



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103742** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

**A61K 35/14** (2006.01)**A61P 5/00****A61P 37/02** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

- (21) Номер заявки: **а 2013 09792**
- (22) Дата подання заявки: **06.08.2013**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **11.11.2013**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.09.2013, Бюл.№ 17**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.11.2013, Бюл.№ 21**
- (72) Винахідник(и):  
**Герасун Борис Абрамович (UA),**  
**Голубовська Ольга Анатоліївна (UA),**  
**Грицько Роман Юліанович (UA),**  
**Зінчук Олександр Миколайович (UA),**  
**Шкурба Андрій Вікторович (UA)**
- (73) Власник(и):  
**Герасун Борис Абрамович,**  
вул. Личаківська, 151, кв. 3, м. Львів, 79014 (UA),  
**Голубовська Ольга Анатоліївна,**  
пр. Лісний, 6, кв. 3, м. Київ, 02166 (UA),  
**Грицько Роман Юліанович,**  
вул. Чернігівська, 34, кв. 3, м. Львів, 79010 (UA),  
**Зінчук Олександр Миколайович,**  
вул. О. Невського, 4, м. Львів-Рудно, 79493 (UA),  
**Шкурба Андрій Вікторович,**  
Харківське шосе, 166, кв. 140, м. Київ, 02091 (UA)
- (74) Представник:  
**Ривюк Марія Михайлівна, реєстр. №197**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
Treatment of children with acute leukemia by passive cyclic immunization with autoplasm and autoleukocytes operated during the remission period. Skurkovich SV, Makhonova LA, Reznichenko FM, Chervonskiy GI. Blood. 1969 Feb;33(2):186-97. (12 стор.)  
RU 2414915 C2; 27.03.2011 (9 стор.)  
RU 2355429 C1; 20.05.2009 (5 стор.)  
RU 2202375 C2; 20.04.2003 (4 стор.)  
UA 57608 C2; 16.06.2003 (3 стор.)  
UA 16552 U; 15.08.2006 (4 стор.)  
UA 29936 U; 25.01.2008 (4 стор.)  
RU 2098125 C1; 10.12.1997 (4 стор.)  
UA 97461 C2; 10.02.2012 (3 стор.)  
Herasun B.A., Hrytsko R.Yu. Original treatment method of frequently recurrent chronic herpetic infection caused by herpes simplex virus I and II types // Central European Journal of Immunology - 2012. - Vol. 37. - No 4. - P. 362-364.(3 стор.)  
Akeno N., Blaskard J.T., Tomer Y. HCV E2 protein binds directly to thyroid cells and induces IL-8 production: a new mechanism for HCV induced thyroid autoimmunity // J. Autoimmun. - 2008. - N 31(4). - P. 339-344. (6 стор.)  
Antonelli A., Ferri C., Pampana A., et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C Am J Med. - 2004. - 117. - P. 10-13. (4 стор.)  
Ворожбит О. Б. Особливості діагностики та перебігу хронічного гепатиту С з позапечінковими ураженнями. Автореф... к. мед. н. 14.01.13 - інфекційні хвороби. Київ-2006 (23 стор.)

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ СПОСОБУ ВАКЦИНАЦІЇ АВТОЛЕЙКОЦИТАМИ ЯК СПОСОБУ ЗМЕНШЕННЯ АКТИВНОСТІ АВТОІМУННОГО ПРОЦЕСУ ВІДНОСНО АНТИГЕНІВ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ****(57) Реферат:**

Винахід належить до застосування способу вакцинації автолейкоцитами для зменшення активності автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози.

UA 103742 C2



Винахід стосується медицини, зокрема клінічної імунології та ендокринології, а також інфектології, та може бути використаний для імунотерапії хворих з розвитком автоімунного процесу відносно клітин щитовидної залози.

Чинники, що сприяють розвитку імунного процесу відносно щитовидної залози, поділяють на внутрішні та зовнішні. До внутрішніх відносять генетичні, до зовнішніх - різні хвороби та стани, які сприяють контакту автоантигенів (внутрішньоклітинних компонентів щитовидної залози) з імунною системою, зокрема, шляхом цитотоксичного ефекту, який призводить до їх виділення [2]. Серед останніх важливе місце займають вірусні інфекції, особливо гепатит С [4, 5]. Чому саме вірусний гепатит С найчастіше викликає активність імунного процесу відносно щитовидної залози вивчено недостатньо. Однією із гіпотез, яка пояснює цей процес, вважається здатність вірусу гепатиту С до антигенної (молекулярної) мімікрії, що полегшує проникнення вірусу до клітин щитовидної залози [4]. Проникнення збудника до клітини може сприяти виділенню автоантигену і формуванню автоімунного процесу [2].

Хоча сам по собі підвищений рівень антитіл до тиреоглобуліну та тиреопероксидази не є підставою для діагностики тиреоїдиту, він свідчить про імунний процес, який може завершитися розвитком тиреоїдиту.

Відомий традиційний метод патогенетичної терапії автоімунних процесів, який полягає у фармакологічній імуносупресії [3]. Зокрема для цього застосовуються глюкокортикостероїдні гормони, а також не стероїдні протизапальні препарати.

Проте у цих препаратів широкий спектр небажаної побічної дії, до того ж, пригнічуючи імунну відповідь, вони сприяють посиленню реплікації вірусу. На фоні інтерферонотерапії така терапія практично не впливає на синтез автоантитіл до тканини щитовидної залози [4, 5].

Способів, які зменшують активність автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози у пацієнтів без ознак тиреоїдиту розроблено недостатньо. Якщо у крові хворих підвищений рівень антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну, але немає ознак порушення функції щитовидної залози, зазвичай обмежуються спостереженням. Метою спостереження є раннє виявлення і своєчасний початок лікування тиреоїдиту.

Відомий спосіб вакцинації автолейкоцитами (імуноцитотерапія), який застосовується для лікування хворих на хронічні вірусні гепатити В і С та складається з двох етапів: виділення лейкоцитів та введення їх пацієнту [6].

Досліджено, що внутрішньошкірна імунізація автолейкоцитами позитивно впливає на стан клітинного і гуморального імунітету, що підтверджується зменшенням проявів системних васкулітів і зниженням концентрації в крові криоглобулінів [6, 7]. Проте, така терапія має певні обмеження, бо є неефективною при хворобах з широким набором автореактивних рецепторів Т-лімфоцитів [2].

Особливістю автоімунного процесу відносно щитовидної залози, на відміну від багатьох інших, наприклад зумовлених криоглобулінемією (системні васкуліти, гломерулонефрити тощо), є те, що клітини щитовидної залози раніше не контактували з імунною системою. Тому до їх речовин не має імунологічної толерантності, тобто вони є автоантигенами, навіть за відсутності патологічних змін [1, 2, 3]. Свідченням автоімунного процесу відносно клітин щитовидної залози є поява антитіл до тиреоглобуліну та тиреопероксидази [2, 3].

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб зменшення інтенсивності автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози для запобігання (чи зменшення) загрози розвитку автоімунного тиреоїдиту.

Поставлена задача досягається застосуванням способу вакцинації автолейкоцитами вперше як способу зменшення активності автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози.

Передумовою для використання цього методу став той факт, що автоімунні хвороби можна пасивно переносити за допомогою автореактивних Т-лімфоцитів. Тому, по аналогії з вакцинами, що застосовуються для профілактики інфекційних хвороб, в лікуванні автоімунних станів стали використовувати автореактивні лімфоцити, що зберегли імуногенність.

Механізм дії таких вакцин пояснюють тим, що введення автореактивних клітин створює стан активності лімфоцитарно-опосередкованої імунної відповіді за рахунок генерації цитотоксичних лімфоцитів. Важливим є і процес корекції сітки Ерне - антиідіотипової регуляції імунної відповіді, що підтверджується збільшенням кількості в сироватці крові антиідіотипових антитіл після лейкоцитарної імунізації. Ще один механізм може включатися при цій імунній маніпуляції: активація CD3+, CD4+, CD25+ лімфоцитів, а також CD3+, CD8+, CD28+ лімфоцитів, одночасно з блокуванням Fc-рецепторів, а також глікопротеїнових, лектинових рецепторів на В-лімфоцитах [2].

Запропонований метод лікування автоімунного процесу, який проявляється утворенням антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну, включає два етапи: виділення лейкоцитів та їх введення пацієнтові (ізоімунізація).

Лейкоцити виділяють шляхом відстоювання гепаринізованої венозної крові хворого із підвищеним вмістом антитіл до тиреопероксидази і до тиреоглобуліну. Для цього венозну кров в об'ємі 40-60 мл набирають у флакон з гепарином з розрахунку 50 од. гепарину на 10 мл крові (об'єм залежить від кількості лейкоцитів в 1 мл крові). Розливають по 10 мл у пробірки і під кутом 45° інкубують у термостаті при температурі 37 °С протягом 90-140 хвилин. Плазму крові обережно, не допускаючи перемішування, відсмоктують, лейкоцити двічі відмивають у 5-10-кратному об'ємі охолодженого 0,9 % розчину натрію хлориду центрифугуванням при 400 g протягом 7 хв. Осад ресуспендують у 1,0-1,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду (вміст лейкоцитів повинен складати  $\geq 10\text{-}15 \times 10^6$  кл/мл).

Ізоімунізацію автолейкоцитами периферичної крові проводять хворим із високим вмістом у сироватці крові антитіл до тиреопероксидази і до тиреоглобуліну. Автолейкоцити вводять внутрішньоскірно за допомогою шприца (до утворення "лимонної кірочки") по 0,1 мл у 8-12 точок в шкіру спини (між лопатками). Через 10-12 днів, 30, 60 і 180 днів визначають рівень антитіл до тиреопероксидази і до тиреоглобуліну. Надалі контролюють рівень автоімунного процесу, при необхідності імунізацію повторюють (індивідуально, з урахуванням особливостей перебігу хвороби).

Ефективність методу підтверджується результатами вакцинації автолейкоцитами 28 пацієнтів із підвищеним вмістом антитіл до антигенів щитовидної залози, при повній відсутності клінічних і лабораторних ознак тиреоїдиту (медикаментозної терапії пацієнти не отримували) (табл. 1).

Таблиця 1

Ефективність лікування автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози, за даними обстеження через 10-12 днів після одноразової імунізації автолейкоцитами

Показник ефективності лікування	Антитіла до тиреопероксидази		Антитіла до тиреоглобуліну	
	К-ть хворих (n=28)	%	К-ть хворих (n=28)	%
Зниження концентрації антитіл (у %)				
До 20	0	0	0	0
21-30	1	3,57	2	7,14
31-39	4	14,29	6	21,43
40-49	7	25,0	6	21,43
>50	9	32,14	9	32,14
нормалізація	7	25,0	5	17,86

З наведених у таблиці 1 даних видно, що після одноразової імунізації автолейкоцитами концентрація антитіл до тиреоглобуліну і тиреопероксидази зменшилась у всіх хворих. При цьому зниження концентрації антитіл до білків щитовидної залози на половину і більше відмічено у 9 хворих (32,14 %), а нормалізація показників - у 7 (25,0 % обстежених пацієнтів). Відносно антитіл до тиреопероксидази це сталося у 9 (32,14 %) та 5 пацієнтів (17,86 %).

Після повторної імунізації, проведеної через 30-40 днів, нормалізація рівня антитіл до тиреопероксидази відбулась у 16 (57,14 %) з 28 пацієнтів, відносно тиреоглобуліну - у 7 (17,86 %).

Стабільність досягнутого ефекту коливалася в широких межах, носила індивідуальний характер, проте нормалізація рівня антитіл у 70-80 % хворих зберігалася протягом 6-12 місяців.

Відомо, що в хворих, які через вірусні інфекції (переважно гепатит С) отримують інтерферонотерапію, часто розвивається або значно посилюється попередній автоімунний процес відносно щитовидної залози. Наростання антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну в таких пацієнтів швидко зростає.

Саме тому ми також дослідили ефективність вакцинації автолейкоцитами на групі хворих, які через наявність хронічного гепатиту С, викликаного вірусом 1-го генотипу, отримували тривалу противірусну терапію інтерфероном (табл. 2). Результати пригнічення автоімунного процесу у період противірусної терапії інтерфероном істотно відрізняються від наведених вище (табл. 1). Ці відмінності полягають у меншій ефективності пригнічення автоімунного процесу (табл. 2).

Таблиця 2

Ефективність лікування автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози у хворих, які отримували протівірусну терапію інтерфероном

Показник ефективності лікування	Антитіла до тиреопероксидази		Антитіла до тиреоглобуліну	
	К-ть хворих (n=22)	%	К-ть хворих (n=22)	%
Зниження концентрації антитіл (у %)				
До 20	3	15	1	5
21-30	2	10	3	15
31-39	7	35	7	35
40-49	4	20	5	25
>50	4	20	4	20
нормалізація	0	0	0	0

Хоча рівень пригнічення автоімунного процесу у хворих, які отримували інтерферонотерапію, був істотно меншим, загальна частота зниження синтезу антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну, також склала 100 %.

5 Стабільність досягнутого результату також була значно меншою і коливалася в межах від 1 до 6 місяців (у першій групі складала 6-12 місяців). Проте імунізація автолейкоцитами все ж стримувала процес утворення автоантитіл і дозволила закінчити інтерферонотерапію без перерв і без зменшення дози препарату, що позитивно впливає на ефективність елімінації вірусу. Це положення можна проілюструвати наступними клінічними прикладами.

#### 10 Приклад 1

Хвора Р., 59 років. Через вірусний гепатит С отримувала терапію інтерфероном (Ітроном А по 3 млн. 3 рази на тиждень) та рибавірином по 1000 мг/доб. До нас хвора звернулася через місяць після початку інтерферонотерапії. При лабораторному обстеженні виявлено підвищений рівень антитіл до тиреоглобуліну (200 МО/мл, при нормі до 30) і до тиреопероксидази (280 МО/мл при нормі до 20); гормони щитовидної залози у межах норми. Рівень РНК вірусу низький (18300 копій/мл), активність АлАТ - 1,54 ммоль/л; гематологічні показники, рівень креатиніну і сечовини в сироватці крові - в нормі. При повторному обстеженні через 45 днів стан хворої істотно не змінився, проте звертало на себе увагу швидке наростання концентрації антитіл до тиреоглобуліну - 500 МО/мл (при попередньому обстеженні - 200, тобто за півтора місяця показник збільшився в 2,5 рази). Таким чином, на тлі інтерферонотерапії посилювся синтез антитіл до антигенів щитовидної залози. Лікування продовжувала. При наступному обстеженні, також через 45 днів, виявити HCV RNA не вдалося, активність АлАТ нормалізувалася. Проте, незважаючи на успішну протівірусну терапію, відмічено посилення синтезу антитіл до тиреоглобуліну (800 МО/мл, при першому обстеженні - 200 МО/мл).

25 У зв'язку з цим хворій проведена внутрішньошкірна вакцинація автолейкоцитами. При наступному обстеженні через 30 днів рівень антитіл до тиреоглобуліну знизився до 500 МО/мл, до тиреопероксидази - до 580 МО/мл (при попередньому обстеженні ці показники складали 800 і 820 - зменшення на 37,50 і 29,27 % відповідно). Інтерферонотерапія продовжувалась. При обстеженні через 2 місяці після вакцинації автолейкоцитами встановлено поліпшення стану хворої, проте відмічено збільшення концентрації антитіл до тиреопероксидази, яка досягла цього разу 2000 МО/мл (продукція антитіл до тиреоглобуліну дещо зменшилась і складала 480 МО/мл).

35 Проведено повторну імунізацію автолейкоцитами. Вже через 10 днів кількість антитіл до тиреопероксидази зменшилась на половину - з 2000 до 1000 МО/мл, а вміст антитіл до тиреоглобуліну залишився на попередньому рівні (480 МО/мл). На цьому рівні показники автоімунного процесу зберігалися до закінчення інтерферонотерапії (наступні 6 місяців). При обстеженні через 4 місяці після закінчення лікування концентрація антитіл відрізнялася несуттєво (коливання в межах випадкових відхилень). Проведена ще одна імунізація, після якої титр антитіл до тиреопероксидази нормалізувався, а кількість антитіл до тиреоглобуліну стала незначно перевищувати норму (42 МО/мл, при нормі до 30 МО/мл). Впродовж року (термін спостереження) ці показники коливалися несуттєво. Рівень гормонів щитовидної залози був у межах норми.

#### 40 Приклад 2

45 Хвора С., 48 років. Діагноз: хронічний гепатит С, 1-й генотип HCV. Отримувала терапію пегільованим інтерфероном (ПЕГ-ІФН) по 100 мкг 1 раз на тиждень і рибавірином по 1000 мг/добу. При обстеженні перед початком лікування виявлено збільшення титру антитіл до

пероксидази щитовидної залози (89 МО/мл, при нормі до 30 МО/мл). При обстеженні через два місяці від початку терапії рівень антитіл до тиреопероксидази досягнув 3000 МО/мл. У зв'язку з цим проведена вакцинація автолейкоцитами. Через 10 днів рівень антитіл зменшився до 1560 МО/мл. Через 35 днів проведене повторне внутрішньшкірне введення автолейкоцитів і досягнуто зменшення вмісту антитіл до тиреопероксидази до 825 МО/мл. З незначними коливаннями рівень антитіл впродовж півроку знаходився в межах 800-900 МО/мл (вміст гормонів у межах норми). На 8 місяці протівірусної терапії рівень антитіл підвищився до 2000 МО/мл. Після чергової імунізації вміст антитіл знизився до 300 МО/мл, і з незначними коливаннями (в межах 300-360 МО/мл) цей показник зберігався до завершення протівірусної терапії (48 тижнів).

З наведених спостережень видно, що в результаті вакцинації автолейкоцитами стало можливим стримати інтенсивність автоімунного процесу стосовно клітин щитовидної залози і провести повний курс інтерферонотерапії.

Запропонований спосіб дозволяє знизити активність автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози, тобто зменшити загрозу розвитку автоімунного тиреоїдиту, навіть у хворих, що отримують інтерферонотерапію, яка через імуномодуючий ефект посилює активність автоімунних процесів.

Джерела інформації:

1. Вершигора А.Е. Основы иммунологии. - Киев: "Вища школа", 1980. - 504 с.
2. Якобисяк М. Иммунология / Переклад з польської за ред. проф. В.В. Чоп'як - Винниця: Нова книга, 2004. - 672 с.
3. Дранник Г.И. Клиническая иммунология и аллергология. - Киев, 2010. - 552 с.
4. Akeno N., Blaskard J.T., Tomer Y. HCV E2 protein binds directly to thyroid cells and induces IL-8 production: a new mechanism for HCV induced thyroid autoimmunity // J. Autoimmun. - 2008. - N 31(4). - P. 339-344.
5. Antonelli A., Ferri C., Pampana A., et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C Am J Med. - 2004. - 117. - P. 10-13.
6. Патент України № 13766, МПК (2006) А61К 39/00, G01N 33/53. Спосіб терапії хворих на хронічні вірусні гепатити В та С з проявами системних васкулітів / Герасун Б.А., Чоп'як В.В., Ворожбит О.Б., Лищук-Якимович Х.А., Синенький О.В.; опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4.
7. Патент України на винахід № 97461. Застосування способу вакцинації автолейкоцитами як способу лікування ідіопатичної оліго- та астенозооспермії / Герасун Б.А., Копець Р.А.; опубліковано 10.02.2012, Бюл. № 3.
8. Herasun B.A., Hrytsko R.Yu. Original treatment method of frequently recurrent chronic herpetic infection caused by herpes simplex virus I and II types // Central European Journal of Immunology - 2012. - Vol. 37. - No 4. - P. 362-364.

#### ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

Застосування способу вакцинації автолейкоцитами як способу зменшення активності автоімунного процесу відносно антигенів щитовидної залози.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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

---

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