolaevna (RU),
Ermakova Svetlana Pavlovna (RU),
Kusajkin Mikhail Igorevich (RU),
Shevchenko Natal'ja Mikhajlovna (RU),
Fedorov Sergej Nikolaevich (RU),
Kvak Jang Jong (KR)

(73) Proprietor(s):
TIKhOOKEANSKIJ INSTITUT BIOORGANIChESKOJ KhIMII DAL'NEVOSTOChNOGO OTDELENIJa ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh DVO RAN) (RU)

(54) AGENT INDUCING MATURING OF DENDRITIC CELLS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns medicine, be more specific to oncology, and concerns the substances stimulating maturing of dendritic cells (DC). Application of fucoidan from Fucus evanescens or polysaccharide composition from Fucus evanescens consisting of fucoidan in amount of 60-80% and poly-mannuronic acid in amount of 20-40%, as an agent possessing ability to induce maturing of dendritic cells is offered. The declared fucoidan preparations have a standardised composition and, hence, possess direct biological effect. They keep the properties for long time (3 years).

EFFECT: increase of DC functional activity under the influence of the declared substances.

8 dwg

RU 2361598 C1

RU 2361598 C1

Изобретение относится к медицине, конкретно к онкологии, и касается веществ, стимулирующих созревание дендритных клеток (DC).

Исследования показали, что использование дендритных клеток при лечении рака имеет обещающие результаты. Дендритные клетки - клетки иммунной защиты, являются потенциальными источниками антигенпрезентирующих клеток (APC) и играют основную роль в регуляции иммунного ответа [Banchereau J., et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 2000. 18. 767-811].

Дендритные клетки существуют, по меньшей мере, в двух функционально и фенотипически разных стадиях развития и созревания. На первом этапе незрелые дендритные клетки (iDC) циркулируют в крови, затем проникают в периферические ткани, где приобретают способность к захвату и прессингу антигенов. В дальнейшем зрелые дендритные клетки (mDC) мигрируют в лимфатические узлы, презентируют пептидные фрагменты антигенов с молекулами Т-лимфоцитов, индуцируя иммунный ответ. Способность DC стимулировать Т-клетки зависит от их стадии созревания.

Когда дендритные клетки полностью созревают, они являются источником информации о содержании раковых клеток. Во многих типах рака дендритные клетки в раковой области являются незрелыми и не могут эффективно донести информацию о раковых клетках остаткам иммунной системы, в частности Т-лимфоцитам. Для того чтобы информация о раке была достоверной, DC клетки должны созреть - это является основным моментом. Поэтому получение большого числа зрелых DC клеток из циркулирующей крови пациентов больных раком представляется важным моментом в иммунотерапии рака.

Моноциты, культивированные с цитокинами (интерфероны, фактор некроза опухоли (TNF), ряд интерлейкинов, колонии-стимулирующий фактор (CSF)) дифференцируют в незрелые дендритные клетки. Созревание DC происходит после обработки их веществами, индуцирующими созревание дендритных клеток, такими как фактор некроза опухоли (TNF-α), γ-интерферон (IFN-γ), или CD40L (семейство фактора некроза опухоли) [Reis e Sousa C: Dendritic cells in a mature age. Nat. Rev. Immunol. 2006. 6(6). 476-483].

Известно использование в качестве агента созревания дендритных клеток бацилл Кальметта-Герена (BCG), соединения имидазохинолина, искусственного двунитевого полирибонуклеотида, а также липополисахарида [RU 2005121256 A, 2006.02.10].

Известно, что фукоидан из Fucus vesiculosus (Sigma) ингибирует связывание T84 эпителиальных клеток к CD11b/CD18, очищенным из нейрофилов, а также увеличивает жизнеспособность DC, продуцирование IL-12 TNF-alpha, MHC I и II, CD54 и CD86. Также этот фукоидан уменьшает поглощение антигена и увеличивает рост аллогенных спленоцитов, проявляет иммуностимулирующий эффект и влияет на созревание DC по пути, включающему NF-kappa-B активацию [Kim, M.H., and Joo, H.G. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. Immunol. Lett. (2008), 115, 138-143].

Задача изобретения - расширение арсенала средств, индуцирующих созревание дендритных клеток.

Задача решена применением фукоидана из Fucus evanescens или полисахаридной композиции из Fucus evanescens, состоящей из фукоидана в количестве 60-80% и полиманнуроновой кислоты в количестве 20-40%, в качестве средства, индуцирующего созревание дендритных клеток.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в выраженном индуцирующем действии фукоидана из Fucus evanescens или полисахаридной композиции из Fucus evanescens на созревание дендритных клеток.

Фукоидан из Fucus evanescens, обозначенный далее «Fe», запатентован заявителем в качестве средства, обладающего антикоагулянтным и иммунотропным действием [RU 2247574 C2, 10.03.2005].

Полисахаридная композиция из Fucus evanescens, состоящая из фукоидана в

количестве 60-80% и полиманнуроновой кислоты в количестве 20-40%, обозначенная далее «Fc», запатентована заявителем в качестве биологически активного продукта, являющегося дополнительным источником иммуноактивных полисахаридов и растворимых пищевых волокон, повышающих неспецифическую резистентность организма [RU 2315487 C1, 2008.01.27].

Заявляемое техническое решение является новым, т.к. в доступной патентной и научно-медицинской литературе не обнаружено описание применения продуктов Fe или Fc в качестве средства, индуцирующего созревание дендритных клеток.

Для специалиста явным образом не следует из уровня техники возможность применения Fe или Fc в качестве средства, индуцирующего созревание дендритных клеток.

Фукоиданы - это семейство высокосульфатированных гомо- и гетерополисахаридов бурых водорослей, имеющих L-фукозу в качестве основной структурной единицы, но отличающиеся друг от друга физико-химическими свойствами, моносахаридным составом, молекулярными массами и иными характеристиками. Это семейство может пополняться все новыми и новыми соединениями, полученными из разных видов бурых водорослей, с присущими только им физико-химическими и иными характеристиками, и обладающими определенными биологически активными свойствами.

Установлено, что проявление биологической активности у какого-либо конкретного фукоидана из определенного вида водоросли не предполагает, что данная биологическая активность будет проявляться и у фукоиданов, выделенных из других видов водорослей. Это подтверждается, например, исследованиями по установлению взаимосвязи между структурой фукоиданов из различных источников и их биологической активностью [Cumashi, A., Ushakova, N. A. et. al. (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. Glycobiology 17, 541-552].

Авторами вышеупомянутой статьи показано, что из девяти исследованных фукоиданов только пять проявляют ингибирование тромбиновой активности. Было также показано, что фукоиданы уменьшают содержание лейкоцитов при перитоните у крыс. Возможный механизм этого действия - ингибирование P-селектин связывающей активности. При этом активность фукоиданов уменьшалась в следующем ряду: L. saccharina, L. digitata, F. evanescens, F. serratus, F. distichus, F. spiralis, A. nodosum. Фукоиданы из Cladosiphon okamuranus и Fucus vesiculosus не проявили ингибирование P-селектин связывающей активности.

Таким образом, предлагаемое техническое решение соответствует критерию «изобретательский уровень».

Фукоидан из Fucus vesiculosus (Sigma), обозначенный далее «Fv», является негомогенным продуктом. Он содержит смесь фукоиданов и уроновых кислот, а также примеси неуглеводной природы [Fitton, J.H. Fucoidans: healthful saccharides from the sea. GlycoScience&Nutrition (2005), 6, 1-6]. Это обстоятельство не позволяет сделать однозначный вывод о том, что именно фукоидан, а не другой компонент этой смеси, индуцирует созревание дендритных клеток.

Препараты Fe и Fc имеют стандартизированный состав и, следовательно, оказывают направленное биологическое действие. Они не содержат полисахариды другой природы, липиды и сохраняют свои свойства длительное время (3 года). Все эти преимущества открывают возможность для применения фукоидана из Fucus evanescens или полисахаридной композиции из Fucus evanescens в качестве средства, индуцирующего созревание дендритных клеток.

Изобретение иллюстрируется следующими чертежами:

На фиг.1 представлена индукция созревания дендритных клеток под действием препаратов Fe и Fc. Fv - препарат сравнения; липополисахарид (LPS) - положительный контроль.

На фиг.2 представлен дозозависимый эффект, оказываемый Fc на созревание дендритных клеток.

На фиг.3 представлена диаграмма индукции маркеров дендритных клеток под действием Fc и LPS.

На фиг.4 представлена диаграмма индукции маркеров дендритных клеток с использованием методов электронной микроскопии с использованием PI-коньюгированных CD-80 антител и FITC-коньюгированных MHC-II антител.

На фиг.5 представлена фагоцитарная активность дендритных клеток под действием Fc и LPS.

На фиг.6 представлена экспрссия цитокинов в дендритных клетках, обработанных Fc и LPS.

На фиг.7 представлена экспрессия IFN-γ в смешанной культуре лимфоцитов под действием Fc и LPS.

На фиг.8 представлена стимуляция роста Т клеток под действием дендритных клеток, обработанных Fc и LPS.

Изобретение иллюстрируется примером.

Принятые сокращения

TNF-α	Фактор некроза опухоли
IFN-γ	γ-интерферон
CD40L	Семейство фактора некроза опухоли
iDC	Незрелые дендритные клетки
mDC	Зрелые дендритные клетки
BCG	Бациллы Кальметта-Герена
LPS	Липополисахарид
CD1	Кластер дифференциации 1
CD3	Кластер дифференциации 3
CD14	Кластер дифференциации 14
CD40	Кластер дифференциации
CD80	Кластер дифференциации
CD86	Кластер дифференциации
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
BSA	Альбумин
FITC	Флюоресцеининизотиоцианатом
PE	Фикоэритрин
MHC-II	Главный комплекс гистосовместимости
CCR7	Хемокиновый рецептор 7
IL-4	Интерлейкин-4
IL-10	Интерлейкин 10
IL-12	Интерлейкин 12
PBS	Фосфатный буфер

Получение дендритных клеток

Моноциты были очищены из клеток периферической крови селекции с использованием суперпарамагнитного носителя MACS (Miltenyi Biotec., Bergisch Gladbach, Germany), коньюгированного с антителами к CD 14 (кластер дифференциации 14). Чистота моноцитов, определенная проточным цитометром, более 95%. Моноциты были культивированы в среде, содержащей рекомбинантные GM-CSF (800 ед/мл) (Novartis, Munich, Germany) с IL-4 (125 ед/мл) (Strathmann Biothec., Hamburg, Germany) на протяжении 6 дней для генерации DC. Дифференциация моноцитов была тестирована экспрессией CD1 и CD 14.

Анализ фенотипа дендритных клеток

Клетки (1×10^6) были собраны, отмыты фосфатным буфером (PBS), содержащим альбумин (BSA), и помечены FITC (флюоресцеининизотиоцианатом) и PE (фикоэритрин)-конъюгированными антителами инкубацией на льду в течение 30 мин с последующей отмывкой в PBS. Жизнеспособные клетки были анализированы на FACSCalibur проточном цитометре (Beckton Dickinson, Franklin lakes, NJ).

Соответствующие антитела были использованы как контроль для неспецифического окрашивания. Препараты Fv и Fc увеличивали уровень экспрессии кластеров дифференциации CD40, CD80, CD83 в дендритных клетках подобно LPS. Однако Fe имел меньший эффект на экспрессию маркеров дендритных клеток, чем Fv и Fc. Экспрессия MHC-II (главного комплекса гистосовместимости) не увеличивалась под действием фукоиданов (Фиг.1). Экспрессия CD80, CD83 в iDC увеличивалась в зависимости от дозы Fc (Фиг.2). Кроме того, Fc увеличивал экспрессию CD80, CD83, CD86 и CCR7 (хемокинового рецептора 7) в дендритных клетках (Фиг.3).

Конфокальная микроскопия

Клетки были фиксированы в течение 15 мин в 3% растворе параформальдегида в PBS, инкубированы 10 мин в 0.1% растворе Triton X-100 в PBS. Слайды были инкубированы в блокирующем буфере при 25°C в течение часа. После промывки (3 раза, PBS), клетки были инкубированы при 4°C в течение часа с PE-коньюгированными антителами против CD-89 или MHC-II и вновь отмыты с PBS. Образцы были анализированы с использованием микроскопии (Carl Zeiss LSM 510). Обработка дендритных клеток препаратом Fc в течение двух дней индуцирует типичные морфологические изменения при созревании дендритных клеток (Фиг.4). Иммуногистохимический анализ показал, что иммунореактивность CD86 и MHC-II значительно увеличивается после двух дней культивирования с фукоиданом Fc и липополисахаридом.

Фагоцитарная активность

Для анализа эндоцитоза 1×10^5 клеток были инкубированы с 1 мг/мл FITC-декстран (42 кДа) при 37°C в течеие часа. Клетки были отмыты дважды с холодным HBSS, инкубированы и анализированы на проточном цитометре. Параллельный эксперимент был проведен при 4°C.

FITC-декстран был тестирован на его способность проникать в клетки. Фагоцитарная активность DC, обработанных Fc, была выше чем в контроле (Фиг.5).

Анализ цитокинов

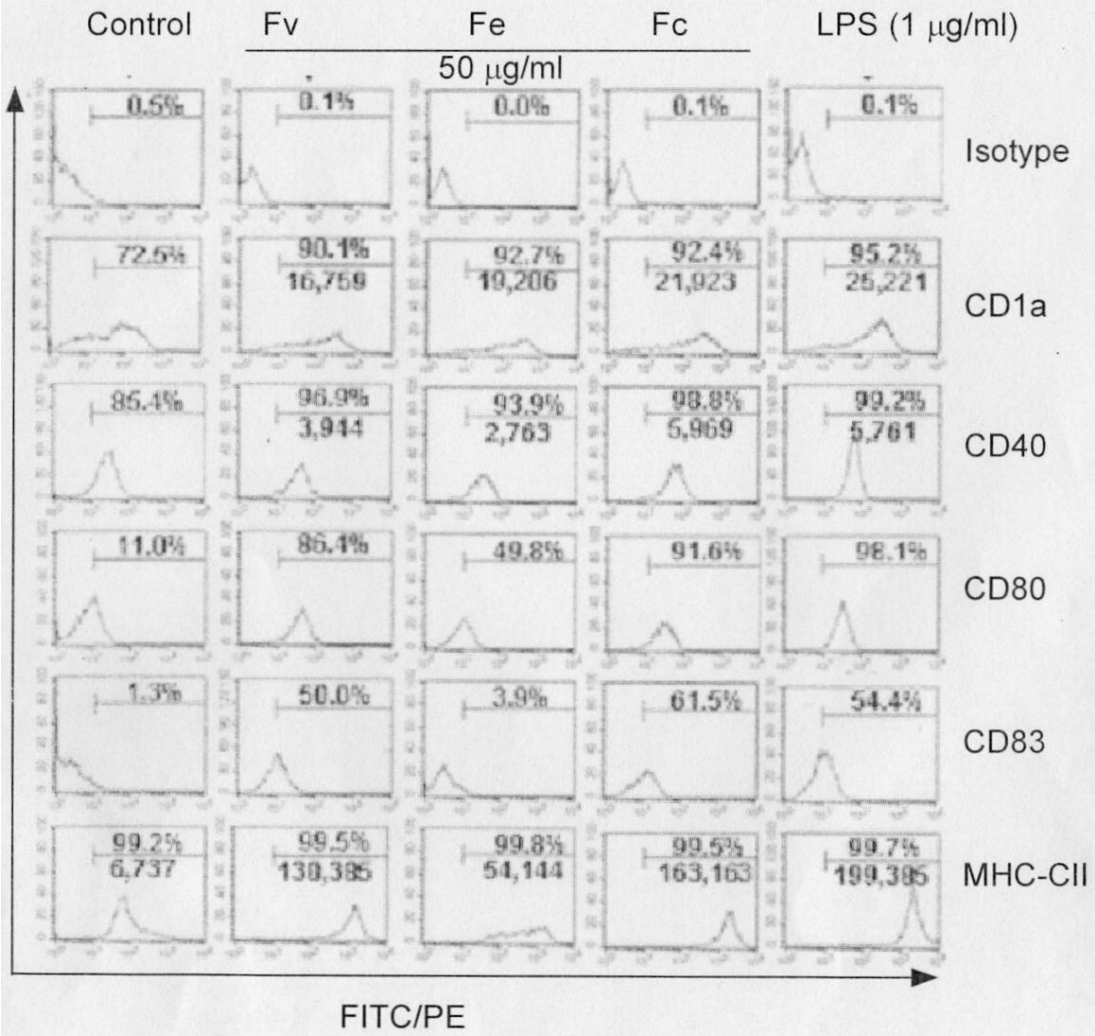
Клетки были инкубированы в среде RPMI-1640, содержащей Fc (50 мкг/мл) или LPS (1 мкг/мл) в течение 24 ч, в присутствии или в отсутствие Т-клеток. Профили секреции цитокинов IL-10, IL-12, TNF-a, IFN-γ в растворах были измерены в трех независимых экспериментах с использованием ELISA наборов (R&D System), чувствительность ≥ 5 пкг/мл. Стандартные цитокины были использованы в качестве контролей. Уровень экспрессии иммуносупрессора IL-10 по сравнению с контролем увеличивался в клетках, обработанных Fc или LPS. Однако экспрессия IL-12 (p70) в клетках, обработанных Fc, была ниже чем при стимуляции липополисахаридом (Фиг.6). Fc стимулировал способность DCs экспрессировать TNF-α, и уровень экспрессии сопоставим с уровнем, полученным при обработке LPS. Экспрессия IFN-γ в Т-клетках увеличивалась, когда дендритные клетки с Т-клетками в соотношении 1:25 были обработаны Fc или LPS (Фиг.7).

Определение функциональной активности дендритных клеток (смешанная культура лимфоцитов)

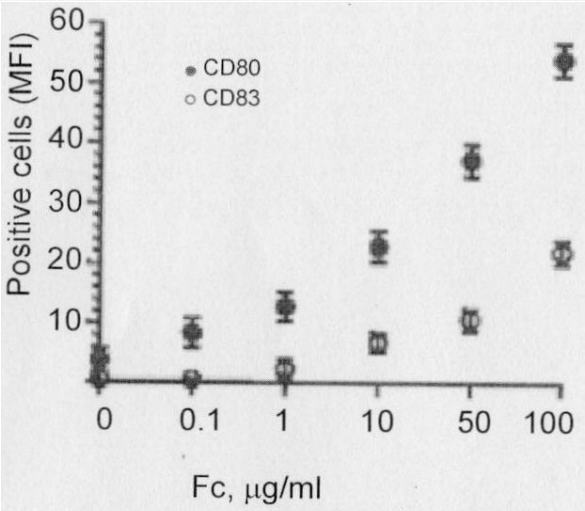
Т-клетки были очищены из периферической крови здоровых добровольцев, и чистота была тестирована окрашиванием с FITC-коньюгированными CD3 антителами. Fc или LPS обработанные дендритные клетки были обработаны с 50 мкг/мл митомицина С в течение 1 ч и затем 1×10^5 Т-клеток были добавлены в 96 луночные планшеты. Клетки были культивированы в течение 5 дней при 37°C, 5% CO_2 и затем добавлен 1 мкКи [^{3}H]тимидин (NEN-DuPont, Boston, MA). Радиоактивность собранных клеток была измерена через 18 ч. Тестирование дендритных клеток на их способность поддерживать активацию Т-клеток показало, что они стимулировали пролиферацию Т-клеток, при культивировании в течение 5 дней в соотношении (T:DC= 1:25) (Фиг.8).

Формула изобретения

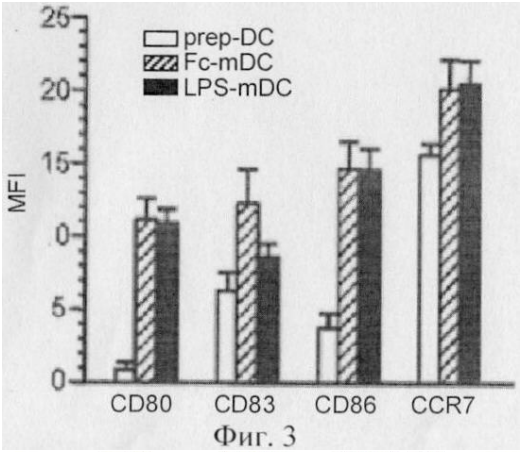
Применение фукоидана из Fucus evanescens или полисахаридной композиции из Fucus evanescens, состоящей из фукоидана в количестве 60-80% и полиманнуроновой кислоты в количестве 20-40%, в качестве средства, индуцирующего созревание дендритных клеток.


Control
Fv
Fe
Fc
LPS (1 μg/ml)
50 μg/ml
Isotype
CD1a
CD40
CD80
CD83
MHC-CII
FITC/PE

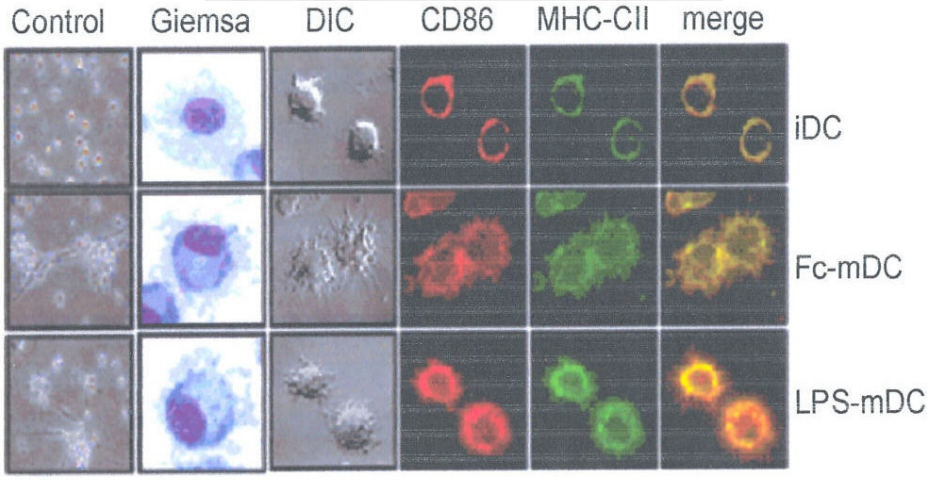
Фиг. 1


Positive cells (MFI)
CD80
CD83
Fc, μg/ml

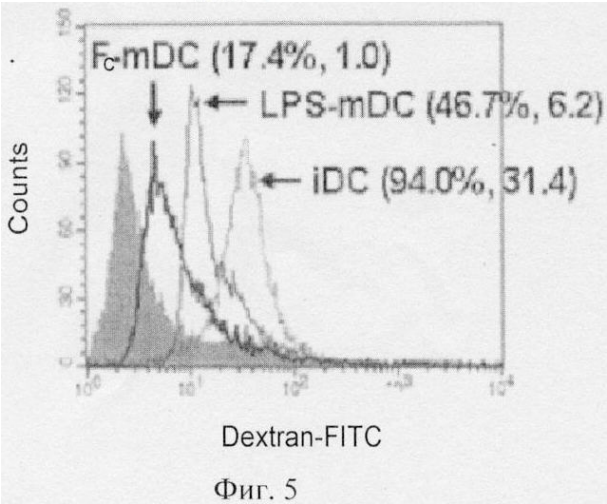
Фиг. 2



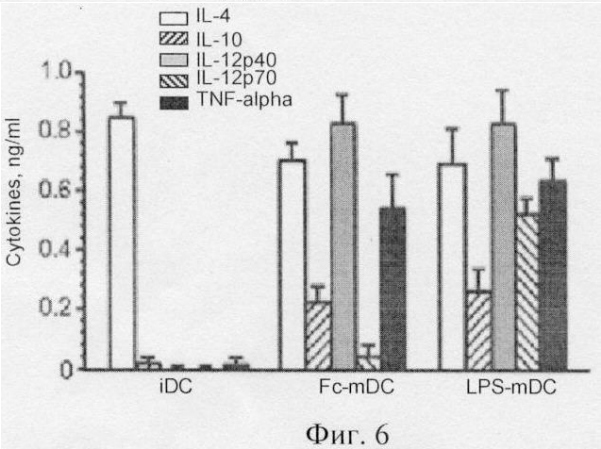
Фиг. 3



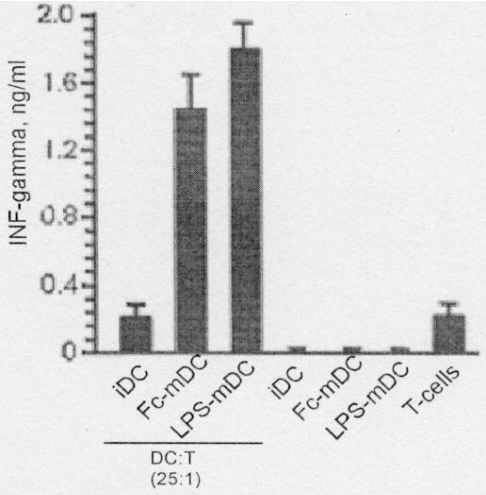
Фиг. 4



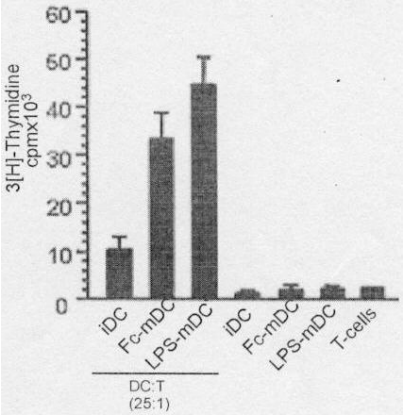
Фиг. 5



Фиг. 6


INF-gamma, ng/ml
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0
iDC
Fc-mDC
LPS-mDC
iDC
Fc-mDC
LPS-mDC
T-cells
DC:T
(25:1)

Фиг. 7


3[H]-Thymidine
cpmx10³
60
50
40
30
20
10
0
iDC
Fc-mDC
LPS-mDC
iDC
Fc-mDC
LPS-mDC
T-cells
DC:T
(25:1)

Фиг. 8