



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52450 (13) U
(51) МПК (2009)
A61B 5/00
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОЇ МІЕЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ТАРГЕТНОЇ ТЕРАПІЇ "ІМАТІНІБ МЕЗИЛАТ" (ГЛІВЕК)

1

(21) u201002606

(22) 09.03.2010

(24) 25.08.2010

(46) 25.08.2010, Бюл.№ 16, 2010 р.

(72) АНДРЕЄВА СВІТЛАНА ВАСИЛІВНА, ДРОЗ-
ДОВА ВІРА ДМИТРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМА-
ТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб прогнозування перебігу хронічної мієлоїдної лейкемії у дітей та підлітків при застосуванні таргетної терапії "Іматиніб мезилат" (Глівек) шляхом проведення цитогенетичних досліджень, який **відрізняється** тим, що визначають аномалії хромосом в суспензії клітин кісткового мозку і при наявності додаткових аномалій в первинному клоні з t(9;22)(q34;q11) або поза таким клоном виявляють резистентність лейкемічних клітин.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до онкогематології. Він може бути застосований для раннього прогнозування ефективності таргетної терапії хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) з використанням інгібітора bcr-abl - тирозинкінази „Іматиніб мезилат" (Глівек).

ХМЛ - це захворювання, яке характеризується клональним та аномальним ростом гранулоцитарного ряду, коли поряд з підвищеною реплікацією клітин-попередників зберігається і їх диференціювання. Захворювання виникає внаслідок ураження ранньої стовбурової клітини із залученням всіх трьох паростків кровотворення. Дорослі хворіють частіше, ніж діти (1). Діагноз підтверджують спленомегалія, яку виявляють при фізикальному огляді, аномальна кількість клітин крові та морфологічна оцінка клітин кісткового мозку. Транслокація t(9;22)(q34;q11) (Ph+-хромосома) на теперішній час визнана цитогенетичним маркером при ХМЛ і є первинною аномалією при цьому захворюванні. В результаті такої перебудови утворюється химерний ген bcr-abl. Ефективність терапії з використанням інгібітора bcr-abl-тирозинкінази базується на блокуванні активності продукту гену bcr-abl, який відіграє ключову роль в патогенезі ХМЛ. Застосування такої терапії дозволяє не тільки досягнути клініко-гематологічну ремісію, а також видалити Ph+-клон і підтримувати повну цитогенетичну відповідь тривалий час. Тому застосування препаратів таргетної терапії з використанням інгібітора bcr-abl-тирозинкінази вимагає постійного контролю за допомогою цитогенетичних та молекулярно-генетичних методів (2, 3). Стандартом відповіді на

«Глівек» вважається досягнення клініко-гематологічної ремісії за аналізом пунктату кісткового мозку та великої цитогенетичної відповіді (1-35% аномальних клітин) через 6 місяців від початку терапії та досягнення повної цитогенетичної відповіді (0% (відсутність) аномальних клітин) через 12 місяців від початку терапії. Однак в літературі є відомості про появу інших аномалій хромосом як поза клоном з t(9;22)(q34;q11), так в клоні з цією аномалією (4).

Відомий спосіб ранньої діагностики злоякісних клітин, який базується на виявленні деконденсації центромерного гетерохроматину у вигляді дифузії центромер за допомогою пофарбування 4',6'-діаміно-2 фенілініндола (DAPI) гетерохроматин-специфічним барвником (5).

Недоліком способу є неможливість виявлення числових змін конкретних пар хромосом та структурних перебудов метафазних хромосом. Характеристика таких перебудов покладена в основу діагностики як гострих лейкемій, так і ХМПЗ. Виконання аналізу ускладнюється використанням люмінесцентного мікроскопу та флюорохромів для пофарбування хромосом і неможливістю створення довгострокового архіву отриманих препаратів.

Найбільш близьким аналогом є спосіб прогнозування перебігу ХМЛ у дорослих пацієнтів за допомогою цитогенетичних досліджень диференційно забарвлених на G - диски метафазних хромосом, при цьому наявність додаткових аномалій не мають однозначного впливу на результат таргетної терапії (4, 6, 7).

(13) U

(11) 52450

(19) UA

Задача корисної моделі - визначення прогностичного значення додаткових аномалій хромосом в клоні з t(9;22)(q34;q11) та поза цим клоном. Це досягається шляхом оцінки появи чи відсутності t(9;22)(q34;q11) після появи нових аномалій хромосом.

Спосіб прогнозування перебігу ХМЛ ілюструється конкретним прикладом його використання. При проведенні цитогенетичного дослідження використовують суспензію клітин кісткового мозку, яку забирають асептично. Розраховують необхідну кількість клітин кісткового мозку для культивування (оптимальна концентрація - 1×10^6 /мл). Препарати готують згідно методики (8).

Вищезазначеним способом проводили цитогенетичні дослідження:

1. Пацієнт М., 15 років. Діагноз ХМЛ, захворювання встановлено вперше. При госпіталізації виявлено лейкоцитоз в периферичній крові (вміст лейкоцитів - $71,3 \times 10^9$ /л), анемію (гемоглобін 94хг/л, еритроцити $2,59 \times 10^{12}$ /л,) тромбоцитоз ($460,0 \times 10^9$ /л), в мазках периферичної крові - мієлоцити - 1,2%, метамієлоцити - 1,8%, паличкоядерні нейтрофіли - 12,2 %, сегментоядерні нейтрофіли - 54,0 %, в кістковому мозку - 4,0 % бластних клітин, клінічно - гепато-спленомегалія. Цитогенетичне дослідження виявило патологічний клон: 46,XX, t(9;22)(q34;q11)[20], тобто у 100 % клітин, що здатні до поділу була виявлена дана аномалія. За сукупністю ознак була призначена таргетна терапія з „Іматиніб мезилат” у дозі 400 мг/кг. Подальші клініко-морфологічні дослідження констатували клініко-гематологічну ремісію. Через 6 місяців цитогенетичні дослідження показали 6% клітин з аномальним каріотипом, тобто велику цитогенетичну відповідь - 46,XX, t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XX[31]. Через 12 місяців не виявлено клон t(9;22)(q34;q11), але з'явилася додаткова аномалія - 46,XX,del(22)(q12)[4]/46,XX[18]. Через 18 місяців з'явилися 2 інші клони із структурними аномаліями - 46,XX,del(11)(q23)[3]/46,XX,del(16)(q22)[2]/46,XX[26]/4n±[4]. Через 24 місяці зареєстрована цитогенетична ремісія -46,XX[25]/4n±[4]. Через 30 місяців знову появилася первинна аномалія в 25 % клітин - 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[3]/46,XX[9]. Через 36 місяців кількість метафаз з початковою хромосомною аномалією збільшилась до 43 %, що свідчило про початок фази акселерації захворювання - 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XX[9].

2. Пацієнт С., 9 років. Діагноз ХМЛ, захворювання встановлено вперше. При госпіталізації виявлено лейкоцитоз в периферичній крові (вміст лейкоцитів - $367,0 \times 10^9$ /л), анемію (гемоглобін 87хг/л, еритроцити $2,68 \times 10^{12}$ /л,) тромбоцитоз ($545,0 \times 10^9$ /л), в мазках периферичної крові - мієлоцити - 1,2 %, метамієлоцити -1,8 %, паличкоядерні нейтрофіли - 15,2 %, сегментоядерні нейтрофіли - 56,6 %, в кістковому мозку - 4,0 % бластних клітин, клінічно - гепато-спленомегалія. Цитогенетичне дослідження виявило мозаїчний каріотип: 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[29]/4n±[5]. За сукупністю ознак була призначена таргетна терапія з „Іматиніб мезилат” у дозі 400 мг/кг. Подальші клініко-морфологічні дослідження констатували клініко-гематологічну ремісію. Цитогенетичний аналіз через 6 та 12 місяців зареєстрував велику цитогене-

тичну відповідь із зменшенням розміру аномального клону до 8% та 4%, відповідно - 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[1]/4n±[11] та 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[1]/46,XY[22]/4n±[4], через 18 місяців велика цитогенетична відповідь утримувалася, але в аномальній метафазі виявили додаткову аномалію del(11)(q23) - 46,XY,t(9;22)(q34;q11), del(11)(q23)[1]/46,XY[16]/4n±[4], через 24 та 30 місяців утримувалася велика цитогенетична відповідь 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/4n±[5]/46,XY[23] (7%) та 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/4n±[4] (33%). Через 36 місяців зареєстрована цитогенетична ремісія - 46,XY[14]/4n±[3], але через 42 та 48 місяці кількість клітин з t(9;22)(q34;q11) почала збільшуватися до 10 % та 100 %, відповідно - 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/4n±[3]/46,XY[15] та 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[9].

3. Пацієнт Ш., 5 років 5 місяців. Діагноз ХМЛ, захворювання встановлено вперше. При госпіталізації виявлено лейкоцитоз в периферичній крові (вміст лейкоцитів - $193,6 \times 10^9$ /л), анемію (гемоглобін 110хг/л, еритроцити $3,81 \times 10^{12}$ /л,) тромбоцитоз ($386,0 \times 10^9$ /л), в мазках периферичної крові - мієлоцити - 10,0 %, метамієлоцити - 5,0 %, паличкоядерні нейтрофіли - 27,0 %, сегментоядерні нейтрофіли - 47,0 %, в кістковому мозку - 6,4 % бластних клітин, клінічно - гепато-спленомегалія. Цитогенетичне дослідження виявило мозаїчний каріотип з аномальним клоном в 93 % клітин: 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[26]/4n±[2]. За сукупністю ознак була призначена терапія з „Іматиніб мезилат” у дозі 400 мг/кг. Подальші клініко-морфологічні дослідження констатували клініко-гематологічну ремісію. Цитогенетичний аналіз через 6 місяців виявив 12% клітин з аномальним каріотипом, тобто було зареєстровано велику цитогенетичну відповідь - 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[3]/46,XX[22], через 12 місяців кількість клітин з первинною аномалією збільшилась до 28 %, а також зареєстровано клон з додатковими цитогенетичними аномаліями 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[6]/46,XX,del(16)(q22),del(21)(q22)[2]/46,XX[15].

Таким чином, цитогенетичні дослідження мають важливе прогностичне значення і дають можливість виділяти пацієнтів до появи морфологічних ознак акселерації захворювання серед дітей та підлітків з ХМЛ. Корекція лікувальної стратегії дає можливість досягти довгострокових ремісій у пацієнтів з ХМЛ.

Джерела інформації:

1. Chinnappan D., Verma I.C., Choudhry V.P., Arya L.S. Cytogenetic investigation in childhood chronic myeloid leukemia// Indian J Pediatr. 2000. - 67, №2. - P. 107-112.

2. Yamamoto M., Kakihana K., Kurosu T., Murakami N., Miura O. Clonal evolution with inv(11)(p14q22) and NUP98/DDX10 fusion gene in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia// Cancer Genet Cytogenet. 2005. - 157, №2. - P. 104-08.

3. Patchenko P., Klepfish A., Trakhtenbrot L., Rothman R., Rachmilewitz E.A. Reciprocal relationship between a Ph-negative clone with trisomy 8 associated with severe myelodysplasia and a Ph-positive clone followin imatinib treatment in a patient

with accelerate phase chronic myelogenous leukemia (CML)// Am J Hematol. 2004. -77, №4. - P.420.

4. Mkrtchyan H., Ghazaryan S., Avetisyan G., Hovhannisyan A., Muradyan L., Daghbashyan S., Karst C., Gross M., Hinreiner S., Aroutiounian R., Liehr T. Novel complex t(Y; 9; 22) rearrangements in three cases with chronic myeloid leukemia and a rare translocation in a case with classical Philadelphia chromosome. Oncol Rep. 2008. - 20, №1. - P.99-104.

5. Патент України № 64533, МПК А61В5/00; G01N33/49, G01N33/48. Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин. Заявка №2002065207. Опубл. 16.02.2004. Бюл. №2.

6. Deininger M.W., Cortes J., Paquette R., Park B., Hochhaus A., Baccarani M., Stone R., Fischer

T., Kantarjian H., Niederwieser D., Garbacort-Passerini C., So C., Garthmann I., Goldman J. M., Smith D., Druker B. J., Guilhot F. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells// Cancer. 2007. -110, №7. - P.1509-1519.

7. Zynenchova A., Al Bahar S., Ramesh P. Trisomy 6 in a CML patient receiving imatinib mesylate therapy. Leuk Res. 2008. - 32, №9. - P.1454-1457.

8. Патент України №11079, МПК А61В5/00; G01N33/48. Спосіб прогнозування перебігу гострих лейкемій у дітей та підлітків. Заявка № и200504665. Опубл.15.12.2005. Бюл.№12.