



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18199 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 39/40
A61K 39/44

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КОМПЛЕКСНОЇ МІКРОБНО-ТКАНИННОЇ ІМУНІЗАЦІЇ

1

(21) u200609811

(22) 13.09.2006

(24) 16.10.2006

(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.

(72) Терент'єв Володимир Григорович, Дев'ятка Олександр Григорович, Мельник Олександр Миколайович, Терент'єв Дмитро Григорович

(73) Терент'єв Володимир Григорович, Дев'ятка Олександр Григорович, Мельник Олександр Миколайович, Терент'єв Дмитро Григорович

(57) 1. Спосіб комплексної мікробно-тканинної імунізації, який включає застосування клітин тварин, який **відрізняється** тим, що в підшкірній жировій клітковині, переважно в нижній частині передньої черевної стінки, індукують мікровогнище запалення шляхом введення гомогенату тканини паренхіматозного органа, ксеногенної підшлункової залози або яєчка тварини.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що вводять гомогенат тканини підшлункової залози собаки або свині.

3. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що вводять гомогенат тканини яєчка статевозрілого сам-

2

ця собаки.

4. Спосіб по кожному із пп.1, 2, який **відрізняється** тим, що гомогенат вводять у дозі 0,5мол.

5. Спосіб по кожному із пп.1-3, який **відрізняється** тим, що курс лікувального впливу становить від одного до 18 місяців, при цьому повторно гомогенат вводять через шість місяців після першої ін'єкції, а третє введення виконують через дванадцять місяців після повторного введення.

6. Спосіб по кожному із пп.1, 2, який **відрізняється** тим, що при лікуванні хронічних захворювань дітей у віці до 10 років гомогенат вводять у дозі 0,3мол.

7. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що тканини паренхіматозного органа після отримання промивають стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, заморожують в програмному заморожуванні зі швидкістю 1-2C/хв., зберігають при температурі -9...-10°C до 6 місяців, а перед гомогенізацією розморожують.

8. Спосіб по кожному із пп.1-4, який **відрізняється** тим, що гомогенат перед введенням нагрівають до 37°C.

Розробка відноситься до галузі медицини, і, зокрема, стосується комплексної мікробно-тканинної імунізації.

В медичній практиці широко застосовується імунізація як спосіб лікувального впливу спрямований на запобігання появи, обмеження розповсюдження і ліквідацію певних (конкретних) інфекційних хвороб. Відома висока ефективність імунізації як способу протидії окремим хворобам. Недоліком імунізації як способу лікувального впливу на організм є вузький спектр її дії.

Для вирішення цієї проблеми в медичній практиці розширюється вживання комплексної імунізації, наприклад, декількома вакцинами, що забезпечує розширення сфери лікувального впливу.

Проте до недоліку комплексної імунізації слід віднести необхідність попереднього вивчення сумісності вакцин при комплексній імунізації. Іншою проблемою комплексної імунізації є тривалість процесу приготування вакцин. Викладені проблеми суттєво обмежують вживання комплексної імунізації.

Частково проблеми застосування способу імунізації розв'язуються вживанням речовин отриманих з тканин тварин.

Відомий спосіб імунізації [див. патент Росії 2192884, МПК A61K39/00, дата публікації 2002.08.27] в якому в якості вакцини застосовують клітини мишачої меланоми.

До недоліків способу слід віднести обмеже-

(13) U

(11) 18199

(19) UA

ність застосування способу пов'язану з необхідністю застосування клітин мишачої меланоми. Іншим недоліком способу, який також обмежує його застосування є завузька сфера впливу, яка розповсюджується тільки на дисиміоновану меланому шкіри, та рак нирки.

Відомий спосіб імунізації [див. заявку W02004053072, МПК А61К39/00; С12N5/06; А61К39/00; С12N5/06; дата публікації 2004-06-24] що включає введення індивідууму з пухлиною популяції дендритних клітин, що піддані частковому дозріванню *in vitro*, при чому дендритні клітини одержують із шкіри, селезінки, кісткового мозку, тимусу, лімфатичних вузлів, пуповинної крові або периферичної крові здорового індивідууму, HLA-сумісного з індивідуумом, якого лікуватимуть.

До недоліків способу слід віднести складність отримання дендритних клітин від здорового індивідуума, HLA-сумісного з індивідуумом, якого лікуватимуть, необхідність їх часткового дозрівання, необхідність їх доставляння безпосередньо в ложе пухлини після її видалення, або безпосередньо в пухлину.

Відомий спосіб імунізації [див. патент Росії 2267326, МПК А61В5/145; А61К35/12; А61К38/20; А61Р35/00; А61В5/145; А61К35/12; А61К38/20; А61Р35/00; (IPC1-7): А61К38/20; А61В5/145; А61К35/12; А61Р35/00, дата публікації 2006.01.10] в якому в якості вакцини застосовують 10^7 клітин аутологічного пухлинного лізату і вводять підшкірно паравертебрально в 3 крапки на відстані 3см один від одної. Введення здійснюють кожні 3 тижні, причому першу і другу вакцинації комбінують з введенням 470мг беталейкіна в передню черевну стінку.

До недоліків способу слід віднести обмеження застосування способу пов'язану з необхідністю застосування клітин аутологічного пухлинного лізату. Іншим недоліком способу, який також обмежує його застосування є завузька сфера впливу, яка розповсюджується тільки на дисиміоновану меланому шкіри, та рак нирки.

Завданням розробки є створення способу комплексної мікробно-тканинної імунізації в якому завдяки застосуванню нових речовин для імунізації, дій по її здійсненню режимів та параметрів її здійснення забезпечується різнобічний біостимулюючий вплив на організм і організм отримує виражений імунний захист не тільки від анаеробної аутофлори, але й від різних факторів патогенності, які в безлічі утворюються в штучно створеному мікроовогнищі внаслідок чого забезпечується лікування та профілактика широкого кола захворювань.

Для вирішення цього завдання спосіб комплексної мікробно-тканинної імунізації передбачає застосування клітин тварин.

Новим в способі є те, що в підшкірній жировій клітковині, переважно в нижній частині передньої черевної стінки, індукують мікроовогнище запалення шляхом введення гомогената тканини паренхіматозного органу, ксеногенної підшлункової залози, або яєчка тварини.

В конкретних варіантах застосування способу вводять гомогенат тканини підшлункової залози собаки або свині.

В окремих варіантах застосування способу

вводять гомогенат тканини яєчка статевозрілого собаки чоловічої статі.

В конкретних варіантах застосування способу гомогенат вводять у дозі 0,5мол.

В конкретних варіантах застосування способу курс лікувального впливу становить від одного до 18 місяців, при цьому повторно гомогенат вводять через шість місяців після першої ін'єкції, а третє введення через дванадцять місяців після повторного введення.

При лікуванні хронічних захворювань дітей у віці до 10 років гомогенат вводять у дозі 0,3мол.

У випадку застосування консервованих засобів тканини паренхіматозного органу після отримання промивають стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, заморожують в програмному заморожуванні зі швидкістю 1-2°C/хвил., зберігають при температурі - 9-10°C до 6 місяців, а перед гомогенізацією розморожують.

В конкретних варіантах застосування в способі консервованих засобів гомогенат перед введенням нагрівають до 37°C.

Людина і вказані види тварин є по відношенню один до одного дискордантними видами. Це означає, що в сироватці крові людини в обов'язковому порядку присутні природні антитіла, здатні викликати гостре відторгнення трансплантованих ксеногенних клітин. Велика частина цих антитіл (яка становить приблизно 1% сироваткових імуноглобулінів) розпізнають на ксеногенних клітинах альфа - галактозильний епітоп (клітини людини не експресують цей епітоп через відсутність в них ферменту альфа-1.3-галактозилтрансферази).

На основі наявних експериментальних даних можна вважати, що попадання ксеногенних клітин в організм людини включає роботу наступний імунний механізм.

1. Сироваткові антигалактозильні антитіла і комплемент покривають поверхню ксеногенних клітин та індукують процес їх руйнування.

2. Через взаємодії з Fc-рецепторами і рецепторами до компонентів комплементу антигенний матеріал потрапляє в макрофаги і дендритичні клітини,

3. Макрофаги і дендритичні клітини презентують антигенні детермінанти в комплексі з продуктами ГКГ II і I класу Т-хелперам (CD4⁺) і попередникам цитолітичних Т-лімфоцитів (CD8⁺), відповідно. Взаємодія експресуючих і антиген - презентуючих клітинах коstimуляторних молекул з відповідними Т - клітинним і мембранними лігандами, а також продуків цими клітинами імуностимуляторні цитокіни (ІЛ-12, фактор некрозу пухлини (ФНП) -альфа, ІЛ-4 і ін.) здійснюють ефективну до стимуляції антиген специфічних CD4⁺ - Т-лімфоцитів.

4. Т-хелпери, активовані ОАГ і ксеноантигенами, за допомогою продукції цитокінів (ІФ-гамма, ІЛ-2 і ІЛ-15 і др) стимулюють функціональну активність клітин, що володіють неспецифічною проти-пухлинною активністю (макрофаги, кісткомозкові цитостатичні ефектори, природні цитотоксичні і килерні клітини). Активація цих клітин призводить до гальмування пухлинного зростання і асоціюється з посиленням експресії на клітинах пухлини продуктів ГКГ.

5. Пухлинноспецифічні (CD8⁺) цитолітичні Т-лімфоцити, а також їх попередники, розпізнають експресовані на поверхні пухлинних клітин комплекси, що складаються з ОАГ і продуктів ГКГ 1 класу, і після контактної і цитокінової стимуляції з боку активованих Т-хелперів і професійних антиген-презентуючих клітин вступають у фазу активного зростання.

6. Висока активність Т-клітинних цитолітичних клонів, направлена проти широкого спектру ОАГ, приводить до елімінації пухлини з організму.

Спосіб ілюструється прикладами клінічних випробувань. Результати клінічних випробувань представлені в Таблицях 1 та 2.

В межах клінічних випробувань, що проводилися із застосуванням способу мікровогнища запалення створювали шляхом підшкірного введення гомогената тканини ксеногенної підшлункової залози або яєчка в кількості 0, 2-2- 0,5мол. Переважно введення здійснювали у нижню частину передньої черевної стінки.

Тканини паренхіматозного органу після отримання промивли стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, заморожували в програмному заморожуванні зі швидкістю 1-2°C/хвил., зберігали при температурі - 9-10°C до 6 місяців, після розморожування його гомогенізували механічним шляхом у гомогенізаторі й витримували протягом двох годин в термостаті при температурі 37°C. Не виключається можливість збереження гомогената в ліофілізованому виді.

Проникнення аутоанаеробної флори до місця введення препарату, дає підстави думати, здійснюється гематогенне нейтрофілами, або мікрофагами кишкової стінки, у яких утримуються анаеробні бактерії або їхні похідні (елементарні тільця). Після введення гомогената розвиваються загальна й місцева реакції.

Початок загальної реакції організму на створене мікровогнище відбувається звичайно через 4-6 годин після введення препарату.

Реакція проявляється у вигляді підвищення температури тіла, що буває переважно в межах від 38°C до 39°C. Нерідко підвищення температури супроводжується ознобом. Тривалість температурної реакції частіше від 1,5 до 3,5 годин. Після загальної реакції стає помітніше місцева реакція навколо ділянки введення препарату у вигляді гіперемії й поступового збільшення інфільтрату. По мірі збільшення місцевої реакції помітно знижується загальна. Іноді, при хронічних запальних процесах, загальна реакція продовжується через нетривале загострення основного захворювання.

При пропонованому способі мікробне - тканинної імунізації вогнище запалення в місці введення препарату триває 6-8 днів, проходячи стадії дозрівання й розкриття. У спокої (лежачи, сидячи, коштуючи) він не болісний, біль відчувається при здавлюванні (згинання, розгинання тулуба) або поштовху в області вогнища. Пацієнти через добу дві можуть виконувати звичайну роботу, за винятком важкої фізичної роботи. Відносно слабка хворобливість інфільтрату пояснюється частково локалізацією його, тобто відсутністю напруженості тканин у м'якій стінці живота. Після дозрівання інфільтрат розкривається, виділяючи велику кіль-

кість бурого гною. Гній виділяється протягом 2-3 днів, після чого місце ін'єкції гоїться.

Загальна й місцева реакція, виникають у всіх випадках і протікають однотипно, відрізняючись лише по ступені виразності залежно від імунного статусу організму. Ефективність лікування залежить від виду хвороби, її тривалості й віку хворого. Видужання може наступити поступово й при однократному введенні препарату, але частіше після повторного введення (через 6 місяців) або навіть після третього введення (через 12 місяців після повторного).

Позитивні наслідки при лікуванні різних захворювань є результатом значного підвищення загальної резистентності організму й, головним чином, від придбання специфічного імунітету на ецтогенну мікрофлору й насамперед на анаеробних її представників - бактериодів і клостридій. Вони є постійними мешканцями шлунково-кишкового тракту, їм властиві складні перетворення й взаємини зі слизистим шаром, виявлена міграція мікробів не тільки в просвіті кишки, але й у клітках епітелію, у лейкоцитах кишкової стінки. Треба думати, що імунітет до кишкової флори в організмі не тільки виробляється у звичайних умовах (кишковий бар'єр), але може бути отриманий тільки парентерально за наявності мікробно-тканинного біофактору, яким є нативна тканина підшлункової залози.

Пропонований спосіб комплексної мікробно-тканинної імунізації перспективний у лікуванні й профілактиці багатьох захворювань завдяки сильному й різнобічному біостимулюючому впливу на організм і завдяки придбання організмом вираженого імунного захисту не тільки від анаеробної аутофлори, але й від різних факторів патогенності, які у великій кількості утворюються в штучно створеному мікровогнищі.

Завдяки зазначеним особливостям застосування способу показало значну ефективність у комплексному підході до лікування таких захворювань як перитоніт, панкреатит, гостра кишкова непрохідність, дуоденостаз, туберкульоз.

Лікування або профілактика таких захворювань проводилася на собаках, кроликах, пацюках, кішках, морських свинках і телятах.

Матеріалом для готування препарату використовувався гомогенат, підшлункової залози собаки або свині і яєчка статевозрілого собаки чоловічої статі.

Значна ефективність даного способу при лікуванні захворювань людини отримана при різних кишкових захворюваннях запального характеру: органів шлунково-кишкового тракту (гастро-дуоденіти, холицито-панкреатити, гепатити, ентероколіти та ін.), органів дихання, органів мочевидної системи. Отриманий також позитивний ефект при коллагенезах, онкологічних і ендокринних захворюваннях.

Оптимальна доза препарату становить 0,5мол. При подальшому збільшенні дози клінічний ефект не наростає. Для дітей до 10 років оптимальна доза становить 0,3мол. При наявності супутніх захворювань алергічної етіології розрахунок дози препарату повинен бути заснований на даних вихідної імунограми. Введення препарату протипоказане при термальному стані хворого

(гостра серцево-судинна, дихальна, ниркова недостатність).

Строк придатності препарату при зберіганні в замороженому стані (температура - 10°C) дорівнює шести місяцям. Термін придатності до застосування препарату, що зберігається при температурі 0°C - 24 години.

Лікувальні властивості препарату відновлюються після його зігрівання до температури 37,0°C протягом 10 хвилин.

Запропонований спосіб був широко перевірений в клінічній практиці й отримав позитивний результат (див. табл. 2).

Таблиця 1

№ п/п	Діагноз	П.І.Б. рік народження	Курс лікування	Результат
1	Хронічний гастрит, хронічний гепатохолецистит	Грачов Георгій Васильович 1954р.н.	4 вакцинації	Стійка ремісія
2	Хронічний панкреатит	Подковиркин Віктор Павлович 1949р.н.	4 вакцинації	Видужання
3	Виразкова хвороба дванадцятипалої кишки	Янкович Алена Геннадіївна 1974р.н.	3 вакцинації	Стійка ремісія
4	Хронічний ентероколіт	Горщиків Андрій Анатолійович 1972р.н.	3 вакцинації	Видужання
5	Хронічний бронхіт	Кам'янець Ростислав Олегович 1986р.н.	3 вакцинації	Видужання
6	Бронхіальна астма	Коряки Микола Георгійович 1925р.н.	3 вакцинації	Видужання
7	Хронічний пієлонефрит	Лук'янов Василь Іванович 1966р.н.	2 вакцинації	Видужання
8	Хронічний простатит	Строчу Василь Іванович 1946р.н.	2 вакцинації	Видужання
9	Хронічний ендометрит	Волощина Галина Петрівна 1949р.н.	3 вакцинації	Стійка ремісія
10	Ревматоїдний поліартрит	Кальченко Лідія Галивовна 1936р.н.	2 вакцинації	Стійка ремісія
11	Системна червона волчанка	Мортуніч Тетяна Василівна 1973р.н.	3 вакцинації	Стійка ремісія
12	Цукровий діабет	Патаєв Низами Самедович 1948р.н.	2 вакцинації	Стійка ремісія
13	Розсіяний склероз	Подгурська Ніна Іванівна 1956р.н.	5 вакцинацій	Стійка ремісія
14	Псоріаз	Яровий Віталій Григорович 1975р.н.	3 вакцинації	Стійка ремісія
15	Фіброміома матки	Чех Наталя Сергіївна 1939р.н.	2 вакцинації	Видужання
16	Поліпоз шлунку	Чурашкін Микола Сергійович 1939р.н.	2 вакцинації	Видужання
17	Дифузійна мастопатія	Вершиніна Світлана Єгорівна 1941р.н.	4 вакцинації	Стійка ремісія
18	Меланобластома стегна з метастазами в пахові вузли	Алексеев Олександр Володимирович 1974р.н.	5 вакцинацій	Стійка ремісія
19	Лімфогранулематоз	Ковтуцька Світлана Олександрівна 1950р.н.	4 вакцинації	Стійка ремісія
20	Меланома плеча	Лисицька Тетяна Пилипівна 1955р.н.	3 вакцинації	Стійка ремісія
21	Рак кардиального відділу шлунка	Тодоров В'ячеслав Олександрович 1941р.н.	3 вакцинації	Стійка ремісія

Таблиця 2

Нозологічні одиниці	Загальна кількість хворих	Позитивний результат %	Відсутність ефекту %	Відомості про результати лікування не надійшли
Хронічні запальні захворювання				
ХВЗ шлунково-кишкового тракту (гастрит, дуоденіт, коліт, тифліт, сигмоидит, проктит, парапроктит.)	230	168 73,0%	3 1,3%	59
Виразкова хвороба шлунка дванадцятипалої кишки.	45	36 80,0%	1 2,2%	8
ХВЗ печінки, підшлункової залози, жовчного міхура, (гепатит, холецистит, холангіт, панкреатит)	164	118 71,9%	5 3,0%	41
ХВЗ центральної й периферичної нервової системи (енцефаломієліт, неврити, радикуліт, енцефалит, арахноідит)	32	24 66,6%	-----	8
ХВЗ пазух черепа (фронтит, гайморит)	40	20 50%	25%	8
ХВЗ органів зору, слуху (отит, кон'юнктивіт, евстахиїт)	5	5 100%	-----	-----
ХВЗ органів носоглотки (танзиліт, ларингіт, риніт, фарингіт) схильність КОРЗ	167	123 73,6%	4 2,3%	40
ХВЗ органів подиху (трахеїт, бронхіт, хронічна пневмонія)	62	50 80,6%	1 1,6%	11
ХВЗ бруньок (пієлонефрит, гломерулонефрит), сечового міхура (цистит) і сечовивідних шляхів, мочекаменна хвороба.	52	40 76,9%	1 1,9%	11
ХВЗ статевих органів у чоловіків (простатит, орхіт)	55	38 69,1%	-----	17
ХВЗ статевих органів у жінок (аднексит, параметрит, ендометрит, безплідність)	130	63 48,8%	7 5,3%	60
Дерматит і гнійничкові захворювання шкіри (екзема вулгарна, фурункульоз, бешішове запалення)	41	31 75,6%	3 7,3%	7
ХВЗ опорно-рухової системи (мнотит, артрити різні етіології, остеомиєліт, остеохондроз)	41	31 75,6%	3 7,3%	7
Алергічні захворювання				
Бронхіальна астма, бронхіт з астматичним компонентом, побутова й лікарська алергія	143	120 83,9%	3 2,1%	20

Продовження таблиці 2

Злоякісні пухлини				
Иноперабельний Ca(Sa) різних органів і систем, лейкози лимфогранулематоз	191	11560,2%	26 13,6%	50
Ca (Sa) після оперативного лікування без хіміко-и променевої терапії	83	53 63,8%	7 8,4%	23
Доброякісні пухлини				
Аденома передміхурової залози, липоматоз, поліпи, фиброматоз молочних залоз мастопатія, фіброміома матки, синовіома, остеохондрома.	140	91 65,0%	7 5,0%	42
Системні захворювання				
Коллагенези, атеросклероз розсіяний склероз	71	54 76,0%	6 8,4%	9
Захворювання шкіри				
Псоріаз, нейродерміт, себорея	180	11362,7%	14 7,7%	53
Ендокринологічні захворювання				
Цукровий діабет	28	2278,5%	1 3,5%	5