



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109625** (13) **C2**

(51) МПК (2015.01)

**A61B 10/00**

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2015 04854</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Пережестенко Тетяна Петрівна (UA),</b> <b>Гордієнко Алла Іванівна (UA),</b> <b>Третяк Наталія Миколаївна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>19.05.2015</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.09.2015</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>27.07.2015, Бюл.№ 14</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ</b> <b>ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ</b> <b>НАМН УКРАЇНИ",</b> вул. М. Берлінського, 12, м. Київ, 04060 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.09.2015, Бюл.№ 17</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 49760 U, 11.05.2010 UA 89166 U, 10.04.2014 Gillespie V. Canine Gastrointestinal Stromal Tumors: Immunohistochemical Expression of CD34 and Examination of Prognostic Indicators Including Proliferation Markers Ki67 and AgNOR / V. Gillespie, K. Baer, J. Farrelly, D. Craft, R. Luong // Veterinary Pathology. - 2011. - № 48(1). - P. 283-291 Pellicano F. The antiproliferative activity of kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells is mediated by FOXO transcription factors / F. Pellicano, M.T. Scott, G.V. Helgason, L.E. Hopcroft, E.K. Allan, M. Aspinall-O'Dea, M. Copland, A. Pierce, B.J. Huntly, A.D. Whetton, T.L. Holyoake // Stem Cells. - 2014. - № 32(9). - P. 2324-37 Воробьев В.И. Высокодозная программная риск-адаптированная терапия лимфомы из клеток мантии : автореф. дис... канд.мед.наук: 14.01.21 / В.И. Воробьев: Гем. научн. центр МЗ РФ. - М., 2014. - 28 с.

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЕЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі медицини, а саме до гематології, і може бути використаний у клінічній практиці для прогнозування ефективності лікування інгібіторами тирозинкінази (ІТК) хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ). У периферичній крові методом проточної лазерної цитофлуориметрії визначають експресію маркера проліферативної активності глікопротеїну Ki-67 та антигену CD 34+, вираховують ці ж показники кісткового мозку на основі формули типу  $Y=f(x)$ , де  $Y$  - залежна змінна показника кісткового мозку;  $f$  - функція;  $x$  - відповідний показник периферичної крові, за математичною моделлю для показника Ki-67:  $Y=0,94X+5,26$ ; для CD34 -  $Y=0,94X+2,14$ .

UA 109625 C2



Винахід належить до галузі медицини, а саме до гематології, і може бути використаний у практиці для прогнозування ефективності лікування інгібіторами тирозинкінази (ІТК) хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ).

Застосування ІТК відкрило новий етап у подоланні злоякісного клону при ХМЛ. Такі  
5 обнадійливі результати стали передумовою можливого виліковування даного захворювання. Однак, близько 30 % пацієнтів не досягають очікуваної мети протягом першого року лікування, дехто втрачає отриманий позитивний ефект у подальшому [1].

Відомий спосіб прогнозування відповіді на терапію іматинібом у хворих на ХМЛ, який  
10 включає аналіз типу транскрипту химерного гена BCR/ABL p210 та при виявленні транскрипту b2a2 прогнозує високу вірогідність досягнення повної цитогенетичної відповіді, а при виявленні транскрипту b3a2 прогнозує низьку вірогідність досягнення повної цитогенетичної відповіді через наступні 6 місяців лікування (несприятливий перебіг захворювання) [2].

Проте, молекулярні дослідження з виявлення гена BCR-ABL потребують спеціального обладнання і займають багато часу.

15 Розроблені рекомендації щодо моніторингу ефективності лікування пацієнтів з ХМЛ препаратами ІТК. Вони ґрунтуються на цитогенетичних та молекулярно-генетичних способах визначення Ph - хромосоми та гена BCR-ABL у певні проміжки часу з виявленням рівнів відповіді - оптимальної, субоптимальної та неефективності терапії [3].

Недоліком способу є виконання досліджень через кожні 6 міс. терапії, що не дозволяє  
20 виявити несприятливі ознаки відповіді раніше, в інтервалах між дослідженнями. Незадовільна відповідь (субоптимальна та неефективна) констатується на підставі підрахунку кількості Ph-хромосом у кістковому мозку та не передбачає визначення прогностичних факторів відповіді. Крім того, дослідження каріотипу є трудомістким процесом, залежить від кількості та якості метафаз, потребує тривалого часу виконання.

25 Відомий спосіб оцінки прогнозу перебігу ХМЛ за рівнем експресії CD38<sup>+</sup> антигену в клітинах кісткового мозку, який включає визначення відносного рівня CD38<sup>+</sup> клітин кісткового мозку, і при значеннях менше 30 % прогноз відповідає сприятливому перебігу захворювання на ХМЛ, а при значеннях рівня CD38<sup>+</sup>, вище за 30 %, прогноз захворювання несприятливий [4].

30 Проте і даний спосіб має недоліки: він є малоінформативним, оскільки конкретно не вказується, яка відповідь буде досягнута - мова йде тільки про сприятливий і несприятливий перебіг.

За прототип взятий спосіб прогнозування медикаментозної резистентності до терапії ІТК у хворих на ХМЛ. Спосіб полягає у визначенні коекспресії маркера резистентності глікопротеїну Pgp-170 CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> гемопоетичними клітинами за допомогою проточного лазерного  
35 цитофлуориметра. При наявності в крові більше 20 % CD33<sup>+</sup>Pgp-170+ та більше 10 % CD34<sup>+</sup>Pgp-170+ гемопоетичних клітин визначають медикаментозну резистентність хворих до терапії ІТК, тобто, аналіз отриманих результатів дозволяє розділити обстежених хворих з ХМЛ на дві групи - резистентних та з оптимальною відповіддю на терапію TKI. [5].

Даний спосіб дозволяє прогнозувати медикаментозну резистентність та своєчасно змінити  
40 тактику терапії, що підвищує якість життя пацієнтів. При цьому спосіб є обмеженим, оскільки хворі з незадовільною відповіддю об'єднані в одну групу резистентних пацієнтів, без розподілу їх на субоптимальну відповідь та неефективність терапії, тобто є малоінформативним.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб прогнозування у хворих на ХМЛ  
45 ефективності терапії ІТК шляхом визначення експресії внутрішньоядерного протеїну Ki-67 і антигену CD34<sup>+</sup> у периферичній крові (ПК) та цих же факторів у кістковому мозку (КМ). Спосіб інформативний, достовірний, дозволяє в ранні терміни хронічної фази або ж у проміжках часу між стандартизованим дослідженням ефективності лікування ХМЛ виявити ознаки оптимальної або ж субоптимальної відповіді чи неефективності терапії, а також, залежно від виявленої експресії показників, вносити корекцію в діагностичний процес і лікувальну тактику.

50 Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який включає визначення експресії імунологічних маркерів методом проточної лазерної цитофлуориметрії, згідно з даним винаходом, у ПК визначають експресію маркера проліферативної активності протеїну Ki-67, антигену CD34<sup>+</sup>, а також вираховують ці ж показники КМ на основі формули типу  $Y=f(x)$ ,

де Y - залежна змінна показника КМ; f- функція;

55 x - відповідний показник периферичної крові, за математичною моделлю для показника Ki-67- $Y=0,94X+5,26$ ; для CD34 -  $Y=0,94X+2,14$  і при отриманні значень показників експресії маркера Ki-67 від 2,0 % до 3,0 %, антигену CD 34<sup>+</sup> від 3,0 % до 6,5 % у ПК та показників експресії КМ - Ki-67 від 5,0 % до 7,5 %, CD 34<sup>+</sup> від 5,5 % до 11,0 % прогнозує оптимальну відповідь; при значеннях показників експресії маркера Ki-67 від 17,0 % до 23,0 %, антигену CD34<sup>+</sup> від 8,5 % до  
60 14,5 % у ПК та показників експресії КМ - Ki-67 від 22,0 % до 31,0 %, CD34<sup>+</sup> від 15,0 % до 24,0 %

прогнозують субоптимальну відповідь; якщо ж значення показників експресії маркера Ki-67 від 15,5 % до 20,5 %, CD34<sup>+</sup> від 17,0 % до 24,0 % у ПК і КМ - Ki-67 від 20,0 % до 24,0 %, а CD34<sup>+</sup> від 16,5 % до 23,0 %, то це свідчить про неефективність терапії.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак і отриманим результатом доведений завдяки дослідженням змін імунологічних показників в процесі лікування хворих на ХМЛ. Доведено, що результати лікування залежать від експресії маркера проліферативної активності протеїну Ki-67 та експансії антигену CD34<sup>+</sup> позитивних клітин-попередників в ПК і КМ. Дані показники досліджувались у групи пацієнтів в кількості 96 осіб з діагнозом ХМЛ у хронічній фазі, як при різних термінах перебігу захворювання, так і у проміжках часу між стандартизованим дослідженням при різних рівнях відповіді. Доведена висока інформативність показників. Виявилось, що у групах пацієнтів з констатованою оптимальною відповіддю на лікування, субоптимальною відповіддю та при неефективності терапії ці показники знаходились у вищевизначених межах.

Визначення значення показників експресії маркера Ki-67 і антигену CD34<sup>+</sup> КМ підтверджують об'єктивність дослідження завдяки встановленому високому ступеню взаємозв'язку між показниками ПК і КМ. Використовуючи формулу типу  $Y=f(x)$ , де  $Y$  - залежна змінна показника КМ;  $f$  - функція;  $x$  - відповідний показник ПК та, застосовуючи регресійний аналіз, розроблена математична модель для обрахунку показників КМ, виходячи з фактичних значень ПК. Для показника Ki-67 математична модель -  $Y=0,94X+5,26$ ; для CD34 -  $Y=0,94X+2,14$ . Визначення значень показників експресії маркера Ki-67 і антигену CD34<sup>+</sup> КМ дозволяє комплексно оцінити ефективність призначеної терапії ІТК та зменшити кількість інвазивних методів дослідження.

Отже, винахід відповідає критерію новизни і має відповідний винахідницький рівень, а також є промислово придатним, так як може бути відтворений і багаторазово повторений в спеціалізованих лабораторіях медичних закладів.

Спосіб здійснюється наступним чином

Хворому з діагнозом ХМЛ призначають терапію ІТК. Після шести місяців лікування і в проміжках часу між стандартизованим дослідженням проводять моніторинг ефективності терапії. Визначають оптимальну відповідь на лікування (кількість Ph хромосом дорівнює 0 %), субоптимальну чи підтверджують, що терапія є неефективною. Для цього виконують забір ПК та методом проточної лазерної цитофлуориметрії у прямому імунофлуоресцентному тесті з використанням моноклональних антитіл з набору PE Mouse Anti-Human Ki-67 Set (BD Pharmingen, USA) визначають експресію гемопоетичними клітинами ПК та КМ маркера проліферації - внутрішньоядерного протеїну Ki-67. Для дослідження у контрольну та дослідні пробірки вносять по 50 мкл ПК або КМ. У зразках руйнують еритроцити за допомогою розчину FACS Lysing Solution (BD, USA). Після відмивання отримані клітини протягом 10 хвилин фіксують 4 % розчином формальдегіду. Клітини обробляють 0,1 % розчином сапоніну при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Після відмивання у дослідну пробірку додають МКА анти-Ki-67, а в контрольну - ізотипічний контроль і інкубують протягом 20 хвилин у темряві при кімнатній температурі. Експресію Ki-67 вивчали в регіонах гранулоцитів та моноцитів, вибраних за параметрами світлорозсіювання за параметром флуоресценції (FL2). У дослідній пробі визначали кількість клітин з урахуванням даних ізотипічного контролю. Результат виражали у відсотку позитивних клітин.

Методика фарбування моноклональних анти-CD34<sup>+</sup> клітин ПК та КМ полягає в наступному. До 20 мкл відповідних МКА, кон'югованих з FITC і PE додають 100 мкл цільної гепаринізованої крові або КМ хворих, змішують на вихровому змішувачі "Vortex" і інкубують 15-30 хвилин при кімнатній температурі (18-22 °C). Потім до зразків додають по 2 мл лізуючого еритроцити розчину Reagent-10 Lysing Solution (Becton Dickinson, USA) у співвідношенні 1:10 з дистильованою водою і інкубують 10-12 хвилин при кімнатній температурі. Клітини осаджують центрифугуванням при 300 g протягом 5 хвилин після відмивання забуференим фосфатами фізіологічним розчином (PBS); пофарбовані клітини фіксують 1 % параформальдегідом на PBS і аналізують на проточному цитофлуориметрі не пізніше 24 годин після фарбування. З метою кількісної оцінки досліджуваних маркерів регіони лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів виділяли на підставі параметрів світлорозсіювання (переднього і бічного), а також флуоресценції (FL1, FL2) з використанням реагенту CD45/CD14.

Високий ступінь взаємозв'язків між показниками експресії протеїну Ki-67, антигену CD 34<sup>+</sup> у ПК та КМ встановлено застосуванням кореляційного аналізу. Використовуючи формулу типу  $Y=f(x)$ , де  $Y$  - залежна змінна показника КМ;  $f$  - функція;  $x$  - відповідний показник ПК, ми застосували регресійний аналіз і розробили математичну модель для обрахунку показників КМ, виходячи з фактичних значень ПК. Так, показник експресії Ki-67 КМ обчислюють за математичною моделлю:  $Y=0,94X+5,26$ , антигену CD 34 КМ за формулою:  $Y=0,94X+2,14$ .

При отриманні значення показників експресії в ПК маркера Ki-67 від 2,0 % до 3,0 %, антигену CD 34<sup>+</sup> від 3,0 % до 6,5 % та цих же показників КМ - Ki-67 від 5,0 % до 7,5 %, CD34<sup>+</sup> від 5,5 % до 11,0 % прогнозують у даного пацієнта оптимальну відповідь. Якщо отримані значення показників експресії маркера Ki-67 17,0 % до 23,0 %, антигену CD34<sup>+</sup> від 8,5 % до 14,5 % у ПК та показників КМ - Ki-67 від 22,0 % до 31,0 %, CD34<sup>+</sup> від 15,0 % до 24,0 % прогнозують субоптимальну відповідь. Якщо ж значення показників експресії маркера Ki-67 від 15,5 % до 20,5 %, CD34<sup>+</sup> від 17,0 % - 24,0 % у ПК та показників КМ - Ki-67 від 20,0 % до 24,0 %, CD34<sup>+</sup> від 16,5 % до 23,0 %, то це свідчить про неефективність терапії.

Наводимо приклади використання запропонованого способу в клінічній практиці.

#### Приклад 1

Хворий Б., 37 років. Діагноз ХМЛ, хронічна фаза. Отримує лікування ІТК першого покоління іматинібом. Через 6 місяців лікування при моніторингу ефективності терапії досягнута оптимальна відповідь на терапію. Через 3 місяці після зазначеного моніторингу визначали експресію маркерів за розробленим способом. Кількість Ki-67 у ПК становила 2,45 %, CD34<sup>+</sup> - 5,5 %. За допомогою математичної моделі вираховували ці ж показники експресії КМ, які відповідно становили 7,56 % та 7,31 %, тобто відповідали значенням оптимальної відповіді. Під час наступного цитогенетичного дослідження кількість Ph хромосом дорівнювала 0 %, у хворого зберігалася оптимальна відповідь. Пацієнт продовжує прийом іматинібу у стандартному дозуванні 400 мг.

#### Приклад 2

Пацієнтка М., 52 роки. З приводу ХМЛ отримувала терапію іматинібом. Після 12 міс. лікування проводили моніторинг ефективності та визначали оптимальну відповідь, а через 2 місяці від вказаного терміну проводили дослідження експресії маркерів Ki-67 і CD34<sup>+</sup> у ПК, які становили відповідно 20,5 % і 14,0 %, ці ж показники КМ, розраховані за допомогою математичної моделі, відповідно 24,5 % і 15,3 %. Такі значення показників відповідали малофективній терапії (субоптимальній відповіді). І дійсно, через 18 місяців від початку лікування, у пацієнтки спостерігалася втрата оптимальної відповіді, кількість Ph<sup>+</sup> хромосом дорівнювала 43 %.

#### Приклад 3

Пацієнт Г., 44 років. Діагноз ХМЛ, хронічна фаза. Отримував лікування іматинібом. При моніторингу через 6 місяців була констатована неефективність терапії, вміст Ph<sup>+</sup> хромосом дорівнював 95 %, при цьому показники експресії Ki-67 та CD34<sup>+</sup> у ПК також відповідали неефективності терапії і становили відповідно 17,5 % і 20,0 %. Застосовуючи математичну модель, отримали показники КМ, що становили 21,71 % для Ki-67 і 20,94 % для CD34<sup>+</sup>. Терапія була змінена, проводилася ескалація дози препарату. При наступному моніторингу відповідь зберігалася незадовільною. Пацієнту призначався ІТК 2-го покоління нілотиніб. Через 2,5 місяці лікування визначали експресію Ki-67 та CD34<sup>+</sup>. Отримані показники у ПК становили відповідно 16,0 % та 20,5 %. Ці ж показники КМ, дорівнювали відповідно 20,3 % і 23,58 %. Такі значення свідчили про неефективну відповідь. При наступному цитогенетичному дослідженні підтвердилася резистентність до нілотинібу. Пацієнт продовжував прийом препарату, однак очікуваного результату не отримано. Хворому рекомендовано перехід на наступну лінію терапії.

Таким чином, запропонований спосіб є інформативним, дозволяє прогнозувати відповідь на терапію ІТК у хворих на ХМЛ та визначати ризик розвитку резистентності ще до підтвердження цитогенетичними дослідженнями.

#### Перелік посилань

1. Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy? / E. Jabbour, J.E. Cortes, H.M. Kantarjian [et al.] // Mayo Clin Proc. - 2009. - Vol. 84, № 2. - P. 161-169.

2. Пат. 75839U UA, МПК (2012.01) A61B5/00. Спосіб прогнозування відповіді на терапію іматинібом у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію на основі визначення типу транскрипту гена bcr/abl p210 / Дмитренко І.В., Дягіль І.С., Мінченко Ж.М [та ін.]; заявник та патентовласник ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України". - № u201207915; заявл. 26.06.2012; опубл. 10.12.2012, Бюл. № 23.

3. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net / M.Baccarani, J.Cortes, F.Pane [et al.] // J Clin Oncol. -2009. - Vol.27 (35). - P. 6041-6051.

4. Пат. 49760U UA, МПК (2010.01) G01N33/49. Спосіб оцінки прогнозу перебігу хронічної мієлоїдної лейкемії за рівнем експресії cd38 антигену в клітинах кісткового мозку/ Бебешко В.В., Дягіль І.С., Бази́ка Д.А. [та ін.]; заявник та патентовласник ДУ "Національний науковий центр

радіаційної медицини АМН України". № u200911781; заявл. 18.11.2009; опубл. 11.05.2010, Бюл. № 9.

- 5 5. Прототип Пат. 89166U UA, МПК (2014.01) A61K31/00. Спосіб прогнозування медикаментозної резистентності до терапії інгібіторами тирозинкінази у хворих на ХМЛ / А.І Гордієнко, Т.П. Перехрестенко, Н.М. Третяк, Є.В. Шороп.; заявник та патентовласник ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України". - № и201313505; заявл. 20.11.13; опубл. 10.04.2014, Бюл. № 7.

#### ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 10 Спосіб прогнозування ефективності терапії інгібіторами тирозинкінази у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію, який включає визначення експресії імунологічних маркерів методом проточної лазерної цитофлуориметрії, який **відрізняється** тим, що у периферичній крові визначають експресію маркера проліферативної активності глікопротеїну Ki-67, антигену CD 34<sup>+</sup>,  
15 а також вираховують ці ж показники кісткового мозку (КМ) на основі формули типу  $Y=f(x)$ ,  
де Y - залежна змінна показника КМ;  
f - функція;  
x - відповідний показник периферичної крові,  
20 за математичною моделлю для показника Ki-67:  $Y=0,94X+5,26$ ; для CD 34<sup>+</sup> -  $Y=0,94X+2,14$ , і при отриманні значень показників експресії маркера Ki-67 від 2,0 % до 3,0 %, антигену CD 34<sup>+</sup> від 3,0 % до 6,5 % у периферичній крові та показників експресії кісткового мозку - Ki-67 від 5,0 % до 7,5 %, CD 34<sup>+</sup> від 5,5 % до 11,0 % прогнозують оптимальну відповідь;  
при значеннях показників експресії маркера Ki-67 від 17,0 % до 23,0 %, антигену CD 34<sup>+</sup> від 8,5 % до 14,5 % у периферичній крові та показників експресії кісткового мозку - Ki-67 від 22,0 % до 31,0 %, CD 34<sup>+</sup> від 15,0 % до 24,0 % прогнозують субоптимальну відповідь;  
25 якщо ж значення показників експресії маркера Ki-67 від 15,5 % до 20,5 %, CD 34<sup>+</sup> від 17,0 % до 24,0 % у периферичній крові і кісткового мозку - Ki-67 від 20,0 % до 24,0 %, а CD 34<sup>+</sup> від 16,5 % до 23,0 %, то це свідчить про неефективність терапії.

30

---

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

---

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