



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 117087

(13) U

(51) МПК

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 00765**

(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 МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНОГО 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 CD 34, CD 117 та CD 33 на субстратних клітинах мієлоїдного паростка. Для цього спочатку проводять забір зразків кісткового мозку, далі проводять обробку гемопоетичних клітин, що містять в них з використанням моноклональних антитіл до CD 34, CD 117 та CD 33, у наступному досліджуванні оброблені зразки клітин відмивають і аналізують на лазерному цитофлюориметрі для кількісної оцінки досліджуваних маркерів регіони лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів виділяють на підставі параметрів світлорозсіювання, а також флюоресценції.

UA 117087 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 підставі визначення інтенсивності експресії антигенів CD 34, CD 117 та CD 33 на субстратних клітинах мієлоїдного паростка 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, кількості паростків із 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 рівня 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].

Проте зазначений 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 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 CD 34, CD 117 та CD 33 на субстратних клітинах мієлоїдного паростка, для цього спочатку проводять забір зразків кісткового мозку, далі проводять обробку гемопоетичних клітин, що містяться в них, із використанням моноклональних антитіл до CD 34, CD 117 та CD 33, у наступному досліджуванні оброблені зразки клітин відмивають та аналізують на лазерному цитофлуориметрі, і для кількісної оцінки досліджуваних маркерів регіони лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів виділяють на підставі параметрів світлорозсіювання, а також флуоресценції, за умови наявності відсотка CD 34+ клітин $\leq 15,3\%$, CD 34+117+ клітин $\leq 14,9\%$ та CD 33+клітин $> 14,2\%$ у зразках кісткового мозку 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 13-22 місяців, 14-20 місяців і 9,5-20,5 місяців, а у випадку наявності CD 34+ клітин $> 15,3\%$, CD 34+117+ клітин $> 14,9\%$ та CD 33+клітин $\leq 14,2\%$ у зразках кісткового мозку 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.

Факторами, які потенційно спроможні використовуватись під час оцінки тривалості періоду безпрогресивного перебігу МДС, трансфузійної незалежності та прогнозування резистентності до терапії є показники експресії кластерів диференціації (CD) на клітинах мієлоїдного походження. Відповідно до A. van de Loosdrecht та співавт. (2008 р.) більша експресія CD 7 або CD 56 на бластах пацієнтів із МДС спостерігається при трансфузійній залежності, ніж за її відсутності [5]. В іншому дослідженні підтверджено, що кількість CD 34 та CD 34/CD 117-позитивних клітин прямо пропорційно корелює з скороченням часу до трансформації МДС у ГМЛ [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 інтенсивності експресії антигенів CD 34, CD 117 та CD 33 на субстратних клітинах мієлоїдного паростка хворих прогнозування прогресії МДС РАНБ I коливається від 72,7 %, до 81,8 %.

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 діагнозом МДС РАНБ I до призначення терапії проводять забір зразків КМ. Для визначення інтенсивності експресії антигенів CD 34, CD 117 та CD 33 на субстратних клітинах мієлоїдного паростка, що містяться в отриманих зразках КМ, проводять проточну лазерну цитофлуориметрію з використання моноклональних антитіл до CD 34, CD 117 та CD 33. У наступному досліджуванні оброблені зразки клітин відмиваються та аналізуються на лазерному цитофлуориметрі не пізніше 24 годин після фарбування. Із метою кількісної оцінки досліджуваних маркерів регіони лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів виділяються на підставі параметрів світлорозсіювання, а також флуоресценції з використанням реагенту CD 45/CD 14. 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 умов наявності відсотка CD 34+ клітин $\leq 15,3$ %, CD 34+117+ клітин $\leq 14,9$ % та CD 33+ клітин $> 14,2$ % у зразках КМ хворого відносять до групи з низьким рівнем ймовірності прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II або ГМЛ протягом 19,00 місяців (13,00-22,00 місяці), 18,40 місяців (14,00-20,00 місяці) та 14,50 місяців (9,50-20,50 місяці) відповідно. Натомість у випадку наявності CD 34+ клітин $> 15,3$ %, CD 34+117+ клітин $> 14,9$ % та CD 33+клітин $\leq 14,2$ % у зразках КМ хворого відносять до групи високого ризику прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II або ГМЛ протягом наведених 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 патогномічне для предикції прогресії захворювання значення відсотка CD 34+, CD 34+/117+ та CD 33+ клітин у 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 CD 34+, CD 34+/ 117+ та CD 33+ клітин у КМ визначають за допомогою методу Каплана-Мейера з використанням логрангового критерію.

Ефективність застосування критерію "CD 34+ клітини $\leq 15,3$ %" та "CD 34+117+ клітини $\leq 14,9$ %" та "CD 33+клітини $> 14,2$ %" у хворих на МДС РАНБ I характеризується добрим та відмінним рівнем потужності (ППК = 0,85; 95 % довірчий інтервал (ДІ) = 0,66-0,95, p = 0,0003, ППК = 0,93; 95 % = 0,77-0,99, p < 0,0001, ППК = 0,93; 95 % = 0,77-0,99, p < 0,0001 відповідно) та високою цінністю позитивного результату (72,7 %; 95 % ДІ = 37,3-94,6, 69,2 %; 95 % ДІ = 38,6-87,2 та 81,8 %; 95 % ДІ = 48,2-97,7 відповідно) для прогресії захворювання в РАНБ II або ГМЛ.

Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1

Обстежений хворий Л., 55 років. Відсоток CD 34+, CD 34+117+ клітин та CD 33+ клітин у зразках КМ до призначення терапії становить 8,9 %, 7,6 % та 29,1 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на терапію імунomodулятором у пацієнта

верифіковано повну відповідь на лікування. Протягом 23 місяців після верифікації діагнозу прогресії МДС РАНБ I не визначено.

Приклад 2

Обстежена хвора З., 53 роки. Відсоток CD 34+, CD 34+117+ клітин та CD 33+клітин у зразках КМ до призначення терапії цитостатиком становить 18,5 %, 17,3 % та 9,1 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на терапію цитостатиком у пацієнтки верифіковано відсутність відповіді на лікування. Через 14 місяців після верифікації діагнозу відбулась прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II.

Приклад 3

Обстежений Н., 62 роки. Відсоток CD 34+, CD 34+117+ клітин та CD 33+клітин у зразках КМ до призначення терапії імуномодулятором становить 12,9 %, 13,0 % та 19,2 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на терапію імуномодулятором у пацієнта верифіковано часткову відповідь на лікуванні. Протягом 20 місяців після верифікації діагнозу прогресії МДС РАНБ I не визначено.

Приклад 4

Обстежена хвора А., 61 рік. Відсоток CD 34+, CD 34+117+ клітин та CD 33+ клітин у зразках КМ до призначення терапії цитостатиком становить 10,9 %, 9,6 % та 29,5 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на терапію цитостатиком у пацієнтки верифіковано повну відповідь на лікування. Протягом 26 місяців після верифікації діагнозу прогресії МДС РАНБ I не визначено.

Приклад 5

Обстежений хворий Л., 76 років. Відсоток CD 34+, CD 34+117+ клітин та CD 33+клітин у зразках КМ до призначення терапії імуномодулятором становить 18,9 %, 29,9 % та 10,9 % відповідно. Після проведення первинної оцінки рівня відповіді на терапію імуномодулятором у пацієнта верифіковано відсутність відповіді на лікування. Через 13 місяців після верифікації діагнозу відбулась прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II.

Запропонованим способом проведено прогнозування рівня відповіді на терапію імуномодулятором у 47 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. - Vol. 122 (17). - P. 2943
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.
4. <https://www.google.com/patents/WO2013023015A2?cl=en>
5. Identification of distinct prognostic subgroups in low-and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry /A.A. van de Loosdrecht, T.M. Westers, A.H. Westra et al. //Blood. - 2008. - Vol. 111(3). - P. 1067-7.
6. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes /C. Alhan, T.M. Westers, E.M. Cremers et al. //British Journal of Haematology. - 2014. - Vol. 167. - P. 100-9.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

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 CD 34, CD 117 та CD 33 на субстратних клітинах мієлоїдного паростка, для цього спочатку проводять збір зразків кісткового мозку, далі проводять обробку гемопоетичних клітин, що містять в них з використанням моноклональних антитіл до CD 34, CD 117 та CD 33, у наступному досліджуванні оброблені зразки клітин відмивають і аналізують на лазерному цитофлюориметрі для кількісної оцінки досліджуваних маркерів регіони лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів виділяють на підставі параметрів світлорозсіювання, а також флуоресценції, за умов наявності відсотка CD 34+ клітин $\leq 15,3$ %, CD 34+117+ клітин $\leq 14,9$ % та CD 33+ клітин $> 14,2$ % у зразках кісткового мозку хворого відносять до групи з низьким рівнем ймовірності прогресії

- мієлодиспластичного синдрому з надлишком бластів I у мієлодиспластичний синдром з надлишком бластів II або гостру мієлоїдну лейкемію протягом 13-22 місяців, 14-20 місяців і 9,5-20,5 місяців, а у випадку наявності CD 34+ клітин >15,3 %, CD 34+117+ клітин >14,9 % та CD 33+клітин \leq 14,2 % у зразках кісткового мозку хворого відносять до групи високого ризику
- 5 прогресії мієлодиспластичного синдрому з надлишком бластів I у мієлодиспластичний синдром з надлишком бластів II або гостру мієлоїдну лейкемію протягом наведених вище періодів часу.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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