



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111264** (13) **C2**  
(51) МПК**A61K 35/30** (2015.01)**A61K 35/407** (2015.01)**C12N 5/0735** (2010.01)**A61K 35/48** (2015.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 09447</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 64826 C2, 15.03.2004. Yong Jun Kim Candidate ALS Therapeutics Motor toward "In Vitro Clinical Trials/ Yong Jun Kim, Gabsang Lee//2013.- Volume 12, Issue 6, p633–634 Christou YA Wild-type but not mutant SOD1 transgenic astrocytes promote the efficient generation of motor neuron progenitors from mouse embryonic stem cells/Christou YA1, Ohyama K, Placzek M, Monk PN, Shaw PJ.// BMC Neurosci. 2013 Oct 17;14:126. Sakthiswary R Stem cell therapy in neurodegenerative diseases: From principles to practice/ Sakthiswary R, Raymond AA// Neural Regen Res. 2012 Aug 15;7(23):1822-31 US 2009214487 A1, 27.08.2009 US 8460651 B2, 11.06.2013 de Boer AS A perspective on stem cell modeling of amyotrophic lateral sclerosis/ de Boer AS Eggan K.// Cell Cycle. 2015 Dec 2;14(23):3679-88
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>27.08.2014</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>11.04.2016</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.03.2016, Бюл.№ 5</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.04.2016, Бюл.№ 7</b>	
<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Сич Наталія Сергіївна (UA),</b> <b>Клунник Марія Олексіївна (UA),</b> <b>Демчук Марія Петрівна (UA),</b> <b>Матіяшук Ірина Григорівна (UA),</b> <b>Іванкова Олена Віталіївна (UA),</b> <b>Скалозуб Марина Вікторівна (UA),</b> <b>Сінельник Андрій Аркадійович (UA),</b> <b>Архіпенко Інна Володимирівна (UA),</b> <b>Сорочинська Христина Ігорівна (UA),</b> <b>Шаліта Юлія Юріївна (UA)</b>	
<b>(73)</b> Власник(и): <b>ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ</b> <b>ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ЦЕНТР</b> <b>ЕМБРІОНАЛЬНИХ ТКАНИН "ЕМСЕЛЛ",</b> вул. Сирецька, 37-а, м. Київ, 04073 (UA)	

**(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ БІЧНОГО АМІОТРОФІЧНОГО СКЛЕРОЗУ ПРЕПАРАТАМИ З МАТЕРІАЛУ ЕМБРІОФЕТАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ ТА ВИДІЛЕНИХ З НЬОГО КЛІТИН****(57) Реферат:**

Винахід належить до способу лікування бічного аміотрофічного склерозу, що включає приготування та введення препаратів з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин у вигляді суспензії, яка містить терапевтично ефективну кількість стовбурових клітин. Причому виготовляють та вводять принаймні два препарати у вигляді суспензій кріоконсервованих стовбурових клітин, виділених з матеріалу фетуса людини 5-12 тижня гестації, одна з яких містить стовбурові клітини з фетальної печінки, а друга суспензія містить стовбурові клітини з фетального головного мозку. Суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки вводять внутрішньовенно в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $2,64 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення, а суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку вводять підшкірно в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $1,05 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення. При цьому перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки додатково виконують премедикацію.

UA 111264 C2



Винахід належить до галузі медицини, а саме: до неврології та клітинної терапії, та може бути використаний при лікуванні нейродегенеративних захворювань центральної нервової системи, зокрема для лікування хворих на бічний аміотрофічний склероз шляхом введення препаратів з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин у вигляді суспензій, що містять стовбурові клітини, зокрема стовбурові клітини з фетальної печінки та стовбурові клітини з фетального головного мозку на фоні стандартної терапії.

Бічний аміотрофічний склероз (БАС), також відомий під назвою хвороби мотонейрона (ХМН), хвороби Шарко, хвороби Лу Герига - тяжке органічне захворювання неясної етіології, характеризується появою симптомів і ознак дегенерації первинних верхніх (ВМН) і нижніх мотонейронів (НМН) і призводить до прогресуючої слабкості бульбарних, кінцівкових, грудних і черевних м'язів. Інші невральні функції, включаючи окорухові та сфінктерні, відносно збережені, хоча також інколи можуть порушуватися. Когнітивні розлади виявляють у 20-50 % таких хворих, у 3-5 % розвивається деменція, зазвичай лобно-скроневого типу. Смерть настає від дихальної недостатності, в середньому через 2-4 роки від початку захворювання, хоча невелика кількість пацієнтів живе 10 і більше років. Середній вік початку хвороби становить 47-52 роки у сімейних випадках і 58-63 роки - у спорадичних. БАС найчастіше виникає у чоловіків, зазвичай у похилому віці або за наявності спадкової схильності.

При БАС спостерігається деструкція мієліну аксонів волокон пірамідного тракту на різних рівнях цереброспинальної вісі, а також волокон передніх корінців спинномозкових нервів. Найбільша вираженість цих змін спостерігається в пірамідах довгастого мозку і у волокнах вентральних і латеральних пірамідних трактів спинного мозку.

На сьогоднішній день достовірно доведено значення супероксиддисмутази-1 (СОД-1) в етіології БАС, внаслідок мутації гена Cu/Z, локалізованого в 21-й хромосомі [3]. Патологічний процес розвивається в результаті цитотоксичних властивостей мутантного білка, а не через зниження антиоксидантних властивостей ферменту і розвитку оксидативного стресу. Втім, ці мутації визначаються менш ніж у 25 % хворих з сімейною формою БАС і у 5-7 % хворих зі спорадичною формою БАС. Враховуючи, що сімейні форми складають близько 10 %, то всього лише 2 % хворих БАС мають мутантну супероксиддисмутазу [1, 2, 6]. Тому, до теперішнього часу етіологія БАС залишається не до кінця вивченою. Багато дослідників схильються до мультифакторної теорії. Відповідно до цієї теорії, загибель мотонейронів є результатом каскаду подій, множинних факторів, які можуть ініціювати патологічний процес, - це дисфункція СОД-1, дезорганізація нейрофіламентів, глутаматна ексайтотоксичність, оксидативний стрес, порушення клітинного гомеостазу кальцію, дисфункція мітохондрій та інших органел, дефіцит нейротрофічних факторів, аутоімунний процес, процеси апоптозу.

Ексайтотоксичність і окислювальний стрес є взаємопов'язаними процесами. Основним результатом дії ексайтотоксичності і оксидативного стресу є порушення фосфорилювання білків і блоку SH-груп з наступною їх інактивацією, гідроксилування основ ДНК, її фрагментація, а також розвиток перекисного окиснення ліпідів і дестабілізація клітинних мембран та зміною фосфорилювання цитоскелетних білків, порушення аксонального транспорту, особливо повільного антероградного і швидкого ретроградного. Передбачається, що вільне радикальне окислення (оксидативний стрес) сприяє прогресуванню БАС. З урахуванням даних систематичного огляду Кокранівського реєстру клінічних випробувань, переконливих доказів ефективності застосування окремих антиоксидантів або антиоксидантних засобів в цілому при БАС не отримано. Незважаючи на те, що в ході клінічних випробувань ефективність антиоксидантної терапії не доведена, не існує і обґрунтованих протипоказань до її застосування.

В останні роки активно розглядаються кілька напрямків патогенетичного лікування БАС - це пригнічення ексайтотоксичного впливу за рахунок зниження синтезу глутамату, зменшення його вивільнення з нервових терміналей і підвищення зворотного захоплення, блокування постсинаптичних NMDA-рецепторів глутамату, а також вплив на внутрішньоклітинні каскади. На теперішній час єдиним лікарським препаратом з цієї групи є Рілузол (Рілутек), який затвердила FDA [5, 8]. Він призначений для того, щоб зменшити вплив глутамінової кислоти на діяльність моторних нейронів шляхом активації глутамінових транспортерів. Крім того, вважається, що препарат виконує й іншу нейропротекторну дію, шляхом блокування натрієвих і кальцієвих каналів, інгібування протеїнкінази C та активації NMDA (N-метил-D-аспартат) антагонізму рецепторів.

Клінічні випробування, які проводилися на хворих з БАС, показали, що Рілузол подовжує тривалість життя пацієнтів на кілька місяців, а для тих осіб, у яких хвороба спочатку вплинула на довгастий мозок, при вживанні Рілузолу тривалість життя може збільшуватись. Крім того, слід починати лікування за допомогою Рілутеку перш, ніж пацієнту необхідно буде здійснювати

штучну вентиляцію легень. Варто особливо наголосити, що препарат не відновлює функцій моторних нейронів, порушення діяльності яких вже відбулося.

Інші методи лікування БАС призначені для полегшення симптомів і покращення якості життя пацієнтів.

Фізіотерапія і використання спеціального обладнання дають змогу розширити можливості пацієнтів, покращити їхнього якість життя. Легкі фізичні вправи, такі як ходіння, плавання, їзда на велосипеді, та використання велотренажера суттєво зміцнюють м'язи, поліпшують стан серцево-судинної системи і допомагають пацієнтам боротися із втомою та депресією. Чергування рухових вправ та вправ на розтяжку можуть запобігти виникненню хворобливих спазмів і виникнення контрактур м'язів. Але особливу увагу слід звернути на запобігання перенавантажень м'язів. Для збереження мобільності пацієнтів необхідно використовувати різноманітні пристрої - пандуси, підтяжки, ходунки, інвалідні коляски.

Клітина терапія може стати оптимальним методом лікування при цьому захворюванні, оскільки вона може сприяти м'язовій регенерації. Клітинна суспензія містить різноманітні нейротрофічні фактори, які стимулюють роботу моторних нейронів у природних умовах. Стовбурові клітини можуть допомогти пацієнту з БАС декількома способами. Вірогідно, можна викликати їх диференціювання в нижні мотонейрони, щоб вони замінили нейрони, які загинули внаслідок БАС. Можливо, стовбурові клітини могли б врятувати вмираючі мотонейрони, відновивши зв'язки цих нейронів з частково денервованим м'язом до того, як він остаточно атрофується. Ще краще, якщо б вдалося викликати їх диференціювання у верхні мотонейрони в корі головного мозку і встановити їх зв'язок з нижніми моторними нейронами. Ще більше, реально очікувати від стовбурових клітин, що вони зможуть підтримати життєдіяльність або покращити виживаність мотонейронів [7].

Відомий спосіб лікування органічних уражень центральної нервової системи з використанням алогенних ембріональних нейроклітин, що включає отримання останніх та їх ін'єкційне ендолумбальне введення хворому. При чому хворого до лікування додатково обстежують з метою виявлення ознак аутоімунітету до нейробілків і, за наявності таких ознак, одноразово внутрішньовенно вводять алогенні ембріональні клітини печінки (строк гестації 7-9 тижнів) в кількості 90-100 млн. за одну ін'єкцію, після чого через 2-3 місяці після повторного імунологічного обстеження, у разі відсутності ознак аутоімунітету до нейробілків, вводять алогенні ембріональні нейроклітини у вигляді клітинної суспензії у кількості 30-40 млн. за одну ін'єкцію, яких всього може бути 2-3 (патент України на корисну модель № 22507, дата публікації - 25.04.2007 р.).

Відомий спосіб дозволяє лікувати такі органічні ураження центральної нервової системи, як дитячий церебральний параліч, розсіяний склероз та інші захворювання. Крім того, відомий спосіб лікування дозволяє зменшити обмеження до застосування алогенних ембріональних нейроклітин у хворих з органічними ураженнями ЦНС, у яких виявили лабораторні ознаки аутоімунітету до нейробілків та не доведена ефективність цього винаходу при лікуванні хворих на БАС.

Відомий спосіб лікування захворювання БАС, що включає внутрішньовенне або внутрішньокісткове введення ефективної кількості суспензії мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) хворому. Причому в одному варіанті здійснення винаходу суспензію мезенхімальних стовбурових клітин вводять з кількістю від  $1 \times 10^6$  МСК на кг ваги тіла до приблизно  $10 \times 10^6$  МСК на кг ваги тіла, в іншому варіанті здійснення винаходу - з кількістю від  $4 \times 10^6$  МСК на кг ваги тіла до приблизно  $8 \times 10^6$  МСК на кг ваги тіла (заявка на винахід № US 20090214487, дата публікації - 27.08.2009 р.).

Недоліком відомого способу лікування є те, що процес диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин в моторні нейрони є складним і займає багато часу, а внутрішньокісткове введення МСК є травмуючим для пацієнта.

Найбільш близьким до способу лікування БАС, що заявляється, є спосіб лікування БАС, що включає виділення нервових стовбурових клітин людського походження з тканин центральної нервової системи, яка включає фетальну тканину спинного мозку, культивування їх в пробірці, концентрування збільшеної популяції нервових стовбурових клітин та введення терапевтично ефективної кількості вказаних концентрованих нервових стовбурових клітин у одну або декілька областей спинного мозку шляхом ін'єкції у кількості від 0,1 до 100 мкл (патент на винахід США № 8,460,651, дата публікації - 06.11.2013 р.). Причому нервові стовбурові клітини отримують із ембріональних стовбурових клітин людини. А фетальна тканина спинного мозку отримана із фетусу людини 6,5-20 тижнів гестації. При цьому щонайменше 20 % концентрованих нервових стовбурових клітин диференціюються в нейрони спинного мозку.

В одному із варіантів здійснення винаходу спосіб дозволяє лікувати БАС, що викликаний втратою вентральних моторних нейронів шляхом введення нервових стовбурових клітин, що отримані, зокрема, із спинного мозку фетуса людини 7-9 тижня гестації, в якому нейрогенез вентральних моторних нейронів є суттєвим.

Недоліком відомого способу є те, що перед застосуванням фетальну тканину спинного мозку необхідно культивувати, що збільшує час проведення пацієнта в клініці. В результаті чого продовжується поступове погіршення функціонального стану хворого, процесів дихання, ковтання та мовлення.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу лікування БАС препаратами з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин, в якому за рахунок запропонованої послідовності проведення лікування з використанням суспензій стовбурових клітин емпірично підбраного складу, забезпечується підвищення ефективності лікування БАС, зокрема, покращення функціонального стану хворого, дихання, здатності ковтати, мовлення при зменшенні прогресування слабкості й атрофії уражених м'язів без необхідності підбору донора за антигенами гістосумісності. В результаті - продовжується тривалість та якість життя, полегшуються симптоми хворих на БАС, уповільнюється прогресуюче загальне зниження м'язового тону і зменшується м'язова дисфункція та, відповідно, сповільнюється прогресування БАС в цілому. Крім того, забезпечується запобігання виникненню алергійних реакцій та запобігання відторгнення стовбурових клітин з фетальної печінки та стовбурових клітин з фетального головного мозку організмом хворих на БАС при проведенні лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб включає приготування та введення препаратів з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин у вигляді суспензії, що містить терапевтично ефективну кількість стовбурових клітин, який відрізняється тим, що виготовляють та вводять щонайменше два препарати у вигляді суспензій кріоконсервованих стовбурових клітин, виділених з матеріалу фетуса людини 5-12 тижня гестації, одна з яких містить стовбурові клітини з фетальної печінки, а друга суспензія містить стовбурові клітини з фетального головного мозку, причому суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки вводять внутрішньовенно в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $2,64 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення, а суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку вводять підшкірно в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $1,05 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення, при цьому перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки додатково виконують премедикацію.

Суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки, як правило, вводять разом із фізіологічним розчином натрію хлориду зі швидкістю 20-40 крапель за хвилину.

При цьому премедикацію виконують шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону.

Перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку додатково виконують клініко-неврологічне та інструментальне обстеження стану хворого.

Перед проведенням лікування та через 6 і 12 місяців після введення суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку здійснюють контроль стану хворого за клінічними та інструментальними показниками.

Ми встановили, що за рахунок введення принаймні двох суспензій емпірично підбраного складу, що містять кріоконсервовані стовбурові клітини ембріофетального походження, а саме внутрішньовенного введення суспензії стовбурових клітин з фетальної печінки людини 5-12 тижня гестації в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $2,64 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення та підшкірного введення суспензії стовбурових клітин з фетального головного мозку людини 5-12 тижня гестації в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $1,05 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення, забезпечується зниження синтезу глутамінової кислоти, зменшення її вивільнення із нервових терміналей, блокування постсинаптичних NMDA-рецепторів глутамату, що сприяє зменшенню вмісту глутамату в синапсах між моторними нейронами, в результаті чого забезпечується захист моторних нейронів від ексайтотоксичного впливу глутамінової кислоти, нейропротекторний ефект та запобігається загибель нейронів кори головного мозку при гіпоксії. В результаті - продовжується тривалість та якість життя, полегшуються симптоми хворих на БАС, уповільнюється прогресування загального зниження м'язового тону і зменшується м'язова дисфункція та, відповідно, сповільнюється прогресування БАС. При цьому виключається необхідність підбору донора за антигенами гістосумісності та забезпечується можливість

введення суспензії стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії стовбурових клітин з фетального головного мозку повторно. Крім того, проведення премедикації перед введенням суспензії стовбурових клітин з фетальної печінки дозволяє запобігти виникненню алергійних реакцій та запобігти відторгненню стовбурових клітин з фетальної печінки організмом хворих під час проведення лікування.

Причому використання саме фетальної печінки та фетальної тканини головного мозку для отримання стовбурових клітин з метою приготування лікувальних препаратів у вигляді суспензій обумовлено їх пластичністю, зокрема, здатністю таких клітин зазнавати змін та диференціації у відповідь на навколишній вплив або, відповідно до їх внутрішньої програми. Відомо, що клітини ембріофетального походження здатні до росту, розмноження, диференціації, міграції та встановлення зв'язків з іншими клітинами. Порівняно з клітинами зрілих тканин, вони мають кращу здатність до проліферації. Їх введення є ефективнішим також з огляду на утворення великої кількості ростових факторів. Клітини з фетальної печінки можуть виробляти значну кількість факторів росту, нейротрофічного фактору, цитокінів, інтерлейкінів, що сприяють виживанню та росту, проліферації, диференціації, та можуть стимулювати регенерацію за рахунок оточуючих клітин господаря.

Крім цього, клітини з фетальної печінки мають здатність виживати при нижчому рівні кисню, ніж їх повністю диференційовані аналоги, що робить їх стійкими до ішемічного ушкодження як під час маніпуляцій *in vitro*, так і після їх введення. Проліферуючі або незрілі клітини з фетальної печінки переважно не мають довгих відростків або сильної міжклітинної адгезії і тому зазнають менших пошкоджень під час приготування суспензії клітин. Ці властивості дозволяють вводити клітини з фетальної печінки шляхом внутрішньовенної ін'єкції у вигляді суспензії [4, 5]. Ці характеристики можуть пояснити і підвищене виживання клітин і тканин фетальної печінки в порівнянні з дорослими після кріоконсервації.

Спосіб лікування бічного аміотрофічного склерозу препаратами з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин здійснюють таким чином.

Виготовляють два препарати у вигляді суспензій кріоконсервованих стовбурових клітин, одна з яких містить стовбурові клітини з фетальної печінки, а друга суспензія містить стовбурові клітини з фетального головного мозку. Для цього в умовах операційної, з дотриманням правил асептики та антисептики, одержують ембріофетальний матеріал, а саме: тканину печінки, тканину головного мозку фетусів людини від 5 до 12 тижнів гестації, які загинули внаслідок медичного абортів в випадках, коли вагітність переривали за соціальними показниками при відсутності патології розвитку чи інфікованості фетуса та наявності письмової інформованої згоди жінки-донора. Вилучені тканини ембріофетального походження поміщають в стерильне транспортне середовище розчину Хенкса. В стерильних умовах тканини сепарують та гомогенізують в розчині Хенкса. Отримані суспензії піддають фільтрації та кріоконсервують. Як кріопротектор використовують диметилсульфоксид. Далі готові суспензії розливають в кріопробірки в об'ємі 0,1-1,0 мл. Кріоконсервування суспензій клітин проводять у камері програмного заморожувача за розробленою програмою. Таке кріоконсервування забезпечує практично необмежене довгострокове зберігання вказаних суспензій, дозволяє протягом необхідного часу дослідити препарати у вигляді суспензії на бактеріологічну та вірусологічну безпеку, визначити якісні та кількісні показники суспензії, сформувати банк суспензій стовбурових клітин, відповідно до визначених вимог до препаратів. Суспензії, що містять стовбурові клітини з фетальної печінки та клітини з фетального головного мозку, зберігають в кріобанку в рідкому азоті при температурі -196 °C.

При формуванні банку суспензій з тканин ембріофетального походження для лікування хворих на БАС, суспензія стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензія стовбурових клітин з фетального головного мозку повинні мати такі параметри: вміст ядровмісних клітин (підраховують загальну кількість ядровмісних клітин в одиниці об'єму за допомогою клітинного аналізатора чи візуально під мікроскопом в лічильній камері) повинен становити не менше ніж  $2,64 \times 10^6$  в 1 мл суспензії для ядровмісних клітин з фетальної печінки та не менше за  $1,05 \times 10^6$  в 1 мл суспензії для ядровмісних клітин з фетального головного мозку; вміст живих клітин після кріоконсервування - 70 %.

Пробірки, що містять суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку, безпосередньо перед введенням виймають з рідкого азоту, занурюють у водяну баню при температурі +37 °C та витримують до появи рідкої фази. Подальші маніпуляції проводять при кімнатній температурі з суворим дотриманням правил асептики. Час перебування розмороженої суспензії стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії стовбурових клітин з фетального головного мозку при кімнатній температурі не повинен перевищувати 10 хвилин.

При цьому перед введенням вказаних суспензій здійснюють додатковий контроль якості суспензії стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії стовбурових клітин з фетального головного мозку, зокрема, проводять мікроскопію та здійснюють підрахунок кількості життєздатних клітин за допомогою автоматичного клітинного аналізатора чи візуально під мікроскопом в лічильній камері. Вміст живих клітин після кріоконсервування - 80 %.

Перед початком проведення лікування хворих на БАС шляхом введення суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку виконують клініко-неврологічне та інструментальне обстеження стану хворого та здійснюють контроль активності патологічного процесу за клінічними та інструментальними показниками. Далі перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки, з метою запобігання виникненню алергійних реакцій під час лікування, виконують премедикацію шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону через систему для переливання крові. Після чого разом із фізіологічним розчином натрію хлориду вводять суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки шляхом внутрішньовенного введення зі швидкістю 20-40 крапель за хвилину. При цьому об'єм лікувальної дози суспензії для одного введення підбирають індивідуально, але не менше за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не меншою за  $2,64 \times 10^6$  в 1 мл. Введення суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку здійснюють підшкірно в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $1,05 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення. Така кількість клітин забезпечує необхідну якість суспензій та достатня для отримання високої ефективності лікування хворих на БАС.

Після введення суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку хворий знаходиться під спостереженням. Причому після проведення лікування через 6 і 12 місяців здійснюють контроль стану хворого за клінічними та інструментальними показниками. При цьому точки спостереження вибирають згідно з протоколом клінічного застосування препарату з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин, розробленим на основі клінічного досвіду.

Ефективність лікування БАС оцінюють за зменшенням прогресування слабкості і атрофії уражених м'язів, зокрема, покращенням рухових можливостей, дихання, здатності ковтати, мовлення та якості життя в цілому.

Так, з 2011 по 2014 роки у клініці клітинної терапії були проліковані 171 хворих на БАС відповідно до способу лікування БАС, що заявляється. У всіх хворих спостерігався синдром раннього післяінфузійного покращення: відбувалося поліпшення сну, дихання, у деяких хворих збільшилась сила в руках. Після проведеного введення суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки в одному випадку не спостерігались ускладнення чи побічні явища, в тому числі реакція "трансплантат проти господаря" (РТПГ).

Після проведеного лікування спостерігалось покращення якості життя хворих, функціональних можливостей легенів (форсована життєва ємкість легенів (FVC, %), об'єм форсованого видиху за 1 секунду (FEV1, %) (див. рис.).

Отже, після проведеного лікування через 6 та 12 місяців спостерігалось статистично значуще покращення форсованої життєвої ємкості легенів (на 16 % через 6 місяців та 18 % через 12 місяців) та об'єму форсованого видиху за 1 секунду (10 % та 14 % відповідно).

Винахід, що заявляється, пояснюється наступними прикладами.

#### Приклад 1

Хвора К., 13.06.1972 року народження, історія хвороби № 17061307. Хвора знаходилась в клініці клітинної терапії з метою лікування БАС. Із анамнезу відомо, що перші симптоми з'явилися в лютому місяці 2010 року зі слабкості та скутості в правому коліні. З вересня того ж року з'явилась скутість в лівій нозі, через 6 місяців приєдналась слабкість в руках. З червня 2011 року відмітила, що почала втрачати м'язову масу, потім приєдналися посмикування в м'язах, зміна тембру голосу. З квітня 2012 року почала користуватись інвалідним візком.

В неврологічному статусі: в свідомості, всебічно орієнтована. Емоційно лабільна. Очні щілини, зіниці D=S, ністагму немає. Обличчя симетричне. Позитивний хоботковий рефлекс. Ковтальний рефлекс збережений. М'яке піднебіння - фонація збережена. Язик по середній лінії, фасцикуляції на м'язах язика, їх гіпотрофія. Дистонія, дисфагія, дизартрія. Сухожилкові рефлекси D=S з рук, з ніг, високі з розширеною рефлексогенною зоною. М'язова сила знижена в проксимальних відділах рук 3,5/5, в ногах - 3/5. М'язовий тонус підвищений в руках до I ступеню, в ногах - до II ступеню. Фасцикуляції м'язів плечового поясу, стегон. Гіпотрофія м'язів плечового поясу, м'язів передпліч, китиць. Утримує руки в горизонтальному положенні, зігнуті в ліктьових

суглобах, може підняти ноги по черзі вгору та утримувати їх декілька секунд. Патологічних стопних знаків не виявлено. Ходить декілька метрів, притримуючись за асистента. В побуті цілком залежна від оточуючих.

До лікування форсована життєва ємкість легенів склала 62,41 %, об'єм форсованого видиху за 1 секунду - 64,12 %.

Перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки хворій була проведена премедикація шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону. Введено суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки в об'ємі 5,2 мл шляхом внутрішньовенного крапельного введення. На другий день введено суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку підшкірно в об'ємі 5,0 мл. Характеристика введеної суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки: зразок R213112, вік фетуса - 12 тижнів гестації; кількість ядровмісних клітин -  $43,5 \times 10^6$  в 1 мл. Характеристика введеної суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку: зразок R213212, вік фетуса - 12 тижнів гестації; кількість ядровмісних клітин -  $21,7 \times 10^6$  в 1 мл.

У перші кілька діб після введення вказаних суспензій спостерігався синдром раннього післяінфузійного покращення, який проявлявся покращенням сну та апетиту, збільшенням рухових можливостей, покращенням дихання.

Через 6 місяців після вказаного лікування у пацієнта форсована життєва ємкість легенів становила 74,21 %, об'єм форсованого видиху за 1 секунду - 69,82 %. Через 12 місяців після лікування - 78,23 % та 73,52 % відповідно.

Також хвора відчула збільшення об'єму рухів в руках та ногах, починаючи вже через 6 місяців після лікування.

#### Приклад 2

Хвора В., 12.05.1968 року народження, історія хвороби № 09011402. Знаходилась в клініці клітинної терапії з метою лікування БАС з тетрапарезом, більше вираженим в ногах, шийно-грудною формою, бульбарним синдромом. При поступленні виказувала скарги на порушення мови, кашель, слабкість в руках, ногах, обмеження пересування, слинотечу.

З анамнезу відомо, що перші симптоми захворювання виникли в листопаді 2011 року, коли з'явилася слабкість при швидкій ході. Звернулась до лікаря, пройшла обстеження, після чого через 3 місяці був поставлений діагноз БАС. Призначено Рілутек по 50 мг 2 рази на добу, Коензим Q10 по 600 мг 2 рази на добу. Проблеми з мовою, ходою та кашель з'явилися в 2012 році. Користується ходунками, на тривалі відстані - візком.

Неврологічний статус: в свідомості, всебічно орієнтована. Очні щілини, зіниці D=S, ністагму немає. Об'єм рухів очних яблук повний. Обличчя симетричне. Ковтальний рефлекс знижений. Язик по середній лінії, атрофія м'язів язика, фібриляції м'язів язика. М'яке піднебіння - фонація знижена.

Сухожилкові рефлекси D=S з рук, з ніг. Черевні рефлекси D=S. М'язова сила знижена в руках - 2/5, в ногах - 1/5. М'язовий тонус дещо підвищений в ногах. Рідкі фібрилярні посмикування м'язів передпліч, стегон. Гіпотрофія всіх груп м'язів. "Типова" установка рук. Патологічних стопних знаків не виявлено. Самостійно може тримати ложку, виделку в руках, стакан може тримати двома руками. В побуті повністю залежна від сторонньої допомоги.

До лікування форсована життєва ємкість легенів склала 57,24 %, об'єм форсованого видиху за 1 секунду - 59,12 %.

Перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки хворій була виконана премедикація шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону. Далі було введено суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки в об'ємі 4,4 мл шляхом внутрішньовенного крапельного введення та на другий день введено суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку підшкірно в об'ємі 5,4 мл. Характеристика введеної суспензії стовбурових клітин з фетальної печінки: зразок R172109, вік фетуса - 9 тижнів гестації; кількість ядровмісних клітин -  $22,15 \times 10^6$  в 1 мл. Характеристика введеної суспензії стовбурових клітин з фетального головного мозку: зразок R172209, вік фетуса - 9 тижнів гестації; кількість ядровмісних клітин -  $3,02 \times 10^6$  в 1 мл.

У перші кілька діб після введення вказаних суспензій спостерігався синдром раннього післяінфузійного покращення, який проявлявся покращенням сну та апетиту, покращенням дихання.

Через 6 місяців після вказаного лікування у пацієнта форсована життєва ємкість легенів склала 69,31 %, об'єм форсованого видиху за 1 секунду - 62,31 %. Через 12 місяців після



лікування - 72,12 % та 67,21 % відповідно. Зменшилися скарги на загальну слабкість, збільшились сила в руках, ногах.

Отже, запропонований спосіб лікування БАС препаратами з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин дозволяє підвищити ефективність лікування при зменшенні прогресування слабкості та атрофії уражених м'язів без необхідності підбору донора за антигенами гістосумісності. В результаті - уповільнюється прогресування захворювання, покращуються рухові функції, дихання, якість та тривалість життя.

Джерела інформації:

1. Бічний аміотрофічний склероз. Керівництво для лікарів / Під ред. І.А. Завалішина. - М.: ООО "ІІА" Євразія + ", 2007. - 447 с.

2. Сковцова С.А., Лімборський С.А., Соколов К.В., Левицький Г.Н. Молекулярні механізми розвитку хвороби рухового нейрона // Журнал неврології і психіатрії ім. С.С. Корсакова. - 2005. - Т. 102 № 4. - С. 68-76.

3. Andersen P.M., Nilsson P., Kerdnén M.-L., Forsgren I. et al. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn super-oxide dismutase mutations in Scandinavia. Brain 1997; 120: 1723-1737.

4. Appel S. ALS: immune factors in motor neuron cell injury // Neurobiology of ALS: education program syllabus. - Minneapolis: American Academy of Neurology, № 1999. - С. 101-13.

5. Chen et al. Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis // Neurobiology of Aging. - 2007. - 28 (8). - 1148-62.

6. Kaspar BK, Frost LM, Christian L., Umapathi P., Gage FH Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis // Ann. Neural. - 2005. - 57 (5). - 649-55.

7. Svendsen CN, Langston JW. Stem cells for parkinson disease and ALS: replacement or protection? Nature Med. 2004, № 10, С. 224-225.

8. Waldmeier P.C Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. - 2003. - 27(2). - 303-21.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

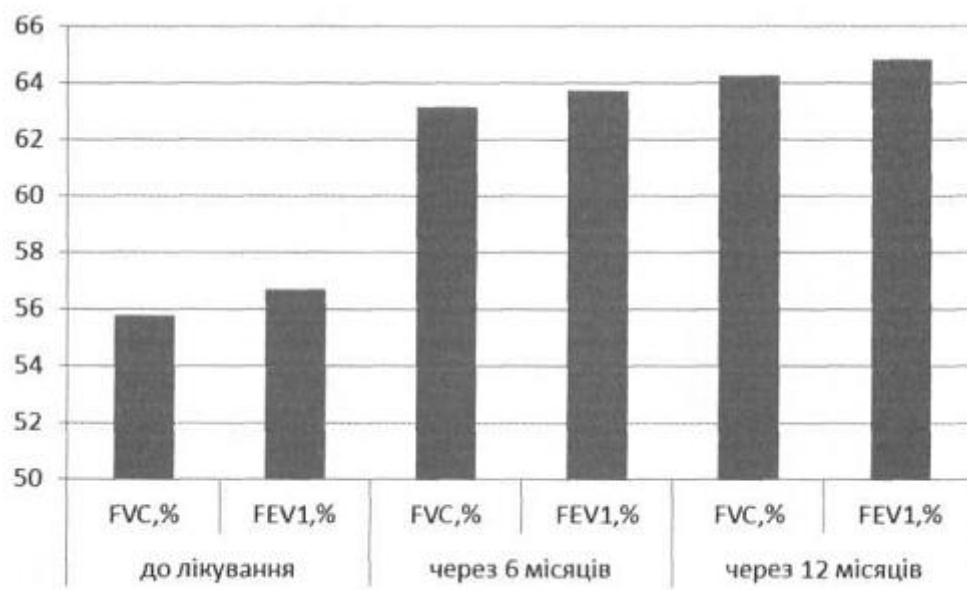
1. Спосіб лікування бічного аміотрофічного склерозу, що включає приготування та введення препаратів з матеріалу ембріофетального походження та виділених з нього клітин у вигляді суспензії, що містить терапевтично ефективну кількість стовбурових клітин, який **відрізняється** тим, що виготовляють та вводять щонайменше два препарати у вигляді суспензій кріоконсервованих стовбурових клітин, виділених з матеріалу фетуса людини 5-12 тижня гестації, одна з яких містить стовбурові клітини з фетальної печінки, а друга суспензія містить стовбурові клітини з фетального головного мозку, причому суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки вводять внутрішньовенно в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $2,64 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення, а суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку вводять підшкірно в об'ємі не меншому за 0,1 мл з кількістю ядровмісних клітин не менше за  $1,05 \times 10^6$  в 1 мл за одне введення, при цьому перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки додатково виконують премедикацію.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки вводять разом із фізіологічним розчином натрію хлориду зі швидкістю 20-40 крапель за хвилину.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що премедикацію виконують шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перед введенням суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку додатково виконують клініко-неврологічне та інструментальне обстеження стану хворого.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перед проведенням лікування та через 6 і 12 місяців після введення суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетальної печінки та суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин з фетального головного мозку здійснюють контроль активності патологічного процесу за клінічними та інструментальними показниками.



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601