



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105902** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 33/48 (2006.01)
A61P 7/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 09396	(72) Винахідник(и): Шляхтиченко Тетяна Юріївна (UA), Дягіль Ірина Сергіївна (UA), Мінченко Жанна Миколаївна (UA), Дмитренко Ірина Віталіївна (UA), Федоренко Віра Григорівна (UA), Дмитренко Олена Олександрівна (UA), Шолойко Валентина Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.09.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.04.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.04.2016, Бюл.№ 7	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВІДПОВІДІ НА ТАРГЕТНУ ТЕРАПІЮ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ НА ОСНОВІ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНІВ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 І ІНТЕРФЕРОНУ- γ В СІРОВАТЦІ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД РІВНЯ ЕЛІМІНАЦІЇ RH-ПОЗИТИВНОГО КЛОНУ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування відповіді на таргетну терапію у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) включає прогнозування перебігу ХМЛ. Здійснюють визначення імуноферментним методом концентрацій сироваткових інтерлейкіну-2 та інтерферону- γ та в залежності від рівня елімінації Rh-позитивного пухлинного клону клітин кісткового мозку прогнозують відповідь на таргетну терапію Іматинібом Мезилатом хворих в хронічній фазі ХМЛ.

UA 105902 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до гематології, і може бути використана для прогнозування ефективності лікування та перебігу захворювання у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ).

Захворюваність на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) складає 1-2 випадки на 100 тис. населення і на його долю припадає 15-20 % всіх лейкемій серед дорослих. Головною патогенетичною подією, що призводить до розвитку ХМЛ, є соматична мутація, яка виникає в плюріпотентній гемопоетичній стовбуровій клітині. Свідомством ураження при ХМЛ саме стовбурової клітини є поява Ph-хромосоми або її молекулярного аналога гена BCR-ABL у всіх клітинах крові, крім Т-лімфоцитів, фібробластів. Внаслідок переносу генетичного матеріалу з 9 на 22 хромосому на ній утворюється зливний ген BCR-ABL, продукт якого - білок p210^{BCR-ABL} - є тирозинкіназою з підвищеною активністю. В основі розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії лежить поява BCR-ABL тирозинкінази в гемопоетичних попередниках, що призводить до злоякісної трансформації клітин за рахунок активації в них різних механізмів, які здійснюють контроль над проліферацією, адгезією клітин до строми кісткового мозку, апоптозу (Gordon MY., 1996).

До 2000 року традиційно при лікуванні ХМЛ використовувалися бусульфан (мілеран, мієлосан), гідроксисечовина, що до певного часу дозволяє ефективно контролювати проліферативну активність кісткового мозку, однак не впливає на патогенез захворювання. Використання інтерферону альфа дозволяє отримати повні цитогенетичні ремісії лише у 10-15 % хворих (Helmann R., 1994; Goldman, 2003, 2006).

В кінці 90-х років з'явилися перші повідомлення про розробку нового препарату STI571, який здатний блокувати p210^{BCR-ABL}. STI571 (імаїніб мезилат) є похідним 2-феніламінопірамідину. Аномальний білок p210^{BCR-ABL} відповідає за перенос АТФ до тирозину на різних внутрішньоклітинних ефекторних білках. В процесі фосфорилування відбувається активація цих білків та порушується нормальна життєдіяльність клітин. Молекула імаїнібу мезилату за розмірами та формою відповідає ділянці BCR-ABL тирозинкінази, яка з'єднується з АТФ. Приєднуючись до цієї активної ділянки замість АТФ, він блокує фосфорилування і весь послідовний ланцюг подій, що приводить до проліферації патологічних клітин (Deiminger MV, Goldman GJ, 1997).

Поява інгібіторів тирозинкіназ суттєво змінила сучасний підхід до лікування ХМЛ і шлях від експерименту до клінічних випробувань зайняв всього декілька років, так як продемонстрував вражаючі дані. За умов призначення імаїнібу мезилату у 76-96 % пацієнтів вдається досягти редукції Ph+ пухлинного клону впродовж року після встановлення діагнозу (O'Brien SG., Guilhot F., Larson RA et al, 2003, Hochhaus, 2004, 2007). Відмічено вірогідне збільшення 5-ти річного виживання, яке складає 90 % на імаїнібі, у раніше нелікованих пацієнтів проти 30-40 % при лікуванні цитостатичними препаратами (Cervantes F., 2003).

Висока ефективність лікування ХМЛ інгібіторами тирозинкіназ призвела до підвищення уваги до нових прогностично значущих клінічних, цитогенетичних, імуногенетичних, молекулярно-генетичних та імунологічних характеристик пухлинних клітин. Враховуючи необхідність проведення диференційної діагностики з Ph-негативними мієлопроліферативними захворюваннями, діагноз ХМЛ на сьогодні верифікують за допомогою цитогенетичних та молекулярно-генетичних методів дослідження, які дозволяють виявити Ph-хромосому та/або BCR-ABL транскрипти. Визначення рівня Ph-хромосоми або BCR-ABL надалі стає критерієм, який обумовлює стратегію та тактику подальшої терапії хворих на ХМЛ, особливо під час моніторингу мінімальної резидуальної хвороби. Одним з найважливіших прогностичних факторів виживання є швидке отримання цитогенетичної та молекулярно-генетичної відповіді на терапію ІТК.

Але не зважаючи на успіхи, досягнуті у лікуванні із застосуванням ІТК, існує група хворих, які практично не відповідають на терапію. Серед них виділяють первинно- та вторинно-резистентних. Механізми, що лежать в основі резистентності до інгібіторів тирозинкіназ, на сьогоднішній день з'ясовані недостатньо. Серед них виділяють пов'язані та непов'язані із BCR-ABL тирозинкіназою.

Після початку терапії ІТК ризик появи мутацій гену BCR-ABL, цитогенетичної клональної еволюції та професії захворювання швидко знижується, тому що зменшується кількість клітин, які знаходяться під впливом BCR-ABL-кінази. Тобто, актуальним є раннє виявлення хворих на ХМЛ, резистентних до терапії ІТК, коли зміни в терапії ще будуть ефективними.

Тому вивчення механізмів розвитку резистентності до терапії ІТК, формування комплексу маркерів прогнозу перебігу захворювання для подальшого обґрунтування лікарської тактики ведення пацієнтів з ХМЛ є актуальним.

В дослідженні можливих механізмів виникнення такої нечутливості організму до ІТК особлива увага приділяється молекулярно-генетичним порушенням. На наш погляд, не менш важливим є дослідження внеску імунологічної компоненти в ефективність таргетної терапії, зокрема дослідженню секреції цитокінів імунокомпетентними клітинами хворих на ХМЛ.

Порушення балансу у системі цитокінів вважається важливим механізмом в розвитку ХМЛ, оскільки основу більшості онкогематологічних захворювань складає пухлинний процес, який розвивається з імунокомпетентних клітин та їх попередників.

Пухлинний ріст спричиняє порушення в системі цитокінів, що проявляється дисбалансом їх регуляції та продукції. Цитокіни здатні паракринно стимулювати ріст неопластичних клітин, активувати антиапоптозні фактори, порушувати регуляцію функцій імунної системи. Пухлинна трансформація гемопоетичних клітин, також може бути пов'язана з аутокринною продукцією в пухлинних клітинах цитокінів, стимулюючих проліферацію, та експресію їх рецепторів.

Задачею корисної моделі є розробка способу прогнозування відповіді на терапію іматинібом у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію на основі визначення концентрації інтерлейкіна-2 та інтерферону- γ у сироватці крові в залежності від рівня елімінації Ph- позитивного клону клітин. До комплексу обстежень хворих на ХМЛ рекомендовано включати визначення рівнів продукції вмісту ІЛ-2, ІНФ- γ у сироватці периферичної крові (ПК) з метою визначення додаткових патогенетичних, діагностичних і прогностичних факторів а також для виявлення наявності і уточнення характеру імунної реактивності організму при ХМЛ.

В теперішній час використовують в клінічній практиці декілька прогностичних клініко-діагностичних індексів. Оцінюють прогноз перебігу захворювання за допомогою прогностичних індексів Sokal (IS), Hasford (IH) та EUTOS (IE). Всі показники визначають на момент встановлення діагнозу.

Прогностична модель індексу Sokal найбільш розповсюджена і використовується у більшості досліджень хронічної мієлоїдної лейкемії. Під час розрахунку враховується вік хворого на час встановлення діагнозу, розміри селезінки, число тромбоцитів і число бластних клітин у крові. Формула для визначення IS наступна [1]:

$$IS = \exp\{0,0116 (\text{вік} - 43,4 + 0,0345 (\text{розмір селезінки} - 7,51) + 0,188 [(\text{число тромбоцитів: } 700)^2 - 0,563] + 0,0887 (\text{число бластних клітин в крові} - 2,10)\},$$

де \exp - експонента (постійне число, рівне 2,718). Фігурні дужки означають, що експонента повинна бути піднесена в ступінь того числа, яке буде отримане у фігурних дужках.

При індексі Sokal менше 0,8 прогноз сприятливий, медіана тривалості життя складає 60 міс. При IS 1,2 і більше прогноз несприятливий і медіана тривалості життя всього 32 міс. При індексі від 0,9 до 1,1 прогноз проміжний. На час розробки даної моделі результати тривалості життя враховували без лікування пацієнтів інгібіторами тирозинкіназ.

Під час розрахунку індексу Hasford (IH) додатково враховується кількість базофільних та еозинофільних гранулоцитів у периферичній крові і формула для розрахунку наступна [2]: $IH = 0,666$ коли вік хворого ≥ 50 років + $(0,042 \times \text{розмір селезінки}) + 1,0956$ коли число тромбоцитів $> 1,500 \times 10^9/\text{л}$ + $(0,0584 \times \text{кількість бластних клітин}) + 0,20399$ коли кількість базофілів $> 3\%$ + $(0,0413 \times \text{кількість еозинофілів}) \times 100$.

Пацієнта може бути віднесено до групи низького ризику при показнику $IH \leq 780$, проміжного ризику - при IH від 781 до 1,480, високого ризику - при $IH > 1,480$.

Вірогідність досягнення повної цитогенетичної відповіді (ПЦВ) через 18 місяців після початку лікування інгібіторами тирозинкінази останнім часом прогнозують за допомогою індексу EUTOS [3]. Під час розрахунку враховують розміри селезінки (у см нижче реберної дуги) та число базофільних гранулоцитів (у відсотках) у периферичній крові і формула для розрахунку наступна: $IE = 7 \times \text{число базофілів} + 4 \times \text{розміри селезінки}$.

При показнику $IE > 87$, пацієнт має високий ризик не отримати ПЦВ через 18 міс. від початку лікування, при показнику менше 87 - пацієнта може бути віднесено до групи низького ризику. Недоліком даних прогностичних індексів є недостатня інформативність у зв'язку з неможливістю визначення точних параметрів паренхіматозних органів черевної порожнини, а також відсутністю співставлення із генетичними порушеннями, які є ключовим ланцюгом при ХМЛ.

Найбільш близьким є спосіб прогнозування відповіді на терапію на основі аналізу динаміки кількості клітин кісткового мозку з транслокацією $t(9;22)$ в динаміці лікування іматинібом мезилатом. [4]

Поставлена задача вирішувалась за рахунок визначення рівнів ІЛ-2 та ІНФ- γ в сироватці периферичної крові (ПК) як найбільш інформативних імунологічних прогностичних маркерів пухлинної прогресії, що дозволяє отримати додаткову інформацію для уточнення патогенезу ХМЛ, формування прогностичних груп та вибору оптимальної тактики лікування. Для оцінки відповіді на терапію використовували критерії ELNet 2013 р., що базуються на оцінці відсотку

Ph+ метафаз в клітинах кісткового мозку. На етапі діагностики ХМЛ цитогенетичне дослідження виконано у 52 осіб, з них 26 чоловіків та 26 осіб жіночої статі. Всім пацієнтам встановлено хронічну фазу (ХФ) ХМЛ. В подальшому проводилось кількісне визначення імуноферментним методом вмісту сироваткових ІЛ-2 та ІФН-γ на протязі прийому препарату через 6, 12, 24 місяці.

Згідно з рекомендацією ELNet 2013 р. критерієм оптимальної відповіді ОВ вважається досягнення повної цитогенетичної відповіді ПЦВ (відсутність Ph+ метафазних пластинок в кістковому мозку) на 6 місяців лікування ІТК 1-ї лінії та рівень BCR-ABL < 1 %. При ознаках відсутності адекватної та своєчасної відповіді (пересторога), а це недосягнення ПЦВ на 6 місяців терапії ІТК (кількість Ph+ метафазних пластинок у кістковому мозку становить 1-35 %, а рівень BCR-ABL 1-10 %). На 12-й місяць лікування при застереженні рівень BCR-ABL становить 0,1-1 %. У разі невдачі терапії ІТК на 6-й місяць Ph+ метафазних пластинок у кістковому мозку >35 %, а рівень BCR-ABL > 10 %, на 12-й місяць лікування Ph+ метафазних пластинок в кістковому мозку > 0 % і рівень BCR-ABL > 1 %.

Концентрації ІЛ-2 та ІФН-γ в сироватці периферичної крові (ПК) досліджували в зразках периферичної крові хворих на ХМЛ імуноферментним методом [5, 6].

Твердофазний ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) імуноферментний метод застосований на зв'язуванні антитіла з антигеном. В роботі використовуються комерційні набори DIACLONE (Франція).

Антитіла, що специфічні до інтерлейкінів (ІЛ-2, ІФН-γ згідно з набором, зразків сироватки крові та кісткового мозку, що досліджуються, стандартів та контрольних зразків) зв'язуються з мишачими антитілами до зазначених інтерлейкінів, які покривають внутрішню поверхню вічок мікропланшета. Додавання кон'югату поліклональних антитіл до зазначених інтерлейкінів і біотину, біотинілізовані антитіла зв'язуються з імунними комплексами інтерлейкінів і антитіл першого порядку (іммобілізованими антитілами на внутрішній поверхні вічок планшета). Після першої інкубації і промивання планшета із вічок видаляється незв'язаний біотиновий кон'югат і додається кон'югат стрептавідину і пероксидази хрину як індикаторного ферменту. Кон'югат стрептавідин-пероксидаза взаємодіє із біотином, кон'югованим із зазначеними інтерлейкінами. Після другої інкубації і промивання вічок планшета, із вічок видаляється незв'язаний стрептавідиновий кон'югат і за допомогою мультипіпетки додається субстратний розчин (ТМБ), який взаємодіє з ферментним комплексом із утворенням забарвленого розчину. Інтенсивність забарвлення виміряна на рідері при довжині хвилі 450 нм. Кількісну оцінку концентрації в сироватці крові та кісткового мозку зазначених цитокінів визначали в пг/мл.

Проведений статистичний аналіз із використанням програми статистичної обробки отриманих даних STATISTICA 6.0.

За рівнем вмісту в сироватці периферичної крові таких цитокінів, як ІЛ-2 та ІФН-γ можна опосередковано прогнозувати рівень регресії пухлинного клону. Теоретично обґрунтовано та практично підтверджено визначення рівнів концентрації ІЛ-2 та ІФН-γ як допоміжних імунологічних маркерів відповіді на терапію препаратами таргетної групи [6].

Проведене дослідження секреції ІЛ-2 та ІФН-γ в динаміці лікування хворих в хронічній фазі ХМЛ інгібітором BCR-ABL тирозинкінази іматинібом мезилатом ІМ. Рівень сироваткового ІФН-γ до початку терапії складав $27,8 \pm 5,64$ пг/мл. А в групі контролю показники сироваткового ІФН-γ були на рівні $78,4 \pm 5,40$ пг/мл. У пацієнтів із оптимальною відповіддю (ОВ) на терапію рівень ІФН-γ - $48,5 \pm 12,23$ пг/мл; у осіб при пересторозі $42,8 \pm 10,23$ пг/мл, у хворих із відсутністю елімінації Ph+ клону клітин т. з. невдачею терапії ІТК складав $28,5 \pm 10,38$ пг/мл. Таким чином, чим нижчий рівень ІФН-γ в сироватці крові, тим гірша відповідь на терапію ІТК.

Концентрація ІЛ-2 в сироватці крові складала до терапії ІМ $-4,4 \pm 0,76$ пг/мл. В групі контролю показники сироваткового ІЛ-2 складали $13,3 \pm 2,41$ пг/мл. У осіб із ОВ $-11,9 \pm 3,23$ пг/мл; при пересторозі $-10,8 \pm 3,41$ пг/мл із невдачею терапії ІТК $-6,9 \pm 3,02$ пг/мл. Таким чином, концентрація ІЛ-2 в сироватці крові знижується в разі погіршення відповіді на лікування ІТК.

Лікування ІМ у пацієнтів з ХМЛ, також супроводжувалось достовірним підвищенням сироваткових рівнів ІФН-γ і ІЛ-2. Так, через 6 місяців терапії у пацієнтів із ОВ концентрація зазначених цитокінів зростала до $33,1 \pm 7,40$ пг/мл та $7,7 \pm 2,04$ пг/мл у пацієнтів при пересторозі до $24,2,1 \pm 5,31$ пг/мл. Та $6,3 \pm 2,32$ пг/мл, а через 12 місяців до $46,3 \pm 8,45$ пг/мл і $(11,02 \pm 2,72)$ пг/мл відповідно у хворих із ОВ і з плином 24 місяців лікування становила $53,9 \pm 7,86$ пг/мл і $13,7 \pm 2,39$ пг/мл відповідно у пацієнтів із ОВ, що майже у 2 рази вище у порівнянні із відповідними показниками основної групи (до лікування), але у 1,5 рази нижче від контрольних значень.

Відновлення секреції сироваткових рівнів досліджених цитокінів, нормалізація вмісту ІЛ-2 та підвищення концентрацій ІФН-γ у хворих ХФ ХМЛ на терапії препаратами таргетної групи свідчить про поступову нормалізацію імунної реактивності, а завдяки тому, що ІФН-γ має направлену цитотоксичну дію на клітини пухлинного клону, імуномодуючу та протизапальну

властивість, що призводить до активації макрофагів, нейтрофілів та ендотеліальних клітин, підвищення їх концентрацій ймовірно свідчить про активацію механізмів апоптозу/некрозу лейкоцитних клітин на фоні терапії ІМ. Таким чином, зазначений спосіб може бути використаний для оцінки прогнозу відповіді на терапію іматинібом та сприяти збільшенню строків виживаності хворих на ХМЛ та індивідуалізації режиму терапії

Приклади результатів дослідження:

Приклад 1.

Пацієнт Т.В., 1952 р.н., діагноз ХМЛ встановлено в 2004 р. Лікування ІТК з 2008 р. Ініціальний рівень ІЛ-2 та ІНФ-γ в сироватці крові становили 5,6 пг/мл та 25,2 пг/мл відповідно. Через 6 місяців лікування рівень ІЛ-2 та концентрація ІНФ-γ у пацієнта склали 10,8 пг/мл та 36,5 пг/мл відповідно, а через 12 місяців 14,9 пг/мл та 46,5 пг/мл. Такі результати повністю співпадають з динамікою цитогенетичного дослідження, що свідчить про оптимальну відповідь.

Приклад 2.

Пацієнт Л.О., 1982 р.н. діагноз ХМЛ встановлено в 2007 р. Лікування іматинібом з 2008 р. При ініціальному обстеженні на етапі встановлення діагнозу рівень ІЛ-2 та концентрація ІНФ-γ в сироватці крові становили 6,6 пг/мл та 19,5 пг/мл відповідно. На 6-му місяці лікування рівень ІЛ-2 та концентрація ІНФ-γ досягли 8,2 пг/мл та 25,4 пг/мл відповідно, на 12-му місяці - 12,1 пг/мл та 40,2 пг/мл. Таким чином, враховуючи динаміку результатів обстеження та їх співставлення з цитогенетичним дослідженням, відповідь на лікування ІТК оцінюється як пересторога.

Приклад 3.

Пацієнтка П.В., 1972 р.н., діагноз ХМЛ встановлено в 2007р. Іматиніб з 2008 р. Ініціальний рівень ІЛ-2 та ІНФ-γ в сироватці крові становили 4,7 пг/мл та 19,2 пг/мл відповідно. Через 6 місяців лікування рівень ІЛ-2 та концентрація ІНФ-γ у пацієнта склали 4,3 пг/мл та 20,4 пг/мл відповідно, а через 12 місяців 5,6 пг/мл та 13,5 пг/мл. Описана динаміка показників свідчить про невдачу терапії ІТК.

Джерела інформації:

1. Sokal, J. E. Prognosis in chronic myeloid leukaemia: biology of the disease vs. treatment / J. E. Sokal // Baillieres Clin Haematol. - 1987. - Vol. 1. - P. 907-929.

2. A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon Alfa Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group / J. Hasford [et al.] // JNCI J Natl Cancer Inst. - 1998. - Vol. 90. - P. 850-858.

3. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score / J. Hasford [et al.] // Blood. - 2011. - Vol. - 118. - P. 686-692.

4. Стандарти аналізу препаратів хромосом людини: метод, рекомендації / КМАПО ім. П.Л. Шупіка МОЗ України. - К., 2003. - 52 с.

5. Normal intrinsic Th1/Th2 balance in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia not treated with interferon-alpha or imatinib / A. Kiani [et al.] // Haematologica-2003. - Vol.88. - P. 754-761.

6. Pawelek G. Cellular immune responses in autologous chronic myelogenous leukemia cells in vitro / G. Pawelek [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. - 2005. - Vol. 42-P. 433-435.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування відповіді на таргетну терапію у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), що включає прогнозування перебігу ХМЛ, який **відрізняється** тим, що на основі визначення імуноферментним методом концентрацій сироваткових інтерлейкіну-2 та інтерферону-γ в залежності від рівня елімінації Рн-позитивного пухлинного клону клітин кісткового мозку прогнозують відповідь на таргетну терапію Іматинібом Мезилатом хворих в хронічній фазі ХМЛ.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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