

1. **Национален патент:** Биологично активен продукт, съдържащ хемоцианин. Изобретение заявка № 110495/16.10.2009 г.; **Защитен № 66374 В1/31.10.2013** г., П. Долашка, Х. Нейчев, А. Долашки, В. Мощанска, Ц. Стефанова, С. Захариева, **Л. Велкова**, И. Димитров, Б. Атанасов.



ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО
на Република България

ПАТЕНТ

ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ **66374**

Председател

Дата:

05.12.2013



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(51) Int.Cl.

C 07 K 14/435 (2006.01)

C 12 N 5/06 (2006.01)

A 61 P 37/04 (2006.01)

A 61 P 35/00 (2006.01)

A 61 K 39/385 (2006.01)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 110495

(22) Заявено на 16.10.2009

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 4 на 29.04.2011

(45) Отпечатано на 31.10.2013

(46) Публикувано в бюлетин № 10
на 31.10.2013

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

ПАВЛИНКА АЛЕКСАНДРОВА ДОЛАШКА-
АНГЕЛОВА, 1220 СОФИЯ, ЖК "НАДЕЖ-
ДА", БЛ. 272, ВХ. 3, АП. 182;ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С
ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ ПРИ БАН, 1113
СОФИЯ, УЛ. "АКАД. Г. БОНЧЕВ", БЛ. 9;
ХРИСТО ОНУФРИ НЕЙЧЕВ, 1111 СОФИЯ,
УЛ. "ЛИДИЦЕ" 29;АЛЕКСАНДЪР КОНСТАНТИНОВ ДО-
ЛАШКИ, 1220 СОФИЯ, ЖК "НАДЕЖ-
ДА 2", БЛ. 272, ВХ. 3, АП. 182;ВЕСЕЛА СОТИРОВА МОЩАНСКА, 1612
СОФИЯ, ЖК "ИВАН ВАЗОВ", УЛ. "ЯНКО
ЗАБУНОВ" 35, ВХ. Б, АП. 27;ЦВЕТАНКА ХРИСТОВА СТЕФАНОВА, 1000
СОФИЯ, БУЛ. "ДРАГАН ЦАНКОВ" 59, ВХ. Б,
ЕТ. 4, АП. 12;СИЙКА ИВАНОВА ЗАХАРИЕВА, 1330 СО-
ФИЯ, ЖК "КРАСНА ПОЛЯНА", УЛ. "РАДИ
ПЕТКОВ", БЛ. 35А;ЛЮДМИЛА ГЕОРГИЕВА ВЕЛКОВА, 1504 СО-
ФИЯ, БУЛ. "КНЯЗ ДОНДУКОВ" 95, ВХ. А,
ЕТ. 5, АП. 11;ИВАН ДОБРЕВ ДИМИТРОВ, 1729 СОФИЯ,
ЖК "МЛАДОСТ 1А", БЛ. 521, ВХ. 5, ЕТ. 5;БОРИС ПЕТКОВ АТАНАСОВ, 1404 СОФИЯ,
УЛ. "ДЕЯН БЕЛИШКИ", БЛ. 6, АП. 7

(72) Изобретател(и):

Павлинка Александрова Долашка-Ангелова;

Христо Онуфри Нейчев;

Александър Константинов Долашки;

Весела Сотирова Мощанска;

Цветанка Христова Стефанова;

Сийка Иванова Захариева;

Людмила Георгиева Велкова;

Иван Добрев Димитров;

Борис Петков Атанасов,

София

(74) Представител по индустриална
собственост:

(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

(54) БИОЛОГИЧНО АКТИВЕН ПРОДУКТ, СЪДЪРЖАЩ ХЕМОЦИАНИН

(57) Изобретението се отнася до биологично активен продукт, съдържащ хемоцианин с имуностимулиращо и антитуморно действие и метод за получаването му. Продуктът е получен от градински охлюви *Helix vulgaris* (HvH), като след диализа на нативните молекули е разделен на изграждащите го изоформи с молекулни маси около 400 кДа: три изоформи за HvX (бета-HvH, алфа1-HvH и алфа2-HvH). Установена е също динамиката на олигомерните състояния на хемоцианин, получен от HvX при различни концентрации на CaCl_2 и MgCl_2 . Също така са доказани имунологичните и терапевтични свойства, притежавани от хемоцианина на *Helix vulgaris*.

2 претенции, 2 фигури

(54) БИОЛОГИЧНО АКТИВЕН ПРОДУКТ, СЪДЪРЖАЩ ХЕМОЦИАНИН

Област на техниката

Изобретението се отнася до биологично активен продукт, съдържащ хемоцианин с имуностимулиращо и антитуморно действие и метод за получаването му, което намира приложение като терапевтичен агент в онкологията и други области на медицината.

Предшестващо състояние на техниката

Хемоцианините са глюкопротеини, разположени в хемолимфата на молюски и артроподни организми. Тяхната функция е пренасяне на кислород до всяка жива клетка. Хемоцианините от молюски и артроподи намират приложение в имунологията, имуноterapiaта и биотехнологията, тъй като те са силни имуногени и индуцират синтеза на различни антитела и Т-специфични лимфоцити. Хемоцианините притежават много сложна структура, като нативната молекула съдържа 2 субединици с молекулна маса около 400 kDa, които са изградени от осем функционални единици с маса около 50 kDa. Проявените от тях неспецифични свойства ги правят изключително приложими като имунотерапевтични агенти за лечение на някои видове рак.

Например: 1. Известно е приложението им като: а) носители на лиганди, които сами по себе си не са имуногени (като синтетични пептиди, токсини, лекарствени препарати, хормони и др.); б) при продуциране на моноклонални и поликлонални антитела. 2. Използват се като неспецифични имуностимуланти при терапията на някои видове рак; 3. Използват се като реагент за диагностика на някои видове заболявания.

Известно е, че Cu-съдържащият протеин (хемоцианин) keyhole limpet, изолиран от молюски *Megathura crenulata* (KLH), проявява имуномодулиращи свойства и предизвиква биомедицински интерес в продължение на повече от 30 години (1, 2). Дългогодишното му изучаване е довело до бързото производство на KLH-продукти с различно предназначение. Известно е, че KLH е получил широко приложение като терапевтичен агент в онкологията и други дялове на медицината. Използването на KLH като носи-

тел на малки молекули, като: пептиди, хормони, полизахариди, липиди, олигонуклеотиди, срещу които е доказано, че е затруднено или почти невъзможно създаването на поликлонални антитела, разшири прилагането на този протеин в областта на имунобиологията и имунохимията, както и използването му като антитуморна ваксина (3-5).

Установено е, че някои хемоцианини от молюски са мощни антигени. Доказан е имунотерапевтичният ефект на KLH и възможността от прилагане на този протеин при лечение на рак на кръвта (6). Най-обещаващо приложение KLH намира при антитуморната имуноterapia за изготвяне на ваксина (4).

Известно е получаване на хемоцианин от *Concholepas concholepas* и на субединица A (7). Субединицата CCH-A, с молекулна маса 404 kDa, е изолирана от морския гастропод *Concholepas concholepas* (CCH) и са доказани имуностимулиращите й свойства.

Известен е метод за третиране на рак на пикочния мехур с композиция на хемоцианин от keyhole limpet, притежаващ значителна антитуморна активност (8) Това изобретение е насочено към стабилизиране композицията на хемоцианин от keyhole limpet hemocyanin (KLH), в която (i) нативната (цяла) недисоциирана субединица е с молекулно тегло = 400 kDa, базирано на проведените SDS-PAGE анализи; и (ii) съдържат най-малко около 50% дидекамери или мултимери. Композицията на KLH е стабилизирана при 4°C, чрез разтваряне и съхранение в буфер, съдържащ калций и магнезий. KLH не може да бъде замразен или лиофилизиран за съхранение. Композицията KLH проявява повишена имунологична активност, в частност повишена антитуморна активност, която се понижава ако KLH бъде замразен или лиофилизиран. Това изобретение показва и повишена антитуморна активност на KLH в миши модел на тумор на пикочния мехур.

Антитуморните свойства на хемоцианините са потвърдени и от установената антитуморна активност на KLH срещу рак на пикочния мехур (8). KLH е широко използвано терапевтично средство в медицината, но изискванията на пазара не могат да задоволят нуждите за неговото биохимично и фармакологично приложение в експерименталната и клинична медицина. Това на-

лага необходимостта от намиране на други хемоцианини (от сухоземни или сладководни организми), проявяващи имунологични и терапевтични свойства. Известни са различни методи, включващи диференцирано центрофугиране, йонообменна хроматография и др., както за получаване на KLN, така и на други хемоцианини, като *Rapana venosa* (RvH) и *Helix vulgaris* (HvH) (9). Структурата в разтвор на тези препарати е добре изучена, като се знае, че RvH е изградена от две гликозилирани вериги с молекулна маса от 420 и 400 kDa. При различни условия те образуват декамери, дидекамери и мултидекамери (9). Тези продукти съдържат въглеводородна структура, която е свързана с имунологичните им свойства (10-12). Установено е, че не всички хемоцианини изолирани от моллюски притежават имунологични свойства.

От значение за имунотерапията е да се намери алтернативен продукт, с присъщото му или разширено действие като имуностимулант да съответства на известните до сега и използвани в имунотерапията хемоцианини.

Техническа същност на изобретението

Изобретението представлява биологично активен продукт на базата на хемоцианин, получен от градински охлюви *Helix vulgaris* (HvX), и метод за получаването му.

Субстанцията "хемоцианин" се изолира от градински охлюви *Helix vulgaris* (HvX), след диализа на нативните молекули, последвано от ултрацентрофугиране при високи обороти 35000-45000 и температура 0-8°C. Полученият нативен хемоцианин се диализира в буфери с pH 5.0-6.0 и 8.5-9.6 и трите структурни субединици (бета-HvH, алфа1-HvH и алфа2-HvH), изграждащи хемоцианиновата молекула, се разделят с помощта на йонообменна хроматография, със слабо алкален буфер Tris при pH 7.8 - 8.6, и солеви градиент на NaCl (Фиг. 1).

Като резултат се получават добре пречистен хемоцианин, изолираните от него структурни субединици с молекулна маса около 400 kDa и функционални единици с маса около 50 kDa (Фиг. 2). Установена е динамиката на олигомерните състояния на RvX и HvX при различни концентрации на CaCl_2 и MgCl_2 . Доказани са имунологични и терапевтични свойства, притежа-

вани от хемоцианините *Rapana venosa* и *Helix vulgaris*.

Изобретението се илюстрира с приведените по-долу примери, които не го ограничават.

Пояснения на приложените фигури

Фигура 1. Хроматограма за разделяне на структурните субединици на HvH на Resource Q колона, с буфер Tris/HCl, pH 8.2 и солеви градиент на NaCl 0-1.0 M, на високоскоростен течен хроматограф FPLC.

Фигура 2. Маспектър на функционална единица, изолирана от структурната субединица на хемоцианин *Helix vulgaris* (HvH).

Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1

Ходилото на градински охлюв *Helix vulgaris* се разрязва със скалпел и се събира хемолимфата, която се подлага на ултрацентрофугиране при 6000 g и температура 0°C. Полученият препарат - хемоцианин HvH - се съхранява в продължение на година в Tris/HCl, pH 7.0, 10 mM CaCl_2 и 5 mM MgCl_2 и 30% захар. Структурната субединица бета-HvH се получава след диализа на HvH в амониено ацетатен буфер (pH 5.6) и центрофугиране при 8000 g и температура 0°C. Другите две субединици алфа1-HvH и алфа2-HvH се изолират след центрофугиране при 35000 g и диализа срещу глицин/NaOH, pH 9.6 и се фракционират на йонообменна хроматография на Resource Q колона, с буфер Tris/HCl, pH 8.2 и солеви градиент на NaCl 0-0.5 M (Фиг. 2).

Функционалните единици се получават след лимитирана протеолиза с трипсин и пречистване чрез йонообменна хроматография на Resource Q колона, с буфер Tris/HCl, pH 8.2 и солеви градиент на NaCl 0-1.0 M, на високоскоростен течен хроматограф FPLC. Чистотата на всички фрагменти се доказва чрез електрофореза и маспектрометър (Фиг. 2).

Пример 2

Ходилото на градински охлюв *Helix vulgaris* се разрязва със скалпел и се събира хемолимфата, която се подлага на ултрацентрофугиране при 8000 g и температура 4°C, като се получава хемоцианин. Полученият препарат се съхранява в продължение на година в Tris/HCl, pH 7.0, 20 mM CaCl_2 и 5 mM MgCl_2 и 30% захар.

Структурната субединица бета-HvN се получава след диализа в амониено ацетатен буфер (pH 6.0) и центрофугиране на HvN при 10000 g и температура 4°C. Другите две субединици алфа1-HvN и алфа2-HvN се изолират след центрофугиране при 40000 g диализа срещу глицин/NaOH, pH 9.0, и се фракционират на йонообменна хроматография на Resource Q колона, с буфер Tris/HCl, pH 8.0. и солеви градиент на NaCl 0-1.0 M.

Функционалните единици се получават след лимитирана протеолиза с трипсин и пречистване чрез йонообменна хроматография на Resource Q колона, с буфер Tris/HCl, pH 8.0 и солеви градиент на NaCl 0-1.0 M, на високоскоростен течен хроматограф FPLC. Чистотата на всички фрагменти се доказва чрез електрофореза и масспектрометър.

Пример 3

Ходилото на градински охлюв *Helix vulgaris* се разрязва със скалпел и се събира хемолимфата, която се подлага на ултрацентрофугиране при 10000 g и температура 0°C, като се получава хемоцианин. Полученият препарат се съхранява в продължение на година в Tris/HCl, pH 7.5, 20 mM CaCl₂ и 5 mM MgCl₂ и 30% захар. Структурната субединица бета-HvN се получава след диализа на HvN в амониено ацетатен буфер (pH 5.6) и центрофугиране при 15000 g и температура 0°C. Другите две субединици алфа1-HvN и алфа2-HvN се изолират след центрофугиране при 45000 g и диализа срещу глицин/NaOH, pH 9.6 и се фракционират на йонообменна хроматография на Resource Q колона, с буфер Tris/HCl, pH 8.5, и солеви градиент на NaCl 0-0.8 M.

Функционалните единици се получават след лимитирана протеолиза с трипсин и пречистване чрез йонообменна хроматография на Resource Q колона, с буфер Tris/HCl, pH 8.5 и солеви градиент на NaCl 0-0.6 M, на високоскоростен течен хроматограф FPLC. Чистотата на всички фрагменти се доказва чрез електрофореза и масспектрометър.

Имуностимулиращ ефект на хемоцианите *Rapana venosa* и *Helix vulgaris*

Използвани са 50 мишки от линия C57 BL/6 с тегло 18-20 g, разделени на три групи и са имунизирани по следния начин.

Пример 1

Група I - 50 microg TNP-KLH, II - 50 microg TNP-*Rapana venosa*, и III - 50 microg TNP-

Helix vulgaris, смесени 1:1 по обем с пълен адювант на Фройд (CFA) и инжектирани подкожно в гърба на мишките. На 7-ия, 14-ия и 21-ия ден са взети по 3 мишки от група, взети са серумите от всяка мишка поотделно и са замразени при -70°C. Изолирани са стерилно далаците, стрити са с марля в хаванче в разтвор на Хенкс. Суспензията се центрофугира на 1800 об/мин при 0°C. Еритроцитите лизират с 0.84% NH₄Cl, след което се центрофугират и се промиват трикратно с разтвор на Хенкс. Живите клетки са преброени под микроскоп и доведени до 2.5 x 10⁶/ml. Направени са спленоцитни култури (1 ml/ямка в 24-ямкови плаки) със стимуланти: 5 microg/ml конкавалин А; 50 microg/ml TNP-BSA; 50 microg/ml от съответния неконюгиран с TNP-хемоцианин; 50 microg/ml от съответния конюгиран с TNP-хемоцианин. След 3 дни култивиране в инкубатор за клетъчни култури на 37°C при 5% CO₂ в атмосферата, супернатантите се центрофугират и замразяват.

Пример 2

Група I - 100 microg TNP-KLH, II - 100 microg TNP-*Rapana venosa*, и III - 100 microg TNP-*Helix vulgaris*, смесени 1:1 по обем с пълен адювант на Фройд (CFA) и инжектирани подкожно в гърба на мишките. На 7-ия, 14-ия и 21-ия ден са взети по 3 мишки от група, взети са серумите от всяка мишка поотделно и са замразени при -70°C. Изолирани са стерилно далаците, стрити са с марля в хаванче в разтвор на Хенкс. Суспензията се центрофугира на 1900 об/мин при 4°C. Еритроцитите се лизират с 0.84% NH₄Cl, центрофугират се и се промиват трикратно с разтвор на Хенкс. Живите клетки са преброени под микроскоп и доведени до 2.0 x 10⁶/ml. Направени са спленоцитни култури (1 ml/ямка в 24-ямкови плаки) със стимуланти: 5 microg/ml конкавалин А; 30 microg/ml TNP-BSA; 30 microg/ml от съответния неконюгиран с TNP-хемоцианин; 30 microg/ml от съответния конюгиран с TNP-хемоцианин. След 3 дни култивиране в инкубатор за клетъчни култури на 37°C при 5% CO₂ в атмосферата, супернатантите се центрофугират и замразяват.

Пример 3

Група I - 80 microg TNP-KLH, II - 80 microg TNP-*Rapana venosa*, и III - 80 microg TNP-*Helix vulgaris*, смесени 1:1 по обем с пълен адювант на Фройд (CFA) и инжектирани под-

ложно в гърба на мишките. На 7-ия, 14-ия и 21-ия ден от по 3 мишки от група, са взети серумите от всяка мишка поотделно и са замразени при -70°C . Изолирани са стерилно далаците и са стрити с марля в хаванче в разтвор на Хенкс. Суспензията се центрофугира на 1800-2000 об/мин при 6°C . Еритроцитите се лизират с $0.84\% \text{NH}_4\text{Cl}$ и се центрофугира, след което се промива трикратно с разтвор на Хенкс. Живите клетки са преброени под микроскоп и доведени до $3.0 \times 10^6/\text{ml}$. Направени са спленоцитни култури ($1 \text{ ml}/\text{ямка}$ в 24-ямкови плаки) със стимуланти: Конкавалин А - $5 \text{ microg}/\text{ml}$; - $60 \text{ microg}/\text{ml}$ TNP-BSA; - $60 \text{ microg}/\text{ml}$ от съответния неконюгиран с TNP-хемоцианин; - $60 \text{ microg}/\text{ml}$ от съответния конюгиран с TNP-хемоцианин. След 3 дни култивиране в инкубатор за клетъчни култури на 37°C при $5\% \text{CO}_2$ в атмосферата, супернатантите се центрофугират и замразяват.

Далаците на мишките се отделят по асептичен начин и се определят пролиферативните отговори на лимфоцитите в присъствие на митогени, както и жизнеността на клетките. Суспенсия от живи клетки в обем от пълна среда RPMI-1640 се разпределя в 96-ямкова плака за тъканно култивиране и стимулирани с фитохемаглутинин, *Escherichia coli* липополизари (LPS) или респективно имунизация хемоцианин/фрагмент. Плаките се култивират в CO_2 инкубатор до 92 h. Клетките се събират върху филтри с помощта на клетъчен харвестър и се разпределят в сцинтилационни шишета. След добавяне на сцинтилационна течност пробите се отчитат на сцинтилационен брояч.

След инжектиране на мишки с модифицираните форми на хемоцианините с TNP, беше проследен ефекта с широко използвания ензим-свързан-имуносорбентен тест (ELISA) след 7-ия, 14-ия и 21-ия ден след имунизация. Установено бе, че хемоцианините от *Rapana venosa* и *Helix vulgaris* могат да бъдат използвани като носители на хаптени, защото те притежават способността да предизвикват хаптен-специфична секреция на интерферон-гама от далачни клетки, като тази способност се запазва по-дълго след имунизацията в сравнение с използването на KLH като носител (Таблица 1). Те предизвикват образуването на хаптен-специфични антители в същата или по-висока степен, отколкото KLH.

Хемоцианините *Rapana venosa* и *Helix vulgaris* притежават имунологични и терапевтични свойства. Използването им, като носители на хаптен предизвиква далачните клетки при мишки да продуцират интерферон-гама. Хаптените са малки молекули, които могат да се свързват с антитела, но сами по себе си не са имуногенни, но при конюгирането им към белтък-носител те стават имуногенни и предизвикват образуването на анти-хаптенови антители. Хемоцианините *Rapana venosa* и *Helix vulgaris*, както и структурните им субединици бяха модифицирани с TNBS до получаване на TNP-производни, които бяха използвани за стимулиране и продуциране на антители. Хемоцианин (KLH), който е утвърден като хаптен-носител и имуностимулант в лечението на рак на пикочния мехур и други видове тумори, беше използван за сравняване на резултатите.

Антитуморен ефект на хемоцианините

За установяване на антитуморната активност бе проучен ефекта на хемоцианин от *Rapana venosa* (RvH) върху антицяло-зависимата клетъчна цитотоксичност (АЗКЦ). Върху митогенния отговор на далачни лимфоцити на хамстери с прогресивно растящ миелоиден тумор на Graffi. Хемоцианините RvH и KLH (използван като контрола) се прилагаха подкожно 2-кратно в доза $0.5 \text{ mg}/\text{хамстер}$.

Установи се понижение на далачната лимфоцитна АЗКЦ в хода на туморното развитие. Прилагането на KLH или RvH хемоцианин при тумор-носеци хамстери (ТНХ) повишава двукратно АЗКЦ на далачни лимфоцити срещу туморни клетки в сравнение с АЗКЦ при нетретирани ТНХ. АЗКЦ на лимфоцити изолирани от здрави хамстери е 2-кратно по-ниска от тази установена при третирани на здрави хамстери с KLH или RvH. Хемоцианинът RvH индуцира 3-5% по-висока АЗКЦ при всички варианти на серуми и лимфоцити в сравнение с KLH. И двата хемоцианина (RvH и KLH) показват стимулиращ ефект върху митогенния отговор на далачни лимфоцити на ТНХ и повишена антитуморна активност в миши модел на тумор на Graffi и във връзка с това представляват нови антитуморни и имуно-терапевтични препарати.

Предимства на тези методи

Получен е нов материал - имуностимулатор с голяма чистота и проявен имуностимулиращ ефект и антитуморно действие. Разширена е и суровинната база за получаване на имуностимуланти.

Използването на този препарат е с големи възможности, като може да се прилага и комбинирано, като имуностимулиращ агент на естествения или придобит имунен отговор при

гръбначните организми и/или като имуно терапевтичен агент при рак на хора или животни. Те са стабилни в присъствие на Ca^{2+} и Mg^{2+} и са с чистота над 95%.

5

Разработеният метод за получаване на хемоцианина осигурява получаването на големи количества чист препарат и с по-малко разходи, което е от особено значение за използването на хемоцианините с широк диапазон на приложение в медицинската терапия.

10

Таблица 1. Проследяване способността на хемоцианините, като носители, да предизвикват хаптен-специфична секреция на интерферон-гама от далачни клетки, съответно на 7, 14 и 21 ден.

7 ден след имунизация

Група имунизация	Стимулатор <i>in vitro</i>				
		Конкавалин А	TNP-X	X	TNP-BSA
1.TNP-KLH-CFA	0	296	0	0	169
2.TNP-Rap-CFA	0	2689	89	419	109
3.TNP-Hel-CFA	0	189	0	59	89

14 ден след имунизация

Група имунизация	Стимулатор <i>in vitro</i>				
		Конкавалин А	TNP-X	X	TNP-BSA
1.TNP-KLH-CFA	0	2599	0	119	0
2.TNP-Rap-CFA	0	3669	0	259	29
3.TNP-Hel-CFA	0	829	0	149	79

21 ден след имунизация

Група имунизация	Стимулатор <i>in vitro</i>				
		Конкавалин А	TNP-X	X	TNP-BSA
1.TNP-KLH-CFA	0	2039	0	0	0
2.TNP-Rap-CFA	129	3249	0	0	0
3.TNP-Hel-CFA	0	3109	319	319	189

Патентни претенции

1. Биологично активен продукт, състоящ се от хемоцианин от хемолимфата на градински охлюви *Helix vulgaris*, характеризиращ се с това, че хемоцианинът се състои от три субединици - бета-HvH, алфа1-HvH и алфа2-HvH, с молекулни маси 400 - 450 kDa и функционални единици с молекулна маса ~ 50 kDa, получени чрез йонообменна хроматография след лимитирана протеолиза с трипсин на съответните субединици на хемоцианина, с чистота над 95% и стабилни в буфер, съдържащ Ca^{2+} и Mg^{2+} -йони, с pH 7.5-8.2.
2. Използване на биологично активния продукт съгласно претенция 1, като носител на хаптени за образуването на специфични анти-хап-тенови антитела при стимулиране на митогенния отговор на далачни лимфоцити на тумор-носещи хамстери (THX).

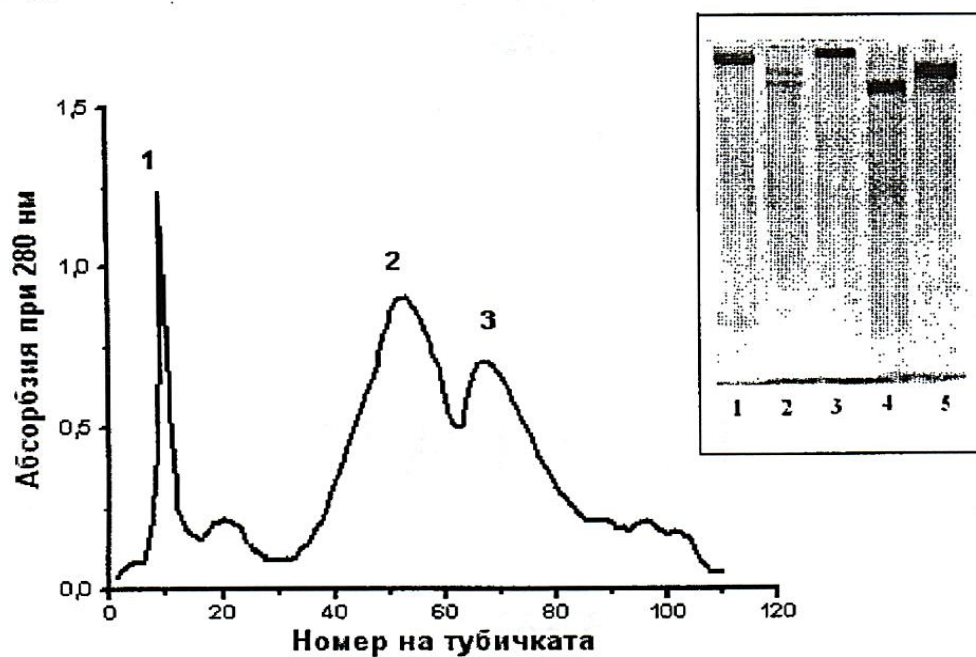
Приложение: 2 фигури

Литература

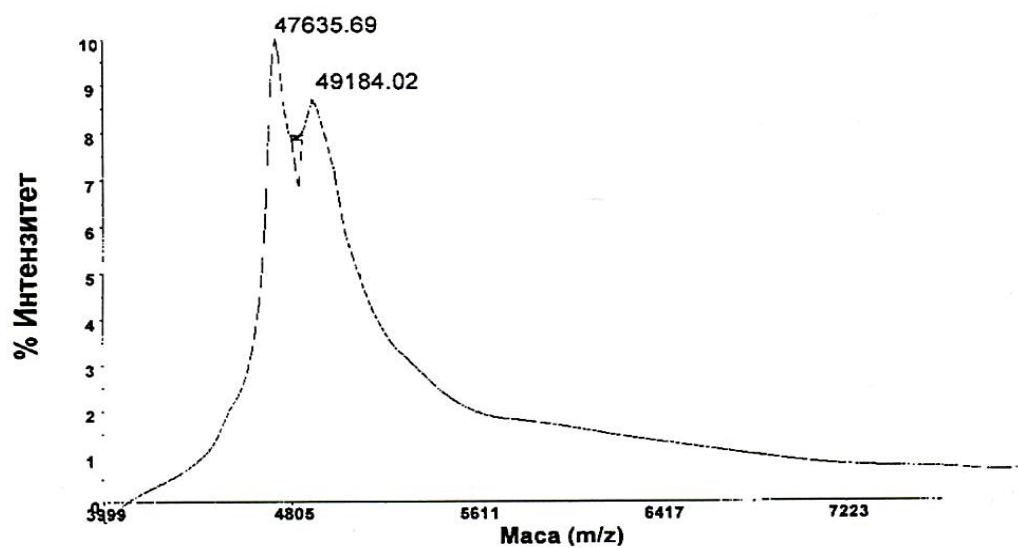
1. Herscovitz H. B., Harold W. W., Stravitzky A. B. Immunochemical and immunogenetic properties of a purified keyhole limpet hemocyanin. *Immunology* 22, 51-61 (1972).
2. Harris J. R., Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review: *Micron* 30, 597-623 (1999).
3. Lamm D. L., Morales A., Grossman H. B. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) immunotherapy of papillary and in situ transitional cell carcinoma of bladder. A multicenter phase I-II clinical trial. *J. Urol.* 155A, 1405 (1996).
4. Schnurr M., Galambos P., Scholz C., Then F., Dauer M., Endres S., Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in Vitro model for assessment of tumor vaccines. *Cancer. Res.* 61, 6445-6450 (2001).
5. Holtl L. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* 8(1), 3369-3376 (2002).
6. Wirguin I. Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(бета1-3)-Gal Mac determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* 40, 307-310 (1995).
7. WO 2005014647 - "Product And Composition Containing A Concholepas Concholepas Hemocyanin (CCH) Subunit A, and a method of use thereof".
8. EP 0621039 Keyhole Limpet Hemocyanin With High Antitumor Activity Against Bladder Cancer.
9. Dolashka-Angelova P., Stefanovic St., Dolashki A., Devreese B., Tzvetkova B., Voelter W., Van Beeumen J., Salvato B. A challenging insight on the structural unit 1 of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. Accepted in *Arch. Biochem. Biophys.* 1; 459(1): 50-8 (2007).
10. Dolashka-Angelova P., Beck A., Dolashki A., Beltramini M., Stevanovic S., Salvato B., Veolter W. Characterization of the carbohydrate moieties of the functional unit RvH1-a of *Rapana venosa* haemocyanin using HPLC /electrospray ionization MS and glycosidase digestion. *Biochem. J.* 374, 185-192 (2003).
11. Beck A., Hillen N., Dolashki A., Stevanovic S., Salvato B., Voelter W., Dolashka-Angelova P. Oligosaccharide structure of a functional unit RvH1-b of *Rapana venosa* hemocyanin using HPLC/electrospray ionization mass spectrometry. *Biochimie* 1-2 (2007).
12. Sandra K., Dolashka-Angelova P., Devreese B., Van Beeumen J. New insights in *Rapana venosa* hemocyanin N-glycosylation resulting from on-line mass spectrometric analyses. *Glycobiology*, 17(2): 141-56 (2007).

1 2 3

Фигура 1



Фигура 2



Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Г. Лъжовска

Пор. № 67928

Тираж: 40 СР