

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201800061 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.06.28

(51) Int. Cl. A61B 10/00 (2006.01)  
C12Q 1/6827 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки  
2017.12.04

---

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

---

(96) 2017/ЕА/0095 (ВУ) 2017.12.04

(71) Заявитель:  
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
"ГРОДНЕНСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ";  
КУРБАТ МИХАИЛ НИКОЛАЕВИЧ  
(ВУ)

(72) Изобретатель:  
Курбат Михаил Николаевич,  
Цыркунов Владимир Максимович  
(ВУ)

(57) Изобретение относится к медицине, клинической лабораторной диагностике. Сущность способа заключается в определении у пациента генотипа полиморфизма С677Т (Ala222Val) гена MTHFR, и при наличии генотипа СТ прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.

A1

201800061

201800061

A1

**Способ прогнозирования вероятности развития лекарственного поражения печени при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции**

Изобретение относится к медицине, клинической лабораторной диагностике и может быть использовано для прогнозирования лекарственного поражения печени (ЛПП) при терапии ВИЧ-инфекции.

В настоящее время активно изучается роль генетических факторов, влияющих на эффективность фармакотерапии и развитие побочных эффектов. По имеющимся в литературе сведениям ЛПП встречаются в общей медицинской практике с частотой, как минимум, 1 случай на 1000 пролеченных пациентов, что составляет 10% всех побочных реакций лекарственных средств (ЛС) [1, 2]. Поиск критериев прогнозирования развития ЛПП позволит существенно снизить затраты на терапию и повысить качество жизни пациентов, находящейся на ней.

Известен способ диагностики токсического поражения печени, состоящий в гистологическом исследовании биоптата печени [3].

Недостатками аналога являются: диагностика не лекарственного, а алкогольного поражения печени, инвазивность (травматичность); наличие противопоказаний для выполнения; сложность и многоэтапность технического исполнения, субъективность трактовки; использование многих реактивов; не обеспечивает прогноз развития ЛПП.

Также известен способ ранней диагностики токсических поражений печени путем определения активности аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) трансаминаз сыворотки крови, отличающийся тем, что при возрастании их уровня в сравнении с нормой на 50% и более судят о наиболее ранних признаках токсического поражения печени [4].

Недостатками этого аналога являются: диагностическая, а не прогностическая направленность способа; диагностическая неточность в связи с изменениями вышеуказанных показателей и при других поражениях печени.

Известен способ прогнозирования развития токсического гепатита при химиотерапии множественной миеломы, который заключается в выделении ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции, проведении генотипирования полиморфизма промоторной области гена CYP1A1 в сайте - Ile 462 Val методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с последующей рестрикцией. При выявлении генотипа Ile-Val прогнозируют высокий риск развития токсического лекарственного гепатита [5].

Ключевым недостатком данного способа является то, что он не позволяет диагностировать поражения гепатоцитов, не связанные с нарушением трансформации ксенобио-

тиков с помощью системы микросомального окисления, одним из ферментов которого является цитохром P<sub>450</sub> 1A1, и не может использоваться для оценки риска ЛПП при АРТ.

Из просмотра доступной литературы нам не удалось обнаружить источник, который может быть выбран в качестве прототипа.

Задача изобретения – разработка способа прогнозирования риска развития ЛПП у ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на длительной антиретровирусной терапии.

Поставленная задача решается путем определения у пациента, находящегося на АРТ, генотипа полиморфизма C677T (Ala222Val) гена MTHFR, и при наличии генотипа СТ, прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.

Способ осуществляют следующим образом. У пациента с ВИЧ-инфекцией выделяют из лейкоцитов цельной крови ДНК. С образцом выделенной ДНК параллельно проводят две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров для гена MTHFR, ответственного за синтез фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, полиморфизм C677T (Ala222Val) и последующим методом детекции продуктов амплификации (флуоресцентной схемой детекции продуктов в режиме реального времени (Real Time) либо с электрофоретической схемой детекции). При наличии генотипа СТ, прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.

Данные генетические показатели выбраны на основании проведенных клинических исследований на 91 пациенте с диагнозом ВИЧ-инфекции, подтвержденным стандартными лабораторными методами (ИФА, иммунный блотинг, ПЦР), находящихся на АРТ, согласно клиническим протоколам лечения [6].

У всех пациентов общепринятыми методами на автоматическом биохимическом анализаторе в плазме крови определяли уровень общего билирубина, активность аланинаминотрансферазы (АЛАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) и щелочной фосфатазы (ЩФ).

Диагностика ЛПП у пациентов проведена в соответствие с международными критериями гепатотоксичности Национального института изучения рака (National Cancer Institute Cancer Therapy Evaluation Program: Common Toxicity Criteria. Veers. 2.0. 1999) [7].

При превышении верхней границы нормы хотя бы одного из вышеуказанных показателей, у пациента диагностировали гепатотоксичность. В соответствии с наличием или отсутствием признаков ЛПП пациенты были разделены на две группы: первая – без ЛПП (без признаков гепатотоксичности) и вторая – с ЛПП (наличием гепатотоксичности).

Для проведения аллельной дискриминации указанного маркера применяли систему реагентов производства «Синтол». Амплификацию ДНК проводили на амплификаторе Rotor Gene-Q («Qiagen», Германия).

Анализ исследуемых полиморфных вариантов изучаемых генов метилентетрагидрофолатредуктазы в исследуемой выборке (рассчитанный с помощью он-лайн калькулятора <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>) показал соответствие наблюдаемого распределения генотипов для всех изученных вариантов гена ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга ( $\chi^2=0,13$ ,  $p>0,05$ ). Такое равновесие указывало на то, что на генетическую структуру популяции по изучаемым полиморфизмам не оказывали влияния различные воздействия (не действует отбор, не идет мутационный процесс, отсутствует обмен особями с другими популяциями, не происходит дрейф генов, все скрещивания случайны).

Полученные наблюдаемые частоты генотипов MTHFR, полиморфизм C677T (Ala222Val) приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Частота выявления генотипов MTHFR (полиморфизм C677T (Ala222Val))  
с учетом гепатотоксичности

| Генотип  | Гепатотоксичность |      | Достоверность (df=1)           |
|----------|-------------------|------|--------------------------------|
|          | нет               | есть |                                |
| СС       | 0,61              | 0,46 | $\chi^2_{*}=1,502$ , $p>0,05$  |
| СТ       | 0,22              | 0,50 | $\chi^2_{*}=4,510$ , $p<0,05$  |
| ТТ       | 0,17              | 0,04 | $\chi^2_{**}=0,065$ , $p>0,05$ |
| Аллель С | 0,72              | 0,71 | $\chi^2=0,022$ , $p>0,05$      |
| Аллель Т | 0,28              | 0,29 |                                |

Примечание: \* -  $\chi^2$  с поправкой Йейтса,

\*\* -  $\chi^2$ , рассчитанный с применением точного критерия Фишера.

Как видно из приведенной таблицы 1, частота встречаемости генотипа СТ в 2,3 выше у пациентов с лабораторными признаками гепатотоксичности, развившейся на фоне АРТ.

Затем для генотипа СТ рассчитали отношение шансов развития гепатотоксичности в сравниваемых 1 и 2 группах (с 95% доверительным интервалом). Результаты кросс-табуляции для генотипа СТ представлены во 2 таблице.

Таблица 2.

Показатели сопряженности генотипа СТ

| Показатель | Фактор риска<br>есть | Фактор риска от-<br>сутствует | Всего |
|------------|----------------------|-------------------------------|-------|
| Исход есть | 34                   | 34                            | 68    |

|            |    |    |    |
|------------|----|----|----|
| Исхода нет | 5  | 18 | 23 |
| Всего      | 39 | 52 | 91 |

Сведения, представленные в таблице 2, позволили рассчитать относительный шанс развития ЛПП в изучаемых группах (таблица 3).

Таблица 3.

Расчет шансов развития ЛПП

| Статистический показатель                    | Значение |
|----------------------------------------------|----------|
| Шанс найти фактор риска в основной группе    | 1,000    |
| Шанс найти фактор риска в контрольной группе | 0,278    |
| Отношение шансов (OR)                        | 3,600    |
| Стандартная ошибка отношения шансов (S)      | 0,561    |
| Нижняя граница 95% ДИ (CI)                   | 1,200    |
| Верхняя граница 95% ДИ (CI)                  | 10,804   |

Как видно из таблицы 3, при наличии у пациентов генотипа СТ гена MTHFR C677T (Ala222Val), относительный шанс развития ЛПП составляет 3,6 (95% ДИ 1,20-10,80).

Соответственно, носительство генотипа СТ MTHFR C677T (Ala222Val) является прогностически неблагоприятным в плане развития ЛПП при АРТ ВИЧ-инфекции.

В качестве иллюстрации приводим примеры конкретных клинических наблюдений.

Пример 1. Пациент Ю. 1986 г.р. Год постановки на учет по поводу ВИЧ-инфекции – декабрь 2014 года. Диагноз: ВИЧ инфекция, 2 клиническая стадия (CD4 – 393 кл/мкл). ПГЛ. Потеря массы тела до 10%. (преСПИД). С 08.12.14 назначена АРТ (зидовудин/ламивудин+эфавир). 14.04.15 смена схемы АРТ на тенофовир/эмтрицитабин 300/200 мг по 1 табл. 1 раз в сутки; эфавир в связи с плохой переносимостью заменен на невирапин 200 мг по 1 табл. 1 раз в сутки (2 недели), затем по 1 табл. 2 раза в сутки. Биохимический анализ крови при назначении АРТ (08.12.2014): общий билирубин – 12,9 мкмоль/л, активность АсАТ 34 Ед/л, АлАТ 28 Ед/л, ЩФ 99 Ед/л, ГГТП 27 Ед/л; ИФА HBsAg, antiHCV – отриц. Биохимический анализ крови (19.03.2015): общий билирубин – 14,6 мкмоль/л, активность АсАТ 29,4 Ед/л, АлАТ 56,8 Ед/л, ЩФ 149,8 Ед/л, ГГТП 32,9 Ед/л.

Определен генотип MTHFR C677T (Ala222Val) – СТ. Прогнозировался высокий риск ЛПП. В настоящее время – хроническое ЛПП 1 степени.

Пример 2. Пациент Я. 1981 г.р. ВИЧ-инфекция, 2 клиническая стадия (CD4 – 1369 кл/мкл). ПГЛ. Рецидивирующая герпетическая инфекция. Новообразования на левом плече и бедре. Саркома Капоши? (преСПИД). Постановка на учет по поводу ВИЧ-инфекции –

2003 г. Дата назначения АРТ (зидовудин /ламивудин 300 мг/150мг по 1 табл. 2 раза в сутки, абакавир 300 мг 1 табл. 2 раза в сутки): 03.06.2006. Отмечается высокая приверженность к АРТ. Объективный осмотр: Жалоб нет. Объективно: пониженного питания. На левом плече выступающее над поверхностью кожи образование, размером 1,5\*2 см, с нечеткими контурами, неоднородного коричнево-синего цвета, при пальпации плотное, безболезненное. Аналогичное образование 1\*1,5 см на задней поверхности левого бедра, над коленом. Пальпируются углочелюстные и заднешейные лимфоузлы. Дыхание в легких везикулярное. Сердечные тоны ритмичные, ясные. Живот мягкий безболезненный. Печень не увеличена. Биохимический анализ крови: общий билирубин – 9,7 мкмоль/л, активность АСТ 20 Ед/л, АЛТ 12 Ед/л, ЩФ 65 Ед/л, ГГТП 14 Ед/л; HBsAg, anti-HCV – отриц. Выявлен генотип CC MTHFR C677T (Ala222Val), соответственно ЛПП не прогнозируется. Заключение: несмотря на прием АРТ более 10 лет, признаки ЛПП отсутствуют.

Преимуществом заявляемого способа прогнозирования ЛПП заключаются в наличии высокой специфичности, ускорении выполнения способа и незначительных материальных затратах, в связи с возможностью проведения исследования во всех районных стационарах обеспеченных в настоящее время ПЦР-лабораториями для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний.

#### Литература:

1. Хазанов, А.И. Особенности лекарственных и вирусно-лекарственных поражений печени / А.И.Хазанов [и др.] // Кремлевская медицина. – 2000. – № 1. – С. 44–47.
2. Identification of metabolites, clinical chemistry markers and transcripts associated with hepatotoxicity / A. Bunes [et al.] // PLoSOne. – 2014. – Vol. 16, N. 9(5). – e97249.
3. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчных путей / Ш.Шерлок, Дж. Дули –М.: ГЭОТАР, 1999 – Стр. 40.
4. Галимова, С.Ф. Лекарственные поражения печени. Часть 1 / С.Ф. Галимова // Российский журнал Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии. – 2012. – №3. – С. 45.
5. Патент RU № 2283494, опубл. 10.09.2006.
6. Метод оптимизации обследования и проведения антиретровирусной терапии у взрослых и подростков/ И.А.Карпов [и др.] // Инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь. – Минск, 2012. – С.13-35.
7. Бабанина, Н.В. Опыт применения гепатопротектора «Гептор» (Адеметеонин) у онкологических пациентов, получающих противоопухолевое лечение / Н.В. Бабанина // Медиаль. – 2013. – № 2. – С. 59–61.

### **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Способ прогнозирования вероятности развития лекарственного поражения печени при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции, заключающийся в том, что у пациента определяют генотип полиморфизма C677T (Ala222Val) гена MTHFR, и при наличии генотипа СТ, прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.

## ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

## ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42

Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201800061

Дата подачи: 04 декабря 2017 (04.12.2017)

Дата испрашиваемого приоритета:

Название изобретения: Способ прогнозирования вероятности развития лекарственного поражения печени при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции

Заявитель: УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ "ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"

☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61B 10/00 (2006.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

Согласно международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)

A61B 10/00, C12Q 1/6827

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей                                                                                                                                                                     | Относится к пункту № |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Y          | RU 2426492 C2 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "АСТРАХАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ") 20.08.2011, формула | 1                    |
| Y          | US 2007/0134709 A1 (XIPING XU et al.) 14.06.2007, формула                                                                                                                                                                                 | 1                    |
| Y          | US 2017/0159107 A1 (TRUE HEALTH IP LLC) 08.06.2017, формула                                                                                                                                                                               | 1                    |

☐ последующие документы указаны в продолжении графы В☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

\* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"У" документ, имеющий наиболее близкое от поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

"&amp;" документ, являющийся патентом-аналогом

"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска:

27 июня 2018 (27.06.2018)

Наименование и адрес Международного поискового органа:

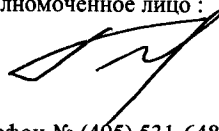
Федеральный институт

промышленной собственности

РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., 30-1.

Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:



М. Белугин

Телефон № (495) 531-6481