



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **144053** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2020 02410</p> <p>(22) Дата подання заявки: 15.04.2020</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.08.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.08.2020, Бюл.№ 16</p>	<p>(72) Винахідник(и): Шевченко-Макаренко Ольга Петрівна (UA), Шостакович-Корецька Людмила Романівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): Шевченко-Макаренко Ольга Петрівна, вул. Богданова, 32-К, кв. 61, м. Дніпро, 49008 (UA), Шостакович-Корецька Людмила Романівна, вул. Гоголя, 2, кв. 44, м. Дніпро, 49044 (UA)</p> <p>(74) Представник: Білозуб Володимир Володимирович, реєстр. №280</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ УСПІШНОСТІ ТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування успішності протівірусної терапії хворих на хронічний гепатит С включає виділення зразків тотальної ДНК, визначення рівня експресії генетичного молекулярного біомаркера та прогнозування високої або вірогідно низької результативності досягнення стійкої вірусологічної відповіді, протягом 24 тижнів на завершення протівірусної терапії. Додатково виділяють плазму, здійснюють зворотну транскрипцію, полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі, визначають рівень експресії мікроРНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера. Високу або вірогідно низьку результативність досягнення стійкої вірусологічної відповіді прогнозують, якщо рівень експресії мікроРНК-196а становить $\geq 0,0017$ або $< 0,0017$ ум. од., відповідно.

UA 144053 U

Корисна модель належить до досліджень або аналізу матеріалів шляхом визначення їх хімічних або фізичних властивостей, зокрема біологічних, наприклад крові, та може бути використана в медицині, зокрема в інфекто- та гепатології.

5 Більш наближеним до дійсної корисної моделі серед об'єктів аналогічного призначення за кількістю істотних ознак є спосіб прогнозування успішності терапії хворих на хронічний гепатит С, що включає виділення зразків тотальної ДНК з цільної венозної крові, визначення генетичного поліморфізму молекулярного біомаркера, зокрема гена ІЛ-6 rs 1800795, та прогнозування високої або вірогідно низької результативності досягнення стійкої вірусологічної відповіді, протягом 24 тижнів після завершення противірусної терапії, за наявності генотипів СС або СG/GG гена ІЛ-6 rs 1800795, відповідно. Визначення генетичного поліморфізму за позицією С/G гена ІЛ-6 rs 1800795 надає достовірний прогноз лише при лікуванні хронічного гепатиту С для хворих, які інфіковані 1 генотипом HCV [1]. Недоліком прототипу є неприйнятна об'єктивність кінцевого результату через недостатню чутливість молекулярного біомаркера гена ІЛ-6 rs 1800795, оскільки дослідження його експресії дозволяє прогнозувати результат лише після використання комбінованих терапевтичних схем, наприклад, інтерферону з рибавирином і/або софосбувіром, без урахування виключного впливу інтерфероном. Інформативність застосовуваного гена rs 1800795 цілком залежить від складу інтерферонових схем.

15 Інші, об'єкти прогнозування успішності противірусної терапії хронічного гепатиту С з досліджуваного рівня техніки не встановлені.

20 Задача корисної моделі вдосконалити спосіб прогнозування успішності терапії хворих на хронічний гепатит С, застосування котрого сприяло б збільшенню достовірності за рахунок застосування мікроРНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера.

Технічний результат вирішується тим, що при використанні у відомому способі прогнозування успішності терапії хворих на хронічний гепатит С, що включає виділення зразків тотальної ДНК, визначення рівня експресії генетичного молекулярного біомаркера та прогнозування високої або вірогідно низької результативності досягнення стійкої вірусологічної відповіді, протягом 24 тижнів на завершення противірусної терапії, відповідно до корисної моделі, додатково виділяють плазму, здійснюють зворотну транскрипцію, полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі, визначають рівень експресії мікроРНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера, а високу або вірогідно низьку результативність досягнення стійкої вірусологічної відповіді прогнозують, якщо рівень експресії мік-роРНК-196а становить $\geq 0,0017$ або $< 0,0017$ ум.од., відповідно.

Новизна способу прогнозування успішності терапії у хворих на хронічний гепатит С полягає в тому, що виділяють плазму, здійснюють зворотну транскрипцію, полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі, визначають рівень експресії мікроРНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера, а високу або вірогідно низьку результативність досягнення стійкої вірусологічної відповіді прогнозують, якщо рівень експресії мікроРНК-196а становить $\geq 0,0017$ або $< 0,0017$ ум. од., відповідно.

40 Виділення зразків тотальної РНК з плазми крові шляхом зворотної транскрипції дозволяє дослідити ефективність надаваної терапії за станом експресії мік-роРНК-196а, а разом із цим, збільшити достовірність прогнозу, незалежно від складу інтерферонових схем, використовуваних під час лікування.

45 Застосування мікро-РНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера збільшує достовірність прогнозу ($p < 0,05$), завдяки його специфічності та підвищеній чутливості до інтерферону.

Визначення рівня експресії мікроРНК-196а дозволяє персоналізувати лікування, диференціювати стан хворих з 1-им генотипом HCV, призначати їм більш ефективні схеми терапії на основі зіставлення значень виявлених рівнів експресії зі встановленим його нормативним значенням ($0,0017$ ум. од. ($\log_{10} - 2,78$ ум. од)) та формувати групи ризику.

50 Заявлений спосіб прогнозування успішності терапії хворих на хронічний гепатит С був апробований серед хворих на ХГС з 1-им генотипом HCV.

Дані, які були отримані після статистичного аналізу результатів терапії 74 хворих на хронічний вірусний гепатит С з 1-им генотипом HCV, дозволили визначити генотип вірусу гепатиту С (HCV), вірусне навантаження HCV, рівень фіброзу печінки тощо, на основі загальноклінічних та біохімічних обстежень крові. Рівень фіброзу встановлювали за допомогою неінвазійних методів оцінки ступеня фіброзу за шкалою METAVIR, зокрема за лабораторними показниками FibroTest® (Bio-Predictive, Франція) та/або за оцінкою жорсткості (еластичності) тканини печінки інструментальним шляхом за різними методиками ультразвукової компресійної еластографії печінки. Вивчали рівень експресії мікроРНК-196а. Обробку та аналіз даних

проводили за допомогою програмних продуктів Statistica v.6.1 (StatSoft, США) і MedCalc v. 19.0.7.

За умов заявленого способу були оцінені різні профілі рівня експресії мікроРНК-196а, у 74 хворих на хронічний гепатит С з 1-им генотипом HCV і урахуванням попереднього досвіду 5 противірусної терапії, відокремленням як хворих з невдалими терапевтичними схемами на основі інтерферону (відсутність відповіді на терапію або рецидив), так і наївних пацієнтів із позитивним ефектом.

За рівнем експресії мікроРНК-196а хворих було розділено на дві групи, у залежності від 10 попереднього досвіду противірусної терапії схемами, які містили інтерферон. До першої групи включали 21 хворого, що мали невдачу після лікування противірусними терапевтичними схемами на основі інтерферону, зокрема комбінованими схемами на основі пегельованого інтерферону і рибавіріну. Ці хворі отримували противірусне лікування 1-7 років тому. Другу 15 групу склали 53 наївних пацієнти (без попереднього досвіду терапії). Обидві групи були статистично порівняними за статтю ($p=0,610$ за критерієм FET) і віком ($p=0,074$ t).

У 1-ій групі пацієнтів середній рівень експресії мікроРНК-196а (Me) склав 0,011 (IQR: 0,002-0,310) і в 2-ій групі - 0,346 (IQR: 0,054; 1,239) при $p=0,012$ за критерієм U. Аналіз 20 результатів свідчив про те, що зміни даного показника у хворих на ХВГС мали статистично значимий характер, у залежності від попереднього досвіду лікування.

На зображенні ROC - криві з CI 95 %, щодо оцінки рівня експресії мікроРНК-196а (miR-196a) у 20 плазмі крові пацієнтів з ХВГС та індекс Юдена (J), залежний від попереднього досвіду противірусної терапії схемами, що містять інтерферон.

Проведений ROC-аналіз показав (див. креслення), що досліджувана мікроРНК-196а може 25 диференціювати пацієнтів з ХВГС з 1-м генотипом HCV, залежно від попереднього досвіду противірусної терапії, а саме, у хворих з невдачами терапії схемами, що містять інтерферон, та наївних пацієнтів з площею, обмеженою ROC-кривою і віссю частки помилкових позитивних класифікацій, $AUC=0,688$ (95 % CI 0,570-0,791; $p=0,017$), $J=0,40$, що показує середню якість даного класифікатора. Критичними точками відсікання пацієнтів з вірогідною невдачею ПВТ, що 30 містять інтерферон, є рівень експресії мікро-РНК-196а $\leq 0,0178$ ум. од., для Log_{10} мікро-РНК-196а $< -1,75$ ум. од. Чутливість і специфічність моделі для диференціювання невдалих результатів при застосуванні інтерферонових схем становили $Se=57,14$ % і $Sp=83,02$ %, $DE=70,08$ %. Результати дослідження дозволили припустити, що досліджена мікро-РНК-196а має значення оцінного біомаркера для хворих на ХВГС з 1-им генотипом HCV.

Оптимальним високоспецифічним критерієм класифікатора експресії мікро-РНК-196а є 35 точки $\leq 0,0017$ ум. од. та $< -2,78$ ум. од. для Log_{10} мікро-РНК-196а з $Se=28,57$ %, $Sp=98,11$ %, $DE=63,34$ %. Ці критерії можуть стати підґрунтям для призначення таким хворим більш ефективних схем терапії.

Таким чином, ідентифікований профіль рівня експресії мікроРНК-196а, що був залежним від 40 попереднього досвіду лікування в українських пацієнтів з 1-им генотипом HCV є достовірно інформативним. Поряд з основними клініко-лабораторними показниками, критеріями тяжкості ХВГС та відомими прогностичними маркерами відповіді на противірусну терапію мають враховуватися епігенетичні маркери, зокрема рівень експресії мікроРНК-196а, що дозволяє персоніфікувати лікувальну тактику у хворих на ХВГС, особливо при виборі схем ПВТ, у залежності від вмісту інтерферону у схемі.

Проведене дослідження показало, що середній рівень експресії мікро-РНК-196а (Me) серед 45 українських хворих на ХВГС з 1-им генотипом HCV і невдалим попереднім досвідом противірусної терапії за схемами, що містять інтерферон, склав 0,011 (IQR: 0,002; 0,310) і був вірогідно ($p<0,05$) нижче показника у наївних пацієнтів - 0,35 (IQR: 0,05; 1,24), що може бути додатковим біомаркером у патогенезі ХВГС і визначати ефективність терапії.

Встановлені за допомогою ROC-аналізу критичні рівні експресії мікро-РНК-196а $\leq 0,0178$ ум. од. та $< -1,75$ ум. од. для Log_{10} мікро-РНК-196а забезпечують можливість диференціації 50 пацієнтів з ХВГС з 1-м генотипом HCV, у залежності від попереднього досвіду противірусної терапії, з показниками ефективності тесту $Se=57,14$ %, $Sp=83,02$ %, $DE=70,08$ %, що може бути використано для скринінгу і дає додаткові можливості для корекції лікувальної тактики хворим.

Низький рівень експресії мікроРНК-196а, а саме $\leq 0,0017$ ум. од. ($\text{Log}_{10} < -2,78$ ум. од.) може 55 бути підґрунтям для призначення наївним хворим більш ефективних схем терапії, із застосуванням противірусних препаратів прямої дії й дозволити персоніфікацію лікувальної тактики серед хворих.

Тож, результати досліджень довели можливість застосування властивостей молекулярного біомаркера мікроРНК-196а у прогнозуванні успішності противірусної терапії хворих на хронічний 60 гепатит С, з попереднім досвідом лікування за схемами, що містять інтерферон.

Суть. Спосіб прогнозування успішності терапії хворих на хронічний гепатит С доцільне здійснювати наступним чином.

При здійсненні способу у хворого на ХГС з визначеним 1-им генотипом HCV відбирають 2,0 мл периферичної крові у спеціальну пробірку з антикоагулянтом. Відділяють плазму крові від клітинних елементів крові та проводять виділення тотальної РНК методом фенол-хлороформної екстракції. Визначення концентрації РНК проводять з використанням спектрофотометра (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies Inc. США). Надалі виконують зворотну транскрипцію, з використанням лабораторного набору для зворотної транскрипції мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems, США), додають специфічних петльових праймерів до зрілої мікроРНК-196а або snRNA U6, як ендogenous контрольного гена, і 10 нг тотальної РНК. Проводять цикли ініціальної температурної денатурації проби. Кількісну ПЛР в реальному часі відтворюють за аналізом мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems, США): hsa-мікро-РНК-196а, snRNA U6. Рівень miRNA розраховують за формулою ($2^{-\Delta Ct}$), нормалізують до U6 snRNA і представляють в умовних одиницях. Ампліфікацію здійснюють на "7500 FastReal-time PCR" (Applied Biosystems, США). На закінчення реакції ампліфікації облікують одержані результати в реальному часі, за рекомендаціями виробника приладу. Отримані результати аналізують за допомогою програми ампліфікації.

Діагностична цінність рівня експресії досліджуваної мікроРНК-196а полягає у збільшенні достовірності прогнозу результативності досягнення стійкої вірусологічної відповіді, забезпеченні можливості призначення оптимальних схем терапії та їх корекції для проблемних хворих, з невдалими результатами лікування за інтерфероновими схемами.

Приклад № 1. Хворий В., 55 років, перебував у гепатологічному відділенні Дніпропетровської міської клінічної лікарні № 21 з приводу лікування ХВГС 1 генотипу. Гепатит був діагностований 4 роки тому. Мав невдалий попередній досвід ПВТ (рецидив через 24 тижня по закінченні ПВТ) за схемою, що включала пегельований інтерферон з рибавирином, впродовж 48 тижнів. Здійснювали обстеження, відповідно до клінічних протоколів.

Успішність терапії прогнозували за умов запропонованої корисної моделі. Відбирали 2,0 мл периферичної крові, виділяли плазму, здійснювали зворотну транскрипцію, полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі та визначали рівень експресії мікроРНК-196а в реальному часі. Отриманий результат, що дорівнював 0,00081 ум. од. ($\text{Log}_{10} = -3,0884$ ум. од.), дозволив прогнозувати вірогідно низьку результативність досягнення стійкої вірусологічної відповіді, оскільки перебував в області значень $<0,0017$ ум. од. Значення експресії мікроРНК-196а порівнювали з медіаною і критичним рівнем експресії miR-196а за результатом ROC-аналізу (див. мал.).

Наведений приклад доводить можливість застосування мікроРНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера для диференціювання станів ХВГС перед призначенням протівірусних препаратів прямої дії або більш ефективних схем, що відповідає умові "промислового придатності".

Приклад № 2. Хворий К., 39 років, перебував у гепатологічному відділенні Дніпропетровської міської клінічної лікарні № 21 з приводу лікування ХВГС 1 генотипу. Гепатит був діагностований 3 роки тому. Не мав попереднього досвіду ПВТ. Залучали обстеження, відповідно до клінічних протоколів.

Визначали рівень експресії мікроРНК-196а за умов дійсної корисної моделі. Відбирали 2,0 мл периферичної крові, виділяли плазму, здійснювали зворотну транскрипцію, полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі та визначали рівень експресії мікроРНК-196а в реальному часі. За рівнем експресії мікроРНК-196а, що становив 0,810 ум. од. ($\text{Log}_{10} = -0,091$ ум. од.), прогнозували позитивну відповідь на будь-яку рекомендовану схему ПВТ, у тому числі за схемами, що містять інтерферон або протівірусні препарати прямої дії.

Приклад дослідження рівня експресії мікроРНК-196а доводить можливість його застосування як показника диференціювання хворих на ХВГС перед призначенням протівірусної терапії, що відповідає умові "промислового придатності".

З урахуванням суттєвих змін сучасних схем лікування ХВГС, що ґрунтуються на використанні протівірусних препаратів прямої дії (ПППД) і досить повільного впровадження нових препаратів, продовження лікування ХВГС за схемами, які містять інтерферон, у т.ч. в комбінаціях з рибавирином і софосбувіром, розробка прогностичних маркерів, стратифікація предикторів протівірусної відповіді у хворих на ХВГС та обґрунтування призначення тих чи інших схем протівірусної терапії за допомогою маркерів й інших факторів залишаються актуальними.

Запровадження способу прогнозування успішності терапії хворих на хронічний гепатит С в інфекто- та гепатології сприятиме реалізації більш достовірного прогностичного результату за

рахунок застосування мікроРНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера, з можливістю статистичної обробки та оцінки вихідних даних з використанням ROC-аналізу. У зв'язку з прогресуванням ХВГС і схильністю інфікованих пацієнтів до високої летальності, запропонована корисна модель вирішує проблеми надання адекватного лікування та своєчасного коригування терапевтичних схем.

5

Джерела інформації:

1. Спосіб прогнозування успішності протівірусної терапії у хворих на хронічний гепатит С: Пат. 136009 України, МПК G01N 33/49 / Рябоконт Ю.Ю., Калашник К.В. (Україна); Запорізький державний медичний університет (Україна). -№ у 2019 02249; заявл. 05.03.19; опубл. 25.07.19.

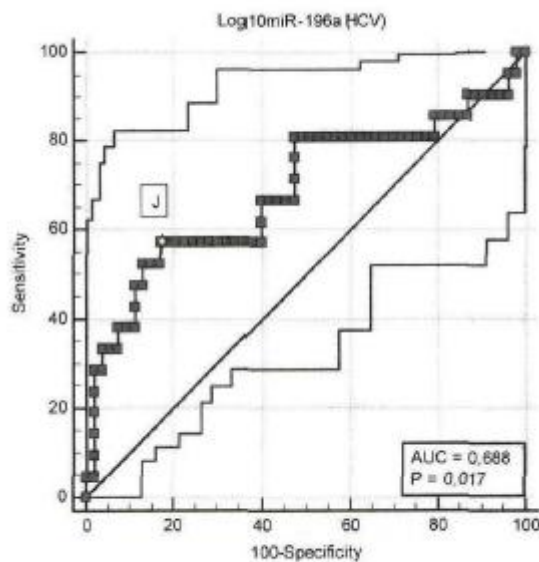
10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування успішності протівірусної терапії хворих на хронічний гепатит С, що включає виділення зразків тотальної ДНК, визначення рівня експресії генетичного молекулярного біомаркера та прогнозування високої або вірогідно низької результативності досягнення стійкої вірусологічної відповіді, протягом 24 тижнів на завершення протівірусної терапії, який **відрізняється** тим, що додатково виділяють плазму, здійснюють зворотну транскрипцію, полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі, визначають рівень експресії мікроРНК-196а як генетичного молекулярного біомаркера, а високу або вірогідно низьку результативність досягнення стійкої вірусологічної відповіді прогнозують, якщо рівень експресії мікроРНК-196а становить $\geq 0,0017$ або $< 0,0017$ ум. од., відповідно.

15

20



Комп'ютерна верстка О. Рябо

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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