



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89166** (13) **U**  
(51) МПК (2014.01)  
**A61K 31/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 13505</b>	(72) Винахідник(и): <b>Гордієнко Алла Іванівна (UA), Перехрестенко Тетяна Петрівна (UA), Третяк Наталія Миколаївна (UA), Шороп Євген Валерійович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>20.11.2013</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.04.2014</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.04.2014, Бюл.№ 7</b>	(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. М. Берлінського, 12, м. Київ, 04060 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ

### (57) Реферат:

Спосіб прогнозування медикаментозної резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназної активності у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію шляхом проведення клініко-лабораторних досліджень, причому коекспресію маркера резистентності глікопротеїну Pgp-170 CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> гемопоетичними клітинами визначають за допомогою проточного лазерного цитофлюориметра, й при наявності в крові більше 20 % CD33<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> та більше 10 % CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> гемопоетичних клітин визначають медикаментозну резистентність хворих до терапії інгібіторами тирозинкінази.

**UA 89166 U**



Запропонований спосіб належить до галузі медицини і може бути використаний для прогнозування медикаментозної резистентності у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), що отримують терапію інгібіторами тирозинкінази (TKI).

ХМЛ хронічне мієлопроліферативне захворювання, що характеризується підвищеною проліферацією малігнізованих стовбурових гемопоетичних клітин, які мають специфічні хромосомні зміни. Так, приблизно у 95 % хворих виявлена Філадельфійська хромосома (Ph-хромосома), яка з'являється в результаті реципроктної транслокації між хромосомами 9 та 22. Це сприяє утворенню химерного гена BCR-ABL, який продукує аномальний білок з тирозинкіназною активністю, що є причиною виникнення ХМЛ. Тому викликає інтерес до застосування в лікуванні хворих терапії патогенетичної спрямованості, а саме: TKI. Але у деяких хворих на ХМЛ спостерігається відсутність відповіді на таке лікування. Це свідчить про розвиток у них медикаментозної резистентності до TKI.

Відомим способом прогнозування медикаментозної резистентності є виявлення в пухлинних клітинах кісткового мозку (КМ) та периферичної крові (ПК) химерного гена BCR-ABL або білка з тирозинкіназною активністю, що він продукує [1]. Однак молекулярні дослідження по виявленню гена BCR-ABL потребують спеціального обладнання і займають багато часу.

Найбільш близьким аналогом заявленої корисної моделі є цитогенетичні дослідження, які спрямовані на виявлення у хворих на ХМЛ, що отримують терапію TKI, Ph<sup>+</sup> пухлинних клітин в КМ та ПК, що дозволяє констатувати резистентність до терапії [2].

Цитогенетичні дослідження складаються з декількох етапів. Так, для виявлення Ph<sup>+</sup> хромосоми потрібне попереднє культивування клітин КМ та ПК в умовах *in vitro*. Подальші етапи включають фарбування препаратів та їх мікроскопічний аналіз для урахування клітин, що знаходяться у стадії метафази. При цьому використовується трудомісткий і досить тривалий метод культури клітин (72 години). Слід підкреслити, що об'єктивність цитогенетичного аналізу залежить від кількості клітин, які знаходяться у стадії метафази.

Задача заявленого способу - підвищення об'єктивності дослідження та зменшення їх тривалості. Це досягається шляхом оцінки в ПК кількості CD33<sup>+</sup>-, CD34<sup>+</sup>- клітин (процентний вміст), що коекспресують глікопротеїн Pgp-170, за допомогою проточного лазерного цитофлюориметра та відповідної комп'ютерної програми.

Для імунофенотипічного дослідження мононуклеари ПК фарбували в прямому двоколірному імунофлюоресцентному тесті відповідними моноклональними антитілами (МКА) фірми Becton Dickinson, міченими флюоресцеїнізотіоціанатом (FITC) і фікоеритрином (PE). Спосіб підготовки зразків крові наведено в статті [3]. Для контролю рівня неспецифічного зв'язування кон'югатів МКА зразки крові фарбували мишачими МКА проти гемоціаніну фісурели (Keyhole limpet) субкласів IgG1, IgG2a, міченими відповідно FITC і PE. Дослідження по вивченню експресії антигенів CD33, CD34 та Pgp-170 проводили на проточному лазерному цитофлюориметрі FACScan (Becton Dickinson, USA). Збір даних і статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення LYSYS-II Ver. 1.1 (Becton Dickinson) та WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) і Microsoft Excel 2000 з пакета Microsoft Office 2000.

Заявлений спосіб характеризується конкретними прикладами його виконання. Нижче наводяться індивідуальні значення кількості CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> гемопоетичних клітин ПК, що коекспресують білок Pgp-170 хворих на ХМЛ, які резистентні до терапії TKI.

Так у хворій Б-ої кількість CD33<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> клітин складало 17,5 %. У хворій К-скої кількість CD33<sup>+</sup> гемопоетичних клітин, що коекспресують білок Pgp-170, дорівнювала 18,2 %. У хворого П-ского кількість CD33<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> складала 14,8 %. Виявлено, що в середньому кількість CD33<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> клітин в ПК хворих (n=15) дорівнювала 20,6±1,9 % проти 1,4±0,06 % в групі з оптимальною відповіддю.

У хворого Б-к в ПК кількість CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> клітин дорівнювала 9,8 %. У хворой Б-вої вміст в ПК CD34<sup>+</sup> гемопоетичних клітин, що коекспресують білок Pgp-170<sup>+</sup>, складала 10,0 %. У хворій А-вої кількість в ПК CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> дорівнювала 9,5 %. В ПК хворого Ш-на в ПК виявлено 18,3 % CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> гемопоетичних клітин-попередників. Показано, що в середньому в групі (n=15) хворих, які резистентні до терапії TKI, кількість в ПК CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> клітин дорівнювала 11,9±2,1 % проти 2,2±0,5 % у порівнянні з пацієнтами з оптимальною відповіддю.

Аналіз отриманих результатів дозволив розділити обстежених хворих з ХМЛ на дві групи - резистентних та з оптимальною відповіддю на терапію TKI. У 1 групу увійшли хворі з більш високим вмістом числа CD33<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> - гемопоетичних клітин-попередників. В 2 групі пацієнтів ці показники були нижче. Клінічні дані свідчать, що у хворих на ХМЛ, у яких CD33, CD34 гемопоетичні клітини коекспресують білок Pgp-170 спостерігалась резистентність до терапії TKI.

Виходячи з цього, вміст у крові хворих на ГМЛ кількості CD33<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> та CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> гемопоетичних клітин більше ніж 20,0 % є імунологічним критерієм розвитку резистентності до терапії ТКІ. Це дає можливість своєчасно змінювати тактику терапії, стратифікувати лікувальний процес, що дозволить підвищити виживаність та якість життя пацієнтів з ХМЛ.

5 Джерела інформації:

1. Волкова С.А., Ковалишина О.В., Гостюжова Е.А. и др. Эффект от терапии иматинибом по данным клинко-эпидемиологического мониторинга хронического миелолейкоза в Нижегородской области за период 2000-2010 гг. Гематол. и трансфузиол. - 2011. - Том 56. - № 4. - С.17-22.

10 2. D.E. Rooney, B.H. Czepulkovsky. Human cytogenetic. A practical approach. Malignancy and acquired abnormalities. V.II, Second edition, IRL Press at Oxford University Pres. Oxford, New York, Tokyo - 1995. - 293 p.

15 3. Гордиенко Ал.И., Исакова Л.М., Третьак Н.Н. и др. Иммунологический мониторинг больных хроническим миелолейкозом в стадии клинко-гематологической компенсации на фоне иммуномодулирующей терапии. Имунологія та алергологія. - 1998. - № 3. - С. 44-47.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб прогнозування медикаментозної резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназної активності у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію шляхом проведення клініко-лабораторних досліджень, який **відрізняється** тим, що коекспресію маркера резистентності глікопротеїну Pgp-170 CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> гемопоетичними клітинами визначають за допомогою проточного лазерного цитофлюориметра, й при наявності в крові більше 20 % CD33<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> та більше 10 % CD34<sup>+</sup>Pgp-170<sup>+</sup> гемопоетичних клітин визначають медикаментозну резистентність хворих до  
25 терапії інгібіторами тирозинкінази.

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

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