



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85713** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/53** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 07548</b>	(72) Винахідник(и): <b>Фільчаков Феодосій Вікторович (UA), Льон Ганна Даріївна (UA), Шуміліна Катерина Станіславівна (UA), Кукушкіна Світлана Миколаївна (UA), Коровін Сергій Ігорович (UA), Кукушкіна Марія Миколаївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>14.06.2013</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.11.2013</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.11.2013, Бюл.№ 22</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА МЕЛАНОМУ ШКІРИ

### (57) Реферат:

Спосіб прогнозування ефективності лікування хворих на меланому шкіри включає виявлення змін стану імунної системи хворих на меланому шкіри в динаміці імунотерапії. При підвищенні вмісту у периферичній крові природних кілерних клітин (CD16<sup>+</sup>), активованих Т-хелперів (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>) та регуляторних Т-лімфоцитів (CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>127<sup>low-neg</sup>) на тлі зниження мітоген-індукованої проліферації Т-лімфоцитів in vitro прогнозують сприятливий перебіг захворювання.

UA 85713 U



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

Меланома шкіри залишається головною причиною смертності серед пацієнтів із злоякісними новоутвореннями шкіри [1]. Терапевтичні можливості обмежені через швидке прогресування захворювання та низьку чутливість пухлинних клітин до хіміопрепаратів. Доведено, що меланома шкіри є імунозалежною пухлиною [2], тому у комплексі із хірургічним та хіміотерапевтичним методами лікування застосовується імунотерапія [3], що спрямована на підвищення протипухлинної резистентності організму таких хворих.

На сьогодні єдиної методології оцінки імунного статусу пацієнтів і консенсусу щодо потенційних біомаркерів, дослідження яких дозволило би своєчасно передбачити перебіг захворювання та відповідь на імунотерапію, немає [4]. Тому існує об'єктивна необхідність визначення лабораторних критеріїв прогнозу ефективності лікування цієї категорії хворих.

За найближчий аналог (прототип) вибрано спосіб імунологічної оцінки ефективності вакцинотерапії у хворих на меланому шкіри [Клинико-иммунологическая эффективность вакцинотерапии при диссеминированной меланоме кожи / М.А. Суровцева, А.А. Шишков, Г.В. Селедцова, В.А. Козлов // Сиб. онкол. журн. - 2009. - № 6 (36). - С 12-18], за яким оцінювали відповідь імунної системи на вакцинотерапію 29 хворих на дисеміновану меланому шкіри в залежності від клінічної ефективності лікування. Лабораторне дослідження включало визначення антиген-індукованої бласттрансформації лімфоцитів периферичної крові (ЛПК), рівня сироваткових цитокінів (Інтерферону- $\gamma$ , ІЛ-4) та антитіл проти вакцинальних антигенів, що дозволило виявити збільшення концентрації ІЛ-4, асоційоване з погіршенням 3-річної виживаності хворих.

Позитивним в прототипі є оцінка імунологічних параметрів хворих в процесі лікування, що може бути використано у прогнозуванні його ефективності.

Недоліком прототипу є обмеження ідентифікації біологічної відповіді організму хворих на меланому шкіри на проведені лікування через визначення тільки ІЛ-4 у сироватці як лабораторного критерію оцінки ефективності лікування, оскільки за рівнем цього цитокіну неможливо оцінити стан клітинної ланки імунної системи, яка відіграє основну роль в протипухлинному захисті [6].

Задача корисної моделі полягає в удосконаленні способу прогнозування ефективності лікування хворих на меланому шкіри шляхом визначення в динаміці імунотерапії зміни вмісту у периферичній крові природних кілерних клітин (ПКК), активованих Т-хелперів (із рецептором до ІЛ-2), регуляторних Т-лімфоцитів (Трег) та мітоген-індукованої проліферації Т-лімфоцитів як лабораторних критеріїв ефективності лікування, що дасть можливість виявити групу хворих з прогнозованою сприйнятливістю до Інтерферонотерапії, а також допоможе в розробці більш ефективних схем її застосування.

Поставлена задача вирішується таким чином:

Хворому з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри ПІВ-ІПС стадії призначають неoad'ювантну імунотерапію інтерфероном -  $\alpha 2b$  (Лаферобіон, підшкірно по 9 млн МО щоденно упродовж 23 днів), після цього виконують регіонарну лімфаденектомію, через 8-10 діб після якої призначають ад'ювантну Інтерферонотерапію (Лаферобіон, підшкірно по 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс). Оцінку відповіді клітинної ланки імунної системи на Інтерферонотерапію проводять з урахуванням динаміки змін вмісту у периферичній крові ПКК (CD16<sup>+</sup>), активованих Т-хелперів (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>), Трег (CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>127<sup>low-neg</sup>) та мітоген-індукованої проліферації Т-лімфоцитів, які визначають до та після ад'ювантної імунотерапії. Визначення кількісного складу популяцій Т-лімфоцитів у периферичній крові проводять методом проточної цитофлуориметрії [7] з використанням моноклональних антитіл до CD4- і CD16-антигенів, мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) ("Сорбент", Росія), CD25-антигену, мічених фікоеритринціаніном-5 (PC5), та CO127-антигену, мічених фікоеритрином (PE) ("Beckman Coulter", США). Результати обчислюють на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Для виявлення Трег використовують багатопараметричний аналіз з багатоетапним введенням логічних обмежень. Трег визначають серед CO4<sup>+</sup>-лімфоцитів за високою експресією CD25 в поєднанні з низькою або негативною експресією CD 127 [8]. Під час обліку результатів підраховують  $2 \times 10^3$  лімфоцитів при визначенні ПКК та активованих Т-хелперів і  $10 \times 10^3$  - при визначенні Трег. Функціональну активність Т-лімфоцитів визначають в реакції бласттрансформації з ФГА ("Sigma", США, 10 мкг/мл) морфологічним методом за відсотком бласттрансформованих лімфоцитів [9].

Підвищення в циркуляції рівня ПКК, активованих Т-хелперів із рецептором до ІЛ-2, Трег та зниження мітоген-індукованої проліферації Т-лімфоцитів у хворих після проведення ад'ювантної імунотерапії є лабораторними критеріями сприятливого прогнозу її ефективності.

За заявленим способом оцінка відповіді клітинної ланки імунної системи онкологічних хворих на імунотерапію була проведена 20 хворим з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри IIIB-IIIC стадії.

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

5 I. Хворий Я., 1952 р. н., Історія хвороби № 11664.

Звернувся у відділення онкоортопедії, пухлин шкіри та м'яких тканин зі скаргами на наявність пухлини у правій пахвинній області, що з'явилася 1 місяць тому та поступово збільшувалася в розмірах. Із анамнезу відомо, що 14.07.2008 р. в Національному інституті раку хворому проведено широке висічення меланоми шкіри передньої черевної стінки (T4aN0M0, стадія IIIB), після чого застосована цитостатична терапія (циклофосфан) та імунотерапія (лаферобіон).

10 Після обстеження, що включало комп'ютерну томографію головного мозку, органів грудної клітки, черевної порожнини та таза, загальноклінічні дослідження, встановлено клінічний діагноз: Меланома шкіри передньої черевної стінки, стан після комбінованого лікування, метастази в пахвинні лімфатичні вузли з правого боку, клінічна група II.

З 23.11.2009 р. по 15.12.2009 р. отримав неоад'ювантну інтерферонотерапію (Лаферобіон ("Біофарма", Україна), підшкірно по 9 млн МО щоденно).

15 17.12.2009 р. під ендотрахеальним наркозом виконано пахвинно-здухвинну лімфаденектомію з правого боку.

20 Патогістологічний висновок № 40482-7/09 від 24.12.2009 р.: Метастази меланоми в 1 лімфатичному вузлі з великим вмістом пігменту та некротичної тканини.

Встановлено заключний діагноз: Меланома шкіри передньої черевної стінки, стан після комбінованого лікування; метастази в пахвинні лімфатичні вузли з правого боку, T4aN1bM0, стадія IIIB, клінічна група II.

25 З 28.12.2009 р. розпочато ад'ювантну інтерферонотерапію (Лаферобіон ("Біофарма", Україна)) підшкірно дозою 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. Відповідь клітинної ланки імунної системи на лікування визначали до (28.12.2009 р.) та після ад'ювантної імунотерапії (21.12.2010 р.). Для цього досліджували вміст у периферичній крові ПКК (CD16<sup>+</sup>), Т-хелперів із рецептором до ІЛ-2 (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>), Трег (CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>127<sup>low-neg</sup>) та мітоген-індуковану проліферативну активність Т-лімфоцитів. Кількісний склад популяцій Т-лімфоцитів у периферичній крові хворого визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до CD4- і CD16-антигенів, мічених FITC ("Сорбент", Росія), CD25-антигену, мічених PC5, та CD127-антигену, мічених PE ("Beckman Coulter", США). Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Для виявлення Трег використовували багатопараметричний аналіз з багатоетапним введенням логічних обмежень. Трег визначали серед CD4<sup>+</sup>-лімфоцитів за високою експресією CD25 в поєднанні з низькою або негативною експресією CD127. Під час обліку результатів підраховували  $2 \times 10^3$  лімфоцитів при визначенні ПКК та активованих Т-хелперів та  $10 \times 10^3$  - при визначенні Трег. Функціональну активність Т-лімфоцитів визначали в реакції бласттрансформації з ФГА ("Sigma", США, 10 мкг/мл) морфологічним методом за відсотком бласттрансформованих лімфоцитів.

40 До ад'ювантної імунотерапії відносна кількість ПКК становила 13 %, після лікування досліджуваний показник збільшився в 2,4 рази при порівнянні із вихідним значенням і склав 31 %, що є перевищенням показника у практично здорових людей ((22,9±3,4) %). Також відбулося збільшення кількості активованих Т-хелперів (від 23 до 28 %) та Трег (від 6,3 до 6,6 %), що є перевищенням норми ((13,8±1,1) та (2,9±0,2) % відповідно). Мітоген-індукована проліферативна активність Т-лімфоцитів до та після ад'ювантної імунотерапії становила 4 та 11 % відповідно, що значно нижче за норму ((32,4±18,6) %). Такі зміни в імунній системі хворого в динаміці інтерферонотерапії дають можливість спрогнозувати сприятливий перебіг захворювання.

50 За період спостереження (29 міс) рецидиву або метастазів меланоми у хворого не виявлено.

II. Хвора М., 1976 р. н., історія хвороби № 12775.

Звернулася у відділення онкоортопедії, пухлин шкіри та м'яких тканин зі скаргами на наявність пухлини у правій пахвинній області, що з'явилася 2 тижні тому та поступово збільшувалася в розмірах. Із анамнезу відомо, що 3 роки тому хвора самостійно видала пігментну пухлину шкіри правого стегна за допомогою мазі.

Після обстеження, що включало тонкоголкову біопсію лімфатичного вузла правої пахвинної області з наступним гістологічним дослідженням, комп'ютерну томографію головного мозку, органів грудної клітки, черевної порожнини та таза, загально-клінічні дослідження, встановлено

клінічний діагноз: Метастази анонімної меланоми в пахвинні лімфатичні вузли з правого боку, клінічна група II.

З 23.12.2009 р. по 14.01.2010 р. отримала неoad'ювантну інтерферонотерапію (Лаферобіон ("Біофарма", Україна), підшкірно по 9 млн МО щоденно).

18.01.2010 р. під ендотрахеальним наркозом виконано пахвинно-здухвинну лімфаденектомію з правого боку.

Патогістологічний висновок № 835-8/10 від 21.01.2010 р.: В 4 лімфатичних вузлах метастази меланоми, гіперплазія здухвинних лімфатичних вузлів.

Встановлено заключний діагноз: Метастази анонімної меланоми в пахвинні лімфатичні вузли з правого боку, ТхN3M0, стадія IIIC, клінічна група II.

З 25.01.2010 р. розпочато ад'ювантну інтерферонотерапію (Лаферобіон ("Біофарма", Україна)) підшкірно дозою 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. Відповідь клітинної ланки імунної системи на лікування визначали до (25.01.2010 р.) та після ад'ювантної імунотерапії (10.01.2011 р.). Для цього досліджували вміст у периферичній крові ПКК (CD16<sup>+</sup>), Т-хелперів із рецептором до ІЛ-2 (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>), Трег (CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>127<sup>low-neg</sup>) та мітоген-індуковану проліферативну активність Т-лімфоцитів. Кількісний склад популяцій Т-лімфоцитів у периферичній крові хворої визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до CD4- і CD16-антигенів, мічених FITC ("Сорбент", Росія), CD25-антигену, мічених PC5, та CD127-антигену, мічених PE ("Beckman Coulter", США). Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Для виявлення Трег використовували багатопараметричний аналіз з багатоетапним введенням логічних обмежень. Трег визначали серед CD4<sup>+</sup>-лімфоцитів за високою експресією CD25 в поєднанні з низькою або негативною експресією CD127. Під час обліку результатів підраховували  $2 \times 10^3$  лімфоцитів при визначенні ПКК та активованих Т-хелперів та  $10 \times 10^3$  - при визначенні Трег. Функціональну активність Т-лімфоцитів визначали в реакції бласттрансформації з ФГА ("Sigma", США, 10 мкг/мл) морфологічним методом за відсотком бласттрансформованих лімфоцитів.

До ад'ювантної імунотерапії відносна кількість ПКК становила 10 %, що нижче за показник у практично здорових людей ((22,9±3,4) %), після лікування досліджуваний показник збільшився в 1,9 разу при порівнянні із вихідним значенням і склав 19 %, тобто відновився до норми. Також відбулося збільшення кількості активованих Т-хелперів (від 17 до 23 %) та Трег (від 6,1 до 6,4 %), що є перевищенням показника у практично здорових людей ((13,8±1,1) та (2,9±0,2) % відповідно). Мітоген-індукована проліферативна активність Т-лімфоцитів до та після ад'ювантної імунотерапії становила 3 та 14 % відповідно, що є нижче за норму ((32,4±18,6) %). Такі зміни в імунній системі хворої в динаміці інтерферонотерапії дають можливість спрогнозувати сприятливий перебіг захворювання.

За період спостереження (29 міс) рецидиву або метастазів меланоми у хворої не виявлено.

Джерела інформації

1. Рак в Україні, 2010-2011. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / З.П. Федоренко, А.В. Гайсенко, Л.О. Гулак [та ін.] // Бюл. Нац. канцер-реєстру України. - К., 2012. - № 13. - 124 с

2. Биологические методы лечения онкологических заболеваний. Принципы и практическое применение / Под ред. ВТ. ДеВита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. - М.: Медицина, 2002. - 936 с.

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

4. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: Immune-related response criteria / J.D. Wolchok, A. Hoos, S. O'day [et al.] // Clin. Cancer Res. - 2009. - Vol. 15, № 23. - P. 7412-7420.

5. Клинико-иммунологическая эффективность вакцинотерапии при диссеминированной меланоме кожи / М.А. Суровцева, А.А. Шишков, Г.В. Селедцова, В.А. Козлов // Сиб. онкол. журн. - 2009. - № 6 (36). - С. 12-18 (прототип).

6. Zitvogel L. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion / L. Zitvogel, A. Tesniere, G. Kroemer / Nat. Rev. Immunol. - 2006. - Vol. 6, №10. - P. 715-727.

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

8. 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.

9. Вплив різних схем Інтерферонотерапії на функціональну активність лімфоцитів у хворих на меланому шкіри / Ф.В. Фільчаков, К.С. Шуміліна, Г.Д. Льон [та ін.] // Імунологія та алергологія. - 2011. - № 2. - С. 120-125.

5

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб прогнозування ефективності лікування хворих на меланому шкіри, що включає виявлення змін стану імунної системи хворих на меланому шкіри в динаміці імунотерапії, який **відрізняється** тим, що при підвищенні вмісту у периферичній крові природних кілерних клітин (CD16<sup>+</sup>), активованих Т-хелперів (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>) та регуляторних Т-лімфоцитів (CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>127<sup>low-neg</sup>) на тлі зниження мітоген-індукованої проліферації Т-лімфоцитів *in vitro* прогнозують сприятливий перебіг захворювання.

---

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