



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **114764**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 1/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 00308	(72) Винахідник(и): Мосійчук Василь Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.01.2017	(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «ДЕВА КЛІНІК», вул. Почайнинська, 4, м. Київ, 04070, Україна (UA), Мосійчук Василь Володимирович, вул. Московська, буд. 27, кв. 7, м. Київ, 01010, Україна (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.03.2017	(74) Представник: Тиртична Галина Василівна, реєстр. №219
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2017, Бюл.№ 5	

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ І ХВОРОБИ КРОНА СЕРЕДНЬО-ТЯЖКОГО І ТЯЖКОГО СТУПЕНІВ

(57) Реферат:

Спосіб лікування виразкового коліту і хвороби Крона характеризується тим, що курс лікування включає внутрішньовенне введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

UA 114764 U

Корисна модель належить до лікування виразкового коліту і хвороби Крона і може бути використана в медицині при лікуванні людей при відповідних захворюваннях кишечника середньо-тяжкого і тяжкого ступенів.

В даний час не існує однозначного підходу до етіології запальних захворювань кишечника, що діагностуються як виразковий коліт і хвороба Крона. Більшість фахівців вважає, що виразковий коліт і хвороба Крона є двома самостійними нозологічними формами, а не різними клініко-морфологічними варіантами одного і того захворювання. Проте, незважаючи на різні етіологічні фактори, що викликають захворювання, при їх впливі на організм людини у середньо-тяжкому і тяжкому ступенях захворювання запускаються однакові універсальні патогенетичні механізми аутоімунного запалювання, що відображається на підходах лікування цих захворювань.

Найбільш близьким є спосіб лікування виразкового коліту і хвороби Крона середньо-тяжкого і тяжкого ступенів, що включає у курсі лікування клітинну терапію (RU, патент № 2460554 C1 [1]). Курс лікування за відомим способом полягає у проведенні попереднього перорального прийому пацієнтом пробіотику біфіформу у дозі 2-3 капсули з наступним 4-5-кратним введенням до слизової оболонки змінених ділянок кишки мезенхімальних стовбурних клітин у кількості 150-200 млн клітин в об'ємі від 0,5 до 1,5 мл, і подальшим пероральним прийомом пацієнтом пробіотику біфіформу у дозі 1 капсула 3 рази на день протягом трьох тижнів.

Недоліком відомого способу є необхідність застосування складної ендоскопічної апаратури при введенні до слизової оболонки змінених ділянок кишки мезенхімальних стовбурних клітин, що потребує, в тому числі, навиків володіння такою апаратурою медичним персоналом. В цілому, процедура є складною і болісною, тому потребує застосування наркозу в ході проведення процедури введення клітинновмісного препарату.

Задачею корисної моделі є удосконалення способу лікування виразкового коліту і хвороби Крона середньо-тяжкого і тяжкого ступенів, в якому завдяки запропонованого комплексного застосування мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика і донорських гематопоетичних клітин пуповинної крові досягається висока ефективність лікування зазначених хворіб без застосування складної ендоскопічної апаратури. При цьому, запропонований спосіб лікування є безболісним і не потребує застосування наркозу.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом лікування виразкового коліту і хвороби Крона середньо-тяжкого і тяжкого ступенів, що включає застосування у курсі лікування клітинної терапії, в якому клітинну терапію здійснюють шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика та ядровмісних клітин пуповинної крові.

У запропонованому способі лікування кожна процедура клітинної терапії включає внутрішньовенне введення по 100 млн мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції і 1 млрд ядровмісних клітин пуповинної крові.

У запропонованому способі лікування зазначені мезенхімальні клітини пупкового канатика складаються з фібробластоподібних клітин, біля 95 % яких є клітинами CD105, CD73 і CD90, а ядровмісні клітини пуповинної крові взяті у вигляді концентрату, що містить лімфоцити з маркерним складом CD34, CD45, CD14, CD19 і HLA-DR.

При цьому, запропонований спосіб може включати терапію аміносаліцилатовими препаратами, зокрема, похідними 5-аміносаліцилової кислоти, що застосовується при лікуванні легкої форми хвороби Крона.

Нами було встановлено, що сукупне застосування мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика і донорських гематопоетичних клітин пуповинної крові на стадіях середньо-тяжкої і тяжкої є ефективним лікуванням, і дозволяє обмежитися додатковим застосуванням тільки аміносаліцилатовими препаратами, які застосовуються на легких стадіях захворювання. Таким чином, при лікуванні виразкового коліту і хвороби Крона у середньо-тяжкому і тяжкому ступенях стало можливим уникнути застосування кортикостероїдів і, у подальшому, імунодепресантів. При цьому, значно скорочуються післяопераційні рецидиви.

Спосіб здійснюють наступним чином.

За результатами огляду пацієнта, вивчення результатів його стану, а також даних щодо групи крові і резус фактору, призначають курс лікування, що включає процедури клітинної терапії: одночасне внутрішньовенне введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

Для клітинної терапії попередньо отримують мезенхімально-стромальну фракцію клітин та ядровмісні клітини пуповинної крові.

Мезенхімально-стромальну фракцію клітин отримують з пуповинного канатика (10-12 см відрізка пуповинного канатика), отриманого в процесі нормальних пологів після відсікання пуповини. Виділення проводять методом ферментної дисоціації з застосуванням колагенази

типу А. Інкубація подрібненої пуповини у середовищі DMEM без сироватки у присутності 1 мг/мл колагенази типу А проводилась протягом 2 годин при температурі 37 °С і постійному прокачуванні. Далі клітини двічі промивали середовищем DMEM з сироваткою. Клітинний осад ресуспендували у середовищі росту DMEM/F12, що містить 10 % сироватку телят, 2 mmol/L

глутаміну, 1 % незамінних амінокислот і 1 % пеніцилін/стрептоміцин. Культивування здійснювали при 37 °С у атмосфері 5 % CO₂. При досягненні суцільного конфлюентного моношару клітини пересівали з використанням 0,0125 % розчину трипсину до нових флаконів з площею дна 175 см² з культуральним середовищем CTS Xeno free (GIBCO).

Такий метод культивування дозволяє отримати до кінця 4-5 тижня популяцію мезенхімальних стромальних клітин у кількості, необхідній для проведення двох процедур для лікування.

Отримані мезенхімальні стромальні клітини пупкового канатика складаються з фібробластоподібних клітин, біля 95 % яких, що є клітинами CD105, CD73 і CD90.

Донорські гематопоетичні клітини: ядровмісні клітини пуповинної крові, – виділяли з пуповинної крові добровільних донорів, отриманої під час нормальних пологів після відсікання пуповини, шляхом проведення седиментації у присутності 1,2 % гідроксіетилкрахмалу і подальшого заморожування концентрату у присутності DMSO. Концентрат ядровмісних клітин пуповинної крові містить лімфоцити з маркерним складом CD34, CD45, CD14, CD19 і HLA-DR. Концентрат також характеризується групою крові і резус-фактором, які мають відповідати групі крові і резус-фактору пацієнта.

Мезенхімальні стромальні клітини пупкового канатика і ядровмісні клітини пуповинної крові досліджуються на відсутність вірусів, бактеріальних і мікроплазмених інфекцій та грибів.

Кожна процедура клітинної терапії включає внутрішньовенне введення по 100 млн мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції і 1 млрд ядровмісних клітин пуповинної крові. Введення здійснюється внутрішньовенно крапельним методом під контролем тиску і температури пацієнта.

У зв'язку з тим, що у патогенезі головний чинник, який визначає враження слизових оболонок кишки, відводиться активації Т-хелперів, можна припустити, що введення клітинної складової буде діяти аналогічно медикаментозним імуносупресорам, що подавляють вироблення ІЛ-2 Т-лімфоцитами.

Спосіб лікування пройшов досліджувався на групі пацієнтів, які отримали клітинну терапію у вигляді чотирьох процедур шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові. Крім того, пацієнти з середньо-тяжким і тяжким ступенями виразкового Коліту чи хвороби Крона додатково могли отримувати медикаментозну терапію аміносаліцилатовими препаратами.

Нижче наведені приклади, які демонструють, але не обмежують корисну модель.

Приклад 1

Пацієнт К., 28 років, діагноз: виразковий коліт, дистальна форма (тяжкий ступінь).

Пацієнт К. відмічає наявність переймоподібних болів у лівій частині живота, домішки крові у випорожненнях, частішання випорожнення до 12 разів на добу, зниження апетиту і підвищення температури до 37,5 °С.

У клінічному аналізі крові відзначено: знижений вміст гемоглобіну до 75 од., підвищений СОЕ до 30 мм/г, помірна диспротейемія, С-реактивний білок – 20 мкл/л. При колоноскопії зареєстровані гіпермія і набряк слизової оболонки дистальних відділів товстої кишки. Слизова оболонка уразлива, контактено кровоточить, визнаються поверхневі язви, покриті фібрином. При рентгенологічному обстеженні Пацієнта К. знайдена деформація гаустри, щербатість контурів зі згладженими фізіологічними вигинами дистальних відділів кишок. При імунологічному дослідженні сироватки крові хворого (Пацієнта К.) зафіксований знижений рівень інтерлейкінів ІЛ-1, рівень аутоантитіл до нейтрофілів – 38 Е/мл, рівень антитіл до парієнтальних клітин – 36 Е/мл. Морфологічне дослідження показало наявність тріщинок слизистої, зменшення кількості бокаловидних клітин, збільшення глибини крипт, скупчення лейкоцитів у прозору крипт, збільшення кількості міжепітеліальних лімфоцитів і збільшення дифузної лімфоплазмоцитарної інфільтрації власної пластинки, дистрофію епітелію.

Пацієнту К. призначена клітинна терапія: внутрішньовенне введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

Попередньо отримали мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика у необхідній кількості (100 млн. і 1 млрд відповідно на кожну процедуру). У день введення розморозили і підготували концентрат ядровмісних клітин пуповинної крові відповідної до групи крові і резус-

фактору Пацієнта К. Усі клітини вводилися краплинним методом у середовищі, що містить: 1,2 %-ий альбумін людини, 3 %-ний реополіглюкін і фізіологічний розчин.

Введення клітинної суспензії здійснювали внутрішньовенно під контролем тиску і температури тіла.

5 Всього протягом року Пацієнту К. проводили чотири рази внутрішньовенне введення клітинної суспензії з мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції у необхідній кількості та концентрату ядровмісних клітин пуповинної крові відповідної до його групи крові і резус-фактору.

10 Після трьох місяців спостереження виявили, що у Пацієнта К. рівень ІЛ-1 збільшився на 35 %, рівень аутоантитіл до нейтрофілів знизився до 25 Е/мл, і рівень антитіл до парієнтальних клітин знизився до 29 Е/мл.

Через 6 місяці Пацієнту К. проводили повторне ендоскопічне дослідження, під час якого виявлено: слизова рожева, гладка, блискуча. Судинний малюнок посилений, перебудований. Контактна кровоточивість відсутня.

15 Пацієнту К. також була призначена підтримуюча терапія препаратом месакол.

При повторному гістологічному дослідженні біоптату у Пацієнта К. визначена різка активізація проліферативних процесів, посилене утворення дрібних і великих фолікулів у слизовій оболонці товстої кишки у порівнянні з вихідним рівнем, глибина кишкових крипт зменшилась.

20 Такі результати дозволяють вважати лікування виразкового коліту високо ефективним і безболісним.

Приклад 2

Пацієнт З., 28 років, діагноз: хвороба Крона (тяжкий ступінь).

25 Пацієнт З. звернувся зі скаргами на переймоподібні болі у правій частині живота, домішки крові у випорожненнях у вигляді окремих мазків, частішання випорожнення до 6 разів на добу, зниження апетиту і підвищення температури до 38,5 °С.

У клінічному аналізі крові Пацієнта З. відмічається виражена анемія зі зниженням гемоглобіну до 65 од., підвищений СОЕ до 39 мм/г, помірна диспротеїнемія, С-реактивний білок – до 35 мкл/л. При глибокій ендоскопії слизова оболонка дистальних відділів товстої кишки виявлена набряклою, гіперемірованою з нерівними вип'ячуваннями, з глибокими язвами з підритими кінцями. Характерна асиметричність ураження з утягуванням до процесу стінок кишки. Рентгенологічне обстеження Пацієнта З.: одночасне ураження клубового і піднімаючого відділів товстої кишки. Уражені сегменти виглядають звуженими і ригідними. При імунологічному дослідженні сироватки крові хворого (Пацієнта З.) виявлено знижений вміст рівня інтерлейкінів, відносно високий рівень аутоантитіл до нейтрофілів – 40 Е/мл, рівень антитіл до парієнтальних клітин – 41 Е/мл. Морфологічне дослідження показало зменшення кількості бокаловидних клітин, збільшення глибини крипт, збільшення кількості міжепітеліальних лімфоцитів і посилення дифузної лімфоплазмочитарної інфільтрації власної пластинки; спостерігалися крипт-абсцеси, дистрофія і некроз епітелію.

40 Пацієнту З. призначені процедури клітинної терапії шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

Попередньо отримали мезенхімальні стромальні клітини пупкового канатика у необхідній кількості (100 млн. і 1 млрд відповідно на кожну процедуру). У день введення розморозили і підготували концентрат ядровмісних клітин пуповинної крові відповідної до групі крові і резус-фактору Пацієнта З. Усі клітини вводилися краплинним методом у середовищі, що містить: 1,2 %-ий альбумін людини, 3 %-ний реополіглюкін і фізіологічний розчин.

Введення клітинної суспензії здійснювали внутрішньовенно під контролем тиску і температури тіла. Всього протягом року Пацієнтові З. було здійснено чотири процедури клітинної терапії шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

Після трьох місяців спостереження виявили, що у Пацієнта З. рівень ІЛ-1 збільшився на 35 %, рівень аутоантитіл до нейтрофілів знизився до 26 Е/мл, і рівень антитіл до парієнтальних клітин знизився до 31 Е/мл.

55 Пацієнтові З. також призначена підтримуюча терапія препаратом месалазин.

При дослідженні стану Пацієнта З. через 6 місяців виявлено: гіперплазія епітелію, збільшення кількості бокаловидних клітин у епітелії слизової оболонки товстої кишки у порівнянні з вихідним рівнем, зменшення глибини кишкових крипт і зниження лімфоцитарної інфільтрації слизової оболонки товстої кишки. Судинний малюнок посилений, перебудований. Контактна кровоточивість відсутня.

Такі результати дозволяють вважати лікування хвороби Крона високо ефективним і безболісним.

Приклад 3.

Пацієнтка Н., 49 років, діагноз: хвороба Крона (середньо-тяжкий ступінь).

5 Пацієнтка Н. скаржилась на болі у правій і лівій частинах живота, наявність яскраво-червоної крові у випорожненнях, частішання випорожнення до 13-17 разів на добу, зниження апетиту і підвищення температури до 38,2 °С. У клінічному аналізі крові відмічається виражена анемія зі зниженням гемоглобіну до 58 од., підвищений СОЕ до 41 мм/г, помірна диспротеїнемія, С-реактивний білок – 34 мкл/л. Ендоскопія: гіперемія, набряк і зернистість слизової оболонки дистальних відділів товстої кишки, контактна уразливість слизової оболонки, тріщини слизової оболонки і невеликі поверхневі язви. Рентгенологічне дослідження: деформація гаустер, зменшення прозора у області сігми, стеноз і скорочення товстої кишки зі згладженими фізіологічними вигинами її дистальних відділів; глибокі язви з підритими кінцями. При імунологічному дослідженні сироватки крові хворої (Пацієнтки Н.) виявлено зниження вмісту інтерлейкінів ІЛ-1, відносно високий рівень аутоантитіл до нейтрофілів – 39 Е/мл, рівень антитіл до парієнтальних клітин – 40 Е/мл. Морфологічне дослідження показало збільшення глибини крипт, скупчення лейкоцитів у прозору крипт і у підслизовим шаром, збільшення кількості міжепітеліальних лімфоцитів і посилення дифузної лімфоплазмоцитарної інфільтрації власної пластинки, дистрофія епітелію.

20 Пацієнтці Н. призначена клітинна терапія шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

Попередньо отримали мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика у необхідній кількості (100 млн. і 1 млрд відповідно на кожну процедуру). У день введення розморозили і підготували концентрат ядровмісних клітин пуповинної крові відповідної до групі крові і резус-фактору Пацієнтки Н. Усі клітини вводилися краплинним методом у середовищі, що містить: 1,2 %-ий альбумін людини, 3 %-ний реополіглюкін і фізіологічний розчин.

Введення клітинної суспензії здійснювали внутрішньовенно під контролем тиску і температури тіла. Всього протягом року Пацієнтці Н. було здійснено чотири процедури клітинної терапії шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

Після трьох місяців спостереження за Пацієнткою Н. виявили, що рівень ІЛ-1 збільшився на 30 %, рівень аутоантитіл до нейтрофілів знизився до 25 Е/мл, і рівень антитіл до парієнтальних клітин знизився до 27 Е/мл.

35 При дослідженні стану Пацієнтки Н. через 6 місяців виявлено: зниження висоти складок, підсилення процесів епітелізації, збільшення кількості бокаловидних клітин у епітелії слизової оболонки товстої кишки у порівнянні з вихідним рівнем, зниження лімфоцитарної інфільтрації слизової оболонки товстої кишки, структура кишкових крипт приблизилася до нормальної. Судинний малюнок посилений, перебудований. Контактна кровоточивість відсутня. Рецидивів захворювань не спостерігалось.

40 Такі результати дозволяють вважати лікування хвороби Крона високо ефективним і безболісним.

Запропонований спосіб лікування досліджувався нами на 16 хворих з діагнозом виразкового коліту чи хвороби Крона середньо-тяжкого і тяжкого ступенів. Лікування включало проведення 45 процедур клітинної терапії шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові, що за необхідністю доповнювалося медикаментозною терапією аміносаліцилатовими препаратами. На рік кожному пацієнтові було призначено чотири процедури зазначеної клітинної терапії. Контроль за результатами лікування вели за динамікою клінічних проявів 50 захворювання, спираючись на індекси клінічної активності хвороби Крона і виразкового коліту. За час спостереження, що тривало більше року, загострювання протікання захворювання не відмічалось. Такі результати дозволяють вважати запропонований спосіб лікування виразкового коліту і хвороби Крона високоефективним та безболісним.

55 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб лікування виразкового коліту і хвороби Крона середньо-тяжкого і тяжкого ступенів, що включає застосування у курсі лікування клітинної терапії, який **відрізняється** тим, що клітинну терапію здійснюють шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стромальних клітин 60 пупкового канатика мезенхімально-стромальної фракції та ядровмісних клітин пуповинної крові.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кожна процедура клітинної терапії включає внутрішньовенне введення по 100 млн мезенхімальних стромальних клітин пупкового канатика і 1 млрд ядровмісних клітин пуповинної крові.

5 3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що зазначені мезенхімальні стромальні клітини пупкового канатика складаються з фібробластоподібних клітин, близько 95 % яких є клітинами CD105, CD73 і CD90, а ядровмісні клітини пуповинної крові взяті у вигляді концентрату, що містить лімфоцити з маркерним складом CD34, CD45, CD14, CD19 і HLA-DR.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що додатково включає терапію аміносаліцилатовими препаратами.

10

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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

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