

(19)



(10) **LT 2014 060 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2014 060**

(51) Int. Cl. (2015.01): **C08B 37/00**
A61K 31/00

(22) Paraiškos padavimo data: **2014 04 14**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 02 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 „BIOCENTRAS“, V.A. Graičiūno g. 10, LT-02241 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Saulius GRIGIŠKIS, LT
Artur JAVMEN, LT
Mykolas MAURICAS, LT
Vilma ČIPINYTĖ, LT
Darius KACANAUSKAS, LT
Fortunatas GRYGAS, LT
Julius VAITOŠKA, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Reda ŽABOLIENĖ, Advokatės Redos Žabalienės kontora METIDA, Verslo centras VERTAS, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Terapinė β -gliukanų kompozicija, moduluojanti žmogaus imuninę sistemą ir inicijuojanti vėžinių ląstelių ardymą

(57) Referatas:

Šis išradimas priskiriamas farmacinių biotechnologijų sričiai. Jame aprašomas organizmo imunostimuliavimas, vėžinių ląstelių ardymo procesų inicijavimas bei metastazių susidarymo prevencija, panaudojant skirtingos molekulinės masės vandenyje tirpių beta-gliukanų kompozicijas. Šiame išradime taip pat aprašytas beta-gliukanų mišiniams gauti panaudojamas specifinis biokatalizatorius, produkto *Streptomyces rutgersensis* 88.

PATENTINĖ PARAIŠKA

Terapinė β -gliukanų kompozicija, moduliuojanti žmogaus imuninę sistemą ir inicijuojanti vėžinių ląstelių ardymą

TECHNIKOS SRITIS

Šis išradimas priskiriamas farmacinių biotechnologijų sričiai. Jame aprašomas organizmo imunostimuliavimas, vėžinių ląstelių ardymo procesų inicijavimas bei metastazių susidarymo prevencija, panaudojant skirtingos molekulinės masės vandenyje tirpių β -gliukanų kompozicijas. Šiame išradime taip pat aprašytas β -gliukanų mišiniams gauti panaudojamas specifinis biokatalizatorius produkuojamas *Streptomyces rutgersensis* 88.

TECHNIKOS LYGIS

Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad skirtingi polisacharidai, sudaryti iš pasikartojančių gliukozės monomerų yra dažniausiai planetoje sutinkami polimerai, tokie kaip celiuliozė, krakmolai, chitinas, mananas ir kiti plačiai paplitę junginiai. Vienas tokių gliukozės polimerų yra β -gliukanas. β -gliukanas yra polimerinė medžiaga, sudaryta iš gliukozės monomerų, sujungtų tarpusavyje β -glikozidiniais ryšiais. Gamtoje yra sutinkama daug skirtingų β -gliukano rūšių, kurie gaminami skirtingų organizmų – bakterijų, grybelių, augalų. Dažniausiai β -gliukanai randami organizmų ląstelių sienelėse (Javmen ir kt., 2013; Basic ir kt., 2009). Skirtingi β -gliukanai gali skirtis tarpusavyje skirtinga struktūra. Tai nulemia glikozidiniai ryšiai, kuriais yra sujunti gliukozės monomerai, nuo polimero šakotumo priklauso medžiagos fizikinės savybės. Pavyzdžiui, kurdlanas yra linijinis *Alcaligenes faecalis* β -(1-3) β -gliukanas, vandenyje tirpus polimeras, o celiuliozė sudėtingas, vandenyje netirpus, β -(1-4) gliukanas (Javmen ir kt., 2012; Basic ir kt., 2009; Novak ir kt. 2008; Peliosi ir kt. 2006). Buvo aptikta, kad neceliulioziniai, grybinės kilmės β -gliukanai dirgina žinduolių imuninę sistemą ir gali būti potencialiais žmogaus imuninės sistemos stimulatoriais (Chen ir kt., 2007). Dėl šios priežasties, grybinės kilmės β -gliukanai yra plačiai tiriami visame pasaulyje. Eksperimentų duomenys rodo, kad šie β -gliukanai apsaugo žinduolius nuo skirtingų

infekcijų ir padidina imuninės sistemos ląstelių citotoksiškumą vėžinėms ląstelėms (Chang ir kt., 2009; Vetvicka, 2011).

Kaip jau buvo minėta, β -gliukanus produkuoja skirtingi organizmai, todėl šios medžiagos yra išskiriamos iš kelių šaltinių. Toliau pateikti keli tokių šaltinių pavyzdžiai. Patente US6660722 B2 aprašytas β -gliukano laminarino, kuris yra iškirtas iš *Laminaria saccharina* mikroorganizmo, panaudojimas. Patente WO03/045414 naudojamas laminarinas išskirtas iš *Laminaria digitata*. Patente US 2007/0117777 A1 naudojamas β -gliukanas išskirtas iš *Aureobasidium pullulans*. Patente US 2008/0311243 A1 naudojamas β -gliukanas išskirtas iš skirtingų javų grūdų. Patente EP1361264 B1 naudojamas β -gliukanas išskirtas iš miežių. Patente US 2009/0098619 A1 aprašyta β -gliukano gamyba panaudojant skirtingus grybus, tokius kaip *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor* ir skirtingus *Lentula* grybų rūšis. Svarbiu imunoaktyvių β -gliukanų šaltiniu yra kepimo mielės *Saccharomyces cerevisiae* (Javmen ir kt., 2012; Basic ir kt., 2009; Novak ir kt. 2008; Hunter ir kt., 2002). *Saccharomyces cerevisiae* β -gliukano panaudojimas aprašytas šiuose patentuose: US 5622939, US 2006/0247205 A1, US 4810646, US 7550584 B2, WO 2006/119395 A2, WO 2004/082691 A1, WO 1997/002356 A1, US 2013/0310338 A1, WO92/13896, US 8323644 B2. Didelę dalį mielių masės sudaro β -gliukanai, kurie yra vieni pagrindinių ląstelės sienelių komponentai. Mielių ląstelių sienelė yra sudaryta iš dviejų sluoksnių – vidinio ir išorinio. Išorinis sluoksnis kontaktuoja su ląstelės išorėje esančia terpe ir yra suformuotas iš mananoproteinų ir baltymų. Tuo tarpu vidinis mielių ląstelės sienelės sluoksnis yra sudarytas iš daugelio skirtingų polisacharidų. Vidiniame polisacharidų sluoksnyje didžiausią procentą sudaro β -gliukanas, iš kurio formuojasi sluoksnio skeletas. Prie β -gliukano taip pat yra kovalentiškai prijungti ir kiti polisacharidai (Klis ir kt., 2006). Mielių sienelių vidinio sluoksnio β -gliukano pagrindą sudaro ilgos, β -1,3 ryšiais sujungtos gliukozės polimerinės grandinės, tarpusavyje papildomai sujungtos β -1,6 ryšiais. Tokiu būdu šios struktūros formuoja trimatį polimerinį tinklą protoplasto išorėje (Bacic et al., 2009). Vidutinis atskirų β -gliukano grandinių ilgis yra ~600 nm ir jas sudaro ~1500 gliukozės monomerų ($2,4 \times 10^5$ Da) (Bacic ir kt., 2009).

Saccharomyces cerevisiae mielių β -gliukano išskyrimui naudojami skirtingi būdai. Tam, kad būtų galima išskirti netirpų β -gliukaną iš *Saccharomyces cerevisiae* mielių ląstelių reikia atlikti šias procedūras:

- 1) suardyti mielių ląsteles ir atskirti netirpias ląstelių sienelės nuo skystos citoplazmos (kadangi β -gliukanas yra lokalizuotas ląstelių sienelėse);
- 2) iš netirpių ląstelių sienelių nuosėdų išskirti netirpų β -gliukaną.

Mielių ląstelių lizavimui yra taikoma daug įvairių būdų, kuriuos galima būtų suskirstyti į tris grupes: a) cheminiai, b) fizikiniai, c) fermentiniai. Cheminei ląstelių lizei gali būti naudojami natrio šarmo, druskos rūgštis, acto rūgštis ir kitų agresyvių cheminių medžiagų tirpalai (Pelizon ir kt., 2005; Zechner-Krpan ir kt., 2010). Taip pat mielių ląstelių ardymui gali būti naudojami fizikiniai ląstelių ardymo būdai: ultragarso arba homogenizatorių poveikis (Shokri ir kt., 2008). Dar viena mielių ląstelių ardymui naudojama metodų grupė yra fermentiniai ardymo būdai, kuriuos dar galima padalinti į du pogrupius:

- a) mielių ląstelių autolizė – ląstelė lizuojama savais, su ląstelės žuvimu susijusiais, vidiniais fermentais (Martinez-Rodriguez ir kt., 2001). Mielių ląstelių autolizė vyksta esant $>50^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, kai terpėje nėra maisto medžiagų. Procesas ilgas ir gali trukti keletą parų (Vosti ir kt., 1954; Hernawan, Fleet 1994).
- b) kitų organizmų sintetinamų fermentų, galinčių ardyti mieles, panaudojimas. Gamtoje yra nemažai mikroorganizmų, kurie išskiria mielių ląsteles lizuojančius fermentus į aplinką. Šie fermentai gali būti panaudojami mielių ląstelių ardymo procesams (Gilbert ir kt., 2002).

Po mielių ląstelių suardymo iš gautų netirpių ląstelių sienelių nuosėdų yra išskiriamas netirpus β -gliukanas. Tam paprastai yra naudojami šarmai, skirtingos rūgštys, vandenilio peroksidas ir kt. Dauguma ląstelių sienelių medžiagų po poveikio šarmais ir rūgštimis pereina į skystą fazę. β -gliukanas netirpsta šarme net esant aukštoms jo tirpalų koncentracijoms, todėl yra dažniausiai naudojamas β -gliukano atskyrimui nuo kitų mielių ląstelės sienelių polimerų (Jamas ir kt., 1989; Hayen ir kt., 2001; Shokri ir kt., 2008; Bacic ir kt., 2009; Bahl ir kt., 2009). Toliau pateikti kai kurie β -gliukano išskyrimo iš *S. cerevisiae* būdai, aprašyti skirtinguose patentuose. US 7.550.584 B2, US 4810646, WO 2004/082691 A1, US 5622939, US 7776843 B2, WO 2007/146416 patentuose aprašytas būdas, pagal kurį *S. cerevisiae* mielės iš pradžių apdorojamos šarmu, o po to rūgštimi. US 2013/0310338 A1 patente aprašytas būdas, pagal kurį *S. cerevisiae* mielės iš pradžių apdorojamos šarmu, o po to etanolium ir

vandeniu. WO92/13896 patente pateiktas būdas, pagal kurį *S. cerevisiae* mielės iš pradžių apdorojamos DMSO, o po to sieros rūgštimi.

V Yra žinoma, kad β -gliukanų poveikis imuninei sistemai priklauso nuo β -gliukano molekulių dydžio (Mantovani ir kt., 2008). Grybinės kilmės β -gliukanų atpažinimas vyksta per specifinius receptorius, kurie yra lokalizuoti leukocitų (makrofagai, neutrofilai, NK ląstelės ir kt.) paviršiuje. Nustatyta, kad β -gliukano sąveikos stiprumas su skirtingais receptoriais priklauso nuo β -gliukano molekulių dydžio (Akramienė ir kt., 2007; Mantovani ir kt., 2008). Pagrindiniai β -gliukano molekules atpažįstantys receptoriai yra: komplimento receptorius CR3, β -gliukanų receptoriumi vadinamas Dectin-1, Toll-like receptorius TLR-2, laktozilkeramidas ir kai kurie kiti receptoriai (Akramienė ir kt., 2007; Novak ir kt. 2008; Chen ir kt., 2007).

Bendra imunostimuliacija. Yra žinoma, kad β -gliukanai stimuliuoja imuninę sistemą kovai su infekcinėmis ligomis ir vėžiu. β -gliukanai po sąveikos su makrofagais, neutrofilais, NK ir dendritinėmis ląstelėmis, kitais leukocitais, turinčiais β -gliukaną atpažįstančius receptorius gali sukelti citokinų sintezę, pagerinti mikrobus fagocitozę ir ardymo savybes (Akramienė ir kt., 2007; Novak ir kt. 2008; Chen ir kt., 2007, Vetvicka ir kt., 2012). Makrofagai, kurie yra aktyvuoti β -gliukano molekulių, gali veikti ne tik prieš β -gliukanus turinčius antigenus. Taip pat jie veikia ir bet kokius kitus antigenus, įskaitant patogeninius mikroorganizmus, o taip pat ir prieš vėžines ląsteles. Tik makrofagų ląstelės geba fagocituoti β -gliukanus ir juos oksiduoti iki paprastesnės struktūros junginių. Tai susiję su tuo, kad žinduoliai neturi fermentų β -gliukanazių ir tai yra vienintelis β -gliukanų pašalinimo būdas žinduolių organizmuose (Novak ir kt. 2008).

V **Antivėžinis poveikis.** Yra žinoma, kad β -gliukanas gali stimuliuoti imuninę sistemą kovoti su vėžinėmis ląstelėmis (Akramienė ir kt., 2007; Novak ir kt. 2008; Chen ir kt., 2007, Vetvicka ir kt., 2012). Tikslus β -gliukano poveikio mechanizmas nėra išaiškintas (Vetvicka ir kt., 2012). Nustatyta, kad neutrofilai, makrofagai, eozinofilai ir NK ląstelės, po sąveikos su β -gliukano molekulėmis, gali ardyti vėžines ląsteles pagal CR3-DCC (nuo komplimento receptoriaus 3 priklausomas citotoksiškumas) mechanizmą, kuriame paprastai nedalyvauja (Vetvicka ir kt., 2012, Yan ir kt., 2009). Yra įrodyta, kad netirpus β -gliukanas žinduolių žarnyne yra fagocituojamas žarnyno makrofagų ir yra transportuojamas į blužnį, limfmazgius ir kraujo čiulpus. Kraujo čiulpuose makrofagai degraduoja dideles netirpias β -gliukano daleles iki mažesnių tirpių fragmentų (Yan ir kt.,

2009; Chan ir kt., 2009). Šios mažesnės β -gliukano molekulės gali sąveikauti su leukocitų CR3 receptoriaus lektino dalimi (neutrofilai, makrofagai, eosinofilai ir NK ląstelės) (Yan ir kt., 2009; Chan ir kt., 2009; Vetvicka ir kt., 2012). Daugelyje atvejų naviko ląstelės būna opsonizuotos antikūnais ir komplimento baltymu iC3b (Vetvicka ir kt., 2012). Neutrofilų, makrofagų, eozinofilų ir NK ląstelių CR3 receptorius atpažįsta tokias opsonizuotas vėžines ląsteles ir po sąveikos su mažomis tirpiomis β -gliukano ląstelėmis, gali jas ardyti, nors, kaip jau buvo minėta, paprastai šie leukocitai neardo vėžinių ląstelių pagal šį mechanizmą (Yan ir kt., 2009; Chan ir kt., 2009; Vetvicka ir kt., 2012). Normalios, nemutavusios, audinio ląstelės yra apsaugotos nuo tokio leukocitų puolimo, nes jos nebūna opsonizuotos iC3b komplimento baltymu (Vetvicka ir kt., 2012).

Šių žinių pagrindu yra užpatentuoti keli vėžio terapijos būdai. Patente US 6.660.722 B2 aprašytas vėžio terapijos būdas, pagal kurį navikų ardymui naudojamas tirpus β -gliukanas laminarinas (pavyzdyje aprašomas laminarinas iš *Laminaria saccharina*). Patente WO 2004/021994 A2 aprašytas vėžio terapijos būdas, kuris pagrįstas netirpių, dalelių pavidalo avižų, grybų ar mielių (*Saccharomyces cerevisiae* ir kitos rūšys) β -gliukanų panaudojimu kartu su komplimento sistema aktyvuojančiais antikūnais prieš vėžinį naviką ar prieš vėžio antigenus. Patente WO 2005/049044 A1 aprašytas vėžio terapijos būdas, pagal kurį gydymui naudojami sintetiniai β -gliukano oligomerai (iki 10 monomerų, optimaliai 2-3) kartu su monokloniniais antikūnais prieš determinantes, esančias vėžinių ląstelių paviršiuje. US 2009/0074761 A1 patento autoriai patentuoja terapines β -gliukano kombinacijas, kurios bus naudojamos kaip vaistas prieš vėžį. Patentuojami terapiniai deriniai sudaryti iš skirtingų β -gliukanų (tirpaus ir netirpaus) ir antikūnų – VEGF antagonistų. Šiame patente β -gliukanas yra išskiriamas iš mielių. Patentas US 8323644 B2 aprašo būdą, pagal kurį vėžys yra gydomas antivėžinių antikūnų ir β -gliukano deriniu. β -gliukano šaltinis yra *S. cerevisiae* mielės; β -gliukanas gali būti tirpios ir netirpios formų. Patente WO 2004/082691 aprašyta *S. cerevisiae* tirpaus β -gliukano gamyba, kuris toliau naudojamas vėžio gydymui ir prevencijai.

Taip pat β -gliukanas yra naudojamas kitiems susirgimams gydyti. Patente US 7776843 aprašytas kaulų lūžių gydymo būdas, panaudojant mielių β -gliukaną. Patentas

WO 2007/144616 aprašo būdą, pagal kurį *S. cerevisiae* mielių β -gliukanas naudojamas bendrai imunostimuliacijai.

Patentas US 8367641 B2 aprašo modifikuotą β -gliukanų sintezę, kuriuos galima panaudoti navikų ardymui, virusinių, bakterinių ir grybelinių infekcijų gydymui bei imuninės sistemos sutrikimams gydyti. Patente US 2008/0167268 aprašomas citokinų sintezės aktyvavimo būdas, naudojant dalelių pavidalo *S. cerevisiae* β -gliukaną. Patentas US 8318218 B2 aprašo svorio mažinimo būdą, panaudojant *S. cerevisiae* β -gliukaną. Patente US 2007/0117777 A1 aprašytas osteoporozės prevencijos ir terapijos būdas, pagal kurį navikų ardymui naudojamas β -gliukanas iš *Aurobasidium pullulans*.

Iš patentinių šaltinių analizės matyti, kad biomedicininiai tyrimai buvo atliekami dvejomis kryptimis:

- naujų β -gliukanų šaltinių paieška;
- β -gliukanų taikymas medicininėje terapijoje.

Kadangi skiriasi β -gliukanų išskyrimo būdai bei pirminiai jų šaltiniai, skiriasi ir jų terapinis poveikis. Vieni β -gliukanai taikomi imunomoduliavimui, kiti β -gliukanai daugiau ar mažiau efektyviai taikomi patogeninių mikroorganizmų slopinimui ir vėžinių ląstelių ardymui.

Imuninės sistemos atsakas į didesnės molekulinės masės vandenyje tirpius β -gliukanus yra makrofagų aktyvinimas. Jie suaktyvindavo imuninę sistemą ir padidindavo dendritinių ląstelių kiekį kraujyje. Tuo tarpu mažesnės molekulinės masės vandenyje tirpūs β -gliukanai yra kaip antras vėžinių ląstelių atpažinimo signalas pagal CR3-DCC mechanizmą. Tai įgalina juos naudoti kaip vėžinių ląstelių ardymo-žudymo iniciatorius.

Vėžinės ląstelės gana greitai adaptuojasi prie jas ardančių išorinių veiksnių. Chemoterapinio ar radiacinio spinduliavimo poveikio metu žuvusios vėžinės ląstelės apnuodija organizmą. Dėl šios priežasties vėžinių ląstelių tiesioginis ardymas daugeliu atvejų yra apsunkintas, kadangi į kraują patenka daug toksinių medžiagų. Todėl praktiškai neįmanoma išvengti metastazių susidarymo ir sveikų ląstelių ardymo. Šie terapiniai būdai nėra atrankūs vėžinėms ir sveikoms ląstelėms. Žuvusių ląstelių irimo produktai apsunkina maistinių medžiagų transportą į ląsteles ir dėl šios priežasties vėžinės ląstelės migruoja į kitas organizmo vietas, tokiu būdu atsirandant metastazėms.

Aukščiau aprašyti organizmo imunostimuliacijos ir vėžinių ląstelių ardymo būdai pilnai neišsprendžia visų su vėžinių susirgimų terapija susijusių problemų:

- sudėtingas vėžinių susirgimų terapijos procesas, reikalaujantis aukštos kvalifikacijos žmogiškųjų išteklių ir technologijų;
- nėra universalių kompleksinių preparatų, skirtų ir imunomoduliacijai ir vėžinių ląstelių ardymo iniciacijai;
- nėra preparatų ir būdų vėžinių ląstelių ardymo greičiui valdyti;
- nėra efektyvių nei sintetinių nei biologinės kilmės preparatų, skirtų metastazių plitimui stabdyti;
- nėra kompleksinių preparatų, prie kurių vėžinės ląstelės negalėtų adaptuotis.

IŠRADIMO ESMĖ

Išradimo tikslas yra sukurti terapinę β -gliukanų kompoziciją, moduliuojančią žmogaus imuninę sistemą ir inicijuojančią vėžinių ląstelių irimo procesus.

Šio išradimo esmė yra β -gliukanų kompozicija, susidedanti iš skirtingo molekulinio svorio vandenyje tirpių β -gliukanų, galinčių tiek imunomoduliuoti, tiek inicijuoti vėžinių ląstelių ardymo procesus.

Didelės molekulinės masės β -gliukanai aktyvina fagocitus, skatina γ -interferono sintezę ir tokiu būdu stimuliuoja organizmo imuninę sistemą bei ardo pavienes vėžines ląsteles.

Mažos molekulinės masės vandenyje tirpūs β -gliukanai sąveikaudami su neutrofilų CR3 receptoriais inicijuoja visų vėžinių ląstelių ardymą. Tam, kad vėžinių ląstelių ardymas vyktų optimaliai ir nesukeltų letalinės organizmo baigties, svarbu išlaikyti didelės ir mažos molekulinės masių β -gliukanų santykį jų kompozicijoje.

Kad būtų galima valdyti vėžinių ląstelių ardymą, tam panaudojamos kompozicijos su keičiamomis skirtingos molekulinės masės β -gliukanų koncentracijomis.

Metastazių susidarymui išvengti, yra ruošiama β -gliukanų kompozicija su imunomoduliuojančiais ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančiais β -gliukanų komponentais, kurių koncentracijos pastovios.

Šiame išradime aprašytas vėžinių ląstelių ardymo būdas nuo žinomų skiriasi tuo, kad netirpus β -gliukanas yra išskirtas *Sacharomyces cerevisiae* specifinės fermentinės

hidrolizės būdu, ir iš gautų vandenyje tirpių β -gliukanų sudaromos terapeutinės kompozicijos.

Antras skirtumas pasireiškia tuo, kad tirpūs β -gliukanai yra gaunami specifinės fermentinės hidrolizės būdu, panaudojant išgrynintą β -1,3-gliukanazę iš *Streptomyces rutgersensis* 88.

Trečias skirtumas pasireiškia tuo, kad β -gliukanai yra specifiškai hidrolizuojami, panaudojant β -1,3-gliukanazę iš *Streptomyces rutgersensis* 88 iki tam tikros molekulinės masės oligosacharidų.

Ketvirtas skirtumas pasireiškia tuo, kad tirpūs β -gliukanai yra frakcionuojami į imunomodulatorius ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančius agentus.

Penktas skirtumas pasireiškia tuo, kad vėžinių ląstelių ardymo proceso efektyvumui padidinti yra apjungiamos skirtingos molekulinės masės β -gliukanų fermentinės hidrolizės frakcijos, kurių ribiniai klampos skaičiai yra intervale nuo 0,3 iki 0,01, geriau nuo 0,08 iki 0,02.

Šeštas skirtumas pasireiškia tuo, kad siekiant išvengti vėžinių ląstelių apsauginių sistemų adaptacijos, yra naudojami skirtingos molekulinės masės vėžinių ląstelių ardymą inicijuojantys agentai.

Septintas skirtumas pasireiškia tuo, kad ardant vėžines ląsteles, pirmiausia yra atliekama organizmo imunomoduliacija, o po to vėžinės ląstelės yra pažymimos vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančiu agentu.

Aštuntas skirtumas pasireiškia tuo, kad imunostimuliuojantys biopreparatai ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojantys agentai yra įvedami pakaitomis.

Devintas skirtumas pasireiškia tuo, kad imunostimuliuojančių biopreparatų ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančių agentų įvedimo į organizmą tvarka yra keičiama iki vėžinių ląstelių suardymo.

Dešimtas skirtumas pasireiškia tuo, kad imunostimuliatoriai ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojantys agentai yra įvedami į organizmą *in vitro* palaipsniui didinant jų koncentracijas, siekiant išvengti sveikų organizmo ląstelių pažeidimo.

Vienulištas skirtumas pasireiškia tuo, kad vėžinių ląstelių ardymo procesas yra dirbtinai stabdomas, išlaikant neaukštas vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančių agentų koncentracijas ir aukštą imunostimuliaciją tam, kad iš vėžinių ląstelių sudarytas audinys

irtų palengva, tokiu būdu išvengiant organizmo nuodijimo toksiniais vėžinių ląstelių produktais.

Dvyliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad imunostimuliatorių ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančių preparatų koncentracijos nuo 0 iki 1000 mg/ml yra keičiamos iki vėžinių ląstelių ardymo proceso pabaigos.

Tryliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad siekiant išvengti antrinio vėžinių ląstelių augimo (metastazių), vėžinių ląstelių ardymo procesas yra kartojamas (5-9 punktai), palaikant vėžinėms ląstelėms suardyti pakankamas imunostimuliatorių ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančių agentų koncentracijas.

Keturioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad siekiant išvengti vėžinių ląstelių adaptacijos jas ardantiems imuninės sistemos aktyviesiems komponentams, vėžinių ląstelių imunoatpažinimui yra naudojami skirtingos molekulinės masės vandenyje tirpūs β -gliukanai.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig. 1. Pagrindinio ir darbinio *S. rutgersensis* 88 kultūros bankų paruošimas (I etapas)

Fig. 2. *Streptomyces rutgersensis* 88 kamieno mieles lizuojančio kompleksio biosintezė (II etapas)

Fig. 3. Fermento β -1,3-gliukanazės chromatografinis gryninimas (III etapas)

Fig. 4. Vandenyje netirpaus β -gliukano preparato paruošimas (IV etapas)

Fig. 5. Vandenyje tirpių β -gliukano preparatų paruošimas (V etapas)

Fig. 6. Frakcijų po chromatografinio atskyrimo bei apjungtų frakcijų priklausomybė nuo bendro angliavandenių kiekio

Fig. 7. Plonasluoksnės chromatogramos, prieš frakcionavimą ir po frakcionavimo proceso: a) prieš chromatografiją; b) po chromatografijos (1, 2, 3, 4, 5, 6 frakcijos)

Fig. 8. Ribinio klampos skaičiaus priklausomybė nuo frakcijos komponentų molinės masės

Fig. 9. Terapinių β -gliukanų kompozicijų veikimo principinė schema

Fig. 10. β -gliukanų preparatų įtaka IFN- γ ekspresijos padidėjimui *in vivo*

Fig. 11. Žuvusių vėžinių ląstelių kiekis procentais po poveikio β -gliukanų preparatų kompozicijomis *in vitro*

TINKAMIAUSI ĮGYVENDINIMO VARIANTAI

Vandenyje netirpaus β -gliukano ir vandenyje tirpių β -gliukanų preparatų gamybai yra naudojamos komercinės *Sacharomyces cerevisiae* kepimo mielės (IHEM numeris: 7071), atitinkančios ISO 17025 standarte nurodytus reikalavimus.

Šių preparatų išskyrimui iš mielių sienelių ir jų hidrolizei yra naudojamas lizuojantis kompleksas, gautas iš *Streptomyces rutgersensis* 88. Pirmiausia, siekiant gauti kompleksą, turintį optimaliausius mieles lizuojantį ir β -gliukanazinį aktyvumą, yra atliekama *Streptomyces rutgersensis* 88 selekcija ir kultūros saugojimui paruošiami ląstelių bankai (Fig. 1).

Toliau pateikiamos šį lizuojantį kompleksą produkuojančio mikroorganizmo charakteristikos.

***Streptomyces rutgersensis* 88** kamienas (UAB „Biocentras“ mikroorganizmų kolekcijos registracijos numeris K-91-2) buvo išskirtas iš dirvožemio Lietuvoje.

Ląstelės. Ląstelės gramteigiamos, sudaro šakotus hifus, kurių diametras yra 0,4-0,8 μm . Kultūrai subrendus, hifų galuose susidaro ovalių ar pailgų sporų grandinėlių. Sporos yra nejudrios, jų paviršius lygus.

Kultūrinės. Auginant kultūrą ant standžios kukurūzinės terpės Nr. 2, susiformuoja gausus micelis (paviršinis: pradžioje rudas, o kultūrai subrendus susidaro sporos ir micelis įgauna rusvai-pilkšvai-baltą spalvą, substratinis: rudas). Ant sojos-peptono terpės formuojasi baltas paviršinis ir rusvas substratinis micelis.

Fiziologinės-biocheminės savybės. Aerobas, katalazės reakcija teigiama, optimali augimo temperatūra 28- 30 °C, pH: 7,0 – 7,8. Kultūra neatspari rūgščiai. Hidrolizuoja kazeiną, želatiną, β -gliukanus, krakmolo nehidrolizuoja, lizuoja mielių ir bakterijų ląstelių sieneles. Naudoja gliukozę, arabinozę, ksilozę, fruktozę, manitą. Nenaudoja inozito, sacharozės, ramnozės ir rafinozės.

Remiantis 16S rRNR geno seka, pavaizduota SEQ ID Nr. 1, šis mikroorganizmas yra artimiausias *Streptomyces rutgersensis* rūšiai.

Siekiant užtikrinti nepertraukiamą β -gliukanų preparatų gamybą, paruošiamas didesnis mieles lizuojančio ir vandenyje netirpų β -gliukaną hidrolizuojančio komplekso kiekis (Fig. 2).

Po mieles lizuojančio komplekso biosintezės gautas *Streptomyces rutgersensis* 88 kultūrinis skystis yra naudojamas vandenyje netirpaus β -gliukano išskyrimui iš mielių sienelių. Tuo tarpu prieš vandenyje netirpaus β -gliukano hidrolizę, β -1,3-gliukanazė iš kultūrinio skysčio gryninama chromatografiškai, kad galutiniuose vandenyje tirpiuose β -gliukanų preparatuose būtų kuo mažiau nepageidaujamų priemaišų (Fig. 3).

Vandenyje tirpių β -gliukanų preparatų gavimui iš mielių sienelių iš pradžių yra išskiriamas netirpus β -gliukanas, naudojant mieles lizuojantį kompleksą ir 2 M NaOH vandeninį tirpalą (Fig. 4).

Išvalytas vandenyje netirpus β -gliukanas specifiškai hidrolizuojamas, naudojant chromatografiškai apvalytą *Streptomyces rutgersensis* 88 mieles lizuojantį kompleksą, pasižymintį gliukanaziniu aktyvumu (Fig. 5). Gautas vandenyje tirpus hidrolizatas išskirstomas į vandenyje tirpių β -gliukanų frakcijas gelchromatografijos būdu. Frakcionavimo procesas papildomai standartizuojamas vizkozimetriniu būdu nustatant vandenyje tirpių β -gliukanų frakcijų ribinius klampos skaičius.

Žemiau aprašomi keli išradimo būdo pritaikymo pavyzdžiai.

Vandenyje tirpių β -gliukanų frakcionavimas

Vandenyje tirpių β -gliukanų preparatų gamybai kaip substratas yra naudojamas iš kepimo mielių *Saacharomyces cerevisiae* išskirtas vandenyje netirpus β -gliukanas. Vandenyje netirpaus β -gliukano hidrolizei yra naudojamas *Streptomyces rutgersensis* 88 fermentas β -1,3-gliukanazė. Po vandenyje netirpaus β -gliukano hidrolizės proceso gautas tirpių β -gliukano molekulių mišinys yra koncentruojamas. Gautas koncentratas, susidedantis iš skirtingos molinės masės β -gliukanų, išskirstomas į 5 frakcijas, panaudojant gelchromatografiją.

Koncentruotas vandenyje tirpių β -gliukanų mišinys leidžiamas per gelchromatografinę koloną, užpildytą SEPHACRYL S-200 sorbentu. Gelchromatografijos proceso metu renkamas nustatytas frakcijų kiekis. Judrioji chromatografijos fazė – 0,01 M koncentracijos kalio fosfatinis buferinis tirpalas, kurio pH lygus 7. Įvedamo β -gliukano mišinio tūris – ne daugiau 5% nuo bendro kolonos tūrio,

geriausia ne daugiau negu 3%. Po chromatografinio atskyrimo surinktose frakcijose nustatoma angliavandenių koncentracija.

Po frakcionavimo proceso didžiausią angliavandenių koncentraciją turinčios frakcijos, kurias daugiausia sudaro maži gliukozės oligomerai (įprastai paskutinės frakcijos), apjungiamos į vieną frakciją. Kitos frakcijos apjungiamos į 5 stambesnes vienodo tūrio frakcijas pagal jų buvusį eiliškumą, t. y. nuo žemiausio iki aukščiausio frakcijų numerio. Apjungtos frakcijos analizuojamos šiais būdais: plonasluoksnės chromatografijos būdu ir matuojant jų ribinius klampų skaičius.

Tipinė vandenyje tirpių β -gliukanų frakcionavimo proceso chromatograma (karbohidratų koncentracija) yra pavaizduota Fig. 6 ir Fig. 7.

Chromatografiškai atskirtų vandenyje tirpių β -gliukanų ribinio klampos skaičiaus nustatymas kapiliariniu viskozimetru

Molekulinių sietų chromatografijos būdu buvo gautos šešios vandenyje tirpių β -gliukanų frakcijos. Po to kiekvienoje frakcijoje kapiliariniu viskozimetru išmatuojami ištekėjimo laikai ir apskaičiuojami ribiniai klampos skaičiai. Procedūra kartojama 4-5 kartus ir iš gautų duomenų apskaičiuojamas ištekėjimo laiko aritmetinis vidurkis. Iš gautų duomenų grafiškai nustatoma redukuotoji klampa ir ribiniai klampos skaičiai. Ribinis klampos skaičius nustatomas redukuotąją klampą ekstrapoliuojant į be galo mažą koncentraciją. Per gautus taškus nubrėžta tiesė ant ordinatės ašies atkerta ribinio klampos skaičiaus vertę.

Ribinis klampos skaičius yra lyginamas tarp tų pačių β -gliukanų tirpalų frakcijų, jei jų redukuotosios klampos išmatuotos vienodomis sąlygomis. Redukuotoji klampa yra matuojama esant 25 °C temperatūrai, vienodiems tirpalų tūriams ir esant toms pačioms jų koncentracijomis.

Praskiestų β -gliukanų tirpalų klampa yra tiesiogiai susijusi su β -gliukanų makromolekulių dydžiu ir konformacija. Naudojant kapiliarinį viskozimetą yra nustatoma gliukanų tirpalų savitoji klampa, redukuotoji klampa, ribinis klampos skaičius. Visos klampos vertės apskaičiuojamos lyginant gliukanų tirpalo ištekėjimo per kalibruotą kapiliarą trukmę su tirpiklio ištekėjimo trukme (Fig. 8).

Ribinis klampos skaičius yra molekulinės masės funkcija, kurią nusako Marko ir Huvinko lygtis:

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (1)$$

arba

$$M = \sqrt[\alpha]{\frac{[\eta]}{K}} \quad (2)$$

kurioje:

K ir α yra empirinės konstantos konkrečiam polimerui;

M-molekulinė polimero masė, (g/mol);

$[\eta]$ -ribinis klampos skaičius, (ml/g arba 100ml/g).

Didėjant frakcijos numeriui, mažėja ribinis klampos skaičius, o kartu ir tirpių β -gliukanų molinė masė.

Su paruoštais β -gliukanų preparatais ruošiamos terapinės kompozicijos, optimaliai imunostimuliuojančios organizmą ir inicijuojančios vėžinių ląstelių irimo procesus bei užtikrinančios prevencinį poveikį prieš metastazių išplitimą į sveikus audinius (Fig. 9).

β -gliukanų kompozicijos ir jų panaudojimas imunostimuliavimui bei vėžinių ląstelių ardymo iniciacijai

Iš į skirtingas frakcijas išskirstytų β -gliukanų sudaromos kompozicijos, skirtos vėžiniams susirgimams gydyti 2 etapais (iš viso 26 dienos).

Pirmasis vėžinių susirgimų gydymo etapas trunka 16 dienų. Jo metu iš 5 kintamos koncentracijos preparatų, sudarant skirtingas kompozicijas, organizmas imunostimuliuojamas ir inicijuojamas vėžinių ląstelių ardymo procesas (1a lentelė).

1a lentelė. β-gliukanų kompozicijų ruošimas pirmam imunostimuliavimo ir vėžinių ląstelių ardymo etapui

Preparato vartojimo dienų skaičius	Programa preparatui				Trumpagrandžiai gliukanai 9.6 mg/ml-MMM** gliukanų C _{angliavandenių}
	Ilgagrandžiai gliukanai 5.29 mg/ml-DMM* gliukanų C _{angliavandenių}	12.92 mg/ml- C _{angliavandenių}	23.03 mg/ml- C _{angliavandenių}	8.76 mg/ml- C _{angliavandenių}	
	1	2	3	4	
1	10mg 1.89ml+8.11ml(H ₂ O)				
2	20mg 3.78ml+6.22ml(H ₂ O)				
3		10mg 0.77ml+9.23ml(H ₂ O)			
4		20mg 1.54ml+8.46ml(H ₂ O)			
5			10mg 0.43ml+9.57ml(H ₂ O)		
6			20mg 0.86ml+9.14ml(H ₂ O)		
7				10mg 1.14ml+8.86ml(H ₂ O)	
8				20mg 2.28ml+7.72ml(H ₂ O)	
9					10mg 1.04ml+8.96ml(H ₂ O)
10					20mg 2.08ml+7.92ml(H ₂ O)

*DMM-didesnės molekulinės masės; **MMM – mažesnės molekulinės masės.

Pirmąsias 10 veikimo dienų dozę sudarančių skirtingų β-gliukanų preparatų tirpalų masės lygios 10 mg, todėl dozę sudarančių skirtingų β-gliukanų tirpalų ir distiliuoto vandens tūriai apskaičiuojami atitinkamai pagal (3) ir (4) formules.

$$V(\text{gliukanų tirpalo}) = \frac{m_{\text{gliukanų}}}{C_{\text{preparato}}} = \frac{10\text{mg}}{C_{\text{bendras}}} \quad (3)$$

$$V(H_2O_{\text{dist.}}) = V(\text{bendras}) - V(\text{gliukanų tirpalo}) = 10\text{ ml} - V(\text{gliukanų tirpalo}) \quad (4)$$

1b lentelė. β-gliukanų kompozicijų ruošimas pirmam imunostimuliavimo ir vėžinių ląstelių ardymo etapui

Preparato vartojimo dienų skaičius	Programa preparatui				Trumpagrandžiai gliukanai
	Ilgagrandžiai gliukanai				
	5.29 mg/ml-DMM* gliukanų $C_{\text{angliavandenių}}$	12.92 mg/ml- $C_{\text{angliavandenių}}$	23.03 mg/ml- $C_{\text{angliavandenių}}$	8.76 mg/ml- $C_{\text{angliavandenių}}$	9.6 mg/ml-MMM** gliukanų $C_{\text{angliavandenių}}$
	1	2	3	4	5
11	20mg 3.78ml+6.22ml(H ₂ O)				20mg 2.08ml+7.92ml (H ₂ O)
12		20mg 1.54ml+8.46ml(H ₂ O)		20mg 2.28ml+7.72ml(H ₂ O)	
13			40mg 1.72ml+18.28ml(H ₂ O)		
14	30mg 5.67ml+4.33ml(H ₂ O)				30mg 3.12ml+6.88ml (H ₂ O)
15		30mg 2.31ml+7.69ml(H ₂ O)		30mg 3.42ml+6.58ml(H ₂ O)	
16			60mg 5.22ml+14.78ml(H ₂ O)		

*DMM-didesnės molekulinės masės; **MMM – mažesnės molekulinės masės.

Tuo tarpu 11-16 veikimo dienomis dozę sudarančių skirtingų β-gliukanų preparatų tirpalų kiekiai yra keičiami, t.y lygūs 20 mg, 30 mg, 40 mg ir 60 mg. Šiais atvejais dozę sudarančių skirtingų β-gliukanų tirpalų ir distiliuoto vandens tūriai apskaičiuojami atitinkamai pagal (5) ir (6) formules.

$$V(\text{gliukanų tirpalo}) = \frac{m_{\text{gliukanų}}}{C_{\text{preparato}}} \quad (5)$$

$$V(H_2O_{dist.}) = V(bendras) - V(gliukanų tirpalo) = 10 \text{ ml} - V(gliukanų tirpalo) \quad (6)$$

Antrasis vėžinių susirgimų gydymo etapas trunka 10 dienų (17-26 dienos). Jo metu iš 5 mažiausios pakankamos pastovios koncentracijos preparatų, sudarant skirtingas kompozicijas, organizmas veikiamas tam, kad nesusidarytų metastazės (2 lentelė).

2 lentelė. β -gliukanų kompozicijų ruošimas antram vėžinių ląstelių metastazavimo prevencijos etapui

Preparato vartojimo dienų skaičius	Programa preparatui				Trumpagrandžiai gliukanai C _{cukrų}
	Ilgagrandžiai gliukanai 5.29 mg/ml-DMM* gliukanų C _{cukrų}	12.92 mg/ml- C _{cukrų}	23.03 mg/ml- C _{cukrų}	8.76 mg/ml- C _{cukrų}	
	1	2	3	4	
1		10mg 0.77ml+9.23ml(H ₂ O)	20mg 0.87ml+9.13ml(H ₂ O)		
2		15mg 1.16ml+8.84ml(H ₂ O)	30mg 1.3ml+8.7ml(H ₂ O)		
3		10mg 0.77ml+9.23ml(H ₂ O)	20mg 0.87ml+9.13ml(H ₂ O)		
4		15mg 1.16ml+8.84ml(H ₂ O)	30mg 1.3ml+8.7ml(H ₂ O)		
5		10mg 0.77ml+9.23ml(H ₂ O)	20mg 0.87ml+9.13ml(H ₂ O)		
6		15mg 1.16ml+8.84ml(H ₂ O)	30mg 1.3ml+8.7ml(H ₂ O)		
7		10mg 0.77ml+9.23ml(H ₂ O)	20mg 0.87ml+9.13ml(H ₂ O)		
8		15mg 1.16ml+8.84ml(H ₂ O)	30mg 1.3ml+8.7ml(H ₂ O)		
9		10mg 0.77ml+9.23ml(H ₂ O)	20mg 0.87ml+9.13ml(H ₂ O)		
10		15mg 1.16ml+8.84ml(H ₂ O)	30mg 1.3ml+8.7ml(H ₂ O)		

*DMM-didesnės molekulinės masės; **MMM – mažesnės molekulinės masės.

Organizmą veikiant 17-26 dienomis, dozę sudarančių skirtingų β -gliukanų preparatų tirpalų kiekiai yra keičiami, t.y lygūs 10 mg, 15 mg, 20 mg ir 30 mg. Šiais atvejais dozę sudarančių skirtingų β -gliukanų tirpalų ir distiliuoto vandens tūriai taip pat apskaičiuojami pagal (5) ir (6) formules.

Organizmo atsakas į poveikį β -gliukanų terapinėmis kompozicijomis

Organizmo imunostimuliacija. IFN- γ (γ -interferonas) didina žinduolių imuninės sistemos antiinfekcines ir antivirusines savybes, gerina fagocitozę ir yra svarbus imuninio atsako citokinas. IFN- γ preparatai naudojami skirtingų ligų gydymui. Dėl šių priežasčių IFN- γ sintezės pokytis yra naudojamas organizmo imunostimuliacinio poveikio įvertinti.

Subrendusios „BALB/c“ pelės (5 kontrolinės ir po 5 pelės kiekvienam preparatui; viso 35 pelės) savaitę buvo šeriamos skirtingais β -gliukanų preparatais (1 netirpus vandenyje ir 5 tirpus vandenyje; iš viso 6). Pelių šėrimo 2-ąją ir 7-ąją paromis ir po šėrimo praėjus 2 savaitėms, pelių kraujyje yra stebimas mRNR lygis. β -gliukano preparatai padidina IFN- γ sintezę 2-4 kartus. Pelių racione nesant β -gliukano preparatų, IFN- γ sintezė grįžta į pradinį lygį (Fig. 10).

Vėžinių ląstelių ardymo iniciacija. β -gliukanų preparatai pasižymi antivėžiniu poveikiu. Terapijoje naudojamos vandenyje tirpių β -gliukanų preparatų kompozicijos. „BALB/c“ pelės 2 savaites šeriamos imunostimuliuojančiais β -gliukanais. Po bendros imunostimuliacijos iš pelių paimamas kraujas ir įvedamas į MH22a vėžinių pelių ląstelių kultūros kultivacijos terpę. Taip pat papildomai į MH22a kultivacijos terpę įvedamas vandenyje tirpių β -gliukanų mišinys.

Parą paveikus šiuo mišiniu, analizuojamas vėžinių ląstelių gyvybingumas. Gauti rezultatai rodo, kad po MH22a kultūros ląstelėms kompleksinio poveikio imunizuotu pelių krauju ir vandenyje tirpių β -gliukanų mišiniu, žuvusių vėžinių ląstelių kiekis padidėja 4-6 kartus, lyginant su:

- imunizuotu pelių krauju;
- neimunizuotu pelių krauju kartu su vandenyje tirpių β -gliukanų mišiniu;
- neimunizuotu pelių krauju;
- vandenyje tirpių β -gliukanų mišiniu;
- ląstelėmis, nepaveiktomis minėtais komponentais.

SEKOS

SEQ ID Nr. 1

<110> UAB „Biocentras“

<120> Terapinė β -gliukanų kompozicija, moduluojanti žmogaus imuninę sistemą
ir inicijuojanti vėžinių ląstelių ardymą

<160> SEQ ID Nr. 1

<211> 818 bazių porų

<212> 16S rRNR

<213> *Streptomyces rutgersensis* 88

<400> 1

NATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATC
TGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCGT
CCATCGCATGGTGGATGGTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTA
TCAGCTAGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG
AGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA
TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTA
CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGC
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCG
GTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGA
GTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGNTGAAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGGTGGCGAANGCGGANCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGANTAGATACCCTGNNAGTNCACGNCGTANACGGNG
GGCACTAGGNGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCNNANCTAANNCNNTAANN
NNCCCNCCNGGGGANNNNGGNCNNAAGGNTAANNTCAN

LITERATŪRA:

1. Bacic A, Fincher GB, Stone BA (2009). Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides. Academic Press, Burlington, San Diego, London, New York.
2. Javmen A, Grigiskis S, Gliubutė R (2012) β -glucan extraction from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using *Actinomyces rutgersensis* 88 yeast lyzing enzymatic complex. *Biologija* 58: 51-59.
3. Novak M., Vetvicka V. 2008. B-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanism of action. *J. Immunotoxic* 5: 47–57.
4. Javmen A, Grigiskis S, Rudenkov M, Mauricas M. (2013). Purification and partial characterization of a novel β -1,3-endoglucanase from *Streptomyces rutgersensis*. *Prot J* 32: 411-417.
5. Bulone V, Heux L, Pelosi M (2006). Polymorphism of curdlan and (1-3)-b-D-glucans synthesized *in vitro*: $A^{13}C$ CP-MAS and X-ray diffraction analysis. *Carbohydrate Polymers* 66: 199 – 207.
6. Vetvicka V (2011) Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World J Clinic Oncol* 2: 115–119.
7. Hunter JKW, Gault RA, Berner MD (2002). Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Appl Microbiol* 35: 267–271.
8. Klis FM, Boorsma A, De Grot PWJ (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 185–202.
9. Chen J, Seviour R (2007). Medicinal importance of fungal β -(1-3),(1-6)-glucans. *Mycol Research* 3: 635–652.
10. Chan GC, Chan WC, Daniel Man-Yuen Sze D (2009) The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol & Oncol* 2009; 2–25.
11. Petravic-Tominac V, Zechner-Krpan V, Grba S, Srećec S, Panjkota-Krbavčič I, Vidovič L (2010). Biological Effects of Yeast β -Glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 75: 149–158.

12. Pang Z, Otaka K, Suzuki Y, Goto K, Ohnishi M (2004). Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Arthrobacter* sp., J Biol Macromol 4: 57-66.
13. Klis F M, Boorsma A, De Grot PWJ (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 23: 185-202.
14. Zechner-Krpan V, Petravic-Tominac V, Gospodaric I, Sajli L, Dakovic S, Filipovic-Grcic J. (2010). Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. Food Technology and Biotechnology, 48: 189-197.
15. Shokri H, Asadi F, Khosravi AR (2008). Isolation of β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Natural Product Research 22: 414–421.
16. Martinez-Rodriguez A J, Polo M C, Carrascosa A V. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. International Journal of Food Microbiology, 2001; nr. 71, 45–51 psl.
17. Vosti D C, Joslyn M A. Autolysis of Baker's Yeast. Applied and Environmental Microbiology, 1954; nr 2, 79–84 psl.
18. Hernawan F, Fleet G. Chemical and citological changes during the autolysis of yeast. Journal of Industral Microbiology, 1995; nr.14
19. Gilbert R W, Kulandai J, Langeris W H, Sime K J, Smith C G, Wheatcroft R. Production of β -glucan-mannan preparations by autolysis of cells under certain pH, temperature and time conditions, US Patent 6444448, 2002 m.
20. Jamas S, Rha C K, Sinskey A J. Glucan compositions and proces for preparation thereof, US Patent NR. 4810646, 1989 m.
21. Hayen DG, Pollmann DS. Animal feeds comprising yeast glucan, US Patent 6214337, 2001 m.
22. Bahl A K., Vercellotti S V, Vercellotti J R, Klein E. Methods of purifying β -glucans, US Patent 7550584, 2009 m.
23. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt. The Prokaryotes. 3 ed. 2006.
24. Patchen M L, Macvittie T J. Stimulated hemopoiesis and enhanced survival following glucan treatment in sublethally and lethally irradiated mice. International Journal of Immunopharmacology, 1985; nr. 7, 923-932 psl.
25. Patchen M L, Macvittie T J. Comparative Effects of Soluble and Particulate Glucans on Survival in Irradiated Mice. Journal of Biological Response Modifiers, 1986; nr. 5, 45-60 psl.

26. Babineau T J, Marcello P, Swails W, Kenler A, Bistran B, Forse R A. Randomized phase I/II trial of a macrophage-specific immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. *Annals of surgery*, 1994; nr. 220, 601–609 psl.
27. Liang J, Melican D, Cafro L, Palace G, Fissete L, Armstrong R, Patchen M L. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *International Journal of Immunopharmacology*, 1998; nr. 20, 484-503 psl.
28. Gu Y, Takagi Y, Nakamura T, Hasegawa T, Suzuki I, Oshima M, Tawaraya H, Niwano Y. Enhancement of Radioprotection and Anti-Tumor Immunity by Yeast-Derived β -Glucan in Mice. *Journal of Medicinal Food*, 2005; nr 8, 154-158 psl.
29. Yan J, Allendorf D J, Brandley B. Yeast whole glucan particle (WPG) β -glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opinion Biological Therapy*, 2005; nr 5, 691-702 psl.
30. Mantovani M S, Bellini M F, Angeli J P F, Oliveira R J, Silva A F, Ribeiro L C. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer, *Mutation Research*, 2008; nr. 658, 154–161 psl.
31. Akraminė D, Kondrotas A, Didžiapetrienė J, Kėvelaitis E (2007). Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina* 43(8): 597–606.
32. Vetvicka V, Vetvickova J (2012). B 1,3-Glucan in Cancer Treatment. *American Journal of Immunology* 8(2): 38-43.
33. Yan J, Driscoll M, Hansen R, Ding C, Cramer DE (2009). Therapeutic potential of various β -glucan sources in conjunction with anti-tumor monoclonal antibody in cancer therapy. *Cancer Biology and Therapy* 8(3): 216-223.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Tirpaus β -gliukano gavimo būdas iš vandenyje netirpių β -gliukanų, besiskiriantis tuo, kad minėtas būdas apima šias pakopas:

- a) netirpių β -gliukanų išskyrimą iš mielių sienelių, naudojant mieles lizuojantį kompleksą ir 2M NaOH;
- b) netirpių β -gliukanų specifinį hidrolizavimą, panaudojant išgrynintą β -1,3-gliukanazę iš *Streptomyces rutgersensis* 88, siekiant gauti tirpius β -gliukanus;
- c) minėtų tirpių β -gliukanų koncentravimą;
- d) minėtų tirpių β -gliukanų frakcionavimą į imunomodulatorius ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančius agentus;
- e) minėtų tirpių β -gliukanų suskirstymą į imunomodulatorius ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančius agentus.

2. Tirpaus β -gliukano gavimo būdas iš vandenyje netirpių β -gliukanų pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad β -gliukanai b) pakopoje specifiškai yra hidrolizuojami panaudojant β -1,3-gliukanazę iš *Streptomyces rutgersensis* 88 iki tam tikros molekulinės masės oligosacharidų.

3. Tirpus β -gliukanas, besiskiriantis tuo, kad jis yra gaunamas būdu pagal 1 arba 2 punktą.

4. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad ji apima tirpius β -gliukanus pagal 3 punktą.

5. Farmacinė kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad ji apima imunomodulatorius ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančius agentus.

6. Farmacinės kompozicijos pagal 4 arba 5 punktą panaudojimas gamybai vaisto, skirto žmogaus imuninės sistemos moduliavimui ir vėžinių ląstelių ardymui.

7. Panaudojimas pagal 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad siekiant padidinti vėžinių ląstelių ardymo proceso efektyvumą, yra sujungiamos skirtingos molekulinės masės β -

gliukanų specifinės fermentinės hidrolizės būdu gautos frakcijos, kurių ribiniai klampos skaičiai yra intervale nuo 0,3 iki 0,01, geriau nuo 0,08 iki 0,02.

8. Panaudojimas pagal 6 arba 7 punktą, besiskiriantis tuo, kad imunostimuliuojantys biopreparatai ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojantys agentai yra įvedami pakaitomis.

9. Panaudojimas pagal 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad vėžinių ląstelių ardymą inicijuojantys agentai pacientui yra įvedami pakaitomis iki pilno vėžinių ląstelių suardymo.

10. Panaudojimas pagal bet kurį iš 6-9 punktų, besiskiriantis tuo, kad siekiant išvengti vėžinių ląstelių apsauginių sistemų adaptacijos, yra naudojami mažos molekulinės masės vėžinių ląstelių ardymą inicijuojantys agentai.

11. Panaudojimas pagal bet kurį iš 6-10 punktų, besiskiriantis tuo, kad minėti agentai yra įvedami į organizmą *in vitro* palaipsniui didinant jų koncentracijas.

12. Panaudojimas pagal bet kurį iš 6-11 punktų, besiskiriantis tuo, kad vėžinių ląstelių ardymas yra dirbtinai stabdomas, išlaikant neaukštas vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančių agentų koncentracijas ir aukštą imunostimuliaciją tam, kad iš vėžinių ląstelių sudarytas audinys irtų palengva, tokiu būdu išvengiant organizmo nuodijimo toksiniais vėžinių ląstelių irimo produktais.

13. Panaudojimas pagal bet kurį iš 6-12 punktų, besiskiriantis tuo, kad imunostimuliatorių ir vėžinių ląstelių ardymą inicijuojančių preparatų koncentracijos keičiamos nuo 0 iki 1000 mg/ml minėto proceso vykdymo metu.

14. Panaudojimas pagal bet kurį iš 6-13 punktų, besiskiriantis tuo, kad siekiant išvengti antrinio vėžinių ląstelių augimo (metastazių), vėžinių ląstelių ardymo procesas kartojamas, palaikant vėžinėms ląstelėms suardyti mažiausias pakankamas vėžinių

ląstelių ardymą inicijuojančių β -gliukanų kompozicijų koncentracijas, priklausomai nuo gydymo efektyvumo.

15. Farmacinė kompozicija pagal 4 arba 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad ji yra skirta panaudoti imuninės sistemos imoduliavimui ir vėžio gydymui.

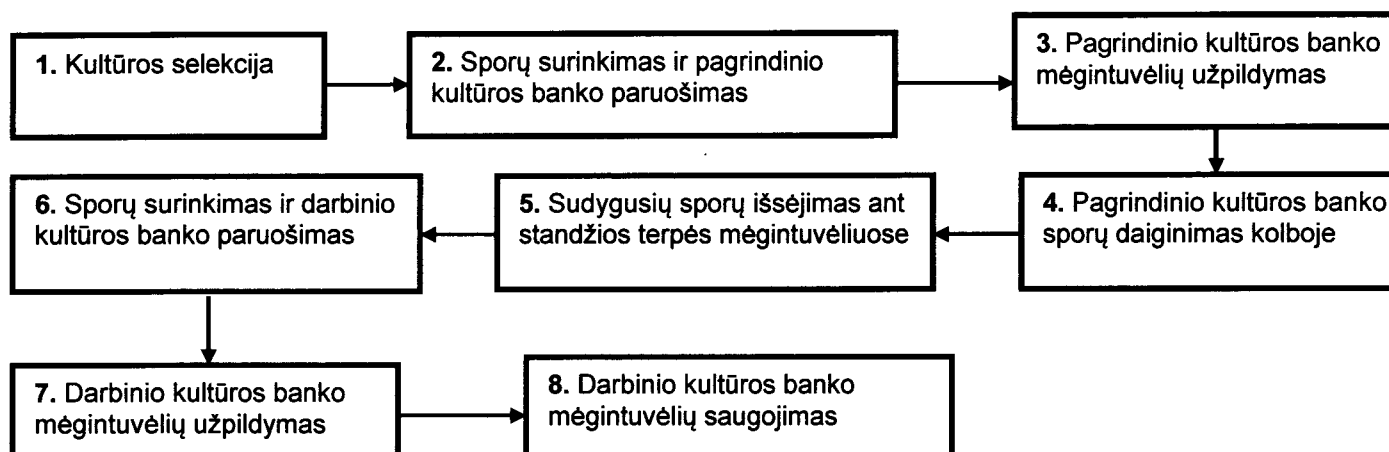


Fig. 1. Pagrindinio ir darbinio *S. rutgersensis* 88 kultūros bankų paruošimas
(I etapas)



Fig. 2. *Streptomyces rutgersensis* 88 kamieno mielės lizuojančio komplekso biosintezė (II etapas)

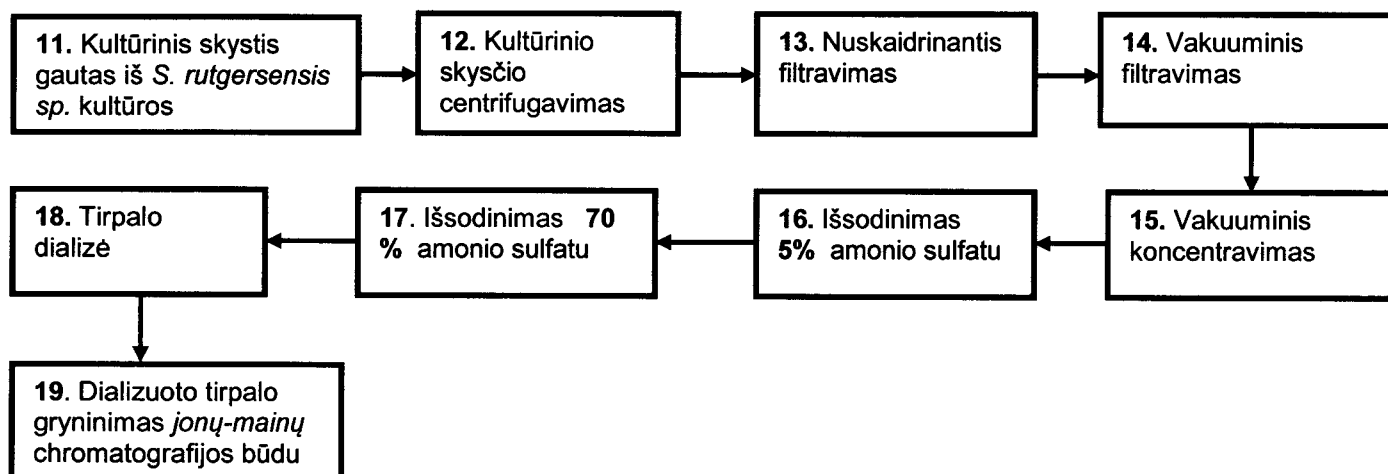


Fig. 3. Fermento β -1,3-gliukanazės chromatografinis gryninimas (III etapas)

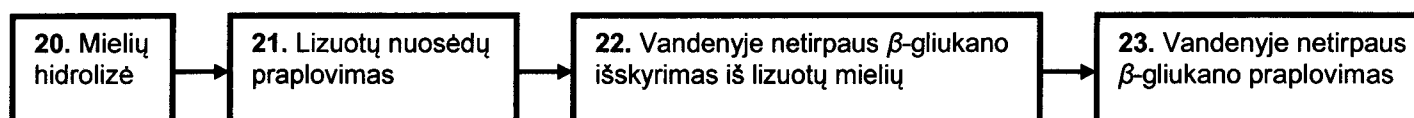


Fig. 4. Vandenyje netirpaus β -gliukano preparato paruošimas (IV etapas)

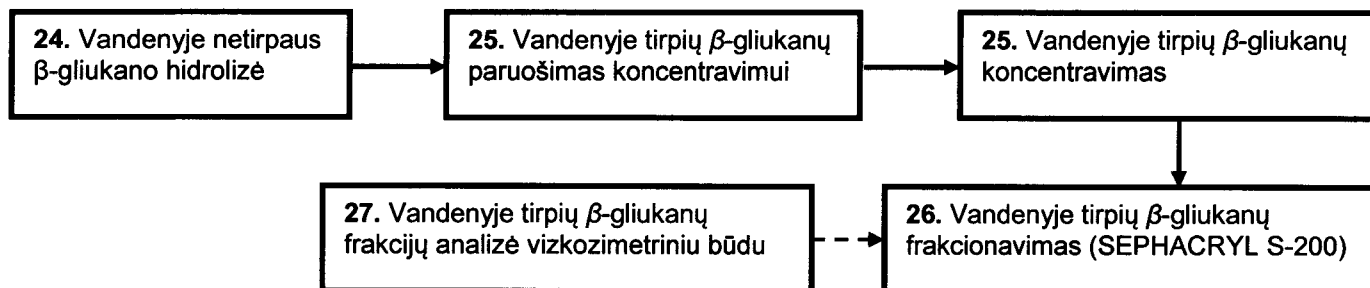


Fig. 5. Vandenyje tirpių β -gliukano preparatų paruošimas (V etapas)

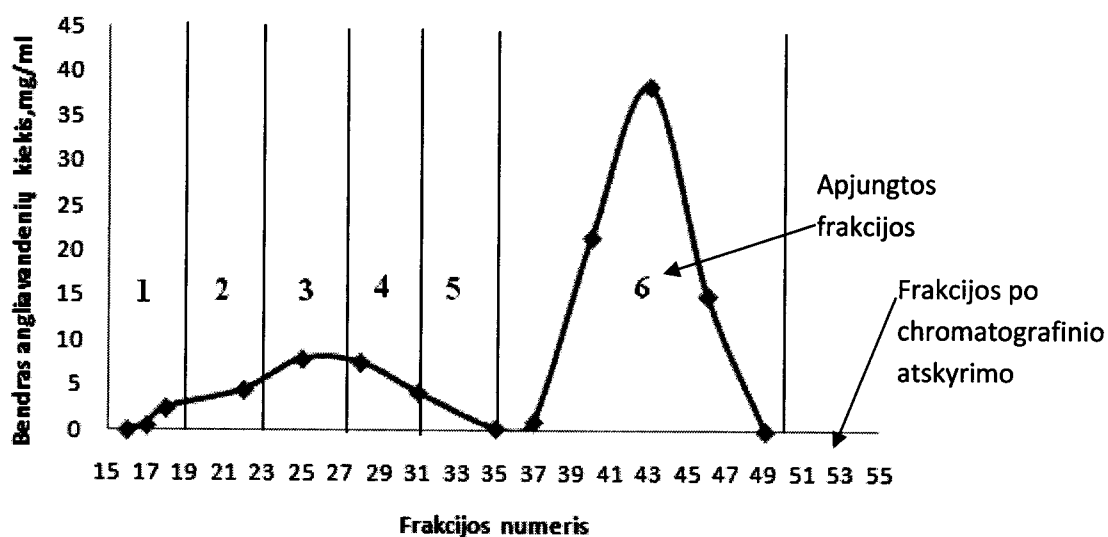


Fig. 6. Frakcijų po chromatografinio atskyrimo bei apjungtų frakcijų priklausomybė nuo bendro angliavandenių kiekio

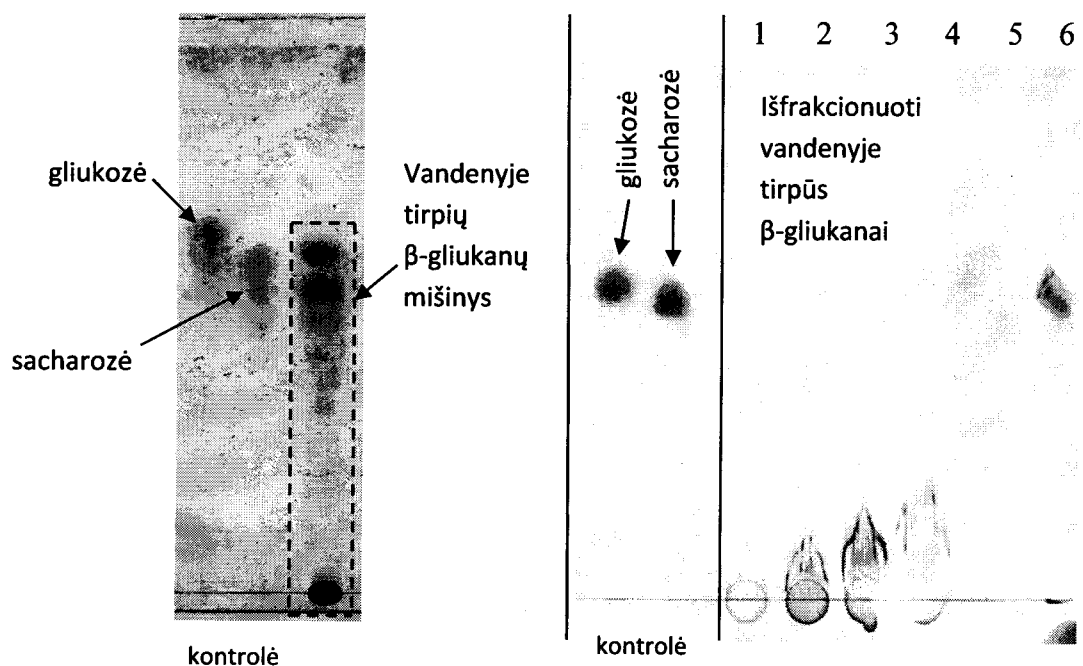


Fig. 7. Plonasluoksnės chromatogramos, prieš frakcionavimą ir po frakcionavimo proceso: a) prieš chromatografiją; b) po chromatografijos (1, 2, 3, 4, 5, 6 frakcijos)

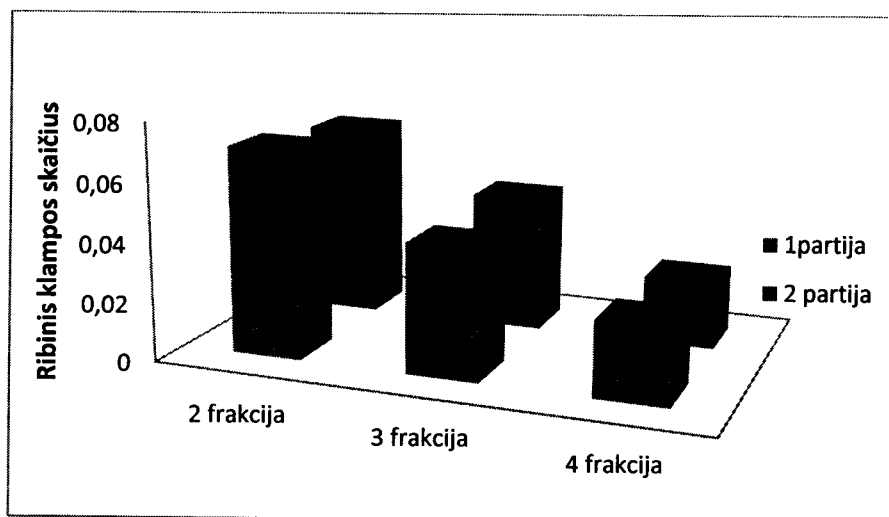


Fig 8. Ribinio klamos skaičiaus priklausomybė nuo frakcijos komponentų molinės masės

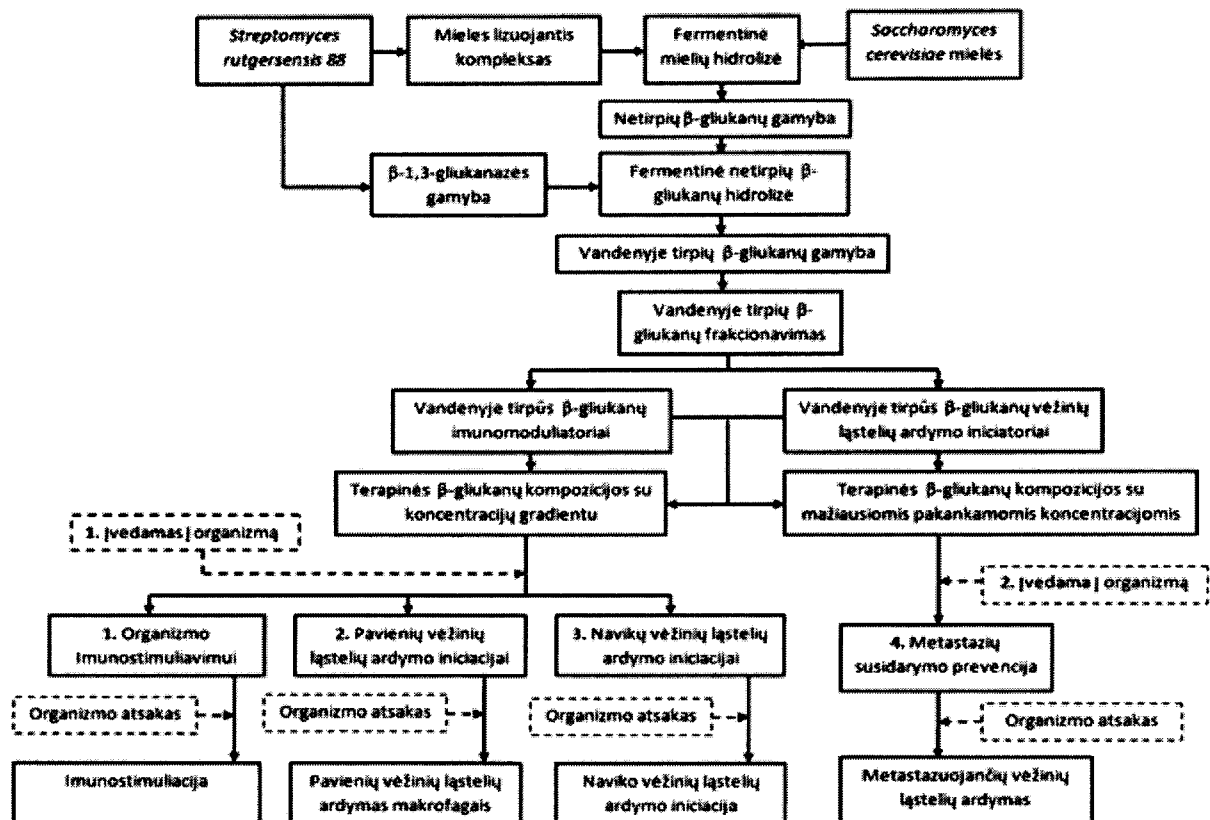


Fig. 9. Terapinių β -gliukanų kompozicijų veikimo principinė schema

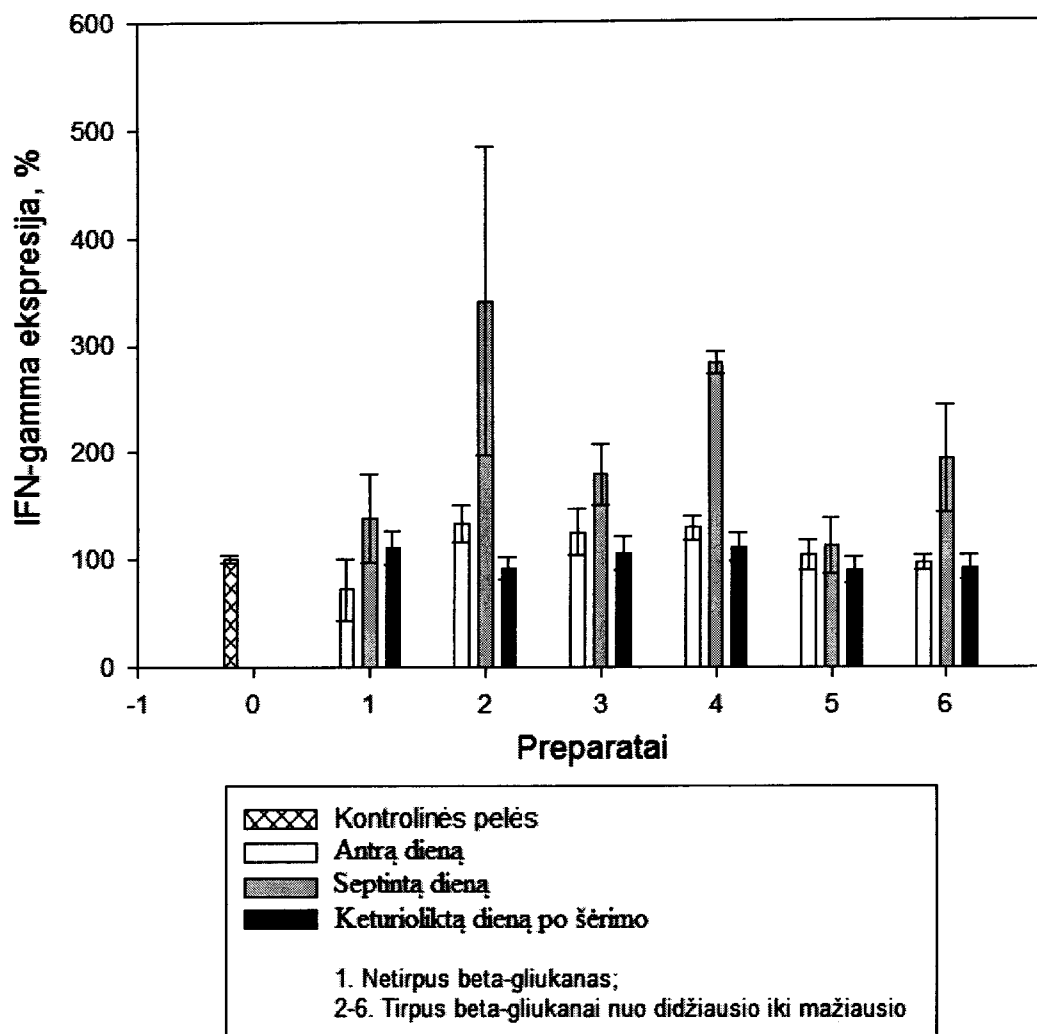


Fig. 10. β -gliukanų preparatų įtaka IFN- γ ekspresijos padidėjimui *in vivo*

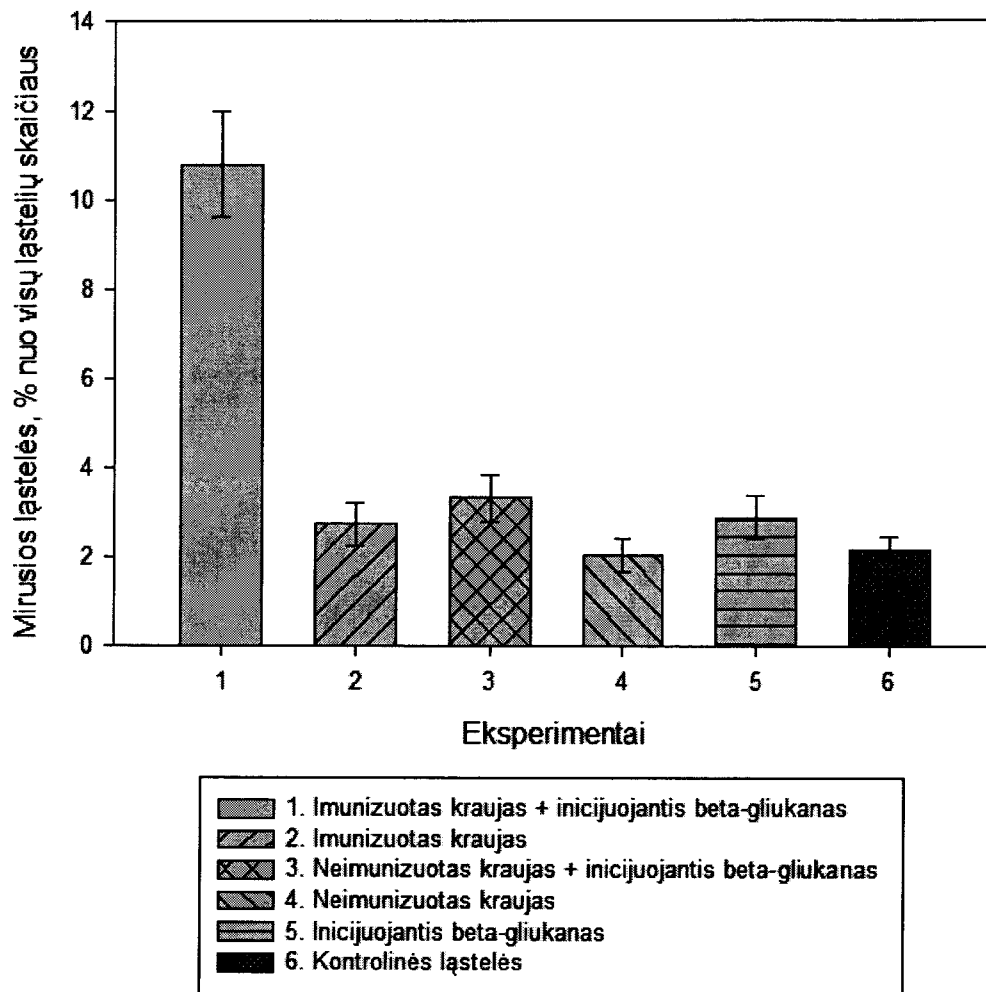


Fig. 11. Žuvusių vėžinių ląstelių kiekis procentais po poveikio β -gliukanų preparatų kompozicijomis *in vitro*