



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **70181**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 14905**

(22) Дата подання заявки: **15.12.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.05.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.05.2012, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Фільчаков Феодосій Вікторович (UA),
Кукушкіна Світлана Миколаївна (UA),
Льон Ганна Даріївна (UA),
Шуміліна Катерина Станіславівна (UA),
Коровін Сергій Ігорович (UA),
Кукушкіна Марія Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ,
вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)**

(54) СПОСІБ ІМУНОЛОГІЧНОЇ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ІНТЕРФЕРОНОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА МЕЛАНОМУ ШКІРИ

(57) Реферат:

Спосіб імунологічної оцінки ефективності інтерферонотерапії у хворих на меланому шкіри включає виявлення автореактивності в процесі інтерферонотерапії. У периферичній крові хворих визначають індекс співвідношення кількості В1-лімфоцитів до кількості В2-лімфоцитів.

UA 70181 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме - онкології, і може бути використана в комбінованому лікуванні хворих на меланому шкіри.

Меланома шкіри вважається імунозалежною пухлиною, тому після хірургічного лікування з метою запобігання розвитку метастазів у цієї категорії хворих застосовують імунотерапію, зокрема, інтерферонотерапію [1]. Її ефективність у хворих в залежності від стадії захворювання складає 16-48 % [2-3]. Згідно з 2-ма мета-аналізами [4-5], проведеними за результатами 12 та 9 рандомізованих контрольованих досліджень, застосування інтерферону- α (ІФН- α) збільшує безрецидивну виживаність пацієнтів з меланомою високого ризику розвитку рецидиву, проте не впливає на загальну виживаність. У зв'язку з цим залишаються невирішеними питання щодо призначення всім хворим на меланому шкіри ІФН- α , введення якого супроводжується суттєвою токсичністю та є економічно обтяжливим [6-8]. Тому існує об'єктивна необхідність визначення прогностичних критеріїв призначення в ад'ювантному режимі інтерферонотерапії хворим на меланому шкіри для відбору пацієнтів, що отримають від цього найбільшу користь.

Одним з таких прогностичних факторів є розвиток у пацієнтів автоімунних порушень на тлі ад'ювантної терапії ІФН- α , що асоціюється з подовженням безрецидивної виживаності [9-10].

За прототип вибрано спосіб прогнозування ефективності ад'ювантного лікування інтерфероном- α 2b (ІФН- α 2b) у хворих на меланому шкіри [Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon / H. Gogas, J. Ioannovich, U. Dafni [et al.] // N. Engl. J. Med. - 2006. - Vol. 354. - P. 709-718], за яким автоімунні реакції визначали у 200 хворих з ІІВ-ІП стадією захворювання на тлі імунотерапії ІФН- α 2b після хірургічного лікування та співставляли з виживаністю. Автоімунні реакції визначали за клінічними ознаками та наявністю у сироватці крові одного із 5 різновидів автоантитіл (антинуклеарні, антимікросомальні, антикардіоліпінові, проти ДНК, проти тиреоглобуліну). Таким чином автоімунні порушення (органоспецифічні та/або органонеспецифічні) були виявлені у 52 хворих (26 %). Медіана часу до появи автоантитіл після початку введення ІФН- α 2b складала 3 міс., а медіана часу до розвитку клінічних ознак - 9 міс. Автоімунні порушення асоціювались із суттєвим підвищенням безрецидивної виживаності: у хворих без ознак автоімунних проявів медіана складала 16 міс., а серед хворих із автоімунними порушеннями - за час спостереження досягнута не була (медіана спостереження складала 45,6 міс).

Позитивним в прототипі є можливість виявлення автореактивності у хворих на меланому шкіри на тлі інтерферонотерапії, розвиток якої пов'язаний зі збільшенням виживаності таких хворих, і може бути використаний для прогнозування її ефективності.

Недоліком прототипу є визначення у сироватці крові автоантитіл тільки певної специфічності, що обмежує ідентифікацію інших автоімунних порушень.

Задачею корисної моделі є удосконалення способу імунологічної оцінки ефективності інтерферонотерапії у хворих на меланому шкіри шляхом визначення в процесі ад'ювантної інтерферонотерапії у периферичній крові індексу співвідношення кількості В1-лімфоцитів до кількості В2-лімфоцитів як інтегрального показника, що дасть можливість виявити групу хворих з автореактивністю внаслідок інтерферонотерапії, що припускає найбільшу користь від її застосування.

Поставлена задача вирішується таким чином:

Хворому з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри ІВ-ПС стадії призначають ад'ювантну терапію ІФН- α 2b ("Лаферобіон" ("Біофарма", Україна)) підшкірно в дозі 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. Імунологічну оцінку ефективності інтерферонотерапії проводять з урахуванням динаміки змін індексу співвідношення субпопуляцій В-лімфоцитів у периферичній крові: кількості В1-лімфоцитів ($CD19^+CD5^+$) до кількості В2-лімфоцитів ($CD19^+CD5^-$), який визначають до, через 3 та 12 міс. від початку лікування. Визначення кількісного складу субпопуляцій В-лімфоцитів у периферичній крові проводять методом проточної цитофлуориметрії за допомогою двопараметричного аналізу з використанням моноклональних антитіл до СО19-антигену, мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) ("Сорбент", Росія), та до СБ5-антигену, мічених фікоеритрином (PE) ("Beckman Coulter", США), згідно з методикою визначення субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові [12]. Результати обчислюють на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Серед $CO19^+$ -лімфоцитів визначають субпопуляції В1 за експресією маркеру CD5 та В2 - за її відсутністю; під час обліку результатів підраховують 10×10^3 лімфоцитів [13]. Індекс співвідношення субпопуляцій В-лімфоцитів розраховують шляхом ділення кількості В1-лімфоцитів, які асоціюються із продукцією автоантитіл, на кількість В2-лімфоцитів [14]. Зростання індексу співвідношення В1/В2-лімфоцитів у хворих через 3 міс. від початку ад'ювантної інтерферонотерапії відносно вихідного рівня свідчить про розвиток автореактивності, що є сприятливим прогностичним фактором ефективності такого лікування.

За заявленим способом імунологічна оцінка ефективності ад'ювантної інтерферонотерапії була проведена 20 хворим з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри IB-IIС стадії.

Прикладами реалізації заявленого способу є витяги з історій хвороб наступних пацієнтів.

I. Хвора Д., 1938 р. н., історія хвороби № 10597.

5 Звернулася у відділення онкоортопедії, пухлин шкіри та м'яких тканин зі скаргами на наявність пігментної пухлини на шкірі поперекової області, яка протягом останнього року поступово збільшувалася в розмірах та почала кровити.

Після обстеження, що включало рентгенографію органів грудної клітки, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини та загальноклінічні дослідження, встановлено клінічний діагноз: Меланома шкіри поперекової області, II клінічна група.

03.11.2009 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри поперекової області.

Патогістологічний діагноз: Злоякісна епітеліоїдно-веретенноклітинна меланома шкіри, вузлова форма, III-IV рівень інвазії за Clark, 3,7 мм товщина за Breslow, без поверхневого виразкування (патогістологічне дослідження № 34865-71/09 від 09.11.2009 р.).

Встановлено заключний діагноз: Меланома шкіри поперекової області, T3aN0M0, стадія IIA, клінічна група II.

3 13.11.2009 р. розпочато лікування ІФН- α 2b ("Лаферобіон" ("Біофарма", Україна)) підшкірно в дозі 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. Індекс співвідношення субпопуляцій В-лімфоцитів у периферичній крові визначався до застосування ІФН- α 2b (13.11.2009 р.), через 3 (05.03.2010 р.) та 12 міс (19.11.2010 р.) від початку ад'ювантної інтерферонотерапії. Для цього досліджувалась кількість В1-лімфоцитів (CD19⁺CD5⁺) та В2-лімфоцитів (CD19⁺CD5⁻) у периферичній крові хворої методом проточної цитофлуориметрії за допомогою двопараметричного аналізу з використанням моноклональних антитіл до СО19-антигену, мічених FITC ("Сорбент", Росія), та до CD5-антигену, мічених PE ("Beckman Coulter", США), згідно з методикою. Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховувалися 10×10^3 лімфоцитів. Індекс співвідношення субпопуляцій В-лімфоцитів розраховувався шляхом ділення кількості В1-лімфоцитів на кількість В2-лімфоцитів. Індекс співвідношення В1/В2-лімфоцитів до лікування становив 0,68, що є на рівні показника у практично здорових людей ($0,52 \pm 0,17$). Через 3 міс. від початку інтерферонотерапії досліджуваний показник збільшився в 2,6 рази при порівнянні із вихідним значенням і складав 1,8, що є перевищенням показника у практично здорових людей. Через 12 міс. лікування ІФН- α 2b індекс співвідношення В1/В2-лімфоцитів знизився відносно попереднього значення, але залишився на підвищеному рівні при порівнянні з показником у практично здорових людей і складав 0,76.

За період спостереження (25 міс.) рецидиву або метастазів пухлини у хворої не виявлено.

II. Хворий Х., 1940 р. н., історія хвороби № 2420.

40 Звернувся у відділення онкоортопедії, пухлин шкіри та м'яких тканин зі скаргами на наявність пігментної пухлини на шкірі спини, що з'явилася 4 роки тому, поступово збільшувалася в розмірах та почала свербіти.

Після обстеження, що включало рентгенографію органів грудної клітки, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини та загальноклінічні дослідження, встановлено клінічний діагноз: Меланома шкіри спини, II клінічна група.

45 23.03.2010 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри спини.

Патогістологічний діагноз: Злоякісна епітеліоїдноклітинна меланома шкіри, III-IV рівень інвазії за Clark, 1,5 мм товщина за Breslow, без поверхневого виразкування (патогістологічне дослідження № 9593-9600/10 від 02.04.2010 р.).

50 Встановлено заключний діагноз: Меланома шкіри спини, T2aN0M0, стадія IB, клінічна група II.

3 06.04.2010 р. розпочато лікування ІФН- α 2b ("Лаферобіон" ("Біофарма", Україна)) підшкірно в дозі 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. Індекс співвідношення субпопуляцій В-лімфоцитів у периферичній крові визначався до застосування рекомбінантного ІФН- α 2b (06.04.2010 р.), через 3 (08.07.2010 р.) та 12 міс. (05.04.2011 р.) від початку ад'ювантної інтерферонотерапії. Для цього досліджувалась кількість В1-лімфоцитів (CD19⁺CD5⁺) та В2-лімфоцитів (CD19⁺CD5⁻) у периферичній крові хворого методом проточної цитофлуориметрії за допомогою двопараметричного аналізу з використанням моноклональних антитіл до СО19-антигену, мічених FITC ("Сорбент", Росія), та до СО5-антигену, мічених PE ("Beckman Coulter", США), згідно з методикою.

Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховувалися 10×10^3 лімфоцитів. Індекс співвідношення субпопуляцій В-лімфоцитів розраховувався шляхом ділення кількості В1-лімфоцитів на кількість В2-лімфоцитів. Індекс співвідношення В1/В2-лімфоцитів до лікування становив 0,43, що є на рівні показника практично здорових людей ($0,52 \pm 0,17$). Через 3 міс. від початку інтерферонотерапії досліджуваний показник підвищився в 1,8 рази відносно вихідного значення і складав 0,79, що є перевищенням показника у практично здорових людей, та залишився на цьому рівні через 12 міс. лікування ІФН- α 2b і складав 0,82.

За період спостереження (20 міс.) рецидиву або метастазів пухлини у хворого не виявлено.

Джерела інформації

1. Eggermont A. New developments in adjuvant therapy in melanoma / A. Eggermont // Eur. J. Cancer. - 2007. - Vol. 5, № 4 (suppl.). - P. 45.

2. Dacarbazine, cisplatin and interferon- α -2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized Phase III trial (18951) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group / U. Keilholz, C.J. Punt, M. Gore [et al.] // J. Clin. Oncol. - 2005. - Vol. 23, №27.-P. 6747-6755.

3. A prospective randomized Phase III trial of concurrent biochemotherapy (BCT) with cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD), IL-2 and interferon α -

2b (IFN) versus CVD alone in patients with metastatic melanoma (E3695). An ECOG-coordinated intergroup trial / M.B. Atkins, S. Lee, L.E. Flaherty [et al.] // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. - 2003. - Vol. 22. - P. 708.

4. Does adjuvant interferon- α for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials / K. Wheatley, N. Ives, B. Hancock [et al.] // Cancer Treat. Rev. - 2003. - Vol. 29, № 4. -P. 241-252.

5. Interferon α as adjuvant postsurgical treatment of melanoma: a meta-analysis / D. Pirard, M. Heenen, C. Melot, P. Vereecken // Dermatology. - 2004. -Vol. 208, №1.-P. 43-48.-

6. Eggermont A.M. Management of melanoma: a European perspective / A.M. Eggermont, C. Voit // Surg. Oncol. Clin. Am. - 2008. - Vol. 17, № 3. -P. 635-648.

7. Bajetta E. Adjuvant use of interferon α 2b is not justified in patients with stage IIb/III melanoma / E. Bajetta // Nat. Clin. Pract. Oncol. - 2008. -Vol. 5, № 1.-P. 4-5.

8. Ascierto P.A. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade / P.A. Ascierto, J.M. Kirkwood // J. Transl. Med. - 2008. -Vol. 6.-P. 62.

9. Autoimmunity as a prognostic factor in melanoma patients treated with adjuvant low-dose interferon α /1. Satzger, A. Meier, F. Schenck [et al.] // Int. J. Cancer. - 2007. - Vol. 121, № 11. - P. 2562-2566.

10. Autoimmune antibodies and recurrence-free interval in melanoma patients treated with adjuvant interferon / M.G. Bouwhuis, S. Suci, S. Collette [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. - 2009. - Vol. 101, № 12. - P. 869-877.

11. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon / H. Gogas, J. Ioannovich, U. Dafni [et al.] // N. Engl. J. Med. -2006. - Vol. 354. - P. 709-718 (прототип).

12. Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин, А.В. Симонова [и др.] / Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / пособие для врачей-лаборантов. - М., 2001. - 55 с.

13. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) /СВ. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // Мед. иммунол. - 2009. - Т. 11, № 2-3. - С. 227-238.

14. Казмирчук В.Е. Пособие по клинической иммунологии для практических врачей / В.Е. Казмирчук, Д.В. Мальцев. - К.: ООО «Доктор-Медиа», 2010. - 328 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб імунологічної оцінки ефективності інтерферонотерапії у хворих на меланому шкіри, що включає виявлення автореактивності в процесі інтерферонотерапії, який **відрізняється** тим, що у периферичній крові хворих визначають індекс співвідношення кількості В1-лімфоцитів до кількості В2-лімфоцитів.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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