



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 117086

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 21/39 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 00764**

(22) Дата подання заявки: **27.01.2017**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **12.06.2017**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **12.06.2017, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Третяк Наталія Миколаївна (UA),  
Стародуб Галина Сергіївна (UA),  
Горяїнова Надія Валеріївна (UA),  
Басова Ольга Василівна (UA),  
Перехрестенко Тетяна Петрівна (UA),  
Кубарова Валентина Олександрівна (UA),  
Гордієнко Алла Іванівна (UA)**

(73) Власник(и):

**Третяк Наталія Миколаївна,  
вул. Малишка, 13, кв. 22, м. Київ, 02192 (UA)**

(74) Представник:

**Лісна Тетяна Леонідівна, реєстр. №286**

## (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПРОГРЕСІЇ МІЕЛОДИСПЛАСТИЧНОГО СИНДРОМУ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування прогресії мієлодиспластичного синдрому включає визначення рівня експресії клітинного маркера і приналежності хворого до певної групи ризику. До призначення терапії досліджують інтенсивність експресії маркера проліферації Ki-67. Для цього спочатку проводять забір зразків периферичної крові і кісткового мозку, далі проводять обробку гемопоетичних клітин, що містять в них з використанням моноклональних антитіл до внутрішньоядерного маркера проліферації Ki-67. Досліджувані оброблені зразки клітин відмивають і аналізують на лазерному цитофлуориметрі, інтенсивність експресії Ki-67 вивчають в регіонах гранулоцитів та моноцитів, вибраних за параметрами світлорозсіювання та флуоресценції.

UA 117086 U



Корисна модель належить до медицини, а саме до гематології, та може бути використана для прогнозування прогресії мієлодиспластичного синдрому (МДС) рефрактерної анемії з надлишком бластів I (РАНБ I) у РАНБ II або гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ) на основі врахування рівня експресії маркера проліферації Ki-67 субстратними клітинами мієлоїдного паростку хворих.

Зважаючи на те, що МДС характеризується несприятливим перебігом і високою ймовірністю його трансформації в ГМЛ, на поточний момент вибір терапії ґрунтується на належності хворого до групи низького, проміжного 1 або 2 та високого ризику прогресування процесу [1,2].

У світі розроблена низка стратифікаційних систем для прогнозування перебігу МДС та його трансформації в ГМЛ. Поміж існуючих бальних систем найбільш обґрунтованими з точки зору накопичених даних наукових досліджень і клінічного досвіду, що рекомендовані провідними світовими гематологічними асоціаціями та фундаціями з дослідження МДС, є Міжнародна прогностична бальна система (IPSS), удосконалена Міжнародна прогностична бальна система (IPSS-R) і Прогностична бальна система ВООЗ (WPSS). В усі наведені вище прогностичні системи для визначення приналежності пацієнта до певної групи ризику прогресії МДС включені показники: відсоток бластних клітин у кістковому мозку (КМ), наявність цитогенетичних аномалій, кількість паростків з цитопенією в периферичній крові (ПК) [1-3].

Проте наведені стратифікаційні системи мають обмежене застосування в нашій країні, що зумовлено складністю культивування клітин кісткового мозку та проведення аналізу каріотипу.

Найближчим аналогом до способу, що заявляється, є метод прогнозування прогресії МДС, заснований на визначенні рівня експресії допоміжного протеїну рецептора до інтерлейкіну-1 (ДПР ІЛ-1) (Interleukin 1 Receptor Accessory Protein (IL-1 RAP)) [US20150147271, WO2013023015A3]. Наведений спосіб засновано на визначенні рівня експресії ДПР ІЛ-1 на CD 34-позитивних клітинах у зразках КМ хворих на МДС. Визначено, що за умови наявності рівню експресії ДПР ІЛ-1 менше, ніж 2 % на CD 34-позитивних клітинах хворого з МДС, останній належить до групи низького ризику прогресії в ГМЛ, а при наявності рівня експресії ДПР ІЛ-1 понад 10 % - до групи високого ризику [4].

Спосіб має наступні недоліки: спосіб ґрунтується на визначенні на CD 34-позитивних клітин рівня експресії протеїну, що підвищується при зростанні у пацієнта синтезу ІЛ-1, а останній збільшується при низці неспецифічних патологічних станів - пошкодженні тканин організму, стресі, наявності інфекційних або аутоімунних захворювань, і за наявності в пацієнта з МДС супутньої патології запального характеру рівень клітинної експресії ДПР ІЛ-1 може бути значно підвищеним за рахунок не клонального гематологічного процесу, а наявності інфекційного або аутоімунного захворювання, тому даного пацієнта на МДС буде хибно віднесено до групи високого ризику прогресії; не визначено час безпрогресивної виживаності при МДС.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу, який дозволив би підвищити точність і забезпечити доступність прогнозування прогресії хворих на МДС РАНБ I у РАНБ II або ГМЛ.

Поставлену задачу вирішують тим, що у способі прогнозування прогресії мієлодиспластичного синдрому, який включає визначення рівня експресії клітинного маркера і приналежності хворого до певної групи ризику, згідно з корисною моделлю, у хворого з діагнозом мієлодиспластичного синдрому рефрактерної анемії з надлишком бластів I до призначення терапії досліджують інтенсивність експресії маркера проліферації Ki-67, для цього спочатку проводять забір зразків периферичної крові і кісткового мозку, далі проводять обробку гемопоетичних клітин, що містяться в них з використанням моноклональних антитіл до внутрішньоядерного маркера проліферації Ki-67, у наступному досліджувані оброблені зразки клітин відмивають і аналізують на лазерному цитофлюориметрі, інтенсивність експресії Ki-67 вивчають у регіонах гранулоцитів і моноцитів, вибраних за параметрами світлорозсіювання та флюоресценції, за умови наявності відсотка Ki-67-позитивних клітин у периферичній крові  $\leq 6,9\%$  і в кістковому мозку  $\leq 9,8\%$  хворого відносять до групи з низьким рівнем ймовірності прогресії мієлодиспластичного синдрому з надлишком бластів I у мієлодиспластичний синдром із надлишком бластів II або гостру мієлоїдну лейкемію протягом 12-26 місяців і 21-26 місяців відповідно, а у випадку наявності Ki-67-позитивних клітин у периферичній крові  $> 6,9\%$  і в кістковому мозку  $> 9,8\%$  хворого відносять до групи високого ризику прогресії мієлодиспластичного синдрому з надлишком бластів I у мієлодиспластичний синдром з надлишком бластів II або гостру мієлоїдну лейкемію протягом зазначених періодів часу.

У клінічній онкології широко використовується імуногістохімічний метод оцінки індивідуальних біологічних характеристик пухлини. Одним із маркерів клітинної проліферації є протеїн Ki-67, який належить до регуляторних білків клітинного циклу. Він секретується в клітинах під час мітозу та зникає, коли вони переходить у стан спокою або під час репарації

ДНК. Антитіла до протеїну Ki-67 використовують для оцінки проліферативної активності багатьох новоутворень. Індекс Ki-67 є незалежним показником прогнозування рецидивів і виживання хворих на певні типи солідних новоутворень [5, 6].

Спосіб відрізняється високою прогностичною цінністю позитивного результату, дозволяє підвищити точність і забезпечити доступність предикції прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II або ГМЛ.

За рахунок визначення рівня експресії маркера проліферації Ki-67 у КМ і ПК хворих прогнозування прогресії МДС РАНБ I сягає 75 % і 100 % відповідно.

Спосіб дозволяє припустити тривалість періоду від верифікації діагнозу МДС РАНБ I до його прогресії в РАНБ II або ГМЛ.

Спосіб здійснюють наступним чином.

У хворого з верифікованим діагнозом МДС РАНБ I до призначення терапії проводять забір зразків ПК та КМ. Для визначення рівня експресії Ki-67 у гемопоетичних клітинах, що містяться в отриманих зразках ПК та КМ, проводять проточну лазерну цитофлюорометрію з використанням моноклональних антитіл до Ki-67. Інтенсивність експресії Ki-67 вивчають у регіонах гранулоцитів і моноцитів, вибраних за параметрами світлорозсіювання та флюоресценції. Аналіз даних проточної цитометрії проводять за допомогою програмного забезпечення LYSYS II Ver. 1.1 (Becton Dickinson, США), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Insitute, La Solla, США) та free FCS-reader (Шороп Є. Авм. свід. № 38745 від 23.06.11 р.).

За умови наявності відсотка Ki-67-позитивних клітин у ПК < 6,9 % і в КМ < 9,8 % хворого відносять до групи з низьким рівнем ймовірності прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II або ГМЛ протягом 12-26 місяців і 21-26 місяців відповідно. Натомість у випадку наявності Ki-67-позитивних клітин у ПК > 6,9 % і в КМ > 9,8 % хворого відносять до групи високого ризику прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II або ГМЛ протягом наведених вище періодів часу.

У подальшому хворому призначають стандартну терапію та фіксують час від верифікації діагнозу до прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II або в ГМЛ.

Найбільш патогномонічне для предикції прогресії захворювання значення відсотка Ki-67-позитивних клітин у ПК та КМ визначають за допомогою дискримінаційного аналізу результатів усіх хворих, що здійснюють за допомогою побудови ROC-кривих. Оптимальний дискримінаційний рівень показнику на ROC-кривій констатують за умови обчислювання найбільшого значення чутливості при найменшому значенні частки хибно-позитивних результатів. Загальну ефективність даного способу оцінюють за допомогою аналізу площі під ROC - кривою (ППК) з визначенням її статистичної доведеності, яку припускають за вірогідності помилки (p) менше 0,05, також враховують предиктивну цінність позитивного результату.

Час безпрогресивного періоду перебігу МДС РАНБ I за наявності певних дискримінаційних значень відсотків Ki-67-позитивних клітин у ПК та КМ визначають за допомогою методу Каплана-Мейєра з використанням логрангового критерію.

Ефективність застосування критерію "Ki-67-позитивні клітини в ПК > 6,9 %" та "Ki-67-позитивні клітини в КМ > 9,8 %" у хворих на МДС РАНБ I характеризується відмінним рівнем потужності (ППК=1,00; 95 % довірчий інтервал (ДІ) = 0,87-1,00, p < 0,0001 та ППК = 0,92; 95 % = 0,75-0,99, p < 0,0001 відповідно) та високою прогностичною цінністю позитивного результату (100 %; 95 % ДІ = 47,8-100 та 75,0 %; 95 % ДІ = 41,2-95,0 відповідно) для прогресії захворювання в РАНБ II або ГМЛ.

Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1

Обстежено хворого К., 46 років. Відсоток Ki-67-позитивних клітин у КМ та ПК до призначення терапії становив 3,8 % і 1,0 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на першу лінію терапії у хворого верифіковано повну відповідь на лікування. Протягом 26 місяців після верифікації діагнозу прогресії МДС РАНБ I не визначено.

Приклад 2

Обстежено хвору Р., 67 років. Відсоток Ki-67-позитивних клітин у КМ та ПК до призначення терапії становив 8,7 % і 3,4 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на першу лінію терапії у хворої верифіковано стабілізацію захворювання на лікування. Протягом 23 місяців після верифікації діагнозу прогресії МДС РАНБ I не визначено.

Приклад 3

Обстежено хворого В., 77 років. Відсоток Ki-67-позитивних клітин у КМ та ПК до призначення терапії становив 9,9 % і 6,9 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на першу лінію терапії у хворого верифіковано відсутність відповіді на лікування. Через 18 місяців після верифікації діагнозу відбулась прогресія МДС РАНБ I в РАНБ II.

Приклад 4

Обстежено хвору 3., 58 років. Відсоток Ki-67-позитивних клітин у КМ та ПК до призначення терапії становив 2,3 % та 0,9 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на першу лінію терапії у хворої верифіковано повну відповідь на лікування. Протягом 31 місяця після верифікації діагнозу прогресії МДС РАНБ I не визначено.

#### 5 Приклад 5

Обстежено хворого М., 66 років. Відсоток Ki-67-позитивних клітин у КМ та ПК до призначення терапії становив 5,8 % і 2,2 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на першу лінію терапії у хворого верифіковано часткову відповідь на лікування. Протягом 24 місяців після верифікації діагнозу прогресії МДС РАНБ I не визначено.

10 Запропонованим способом проведено прогнозування рівня відповіді на терапію імунomodулятором у 73 хворих на МДС РАНБ I.

Джерела інформації:

1. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet / L. Malcovati, E. Hellstrom-Lindberg, D. Bowen et al. // Blood.-2013. 15 - Vol. 122 (17). - P.2943-64.

2. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes / Peter L. Greenberg, H. Tuechler, J. Schanz et al. // Blood.-2012. - Vol. 120(12). - P. 2454-2465.

3. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM) / M.G. Delia Porta, H. Tuechler, L. Malcovati et al. // Leukemia.-2015. - Vol. 29 (7).-P. 1502-13. 20

4. <https://www.google.com/patents/WO2013023015A2?c1=en>

5. Value of Ki67 in breast cancer: the debate is still open / M. Colloza, A. Sidoni, M. Piccart-Gebhart et al. // Lancet Oncol-2010; - Vol. 11. - P. 414-15.

25 6. Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer / Rudolph P, Aim P, Heidebrecht H-J, et al // J. Natl. Cancer. Inst.-1999. - Vol. 91.-P. 271-78.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

30 Спосіб прогнозування прогресії мієлодиспластичного синдрому, що включає визначення рівня експресії клітинного маркера і приналежності хворого до певної групи ризику, який **відрізняється** тим, що у хворого з діагнозом мієлодиспластичного синдрому рефрактерної анемії з надлишком бластів I до призначення терапії досліджують інтенсивність експресії маркера проліферації Ki-67, для цього спочатку проводять забір зразків периферичної крові і 35 кісткового мозку, далі проводять обробку гемопоетичних клітин, що містять в них з використанням моноклональних антитіл до внутрішньоядерного маркера проліферації Ki-67, у наступному досліджувані оброблені зразки клітин відмивають і аналізують на лазерному цитофлюориметрі, інтенсивність експресії Ki-67 вивчають в регіонах гранулоцитів та моноцитів, вибраних за параметрами світлорозсіювання та флюоресценції, за умов наявності відсотка Ki- 40 67-позитивних клітин у периферичній крові  $\leq 6,9\%$  і в кістковому мозку  $\leq 9,8\%$  хворого відносять до групи з низьким рівнем ймовірності прогресії мієлодиспластичного синдрому з надлишком бластів I у мієлодиспластичний синдром із надлишком бластів II або гостру мієлоїдну лейкемію протягом 12-26 місяців і 21-26 місяців відповідно, а у випадку наявності Ki-67-позитивних клітин у периферичній крові  $> 6,9\%$  і в кістковому мозку  $> 9,8\%$  хворого відносять до групи високого 45 ризику прогресії мієлодиспластичного синдрому з надлишком бластів I у мієлодиспластичний синдром із надлишком бластів II або гостру мієлоїдну лейкемію протягом зазначених періодів часу.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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