



УКРАЇНА

(19) UA (11) 29936 (13) U

(51) МПК (2006)

A61K 38/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ АДАПТИВНОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ

1

2

(21) u200714440

(22) 21.12.2007

(24) 25.01.2008

(72) КАЛЮГА НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА, UA, КУД-
РЯВЦЕВА ВАЛЕНТИНА ЄВГЕНІЇВНА, UA, ЧЕРЕ-
ДНИК ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, UA(73) КАЛЮГА НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА, UA, КУД-
РЯВЦЕВА ВАЛЕНТИНА ЄВГЕНІЇВНА, UA, ЧЕРЕ-
ДНИК ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, UA(57) 1. Спосіб адаптивної імунотерапії, що включає введення пацієнту аутоцитокінів, отриманих культивуванням моноклеарних клітин пацієнта in vitro у присутності мітогену, який **відрізняється** тим, що культивують моноклеарні клітини, виділені зі слини пацієнта.2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що як мітоген використовують фітогемаглютинін.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до способів імунотерапії і може бути використана для корекції і терапії широкого спектру імунODEпресивних станів.

Виявлення в останні роки особливих речовин-цитокінів, і з'ясування їхньої ролі в активації імунної реакції стало поштовхом для динамічної розвитку цитокінотерапії. Саме цитокіни синтезуються в організмі першими під впливом патогенних факторів. Мікродози цитокінів активують клітки Т-лимфоцитів-хелперів і, по суті, саме вони є пусковим механізмом імунної реакції організму.

Відомий спосіб адаптивної імунотерапії відповідно [до патенту DE №3910011 МПК A61K37/02, 1990р.]. Спосіб включає введення пацієнту підшкірно, внутрішньо, внутрим'язово чи внутрішньовенно синтетичного цитокіну - інтерлейкіну-2.

Оскільки в організмі в силу різних причин - у післяопераційному періоді, станах після важкої травми, розповсюдженої граммпозитивної і грамнегативної інфекції, перитоніті, імунODEпресивних станах, - гальмується вироблення аутоцитокінів, без яких імунна реакція не може відбутися, у відомому способі імунну систему пацієнта запускають ззовні, тобто вводять інтерлейкіл-2 у дозі (1,3-5)10⁶од/кг, унаслідок чого підсилюється неспецифічна клітинна відповідь, що сприяє зниженню числа бактерій у перитонеальній порожнині і зниженню ендотоксинів у плазмі крові.

Однак використання високих доз синтетичного препарату інтерлейкіну-2 може викликати розвиток токсичних реакцій, оскільки він не є "власним продуктом" організму, тобто не є аутоцитокіном. В таких випадках часто відбувається накладення токсичних реакцій на загальний імунODEпресивний стан організму пацієнта, що може призвести до важких наслідків.

Крім того, синтез інтерлейкінів дуже дорога технологія навіть для багатих країн Заходу, що робить використання відомого способу малодоступним для широкого кола пацієнтів.

Відомий спосіб адаптивної імунотерапії відповідно [до патенту RU №20981125 С1 МПК A61K38/20, 38/00 від 10.12.1997р.]. "Спосіб адаптивної імунотерапії". Спосіб включає забір крові в пацієнта, виділення моноклеарних кліток, культивування їх з інтерлейкіном-2 in vitro і повернення їх пацієнту шляхом введення в організм. Виділення моноклеарних кліток проводять у два етапи. На першому етапі одержують лейкозавіс, а на другому - з лейкозавіс виділяють моноклеарні клітки. Супернатант (концентрат) піддають дворазовій процедурі відмивання і культивують з інтерлейкіном-2, після чого повертають їх назад пацієнту. При наявності гнійної порожнини, перед введенням пацієнту культивованих з інтерлейкіном-2 моноклеарних кліток, гнійну порожнину промивають розчином, що містить комбінацію ци-

(13) U

(11) 29936

(19) UA

токінів, отриманих при культивуванні моноклеарних кліток з інтерлейкіном-2.

Відомий спосіб у більшій мірі, у порівнянні з вищерозглянутим аналогом, знижує ризик розвитку токсичних реакцій у пацієнта, оскільки запуск механізму імунної реакції проводять з використанням культивованих з інтерлейкіном-2, *in vitro* моноклеарних кліток пацієнта, після чого модифіковані шляхом зв'язування з комбінацією цитокінів моноклеарні клітки вводять пацієнту. При цьому знижується доза інтерлейкіну-2, яка попадає в організм пацієнта, і знижується ступінь токсичних реакцій. Однак токсична реакція пацієнта не виключена й у відомому способі, оскільки відомий спосіб включає використання синтетичного цитокіну - інтерлейкіну-2.

Крім того, обмежує використання відомого способу те, що він включає забір крові пацієнта, тобто є інвазивним. Любий інвазивний спосіб створює проблеми при його використанні у дітей і деяких категорій пацієнтів, для яких забір крові з вени утруднений.

Відомий спосіб адаптивної імунотерапії відповідно [до патенту UA №17733A МПК A61K39/02 "Спосіб профілактики та лікування післяопераційних гнійно-запальювальних ускладнень" (найближчий аналог)]. Спосіб включає підшкірне введення аутоцитокінів у дозі 50-100мкг/мл, отриманих культивуванням моноклеарних кліток хворого *in vitro* у присутності мітогену ФГА (фітогемаглютиніну) і бактеріального антигену у виді аутовакцини чи вакцини БЦЖ.

В якості бактеріального антигену можливе використання аутовакцини з кишкової палички хворої або для профілактики ускладнень.

Відповідно до відомого способу хворому вводять аутоцитокіни, отримані в результаті взаємодії бактеріального антигену і імунокомпетентних кліток пацієнта (лімфоцитів, моноцитів) *in vitro*. У цьому випадку запуск механізму імунної реакції відбувається винятково "рідними" в повній мере адаптованими до організму пацієнта, аутоцитокінами що абсолютно знімає проблему токсичних реакцій і що значно підвищує ефективність дії відомого способу.

Крім того, собівартість способу, в порівнянні зі способами, що включають використання дорогого рекомбінантного інтерлейкіну-2, істотно нижче, що дозволяє робити цей спосіб більш доступним для пацієнтів.

До недоліків використання відомого способу варто віднести те, що він є інвазивним, а це створює проблеми при його використанні у дітей і деяких категорій пацієнтів, для яких забір крові з вени утруднений.

Задачею корисної моделі, що заявляється, є створення неінвазивного і ефективного способу адаптивної імунотерапії.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі адаптивної імунотерапії, що включає введення пацієнту аутоцитокінів, отриманих культивуванням моноклеарних кліток пацієнта *in vitro* у присутності мітогену, відповідно до корисної моделі, культивують моноклеарні клітки, виділені зі

слини пацієнта. У якості мітогену використовують ФГА.

Суть способу, що заявляється, полягає в наступному.

Слина, будучи унікальною біологічною рідиною, що виконує, крім інших, захисну, бактерицидну, імунну функції, містить імуноглобуліни й антибактеріальні речовини, лейкоцити, тобто може служити ефективним матеріалом для одержання аутоцитокінів неінвазивним способом. При цьому забір матеріалу є не тільки неінвазивним, але і практично необмеженим. Він придатний для дітей будь-якого віку і дорослих із проблемами забору крові з вени.

Спосіб здійснюється таким чином.

В умовах стаціонару або амбулаторно проводять забір слини в пацієнта в кількості 40мл, з якого виділяють моноклеарні клітки культивують їх *in vitro* при температурі 37°C на протязі 3 годин у присутності мітогену ФГА. Потім шляхом центрифугування відокремлюють моноклеарні клітки, надосад видалюють, до осаду додають культуральну середовище і продовжують культивування 18-20 годин. Одержують аутоцитокіни, готові для введення пацієнту - зрошенням, аплікацією на раневу поверхню, чи з допомогою ін'єкції.

Таким чином, спосіб адаптивної імунотерапії, що заявляється, вирішує поставлену задачу ефективного і неінвазивного одержання аутоцитокінів для введення пацієнту і рішення проблем вторинного імунодефіциту.

Приклад №1

Пацієнт А. (27 років), надійшов із хронічним рецидивуючим афтозним стоматитом.

Локалізація: бічна поверхня язика, слизова оболонка губ, тік. Симптоми: тривале існування однієї чи декількох афт (до 2міс.), різка хворобливість, страждає. Загальний стан хворої ослаблений.

Клінічна картина: хворобливі ущільнення з глибокими виразками і гіперемією слизової оболонки по периферії, характер у порожнині рота виявляють рубці, одна виразка перемінна іншу.

Діагностика - заснована на клінічній картині, результатах цитологічного дослідження скребка з поверхні виразки (картина неспецифічного запалення), позитивних шкірно-алергічних пробах з мікробними алергенами (можлива моно- і поліалергія). Гістологічна картина: ділянка некрозу з повним руйнуванням епітелію і базальної мембрани, запалення у власне слизоватій оболонці і підслизистом шарі.

Традиційне лікування хронічного рецидивуючого афтозного стоматиту полягає в застосуванні антистатиків, сульфаніламідів, вітамінних препаратів групи А і Е, використовуються кортикостероїди і цитостатики. Загострення настає на 10-12 день, через 10-20 днів спостерігаються рецидиви, які потребують нового циклу застосування досить сильнодіючих препаратів.

При лікуванні згідно способу, що заявляється, для одержання аутоцитокінів амбулаторно провели забір слини в пацієнта в кількості 40мл, з якої виділили моноклеарні клітки культивували їх *in vitro* при температурі 37°C на протязі 4 годин у присут-

ності мітогену ФГА. Шляхом центрифугування відокремили мононуклеарні клітки, надосад видалили, до осаду додали культуральне середовище і продовжили культивування на протязі 20 годин. Потом перевірили на стерильність.

Використання курсу аутоцитокінів, культивованих з мононуклеарних кліток слини пацієнта, у виді аплікацій поєднаних з підшкірними ін'єкціями тих же аутоцитокінів у передпліччя дозволили позбутися пацієнту від важкого хронічного стоматиту. При гістологічних дослідженнях спостерігався активний відновлювальний процес утворення епітелію слизуватих. За 30 днів спостережень за зазначеним пацієнтом не спостерігалось ні однієї схильності до рецидиву. При цьому слід зазначити, що лікування згідно корисної моделі не передбачає використання хіміопрепаратів, які викликають організму хворого.

Приклад 2

Пацієнт R. (44 роки), надійшов з діагнозом: гострий атрофічний кандидоз. Клінічна картина: - гладка, атрофічна, суха слизувата оболонка дорсальної поверхні язика, заїди. Супутній діагноз: цукровий діабет. Гістологічна картина: проникнення елементів гриба в шар епітелію і підлягаючу сполучну тканину.

Традиційне лікування полягає в застосуванні противогрибкових препаратів, препаратів йоду, антигістамінних препаратів, використовують імудон - полівалентний антигенний комплекс, що підсилює фагоцитарну активність слини і зміст у ній лізоциму. Місцєво застосовують противогрибкові мазі. Одночасно для лікування основного захворювання необхідно (разом з ендокринологом, гастроентерологом, терапевтом і іншими фахівцями) визначити загальні змішувальну терапію - вітаміни групи B, C в лікувальних дозах, обмеження в раціоні харчування вуглеводів (солодкий, борошняний, утримуючий крохмаль продуктів). Повторні бактеріоскопіческие дослідження назначають через 10-14 днів противогрибкового лікування для контролю і при необхідності подальшого продовження курсу. Прогноз: звичайно сприятливий, але можливо генералізоване поширення інфекції при важкій імунній недостатності.

При лікуванні згідно способу, що заявляється, для одержання аутоцитокінів амбулаторне провели забір слини в пацієнта в кількості 40мл, з якої виділили мононуклеари і культивували їх *in vitro* при температурі 37°C на протязі 3 годин у присутності мітогену ФГА. Шляхом центрифугування відокремили мононуклеарні клітки, надосад видалили, до осаду додали культуральне середовище і продовжили культивування на протязі 20 годин.

Лікування аутоцитокінами проводили чергуванням аплікацій і зрошення порожнини рота. При цьому відпала необхідність інтенсивної медикаментозної терапії. Фагоцитарна активність слини відновила на протязі 6-8 днів.

При повторних бактеріологічних дослідженнях через 8-9 днів гіфи кандид не виявили. 30 днів спостереження дозволяють стверджувати про відсутність рецидивів.

Приклад 3

Пацієнт В., (чоловік 38 років). Надійшов з діагнозом: герпетический конъюктивит - рясне слъозовиділення, сверблячка, почервоніння і висипання на віках. У сироватці крові методом імунофлюоресценції визначаються IgM -1,4од. при нормі до 0,3од. У периферичній крові хворого 13% моноцитів, 42% лімфоцитів в, СОЕ-18мм/год.

Для лікування амбулаторно провели забір слини в пацієнта в кількості 40мл, з якої виділили мононуклеари і культивували їх *in vitro* при температурі 37°C на протязі 3 годин у присутності мітогену ФГА. Шляхом центрифугування відокремили мононуклеарні клітки, надосад видалили, до осаду додали культуральне середовище і продовжили культивування на протязі 20 годин.

При лікуванні пацієнта В. аутоцитокінами методом закапування в очі і ніс клінічні ознаки зникли вже на четвертий день, на шостий день нормалізувалися показники периферичної крові, до 12-го дня зникли антитіла герметичної інфекції в крові пацієнта.

У таблиці №1 вказані показники клітинного і гуморального імунітету 16 хворих, зі стоматологічними проблемами до і після лікування, аутоцитокінами отриманими з їх власної слини. Як видно із таблиці, результати проведених досліджень вказують на зниження показників Т-клітинної ланки імунітету з порушенням регуляторного індексу. У досліджених хворих достовірно підвищено рівень ЦИК до (9,94±1,36) о.оп.щ. проти (3,42±0,23) о.оп.щ. у контролі. Після лікування аутоцитокінами у 85% пацієнтів спостерігаємо тенденцію до підвищення Т-клітин, Т-хелперів. Знижується вміст CD19 (В-клітин) до (14,15±1,24) о.оп.щ. Достовірно підвищується практично до контрольних значень індекс імунорегуляції. Знижується рівень ЦИК до (4,24±0,05) о.оп.щ. проти (9,94±1,36) о.оп.щ. (<0,05). Отже бачимо, що практично у всіх хворих при проведенні аутоцитокінотерапії винайденим способом відновлюються показники імунних систем.

Таким чином, спосіб адаптивної імунотерапії відповідно корисної моделі, що заявляється, ефективний при його використанні в лікувальній практиці. Аутоцитокіни, отримані культивуванням *in vitro* мононуклеарних кліток, виділених зі слини пацієнта, запускають імунну реакцію, а курс лікування приводить імунну систему в стан, який забезпечує повноцінну реакцію на патогенні фактори, дозволяє відновити утрачену функцію контролю за етапом організму. При цьому спосіб неінвазивний, що є його істотною перевагою в порівнянні з інвазивними способами. Час, необхідний для одержання аутоцитокінів, згідно корисної моделі, складає біля 2-х діб, тоді як у відомому способі (найближчий аналог) цей час складає 5-6 діб, що є додатковою істотною перевагою, оскільки спосіб стосується здоров'я людей.

Спосіб, що заявляється, дозволяє не тільки лікувати хвороби, з якими звернувся пацієнт, але і запобігти ускладнень і виключити побічні явища.

Таблиця

Показники	До лікування n=16	Після лікування n=16	Контрольні значення n=25
Лейкоцити	7,81±0,79*	5,71±0,42	5,35±0,21
Лімфоцити %	20,12±1,67*	25,67±1,76	28,71±0,81
а.ч.	1,35±0,2	1,5±0,08	1,61±0,07
СД3+%	31,23±2,74*	46,48±1,5	56,88±0,68
а.ч. $\times 10^9$ кл/л	0,46±0,16*	0,69±0,04	0,76±0,04
СД4+ %	22,11±,69*	34,41±11,03	38,71±0,52
а.ч. $\times 10^9$ кл/л	0,25±0,07*	0,44±0,02	0,53±0,03
СД8+ %	22,67±2,0	19,47±1,3	18,39±0,57
а.ч. $\times 10^9$ кл/л	0,3±0,05	0,31±0,03	0,30±0,02
СД19+ %	24,63±2,14*	14,15±1,24**	14,78±0,48
а.ч. $\times 10^9$ кл/л	0,43±0,09	0,23±0,03	0,25±0,01
Тх/Тс	1,15±0,14*	1,71±0,08**	1,97±0,07
НСТ %	12,4±2,69	19,17±1,74*	12,03±0,74
ЦПА	0,26±0,06	0,35±0,07	0,20±0,01
ЦИК о.оп.щ.	9,94±1,36*	4,24±0,05**	3,42±0,23
IgA г/л	2,89±0,34	2,15±0,37	2,25±0,26
IgM г/л	1,53±0,16	1,69±0,18	1,53±0,1
IgG г/л	14,58±1,32	13,51±0,96	12,72±0,42

* - $P < 0,05$ в порівнянні з контролем;

** - $P < 0,05$ між показниками до и після лікування аутоцитокінами зі слини пацієнтів.

Пояснення до скорочень: а.ч. – абсолютне число;

о.оп.щ. – одиниці оптичної щільності.