



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **14962** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
A61K 31/80 (2006.01)
A61B 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА В-КЛІТИННІ ХРОНІЧНІ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ НА РАННІЙ СТАДІЇ

1

2

(21) u200509812

(22) 18.10.2005

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Гайдукова Світлана Миколаївна, Сивак Любов Андріївна, Карнабеда Оксана Андріївна

(73) КИЇВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМ. П.Л. ШУПИКА

(57) Спосіб лікування хворих на В-клітинні хронічні лімфопрولیферативні захворювання на ранній стадії, що включає введення хворому лікарського засобу протипухлинної дії, який **відрізняється** тим, що як лікарський засіб використовують інтерферон-альфа у кількості по 3 млн. Міжнародних Одиниць три рази на тиждень протягом 6 місяців.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме гематології, та може бути використана для лікування хворих на В-клітинні хронічні лімфопрولیферативні захворювання (В-ХЛПЗ) на ранній стадії захворювання.

Упродовж багатьох років "стандартним" лікувальним засобом хворих на В-ХЛПЗ на ранній стадії були цитостатичні препарати (хлорамбуцил, циклофосфамід, фударабін). Однак, проведення цитостатичної терапії частіше призводить до тяжких ускладнень, що виникають на тлі лейкопенії, тромбоцитопенії, анемії, погіршуючи якість життя та прогноз захворювання в цілому. Крім того, цитостатична терапія не виключає розвиток синдрому Рихтера. Відомо, що пухлинні клітини, які "вижили" після чергового курсу терапії, можуть у цей час без перешкоди проліферувати та змінюватися у фенотипічному відношенні, оскільки їх геном більш пластичний і менш стабільний, ніж геном нормальних клітин. Внаслідок виникають більш агресивні клони, знижується їх чутливість до протипухлинних препаратів і захворювання неминуче прогресує. Крім того, в останні роки В-ХЛПЗ розглядають як захворювання, пов'язане, передусім, не з прискороною проліферацією клітин пухлинного клону, а зі зниженням його чутливості до запуску програми загибелі клітин - апоптозу.

В основу винаходу поставлено задачу створення такого способу лікування хворих на В-клітинні хронічні лімфопрولیферативні захворювання на ранній стадії, в якому б завдяки індукції апоптозу забезпечувалось би видалення пухлинного клону клітин. Провідне місце серед природних

регуляторів апоптозу займають цитокини, а саме - інтерферони (ІФН). Відомо, що природний ІФН-альфа є агентом, що здійснює антипроліферативну, імуномодельюючу і антивірусну дію. [Ветра Я.Я. Иванова Л.В. Крейле И.Е. Цитокины // Гематол. и трансфузиол. - 2000.-№45(4).-с.45-48. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. К.: Наукова думка, 1998: 320 с. Воронцова А.Л., Кудрявей; Ю.И. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных // Онкология.- 2000.- №1.-с.11- 15.]. Він пригнічує онкогени і клітинну проліферацію, посилює диференціацію клітин, підвищує чутливість клітин-мішеней до власного ІФН, та стимулює продукцію ендogenous ІФН Т-лімфоцитами. ІФН-альфа забезпечує стабільність клітинного геному за рахунок зниження вірогідності виникнення мутацій у пухлинних клітинах і перешкоджає диверсифікації процесів пухлинної прогресії. Крім того, ІФН-альфа впливає на експресію генів, асоційованих з апоптозом, серед яких є антиген CD95. Встановлено, що ІФН-альфа за допомогою CD95-рецептору посилює апоптоз пухлинних клітин. A.P. Jewell [Jewell A.P. Interferon-alpha, Bcl-2 expression and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia //Leuk. Lymphoma.- 1996.-Vol.21, №1-2. - P. 43-47.] довів, що ІФН-альфа посилює апоптоз in vivo, припиняє дію ростових факторів, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 та ІФН-гамма. Результати застосування ІФН-альфа в якості підтримувальної терапії, було вперше опубліковано у 1992 F. Ferrata і співавт [Recombinant interferon-alpha-2a as maintenance treatment for patients with

(19) **UA** (11) **14962** (13) **U**

advanced stages chronic lymphocytic leukemia responding to chemotherapy / F. Ferrata, V. Rametta, G. Mele et al.// Am. J. Haematol. - 1992.-Vol.42.-P.45-49.]. Аналіз отриманих результатів терапії показав, що хворі, які отримували ІФН-альфа, мали вірогідно більшу тривалість ремісії та меншу кількість інфекційних ускладнень.

Поставлена нами задача вирішується шляхом застосування для лікування хворих на В-клітинні хронічні лімфопроліферативні захворювання інтерферону на ранній стадії.

Ми вперше застосували інтерферон у дозі 3 млн. МО внутрішньом'язево 2-3 рази на тиждень на протязі 6 місяців для лікування хворих В-ХЛПЗ, залежно від прогностичних критеріїв перебігу захворювання. Діагноз верифікували на підставі загальноклінічних даних та морфологічних, цитохімічних і імунологічних досліджень пухлинних клітин. При встановленні діагнозу враховували клінічні і лабораторні параметри: вік хворого, первинний статус, кількість лейкоцитів, час подвоєння лімфоцитів периферичної крові (ЧПЛ), швидкість приросту лімфоцитів (ШПЛ), тип ураження кісткового мозку. Оцінку морфологічних характеристик елементів гемопоєзу проводили на мазках периферичної крові та пунктатах кісткового мозку, забарвлених за Паппенгеймом. Кістковомозкове кровотворення оцінювали в пунктатах із груднини та/або із здухвинної кістки при трепанобіопсії. На підставі цитологічних особливостей лейкоемічних клітин, вираховували лімфоцитограну: кількість малих, великих лімфоцитів і ВГЛ на 200-400 лімфоцитів периферичної крові. Морфологічний варіант В-ХЛПЗ визначали згідно із FAB критеріями: типовий В-ХЛПЗ (> 90% малих лімфоцитів, < 10% пролімфоцитів, <10% великих лімфоцитів) та атипичний варіант В-ХЛПЗ (< 90% малих лімфоцитів, > 10% і < 55% пролімфоцитів, <10% великих лімфоцитів, >5% і <30% лімфоцитів із розщепленим ядром). Проводили гістологічне дослідження трепанобіоптатів здухвинних кісток. Імунофенотипування пухлинних клітин проводили за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) до антигенів різних кластерів диференціювання (CD), характерних для різних стадій лімфопоезу, методом прямої і непрямой імуофлюоресценції за методикою О.М. Лежньової та ПАП-методом. Імунофенотипування проводилося з метою діагностики В-ХЛПЗ. Панель складалася з вітчизняних і імпортованих зразків МКАТ. Дані досліджень обробляли методами варіаційної статистики. Для статистичної обробки матеріалу використовували програму "Statistica for Windows".

Залежно від прогностичних чинників (морфологічний варіант пухлинного клону, тип ураження кісткового мозку, час подвоєння лімфоцитів, імунофенотип пухлинних клітин) серед хворих із ранньою клінічною стадією виділено дві групи низько-

го (I група) та високого (II група) ступенів ризику неопластичного процесу.

Першу групу (n=18) склали хворі, які мали типичну морфологію пухлинних клітин (більше 90% малих лімфоцитів), осередкове ураження кісткового мозку, класичний фенотип (CD19+, HLA-DR+, CD5+,CD23+,CD20+,CD22+) та позитивний CD95 фенотип. Час подвоєння лімфоцитів периферичної крові - більше 12 місяців.

Хворі II групи (n=16) мали атипичну морфологічну картину пухлинних клітин (менше 90% малих лімфоцитів, більше 10% та менше 55% пролімфоцитів, більше 10% великих лімфоцитів), дифузне ураження кісткового мозку та експресію активаційних (CD25, CD38) та/або мієломонітоцитарних (CD11c, CD11b) антигенів, окрім класичних. CD95 антиген на пухлинних клітинах був негативним. Час подвоєння лімфоцитів периферичної крові становив менше 12 місяців.

Залежно від призначеної терапії кожна група була розподілена на дві підгрупи ІА (n=10), ІВ(n=8) та ПА(n=9), ПВ(n=7). Хворі ІА та ІА підгруп отримали курс терапії препаратами альфа-ІФН у дозі 3 млн. МО внутрішньом'язево 2-3 рази на тиждень. Хворим підгрупи ІВ та ІІВ лікування не проводилось, вони знаходились тільки під наглядом гематолога. Час спостереження становив 38 місяців. У віковому і статевому аспектах сформовані групи були однорідні і співставимі.

Результати терапії оцінювалися за критеріями Міжнародної робочої групи по ХЛЛ (IWCLL): повна ремісія (ПР) - не має ознак захворювання; часткова відповідь (ЧВ) - трансформація стадії С в стадію А або В, стадії В у стадію А; стабільний стан (СС) - відсутність трансформації стадії; прогресування захворювання (ПЗ) - трансформація стадії А у стадію В або С, стадії В у стадію С. Крім того, визначали вплив препаратів ІФН на апоптоз, шляхом визначення експресії антигену CD95, а також на корекцію порушень протипухлинного імунного нагляду.

Після проведеної терапії препаратами альфа-ІФН в ІА групі результати були наступними. За критеріями IWCLL ПР - у 2 (з 10 хворих), СС - у 7 (з 10 хворих) та трансформація стадії (ПЗ) тільки у одного хворого (з 10 хворих). В ПА групі з високим ступенем ризику перебігу захворювання, які також отримали терапію препаратами ІФН-альфа, СС- 5 (з 9 хворих) та у 4 (з 9 хворих) хворих спостерігали прогресію захворювання (ПЗ). Лікування препаратами ІФН-альфа хворі переносили добре. Тільки у 2 хворих (з 10 хворих) ІА підгрупи та у 1 (з 9 хворих) ІА підгрупи було зареєстровано грипозоподібний синдром. Співставлення результатів спостереження за хворими I (А,В) та II (А,В) груп від моменту встановлення діагнозу до стадії трансформації захворювання та призначення цитостатичної терапії наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Результати тривалості часу перебігу захворювання В-ХЛПЗ до прогресування захворювання та призначення цитостатичної терапії

Групи спостереження	Час до прогресування захворювання, місяці	Достовірність
IA	35,2±1,2	p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ >0,05
IB	28,0±0,7	
IIA	8,9±0,6	
IIB	8,4±0,16	

Примітка:

1. p₁ - достовірна різниця між IA та IB групою хворих;
2. p₂ - достовірна різниця між IA та ПА групою хворих ;
3. p₃ - достовірна різниця між ПА та IIB групою хворих

Як видно з наведених даних, у хворих IA підгрупи відзначена достовірна різниця тривалості часу до прогресу процесу та призначення цитостатичної терапії порівняно з IIB та II (A,B) групами. У хворих із високим ризиком захворювання (ПА, IIB) достовірної різниці тривалості часу до прогресування захворювання та призначення ХТ відмічено не було.

Після проведеної терапії у хворих IA та ПА групи визначалося достовірне (p₁ <0,05) зниження рівня експресії CD19 та HLA-DR, що свідчить про зменшення пухлинного В-клонів, але не про повну його ліквідацію (табл. 2).

Найважливіше клінічне значення має той факт, що після курсу терапії з препаратами ІФН-

альфа у хворих IA мало місце достовірне підвищення (p <0,05) кількості експресії CD95, на яких виявлявся антиген апоптозу CD95 (табл.2). У хворих на В-ХЛПЗ як у IA, так і у ПА підгрупах після лікування препаратами альфа-ІФН були також виявлені позитивні зміни стану клітинного імунітету за рахунок достовірного зниження рівня CD8+-клітин і, відповідно, нормалізація хелперно-супресорного співвідношення та збільшення кількості CD16+-клітин (Табл.2). Останнє можна розцінювати як позитивний вплив препаратів ІФН-альфа на процес активації і диференціювання ПКК.

Таблиця 2

Результати імунологічного дослідження пухлинних клітин у хворих на В-ХЛПЗ

Антигени, CD	Кількість позитивних клітин, % (M±m)				Статистична достовірність
	IA підгрупа (n=10)		HA підгрупа (n=9)		
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування	
HLA-DR	69,7±0,5	42,8±0,4	71,4±0,2	46,0±0,9	p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ >0,05
CD19	67,4±0,6	48,6±0,7	65,4±0,7	50,4±0,4	p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ >0,05
CD20	71,7±0,4	61,6±0,8	69,8±0,4	63,3±0,5	p ₁ >0,05; p ₂ >0,05; p ₃ >0,05
CD5	92,1±0,9	72,4±0,1	87,9±0,1	73,6±0,1	p ₁ >0,05; p ₂ >0,05; p ₃ >0,05
CD4	4,5±0,2	4,1±0,2	3,7±0,1	3,1±0,1	p ₁ >0,05; p ₂ >0,05; p ₃ >0,05
CD8	8,3±1,9	3,1±0,2	7,8±0,4	4,1±0,3	p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ >0,05
CD4/CD8	0,54±0,09	1,6±0,09	0,29±0,01	1,5±0,08	p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ >0,05
CD16	1,02±0,04	3,4±0,08	0,78±0,01	2,4±0,09	p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ >0,05
CD95	15,4±0,3	29,9±0,2	-	-	p ₁ <0,05

* - p₁ - достовірна різниця до і після лікування у IA групі хворих; p₂ - достовірна різниця до і після лікування у ПА групі хворих; p₃ - достовірна різниця між IA та ПА групою хворих.

Таким чином, застосування препаратів ІФН-альфа на ранній стадії є ефективною та виправданою у хворих на В-ХЛПЗ із низьким ступенем пухлинного процесу, що супроводжується збільшенням тривалості періоду до початку призначення цитостатичної терапії, яка у більшості випадків не є патогенетичною. Нами доведено, що застосу-

вання препаратів ІФН-альфа призводить до позитивних кількісних і якісних змін імунофенотипової характеристики злоякісних В-клітин, сприяє індукції апоптозу та корекції порушень протипухлинного імунного нагляду: зниження рівня Т-клітин супресорів та збільшення кількості природних клітин кілерів.

