

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037105

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.05

(21) Номер заявки
201590773

(22) Дата подачи заявки
2013.10.18

(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОТВЕТА НА ИНГИБИТОР
ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА (TNF α)

(31) P1200607

(32) 2012.10.19

(33) HU

(43) 2015.09.30

(86) PCT/HU2013/000101

(87) WO 2014/060785 2014.04.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭГИШ ДЬЕДЬСЕРДЬЯР ЗРТ. (HU)

(72) Изобретатель:
Надь Ласло, Мешко Берталан,
Штеинер Ласло, Захуцки Габор, Холло
Жольт (HU)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н. (RU)

(56) EP-A1-1857559

WO-A1-2012061620

ANTONIO JULIA ET AL.: "An Eight-Gene
Blood Expression Profile Predicts the Response to
Infliximab in Rheumatoid Arthritis", PLOS ONE,
vol. 4, no. 10, 1 January 2009 (2009-01-01),
page e7556, XP055015104, ISSN: 1932-6203, DOI:
10.1371/journal.pone.0007556, the whole document

LEQUERRÉ THIERRY ET AL.: "Gene
profiling in white blood cells predicts
infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis",
ARTHRITIS RESEARCH AND THERAPY,
BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 8, no. 4,
3 July 2006 (2006-07-03), page R105, XP021020585,
ISSN: 1478-6354, DOI: 10.1186/AR1924, the whole
document, tables 1, 4

WO-A2-2008132176

WO-A2-2004091657

(57) Раскрыты способы диагностики in vitro для прогнозирования того, будет ли пациент отвечать на лечение ингибитором TNF α (фактор некроза опухоли альфа). Указанный способ основан на профилировании экспрессии генов. Путем измерения профиля экспрессии раскрытых генов можно прогнозировать, будет ли успешным лечение ингибитором TNF α или нет.

037105 B1

037105 B1

037105 B1

Область техники

Изобретение принадлежит к области способов диагностики. Раскрыты новые способы прогнозирования *in vitro* того, будет ли пациент отвечать на лечение ингибитором TNF α (фактор некроза опухоли альфа).

Предшествующий уровень техники

Фактор некроза опухоли (TNF) стимулирует воспалительный ответ, который, в свою очередь, вызывает множество клинических проблем, связанных с аутоиммунными расстройствами, такими как ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит, болезнь Крона, псориаз, гнойный гидраденит и рефрактерная астма. Данные расстройства иногда лечат путем применения ингибитора TNF.

Ревматоидный артрит (РА) считают хроническим системным воспалительным аутоиммунным расстройством, которое может поражать многие ткани и органы, но в основном атакует подвижные суставы. РА является болезненным и часто инвалидизирующим состоянием, которое может приводить к потере подвижности. В то же время болезнь Крона представляет собой тип воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), которое может поражать любую часть желудочно-кишечного тракта от полости рта до ануса, вызывая широкое разнообразие симптомов. Прежде всего, оно вызывает абдоминальную боль, диарею, рвоту или потерю массы, но также может вызывать осложнения вне желудочно-кишечного тракта.

Доступные в настоящее время способы лечения вышеуказанных заболеваний основаны на целых популяциях пациентов. В результате известные способы лечения могут приводить к тому, что некоторые пациенты подвергаются неэффективным способам лечения до идентификации эффективной терапии. Таким образом, существует необходимость в персонализированной медицине для лучшего лечения заболеваний, связанных с TNF α (например, РА или ВЗК), и идентификации эффективных вариантов лечения для данного пациента.

В EP 1857559 раскрыт способ прогнозирования *in vitro* того, будет ли пациент отвечать на лечение средством, блокирующим TNF α , который включает определение в биологическом образце пациента уровня экспрессии восьми генов, где указанные гены представляют собой EPS15, HLA-DPB1, AKAP9, RASGRP3, MTCBP-1, PTNP12, MRPL22 и RPS28.

В WO 2011/097301 раскрыт способ прогнозирования способности к ответу субъекта, имеющего ревматоидный артрит (РА), на лечение ингибитором TNF α , причем данный способ включает определение наличия аллели общего эпитопа HLA-DRB 1 (HLA-DRB 1 SE) в образце от субъекта, где наличие по меньшей мере одной копии аллели HLA-DRB1 SE указывает на то, что субъект будет отвечать на лечение ингибитором TNF α .

Несмотря на тот факт, что в WO 2011/097301 и EP 1857559 раскрыты способы прогнозирования способности к ответу на лечение ингибитором TNF-альфа, остается необходимость в дальнейших более эффективных и точных способах определения того, будет ли пациент, имеющий заболевание, связанное с TNF α , отвечать на различные варианты лечения.

Краткое описание изобретения

До конца 2010 г. более 2000000 пациентов во всем мире получили лечение биологическими агентами против TNF α , такими как инфликсимаб, адалимумаб и этанерцепт, при состояниях, таких как, среди прочего, ревматоидный артрит (РА) или болезнь Крона (БК), но эффективность данных агентов различна (M.P. Karampetsov et al., QJM (2010), 103(12):917-928).

Основная проблема терапии моноклональными антителами (mAb) при хронических воспалительных заболеваниях может быть кратко изложена посредством выводов двух недавних публикаций.

1) Значительный процент, приблизительно 30%, пациентов с РА не отвечает на биологическую терапию (Van Baarsen et al., Genes and Immunity 11, 622-629).

2) Результаты нескольких, больших исследований, сосредоточенных на применении биологических терапий при аутоиммунных заболеваниях, также показывают, что эффективность может снижаться после циклирования до второго ингибитора TNF (Rubbert-Roth et al., Arthritis Research & Therapy 2009).

Следовательно, прогнозирование того, будет ли пациент отвечать на терапию перед первым или вторым терапевтическим вариантом, является нереализованной потребностью в клинических условиях и имело бы большой эффект на применение данных лекарственных средств, делая лечение более экономически эффективным и обеспечивая пациентам возможность получать персонализированную терапию.

Способ по изобретению основан на применении алгоритма на основе биоинформатики для идентификации наборов генов, комбинированные профили экспрессии которых позволяют проводить различие между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение ингибитором TNF α .

Более конкретно, для решения указанной выше проблемы авторы настоящего изобретения разработали способ прогнозирования *in vitro* того, будет ли пациент отвечать на лечение ингибитором TNF α , который включает определение уровня экспрессии по меньшей мере 6 генов, выбранных из генов

ABCC4, AIDA, ARHGEF12, BMP6, BTN3A2, CA2, CADM2, CD300E, CYP1B1, ENDOD1, FCGR1A, FMN1, GCLC, GPR34, HORMAD1, IGF2BP2, IL18R1, IL1RL1, KAT2B, MAP1LC3B, MMD, MS4A4A, MS4A7, ODC1, PBX1, PCYT1B, PIP4K2A, PIP5K1B, PRDM1, PSME4, RAD23A, RIOK3, RNASE2, RNF11, SLC7A5, THEM5, TMEM176A, TMEM176B, UBE2H, WARS или из генов APOBEC3A, AQP9, CCL4, CNTNAP3, CYP4F3, DHRS9, EIF2AK2, ELOVL7, EPSTI1, FCGR3A, GPAM, GPR15, GZMB, IFI35, IFI44, IFI44L, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IL2RB, IRF2, IRF7, MGAM, MICA, MME, MX1, OR2A9P, PF4, PTGS2, RAVR2, RFC1, RGS1, RSAD2, S100P, SERPINB10, SERPING1, SIGLEC1, TNF, TNFAIP6, в биологическом образце указанного пациента. Согласно предпочтительному воплощению относительный уровень экспрессии выбранных генов определяют по сравнению с геном домашнего хозяйства. Предпочтительно указанный ген домашнего хозяйства представляет собой ген циклофилина, более предпочтительно циклофилина А (PPIA). Предпочтительно биологический образец представляет собой периферическую кровь, более предпочтительно уровень экспрессии определяют в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК).

Согласно первому предпочтительному воплощению изобретения в указанном биологическом образце определяют уровень экспрессии генов ELOVL7, IFI44L, IFIT1, IFIT3, MICA, OR2A9P и RAVR2; либо уровень экспрессии генов APOBEC3A, IFI44, IFI44L, IFIT1, IFITM1, MICA и RGS1; либо уровень экспрессии генов APOBEC3A, DHRS9, IFI35, IFI44, IFI44L, MICA и RFC1, предпочтительно у пациента, который имеет ревматоидный артрит.

Согласно второму предпочтительному воплощению изобретения в указанном биологическом образце определяют уровень экспрессии генов BMP6, CD300E, CYP1B1, ODC1, RNF11 и UBE2H; либо уровень экспрессии генов ARHGEF12, CADM2, CD300E, GCLC, RIOK3 и UBE2H; либо уровень экспрессии генов CADM2, CD300E, CYP1B1, MMD, ODC1, RNF11 и UBE2H, предпочтительно у пациента, который имеет воспалительное заболевание кишечника, например болезнь Крона.

Согласно третьему предпочтительному воплощению способ по изобретению осуществляют для того, чтобы проследить за эффективностью указанного лечения ингибитором TNF α .

Согласно предпочтительному воплощению изобретения указанный ингибитор TNF α представляет собой антитело против TNF α , слитый белок TNF или рекомбинантный TNF-связывающий белок, более предпочтительно указанный ингибитор TNF α представляет собой адалимумаб, цертолизумаб пегол, этанерцепт, голимумаб, инфликсимаб, пегсунерцепт или их любые биоаналогичные варианты, еще более предпочтительно указанный ингибитор TNF α представляет собой инфликсимаб или его любой биоаналогичный вариант.

В другом аспекте способ по изобретению дополнительно включает стадию сравнения уровня экспрессии указанных выше генов с референсными значениями, полученными от групп пациентов, отвечающих и не отвечающих на лечение.

Предпочтительно в способе по изобретению уровень экспрессии определяют путем количественного определения уровня мРНК указанных генов в биологическом образце. Технологии ДНК-чипов и обратной транскрипции - количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-кПЦР) особенно полезны для определения уровня экспрессии указанных генов.

Согласно еще одному предпочтительному воплощению изобретения способ дополнительно включает стадию определения уровня биомаркерного белка. Предпочтительно указанный биомаркерный белок представляет собой провоспалительный цитокин, хемокин или антитело против лекарственного средства.

Кроме того, изобретение относится к ингибитору TNF α для применения при лечении заболевания, связанного с TNF α , где пациента, получающего лечение, классифицировали как пациента, отвечающего на лечение ингибитором TNF α посредством способа по изобретению, указанный ингибитор TNF α предпочтительно представляет собой адалимумаб, цертолизумаб пегол, этанерцепт, голимумаб, инфликсимаб или пегсунерцепт.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Хронология и дизайн исследования по изобретению.

Фиг. 2: Схематический путь автоматического создания панелей генов.

Фиг. 3: Нормированные уровни мРНК достоверно изменяющихся генов в группах пациентов с ревматоидным артритом (РА) до и после терапии (значения p для AQP9: 0,02, TNFAIP6: 0,028, IGF1: 0,012). Данные рассчитывали на основе измерений посредством микрочипов.

Фиг. 4: Нормированные уровни мРНК четырех генов, для которых обнаружено, что они статистически значимо изменяются в том, что касается сравнения NR (пациент, не отвечающий на лечение) относительно R (пациент, отвечающий на лечение) при РА.

Фиг. 5: Нормированные уровни мРНК значимо изменяющихся генов в группах пациентов с болезнью Крона (БК) до и после терапии (значения p для MMP8: 0,018, AQP9: 0,011, IGKC: 0,001, TNFAIP6: 0,005, MGAM: 0,011). Данные рассчитывали на основе измерений посредством микрочипов.

Фиг. 6: Нормированные уровни мРНК четырех генов, для которых обнаружено, что они статистически значимо изменяются в том, что касается сравнения NR относительно R при БК.

Фиг. 7: Три перечня генов, оцениваемых с помощью линейного дискриминантного анализа (ЛДА) при ревматоидном артрите (РА). Столбики слева представляют пациентов, не отвечающих на лечение, столбики справа представляют пациентов, отвечающих на лечение. Чем больше расстояние между группами и чем меньше перекрытие между образцами, тем выше способность разделения перечня генов. Панель генов из эксперимента с микрочипами (экспериментальная когорта) находится слева, панель генов из экспериментов ОТ-кПЦР (проверочная когорта) находится справа в отношении каждой панели генов, и перечень генов с самыми высокими значениями p , служащий в качестве отрицательного контроля на основе данных по микрочипам, находится справа.

Фиг. 8: Три перечня генов, оцениваемых с помощью линейного дискриминантного анализа (ЛДА) при болезни Крона (БК). Столбики слева представляют пациентов, не отвечающих на лечение, столбики справа представляют пациентов, отвечающих на лечение. Чем больше расстояние между группами и чем меньше перекрытие между образцами, тем выше способность разделения перечня генов. Панель генов из эксперимента с микрочипами (экспериментальная когорта) находится слева, панель генов из экспериментов ОТ-кПЦР (проверочная когорта) находится справа в отношении каждой панели генов, и перечень генов с самыми высокими значениями p , служащий в качестве отрицательного контроля на основе данных по микрочипам, находится справа.

Фиг. 9: Корреляция между числом генов в каждой панели генов и минимальным значением F , вычисленным для данной панели, либо в экспериментальной, либо проверочной когорте при РА.

Фиг. 10: Корреляция между числом генов в каждой панели генов и минимальным значением F , вычисленным для данной панели, либо в экспериментальной, либо проверочной когорте при БК.

Фиг. 11: Уровни IFN γ (гамма-интерферон), измеренные с помощью ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа) при БК (экспериментальная когорта).

Фиг. 12: Уровни IL-6 (интерлейкин-6), измеренные с помощью ELISA при БК (экспериментальная когорта).

Фиг. 13: Диаграммы разброса данных по сывороточным цитокинам, демонстрирующие достоверные различия при РА (экспериментальная когорта).

Фиг. 14: Уровни TNF α , измеренные с помощью ELISA, в образцах РА исходного уровня из экспериментальной когорты.

Фиг. 15: Уровни TNF α , измеренные с помощью ELISA, в образцах РА недели 2 из экспериментальной когорты.

Фиг. 16: Уровни TNF α , измеренные с помощью ELISA, в образцах исходного уровня и недели 2 РА из экспериментальной когорты.

Фиг. 17: Уровни инфликсимаба, измеренные с помощью ELISA, у пациентов РА на неделе 2 и 14 (экспериментальная когорта).

Фиг. 18: Уровни инфликсимаба на неделе 2 у пациентов БК, измеренные с помощью ELISA (экспериментальная когорта).

Фиг. 19: Уровни инфликсимаба на неделе 2 у пациентов РА, измеренные с помощью ELISA (экспериментальная когорта).

Подробное описание изобретения

Глобальное профилирование экспрессии генов в периферической крови является отработанной технологией при описании патогенетического фона аутоиммунных расстройств и разделении заболеваний. Периферическая кровь является доступным источником биологического материала, включающего клетки, и обладает явными преимуществами для ее применения в способах скрининга. Кроме того, поскольку циркулирующие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) являются ключевыми клетками воспаления, несколько групп исследователей изучали МКПК в экспериментах с использованием микрочипов. Паттерны экспрессии генов в циркулирующих моноцитах, Т-клетках и В-клетках могут, но необязательно, отражать механизмы заболевания, это означает, что существует сложная задача распространения фармакогеномных маркеров на полигенные диагностические тесты, основанные на панелях генов, прогнозирующих ответ на терапии или развитие заболевания. Профилирование экспрессии генов МКПК обеспечивает менее дорогостоящую и менее инвазивную альтернативу биопсии или другим инвазивным способам. Тем не менее вплоть до настоящего времени не было проведено сравнения паттернов экспрессии генов различных аутоиммунных заболеваний, сосредоточенного на конкретной терапии.

Биомаркеры или наборы комбинированных биомаркеров, прогнозирующие ответ на терапию, в настоящее время часто применяют для улучшения специфичности лечения. Использование наименее инвазивного отбора образца периферической крови также обладает явными преимуществами. Тем не менее ограничения включают трудности при отборе образца, относящиеся к лабораторной обработке образцов,

и в целях сведения к минимуму гетерогенности образцов как врачи-клиницисты, собирающие образцы, так и обрабатывающие их исследователи должны следовать строгим указаниям.

В процессе глобального профилирования экспрессии генов в периферической крови в экспериментальной когорте пациентов авторы настоящего изобретения определили панели генов с наилучшей дискриминационной способностью и проверили результаты на независимой когорте пациентов.

Подводя итог, способ по изобретению в одном аспекте может быть кратко изложен следующим образом. У пациентов с РА и БК берут периферическую кровь и возможно отделяют МКПК. Из периферической крови или выделенных МКПК выделяют РНК, затем подвергают ее обратной транскрипции с получением кДНК. Для определения относительных уровней экспрессии выбранных генов согласно изобретению одновременно используют метод ОТ-кПЦР.

Подход, которого придерживались авторы настоящего изобретения, заключался в проведении глобального анализа экспрессии генов в экспериментальной когорте с помощью технологии микрочипов Affymetrix для идентификации перечня генов, который можно было проверить в независимой когорте с помощью более чувствительного метода кПЦР в реальном времени (РВ). Технология ОТ-кПЦР является наиболее надежным инструментом для измерений экспрессии генов (в отношении чувствительности, динамического диапазона, стандартизации, производительности и цены), что также делает его идеальным в качестве диагностического инструмента.

Тем не менее авторы изобретения предположили, что для проверки можно было бы использовать не только данные исходного уровня, но и данные, полученные на неделе 2. Таким образом, гены, статистически значимо определяющие статус ответа пациента на лечение на неделе 2, также добавляли к проверочной выборке генов; а также несколько генов из литературы, относящейся к данной области.

Что касается сравнений образцов исходного уровня и недели 2 с помощью микрочипов при обоих состояниях, воздействия самой терапии на уровни экспрессии генов были представлены 5 генами при БК, из которых AQP9 и TNFAIP6 были идентифицированы ранее в качестве маркеров ВЗК; было обнаружено, что MGAM является полногеномным ассоциативным прогностическим фактором ответа на терапию, блокирующую TNF α , при ВЗК у детей, тогда как экспрессия MMP8 была продемонстрирована в области активного воспаления на дне язвы образцов толстой кишки при ВЗК, и ее наличие в строме указывает на этиологию ВЗК. При РА каждый ген, который, как было обнаружено, достоверно изменяется в первые две недели терапии, относится к его патогенезу: AQP9 и TNFAIP6 отличали пациентов с РА от здоровых контролей посредством профилирования экспрессии генов в МКПК; и IGJ (иммуноглобулин J) показывал достоверно более высокую экспрессию мРНК у близнецов с РА по сравнению с их здоровыми однояйцевыми близнецами.

Проверка с помощью ОТ-кПЦР в независимой когорте также дала перечень генов с достоверными различиями между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение. При БК данные гены включают TMEM176B и TMEM176A, которые считаются мишенями функции дендритных клеток за счет образования мультимеров и ограничения созревания дендритных клеток; UBE2H, в отношении которого TNF α является известным регулятором UBE2H-зависимой убиквитин-конъюгирующей активности; и WARS, триптофанил-тРНК-синтазу. Обнаружили, что при РА значимыми являются следующие гены: CYP4F3, который ассоциирован с патомеханизмами остеоартрита; DHRS9, MGAM; и PF4, который был выявлен в качестве прогностического фактора отсутствия ответа на инфликсимаб при РА в протеомном исследовании.

Несмотря на то, что достоверные различия между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, могли бы показать и отдельные гены, лежащие в основе различия, обеспечивающие более высокую предсказательную способность, могут быть выявлены только путем анализа панелей генов.

Для идентификации панелей генов с самой высокой дискриминационной способностью использовали анализ канонических величин (АКВ) или линейный дискриминантный анализ (ЛДА), поскольку по сравнению с одномерным анализом, который может не учитывать потенциальные взаимодействия между генами, он может выявлять лежащие в основе различия путем одновременного использования генов в виде панели генов, обеспечивая полную сегрегацию в многомерном пространстве.

Известно, что наборы панелей генов, связанных с результатом, идентифицированные с помощью сходных исследований экспрессии генов, имели лишь несколько общих генов, что могло бы объясняться разными способами получения образца, выделения мРНК или анализа данных, а также индивидуальными вариациями и гетерогенностью, обусловленной маркерами, даже в клинически однородной когорте пациентов. Включение в перечень генов со статистически значимыми различиями между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, необязательно указывает на важность данного гена в патогенетике заболевания или терапии, соответственно, для того, чтобы выявить потенциальные мишени для лечения, следует анализировать полный перечень генов, связанных с ответом.

Автоматизация отбора панелей генов с высокой дискриминационной способностью между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, в обеих когортах и при обоих заболеваниях путем построения алгоритма на основе биоинформатики проводила к получению примерно 4700 панелей генов при каждом состоянии со 100% сегрегацией относительно статуса ответа пациента на лечение. Среди

них идентифицировали 3-3 панели генов с самой высокой дискриминационной способностью с учетом значений F панелей, данных перекрестной проверки и границ между сегрегированными группами.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили следующее:

1) при хронических воспалительных заболеваниях, например при БК и РА, профили экспрессии генов периферической крови подходят для определения прогностических панелей генов, уровни экспрессии которых, при измерении перед терапией инфликсимабом, идентифицируют пациентов, которые являются чувствительными к данной терапии;

2) неожиданно, для прогнозирования статуса ответа пациента на лечение при БК и РА требуются совершенно разные панели генов, несмотря на тот факт, что данные состояния имеют сходный патогенетический фон; и

3) было идентифицировано несколько панелей генов, которые демонстрируют полную сегрегацию в экспериментальной и проверочной когорте, а также сильную сегрегацию в анализах перекрестной проверки.

В способе по изобретению отбор образцов является критическим моментом. Один из основных критериев способа относился к тому, что следует стабилизировать РНК, таким образом делая возможным хранение и транспортировку образцов. Такие способы являются коммерчески доступными, но они приводят к получению клеточных популяций, более или менее отличных от той, которую использовали в исследовании (МКПК/Тризол). Отбор образцов также должен быть способен обеспечивать как минимум 120-140 образцов, что необходимо для подходящей статистики. Обработка образцов, измерения QC и ОТ-кПЦР являются хорошо отработанными технологиями.

Помимо описанного способа отбора образцов МКПК/Тризол авторы изобретения протестировали другие способы отбора образцов. Среди данных способов способ отбора образцов PAXGene (Qiagen Corp., США) и LeukoLock (Life Technologies Corp., США) показал высокую корреляцию со способом МКПК/Тризол. Тем не менее в клинической практике наиболее предпочтительным способом отбора образцов был бы способ отбора образцов PAXGene, поскольку данный способ требует меньше лабораторного оборудования и навыков специалиста, который осуществляет отбор образцов.

Набор генов согласно изобретению, который был идентифицирован и проверен авторами настоящего изобретения, удовлетворяет нереализованную потребность в геномном способе однозначного проведения различия между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, для терапии ингибитором TNF α (например, инфликсимабом) либо при болезни Крона (БК), либо при ревматоидном артрите (РА). Способ диагностики согласно изобретению впервые в данной области техники дает возможность вводить персонализированное здравоохранение, которое приносит пользу всем пациентам. Кроме того, оно не только полезно для пациентов, в отношении которых можно было бы не допустить получения неэффективной терапии и затем перехода на подходящую терапию, но также врачей-клиницистов, регулирующих и компенсирующих органов, а также приносит прибыль от повышенной эффективности и безопасности терапии.

Примеры

Дизайн исследования.

20 пациентов с болезнью Крона (БК) и 19 пациентов с ревматоидным артритом (РА) включали в исследование (отбор образцов до и через 2 недели после терапии) в экспериментальную когорту для экспериментов с микрочипами.

Для способа проверки образцы от 15 пациентов с РА на неделе 0 из проверочной когорты, 5 пациентов из экспериментальной когорты (для технической проверки) и от 20 пациентов с БК на неделе 0 из проверочной когорты включали в эксперименты ОТ-кПЦР. На схематической диаграмме фиг. 1 показана хронология и дизайн исследования.

Набор пациентов.

А) Ревматоидный артрит.

Критерии включения.

Клинически диагностированный ревматоидный артрит (критерии Американской ревматологической ассоциации 1987).

Возраст от 20 до 60 лет.

Неспособность к ответу по меньшей мере на два модифицирующих заболевание противоревматических лекарственных средства, включая метотрексат.

Активное заболевание (определенное как имеющее индекс активности заболевания, оцениваемый в 28 суставах (DAS28) больше 3,2).

Пациенты, ранее не проходившие терапию против TNF.

Была допустима терапия преднизолом 10 мг в сутки при условии, что дозировка была стабильной в течение по меньшей мере 2 месяцев перед вводом.

Были допустимы пероральные кортикостероиды (максимальная доза 10 мг в сутки - преднизон) и нестероидное противовоспалительное лекарственное средство при условии стабильности в течение по меньшей мере 1 месяца перед исходным уровнем.

Пациенты находились на максимальном переносимом лечении метотрексатом (5-30 мг в неделю), которое должно было быть стабильным в течение по меньшей мере 4 недель перед исходным уровнем.

Отношение женщины:мужчины составляет 3:1.

Критерии исключения.

Курильщик или курильщик в прошлом; беременность или грудное вскармливание; злокачественная опухоль в настоящее время или в недалеком прошлом; клинически значимые сопутствующие заболевания; активное инфекционное заболевание; пациенты с острым воспалительным заболеванием суставов иного происхождения в анамнезе.

Собираемые параметры.

Возраст, диагноз РА (год), DAS28, CRP (С-реактивный белок), We, RF (ревматоидный фактор), сопутствующие заболевания, лекарственные средства (например, DMARD (модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства)). После 14 недель лечения клинический ответ на лечение оценивают, используя как критерии EULAR (Европейская Антиревматическая Лига), так и снижение DAS28 по меньшей мере на 1,2.

Б) Болезнь Крона.

Критерии включения.

Клинически диагностированная болезнь Крона.

Возраст от 20 до 60.

CDAI (Индекс активности болезни Крона) выше 250.

Никогда не получали терапию против TNF.

Терапия метотрексатом (MTX), но меньше 20 мг/неделя.

Терапия преднизолоном, но меньше 10 мг/сутки.

Отношение женщины:мужчины составляет 1:1.

Критерии исключения.

Курильщик или курильщик в прошлом; беременность или грудное вскармливание; злокачественная опухоль в настоящее время или в недавнем прошлом; клинически значимые сопутствующие заболевания; активное инфекционное заболевание; пациенты с острым воспалительным заболеванием кишечника иного происхождения в анамнезе.

Собираемые параметры.

Возраст, диагноз БК (год), CDAI (если CDAI падал ниже 150, пациентов считали отвечающими на лечение, в противном случае - не отвечающими на лечение), CRP, We, сопутствующие заболевания, лекарственные средства, заключение по биопсии толстой кишки (при наличии), способность на ответ на неделе 14.

Отбор образцов у пациентов, обработка и хранение (МКПК/Тризол).

Способность отвечать на терапию определяли врачи-клиницисты через 14 недель после терапии на основе описанных выше критериев. Образцы периферической крови (10 мл) отбирали в вакуумные пробирки для взятия венозной крови, содержащие ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) (BD Vacutainer K2E), для отделения МКПК и 10 мл периферической крови - в необработанные пробирки для экстракции образцов сыворотки. Все образцы обрабатывали в течение одного часа после отбора образца.

МКПК отделяли центрифугированием в градиенте фикола. Кратко, периферическую кровь разводили 10 мл физиологического раствора и наслаивали на 10 мл фикола. Центрифугирование проводили при 2500 об/мин в течение 20 мин и затем отбирали слой МКПК. Клетки дважды промывали физиологическим раствором (1700 об/мин, 7 мин) и подвергали лизису в реагенте Тризол и хранили при -70°C до выделения РНК.

Статистика клинических параметров.

Клинические параметры когорт пациентов сравнивали путем использования GraphPad Prism и использовали U-критерий Манна-Уитни (p меньше 0,05 считали статистически значимым).

Выделение РНК.

РНК выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), используя реагент Тризол (Invitrogen) согласно протоколу изготовителя. Количество и качество РНК проверяли на следующих приборах: УФ-фотометр NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) и Agilent BioAnalyzer (Agilent Technologies).

Микрочип.

Для анализа глобального паттерна экспрессии 28869 хорошо аннотированных генов использовали чип Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST. Для амплификации и мечения 250 нг образцов РНК использовали набор для экспрессии Ambion WT (Applied Biosystems) и набор для концевоего мечения и контроля GeneChip WT (Affymetrix). Образцы гибридизировали при 45°C в течение 16 ч, и затем выполняли стандартный протокол отмывки, используя струйную установку GeneChip 450 и чипы сканировали на сканере GeneChip 7G (Affymetrix).

Анализ данных по микрочипам.

Данные по микрочипам анализировали с помощью Genespring GX10 (Agilent Biotechnologies). Файлы данных Affymetrix импортировали, используя алгоритм RMA, и проводили медианную нормализа-

цию. Что касается сравнения образцов исходного уровня с образцами недели 2, 20% серий проб с самым низким уровнем экспрессии отфильтровывали на первой стадии, затем перечень остальных серий проб фильтровали по кратности изменения (1,2-кратное отсечение) и проводили статистический анализ, используя парный U-критерий Манна-Уитни с коррекцией на множественное тестирование Бенджамини-Хохберга.

Что касается сравнения пациентов, отвечающих на лечение, с пациентами, не отвечающими на лечение, 20% серий проб с самым низким уровнем экспрессии отфильтровывали на первой стадии, затем перечень остальных серий проб фильтровали по кратности изменения (1,2-кратное отсечение) и проводили статистический анализ, используя непарный T-критерий с коррекцией на множественное тестирование Бенджамини-Хохберга. Функциональную категоризацию генов проводили с помощью системы классификации Panther (<http://www.pantherdb.org/>).

ОТ-кПЦР.

Данные по экспрессии генов получали с использованием чипа низкой плотности TaqMan (TLDA) (Applied Biosystems), который представляет собой 384-луночную микрожидкостную плату, которая обеспечивает одновременную постановку 384 реакций ПЦР в реальном времени и которую использовали для профилирования экспрессии генов в нескольких исследованиях. Данная микрожидкостная плата с производительностью от низкой до средней позволяет параллельно прогонять два образца против 96 мишеней анализа экспрессии генов TaqMan®, которые предварительно загружают в каждую из лунок на панели. кДНК получали с помощью набора для высокоэффективной обратной транскрипции кДНК согласно протоколу изготовителя. В реакциях ОТ-кПЦР использовали 1 мкг РНК на образец. В каждом образце использовали 400 нг (4 мкл) кДНК. Для измерений количественной ПЦР в реальном времени добавляли 196 мкл не содержащей нуклеаз воды и 200 мкл 2× TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Затем данную смесь поровну делили на четыре порта загрузки образца TLDA, причем каждый соединяли с одним набором из 96 интересующих генов. Чипы центрифугировали один раз (1', 1300 об/мин при комнатной температуре) для того, чтобы равномерно распределить образец по лункам. Затем панель запаивали, чтобы предотвратить обмен между лунками. Амплификацию ОТ-кПЦР проводили, используя систему обнаружения последовательности Applied Biosystems Prism 7900HT при следующих условиях в термоциклере: 2 мин при 50°C и 10 мин при 94,5°C с последующими 40 циклами по 30 с при 97°C и 1 мин при 59,7°C. На основе предшествующего эксперимента авторов изобретения с микрочипами выбирали 91 ген, а остальные 5 генов представляли собой гены домашнего хозяйства для нормирования.

Анализ данных ОТ-кПЦР.

Файлы данных ОТ-кПЦР импортировали с помощью программы Data Assist (Applied BioSystems), и необработанные данные нормировали методом ΔCt. Циклофилин А (PPIA) выбирали в качестве гена-нормализатора, поскольку его экспрессия показывала меньшее варьирование между образцами. Чтобы найти гены, дифференциально экспрессируемые между группами пациентов, отвечающих и не отвечающих на лечение, применяли непараметрический статистический критерий (U-критерий Манна-Уитни) и проводили анализ канонических величин (АКВ).

Анализ канонических величин (АКВ) или линейный дискриминантный анализ (ЛДА).

Разделение между предопределенными группами объектов лучше всего выявляется с помощью анализа канонических величин (АКВ). АКВ представляет собой обобщение линейного дискриминантного анализа (ЛДА), причем эти два термина в данном исследовании используют эквивалентно. АКВ использовали для определения того, можно ли разделить группы пациентов, отвечающих и не отвечающих на лечение, в многомерном пространстве, перекрытом генетическими переменными, и, если это так, какие подгруппы генов обладают наилучшей дискриминационной способностью. Результатами АКВ являются так называемые канонические баллы, полученные из канонических функций, образованных посредством анализа собственных значений, которые служат в качестве координат наблюдений в каноническом пространстве.

Автоматическое создание панелей генов.

Линейный дискриминантный анализ (ЛДА) (Hamadeh H.K. et al., Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. Toxicol Sci. 2002 Jun; 67(2):232-40) использовали для автоматического создания панелей генов, показывающих 100% сегрегацию между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, при обоих состояниях и в обоих когортах (экспериментальной и проверочной) согласно следующему алгоритму (использовали 40 генов при БК и 41 ген при РА, которые были предварительно отфильтрованы во время экспериментов с экспериментальными когортами и проверены в проверочных когортах):

1) Создают выборку "генов в модели". Исходно данная выборка содержит все гены. Также создают выборку генов с так называемыми "защищенными генами". Исходно данная выборка является пустой.

2) Для каждого гена вычисляют значение F, представляющее собой соотношение межгрупповой вариабельности и внутригрупповой вариабельности.

3) Классификационный алгоритм (ЛДА) запускают, используя выборку "генов в модели" как в экспериментальной когорте, так и проверочной когорте. В обоих случаях процентное значение точности регистрируют как "наилучшие значения точности".

4) Выборку "выбираемых генов" определяют следующим образом: "выбираемые гены" = "гены в модели" минус "защищенные гены".

Если группа "выбираемых генов" не является пустой, тогда алгоритм продолжается на стадии 5, в противном случае алгоритм перескакивает на стадию 7.

5) Гены выбирают из выборки "выбираемых генов" согласно следующим моделям:

- а) случайно с равными вероятностями (однородная модель);
- б) случайно с вероятностью, которая обратно пропорциональна их значению F (модель F_{prop});
- с) гены с самыми низкими значениями F (модель $\min F$).

В любом случае отобранный ген временно удаляют из выборки "генов в модели".

Преимущество использования стохастических моделей вместо модели $\min F$ состоит в том, что они могут обеспечивать лучшую сегрегацию групп пациентов. Однородная модель и модель F_{prop} представляют собой стохастические алгоритмы, тогда как модель $\min F$ является детерминистической.

6) Классификатор запускают, используя (временно сокращенную) выборку "генов в модели".

а) Если любое из двух процентных значений точности становится ниже, отобранный ген вновь вставляют в выборку "генов в модели" и добавляют к выборке "защищенных генов".

б) Если оба процентные значения точности по меньшей мере не уступают "наилучшим значениям точности", отобранный ген навсегда удаляют из "генов в модели" и выборку "защищенных генов" очищают. "Наилучшие значения точности" переписывают с помощью вычисленных значений точности.

Алгоритм возвращается на стадию 4.

7) Алгоритм завершается. Результатами являются выборка "гены в модели" и "наилучшие значения точности".

Линейный дискриминантный анализ проводили посредством использования программы R (R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.) с пакетом MASS (Venables, W.N. & Ripley, B.D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York) и пакетом wordcloud (Ian Fellows (2012). wordcloud: Word Clouds. R package version 2.0. <http://CRAN.R-project.org/package=wordcloud>) для визуализации.

Твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA).

Для определения в сыворотке уровней IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ , TNF α , инфликсимаба и антитела против инфликсимаба проводили твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA). Для измерений IL-6, IL-8, IL-12 и IFN γ использовали наборы Quantikin ELISA (R&D Systems) согласно протоколу изготовителя. Уровни TNF α , инфликсимаба и антител против инфликсимаба измеряли с помощью набора LISA - TRACKER Premium Infliximab (BioMedical Diagnostics). Результаты приведены в пг/мл. Данные анализировали путем использования GraphPad Prism, и использовали U-критерий Манна-Уитни (статистически значимым считали p меньше 0,05).

Примеры

Пример 1.

Глобальный анализ экспрессии генов образцов экспериментальной когорты ревматоидного артрита.

Группы пациентов экспериментальной когорты ревматоидного артрита.

Образцы от 19 пациентов на исходном уровне и на неделе 2 включали в эксперименты с микрочипами. Врачи-клиницисты идентифицировали 6 пациентов, отвечающих на лечение, и 13 пациентов, не отвечающих или умеренно отвечающих на лечение. Каждый пациент получал одну и ту же базовую терапию и был некурящим. Между группами пациентов, не отвечающих на лечение (NR) и отвечающих на лечение (R), не было достоверных различий относительно возраста, DAS28, HAQ (анкета оценки состояния здоровья), CRP, ревматоидного фактора, антител к CCP (циклическому цитрулиновому пептиду) или DMARD (табл. 1).

Таблица 1

Кумулятивные клинические параметры групп пациентов
при РА в экспериментальной когорте

		Пациенты, отвечающие на лечение (АКР (Американская коллегия ревматологов) 70-50)	Пациенты, не отвечающие или умеренно отвечающие на лечение (АКР 20-0)
На неделе 0		6	13
Пол	Мужской/Женский	1/5	2/11
Возраст	НД	44,33	47,08
DAS28	НД	5,63	5,26
HAQ	НД	1,27	2,06
CRP (мг/л)	НД	16,83	28,31
DMARD	НД	2,83	2,69
RF (ME (международная единица)/мл)	НД	105,83	148,62
ССР (ME/мл)	НД	675,78	756,31

НД означает отсутствие достоверных различий, DAS28, HAQ и DMARD представляют собой данные оценки в баллах.

Анализ микрочипов.

Глобальное профилирование экспрессии генов выявило гены со статистически значимыми различиями между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, на исходном уровне. Анализ образцов, полученных на неделе 2, показал гены со статистически значимыми различиями между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение. Экспрессия некоторых генов достоверно отличалась даже на исходном уровне (EPSTI1, IFI44, IFIT1, IFIT2, IFIT3, RFC1 и RSAD2); тогда как другие экспрессировались по-разному на неделе 2 (FCGR3A, GPAM, MICA, ELOVL7, PF4, RGS1 и SNORD41). Многие из этих генов имеют отношение к РА согласно литературе (FCGR3A, MICA, PF4, IFIT1 и т.д.).

В результате сравнения образцов исходного уровня и недели 2 получили перечень трех генов (AQP9, IGJ и TNFAIP6) со статистически значимыми различиями даже с коррекцией на множественное тестирование Бенджамини-Хохберга. Эти гены представляют эффекты терапии с течением времени (фиг. 3).

Пример 2.

Проверка панелей генов ревматоидного артрита с помощью ОТ-кПЦР.

Группы пациентов проверочной когорты ревматоидного артрита.

Врачи-клиницисты идентифицировали 4 пациента, отвечающих на лечение, и 11 пациентов, не отвечающих или умеренно отвечающих на лечение. Каждый пациент получал одну и ту же базовую терапию и был некурящим. Между группами пациентов, не отвечающих (NR) и отвечающих (R) на лечение, не было достоверных различий относительно возраста, DAS28, HAQ, CRP или DMARD (табл. 2).

Таблица 2

Кумулятивные клинические параметры групп пациентов
в проверочной когорте при РА

		Пациенты, отвечающие на лечение	Пациенты, не отвечающие или умеренно отвечающие на лечение
На неделе 0	(экспериментальная когорта)	4 (6)	11 (13)
Пол	Мужской/Женский	0/4 (1/5)	3/8 (2/11)
Возраст	Недостоверно	54 (44,33)	56,2 (47,08)
DAS28	Недостоверно	5,23 (5,63)	5,44 (5,26)
HAQ	Недостоверно	1,59 (1,27)	1,93 (2,06)
CRP (мг/л)	Недостоверно	18,9 (16,83)	9,58 (28,31)
DMARD	Недостоверно	3 (2,83)	2,7 (2,69)

В скобках также показаны данные экспериментальной когорты. DAS28, HAQ и DMARD представляют собой данные оценки в баллах.

Анализ ОТ-кПЦР.

Образцы от 15 пациентов на неделе 0 и 5 пациентов из экспериментальной когорты для технической проверки - 2 пациента, отвечающих на лечение, 3 пациента, не отвечающих на лечение, включали в эксперименты ОТ-кПЦР. Конфигурацию проверочных анализов кПЦР составляли следующим образом: на основе микрочипов экспериментальной когорты 29 серий проб оказались статистически значимыми на исходном уровне в отношении сравнения пациента, не отвечающего на лечение, с пациентом, отвечающим на лечение, из которых 27 генов (гены без аннотации и гены малых ядерных РНК исключали) включали в платы TLDA, а также 6 генов из сравнения NR относительно R на неделе 2, и 10 генов

выбирали из литературы. Из этих генов 41 ген использовали в конечном анализе, как описано ниже (гены, не показывающие различий, исключали). В результате экспериментов ОТ-кПЦР получили 4 гена, демонстрирующих статистически значимые (односторонний U-критерий Манна-Уитни) различия между NR и R (фиг. 4). Также проводили техническую проверку, и она оказалась успешной.

Пример 3.

Глобальный анализ экспрессии генов образцов экспериментальной когорты болезни Крона.

Группы пациентов экспериментальной когорты болезни Крона.

Образцы от 20 пациентов на исходном уровне и на неделе 2 включали в эксперименты с микроchipами (экспериментальная когорта). Врачи-клиницисты идентифицировали 14 пациентов, отвечающих на лечение, и 6 пациентов, не отвечающих на лечение. Каждый пациент получал одну и ту же базовую терапию и был некурящим. Между группами пациентов, не отвечающих на лечение (NR) и отвечающих на лечение (R), не было достоверных различий относительно возраста, CDAI, CRP, гемоглобина, лейкоцитов или нейтрофилов (табл. 3).

Таблица 3

Кумулятивные клинические параметры групп пациентов
при БК в экспериментальной когорте

		Пациенты, отвечающие на лечение	Пациенты, не отвечающие на лечение
На неделе 0		14	6
Пол	Мужской/Женский	8/6	3/3
Возраст	Недостоверно	36,2	33
CDAI	Недостоверно	319,6	351,5
CRP (мг/л)	Недостоверно	22,78	13,59
Гемоглобин (г/л)	Недостоверно	125,1	120,6
Лейкоциты (г/л)	Недостоверно	9,02	8,01
Нейтрофилы (%)	Недостоверно	70,0	74,4

CDAI, Индекс активности болезни Крона, представляет собой балл.

Анализы с микроchipами.

Глобальное профилирование экспрессии генов выявило гены со статистически значимыми различиями между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, на исходном уровне. Анализ образцов, полученных на неделе 2, показал гены со статистически значимыми различиями между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение. Некоторые из этих генов также достоверно изменялись на исходном уровне (DDX11L2, BMP6, THEM5 и ABCC4); тогда как другие представляли собой новые гены, обнаруженные на неделе 2 (GPR34, PRDM1, IL1RL1, CA2, MMD, SCL7A5, CADM2 и RAD23A). Многие из этих генов имеют отношение к БК согласно литературе (BMP6, ABCC4, CA2, IL1RL1 и PRDM1). В результате сравнения образцов на исходном уровне и на неделе 2 получили перечень из пяти генов (AQP9, IGKC, MGAM, MMP8 и TNFAIP6) со статистически значимыми различиями. Данные гены представляют эффекты терапии с течением времени (фиг. 5).

Пример 4.

Проверка панелей генов болезни Крона с помощью ОТ-кПЦР.

Группы пациентов проверочной когорты болезни Крона.

Образцы от 20 пациентов на исходном уровне включали в эксперименты ОТ-кПЦР (проверочная когорта). Врачи-терапевты идентифицировали 13 пациентов, отвечающих на лечение, и 7 пациентов, не отвечающих на лечение. Каждый пациент получал одну и ту же базовую терапию и был некурящим. Между группами пациентов, не отвечающих (NR) и отвечающих (R) на лечение, не было достоверных различий относительно возраста, CDAI, CRP, гемоглобина, лейкоцитов или нейтрофилов (табл. 4).

Таблица 4

Кумулятивные клинические параметры групп пациентов
в проверочной когорте при БК

		Пациенты, отвечающие на лечение	Пациенты, не отвечающие на лечение
На исходном уровне	(экспериментальная когорта)	13 (14)	7 (6)
Пол	Мужской/Женский	8/5 (8/6)	4/4 (4/3)
Возраст	Недостоверно	26,8 (36,2)	30,2 (36)
CDAI	Недостоверно	338,3 (319,6)	370,7 (351,5)
CRP (мг/л)	Недостоверно	27,2 (22,78)	16,5 (13,59)
Гемоглобин (г/л)	Недостоверно	130 (125,1)	127 (120,6)
Лейкоциты (г/л)	Недостоверно	7,58 (9,02)	9,24 (8,01)
Нейтрофилы (%)	Недостоверно	74,0 (70,0)	72,83 (74,5)

В скобках также показаны данные экспериментальной когорты. CDAI, Индекс активности болезни Крона, представляет собой балл.

Анализы ОТ-кПЦР.

Конфигурацию проверочных анализов кПЦР составляли следующим образом: на основе 40 микрочипов в экспериментальной когорте 49 серий проб оказались статистически значимыми на исходном уровне в отношении сравнения пациента, не отвечающего на лечение, с пациентом, отвечающим на лечение, из которых 36 генов (гены без аннотации и гены малых ядрышковых РНК исключали) включали в платы TLDA, а также 8 генов из сравнения NR относительно R на неделе 2 и 7 генов из литературы. Из них 40 генов использовали в конечном анализе, как описано ниже (гены, не показывающие различий, исключали). В результате экспериментов ОТ-кПЦР получили 4 гена, демонстрирующих статистически значимые (односторонний U-критерий Манна-Уитни) различия между NR и R (фиг. 6).

Пример 5.

Биостатистический анализ данных экспрессии.

Проводили статистический анализ, используя данные экспрессии генов предварительно отфильтрованных 40/41 (РА/БК) генов в обеих когортах, используя автоматическое создание панелей генов, подробно описанное выше, разрабатывали алгоритм для обнаружения наилучших панелей генов, позволяющих проводить различие между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение.

Алгоритм запускали с детерминированной моделью $\min_F$ и 5000 раз с обеими стохастическими моделями. При РА F_rgr давала 4747 комбинаций панелей генов, показывающих 100% сегрегацию между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, как в экспериментальной, так и проверочной когортах (используя данные по микрочипам и ОТ-кПЦР соответственно), тогда как однородная модель давала даже больше, 4909 панелей генов. При БК данные числа составляли 4657 для F_rgr и 4878 для однородной модели. Модель $\min_F$ также давала 100% сегрегацию, но необходимо отметить, что стохастические модели давали гораздо более глубокую сегрегацию в отношении показателей точности при обоих заболеваниях. Большое число панелей генов, обеспечивающих 100% сегрегацию, образованное 5000 запусками, позволяет предположить, что существуют другие панели со 100% сегрегацией, причем общее число данных панелей оценивают как превышающее 50000.

Перекрестная проверка представляет собой путь для прогнозирования соответствия модели гипотетической проверочной выборке, когда заданная проверочная выборка недоступна. Авторы изобретения использовали перекрестную проверку с исключением (LOOCV), которая включает использование одного наблюдения от исходного образца в качестве проверочных данных, а остальные наблюдения в качестве обучающих данных. Это действие повторяют таким образом, что каждое наблюдение в образце используют один раз в качестве проверочных данных. Для визуализации выбирали 3-3 панели генов с наилучшей дискриминационной способностью, принимая во внимание значения F, данные перекрестной проверки и границы между сегрегационными группами. Перечень генов с самыми высокими значениями p в эксперименте с микрочипами служил в качестве отрицательных контролей, показывающих отсутствие сегрегации (табл. 5).

Панель генов для РА с наилучшей дискриминационной способностью включала гены, такие как CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVR2, SERPINB10 и TNFAIP6 (RA1); тогда как вторая панель генов содержала CNTNAP3, CYP4F3, EPSTI1, MME, RGS1, SERPINB10 и TNFAIP6 (RA2); третья панель состояла из FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVR2, RFC1 и RSAD2 (RA3) (фиг. 7).

Панель генов для БК с наилучшей дискриминационной способностью включала гены, такие как ARHGEF12, ENDOD1, FCGR1A, GCLC, GPR34, KAT2B, MAP1LC3B и ODC1 (CD1); тогда как вторая панель генов содержала ABCC4, AIDA, ARHGEF12, CADM2, FMN1, KAT2B, ODC1, PCYT1B и RNASE2 (CD2); третья панель состояла из AIDA, CADM2, GCLC, KAT2B, MMD, PCYT1B, PIP5K1B, RIOK3 и RNF11 (CD3) (фиг. 8).

Таблица 5

Показатели точности панелей генов, выбранных для визуализации

Панель генов №	RA1		RA2		RA3		Отрицательный контроль
Когорта ревматоидного артрита	Эксперимент. когорта	Провер. когорта	Эксперимент. когорта	Провер. когорта	Эксперимент. когорта	Провер. когорта	Эксперимент. когорта
Сегрегация групп	100%	100%	100%	100%	100%	100%	53%
Результат перекрестной проверки	100%	87%	95%	93%	95%	87%	-
Источник данных	Микрочип	ОТ-кПЦР	Микрочип	ОТ-кПЦР	Микрочип	ОТ-кПЦР	Микрочип

Панель генов №	CD1		CD2		CD3		Отрицательный контроль
Когорта болезни Крона	Эксперимент. когорта	Провер. когорта	Эксперимент. когорта	Провер. когорта	Эксперимент. когорта	Провер. когорта	Эксперимент. когорта
Сегрегация групп	100%	100%	100%	100%	100%	100%	55%
Результат перекрестной проверки	95%	80%	90%	85%	90%	80%	-
Источник данных	Микрочип	ОТ-кПЦР	Микрочип	ОТ-кПЦР	Микрочип	ОТ-кПЦР	Микрочип

Представлены данные сегрегации и перекрестной проверки каждой выбранной панели генов, а также отрицательного контроля.

На фиг. 9 и 10 показано число генов в пределах каждой панели, показывающих сегрегацию 100% между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, и наименьшее значение F, вычисленное для каждой группы пациентов (чем выше значение F, тем лучше сегрегация, что означает, что выбор минимального значения F представляет собой самую слабую точку модели), расположенные по значению F с целью выявления оцененного числа панелей генов с самой высокой дискриминационной способностью. Точка перегиба кривой минимального значения F показывает, что при РА приблизительно 350, тогда как при БК 200 панелей генов приводили к сильной дискриминации, причем все панели генов на графике приводили к 100% установлению различий между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение.

Пример 6.

Анализ ELISA.

Измерения ELISA проводили для того, чтобы определить в сыворотке уровни белка пяти провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-8, IFN γ и IL-12), терапевтического моноклонального антитела инфликсимаба и антитела против лекарственного средства (против инфликсимаба). В табл. 6 показано, что на основе статистического анализа было обнаружено достоверное различие при РА между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, на исходном уровне по уровню IL-12, тогда как при БК статистически достоверным оказался уровень IFN γ . TNF α измеряли с помощью набора TRACKER Premium Infliximab в когорте РА. Подробные диаграммы разброса данных достоверных сравнений показаны на фиг. 11-13.

Таблица 6

Статистика измерений ELISA цитокинов

	Ревматоидный артрит		Болезнь Крона	
	NR против R на исходном уровне	Исходный уровень против недели 2	NR против R на исходном уровне	Исходный уровень против недели 2
IL-6	0,2	0,03	0,2	0,005
IL-8	0,3	0,01	0,9	0,06
IL-12	0,05	0,05	0,6	0,8
IFNγ	0,5	0,5	0,02	0,06
TNF	0,2	0,67		

Значения p получали посредством статистического анализа данных по уровню цитокинов групп NR против R и исходного уровня против недели 2 с использованием U-критерия Манна-Уитни. Числа, выделенные жирным шрифтом, представляют статистически значимые величины.

Также проводили предварительные эксперименты ELISA по TNF α , инфликсимабу и антителу против инфликсимаба для тестирования набора LISA -TRACKER Premium Infliximab. В связи с ограниченным количеством набора можно было включить только образцы из экспериментальных когорт. Включали следующие образцы:

TNF α 17 РА на исходном уровне 17 РА на неделе 2 7 РА на неделе 14

Инфликсимаб 16 БК на неделе 2 19 РА на неделе 2 7 РА на неделе 14

Антитело против инфликсимаба 17 БК на неделе 2 19 РА на неделе 2 7 РА на неделе 14

Таким образом, TNF α измеряли только в образцах от пациентов с РА экспериментальной когорты, но различие между пациентами, отвечающими и не отвечающими на лечение, не могли выявить ни на исходном уровне, ни на неделе 2, ни при сравнениях исходного уровня с неделей 2 (фиг. 14-16).

Инфликсимаб и антитело против инфликсимаба измеряли в образцах недели 2 и недели 14 РА и БК (экспериментальная когорта) (фиг. 17-19). Уровни антитела против инфликсимаба можно было выявить только в трех образцах, представляющих пациентов, которые показывали нулевые уровни инфликсимаба на неделе 14.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

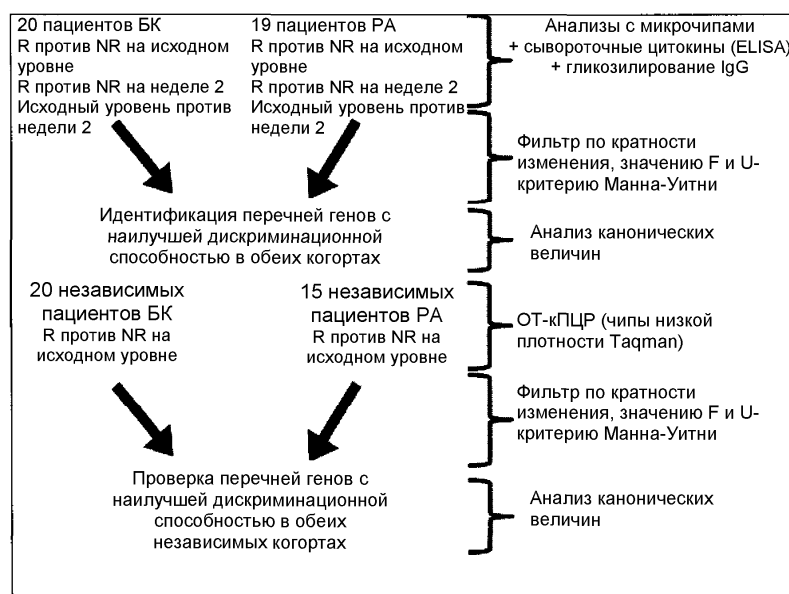
1. Способ прогнозирования *in vitro* того, будет ли пациент, страдающий от ревматоидного артрита, отвечать на лечение ингибитором TNF α (фактор некроза опухоли альфа), включающий

стадию определения уровня экспрессии генов CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVR2, SERPINB10 и TNFAIP6, или определения уровня экспрессии генов CNTNAP3, CYP4F3, EPSTI1, MME, RGS1, SERPINB10 и TNFAIP6, или определения уровня экспрессии генов FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVR2, RFC1 и RSAD2, где уровни экспрессии выбранных генов определяют по сравнению с уровнем экспрессии гена домашнего хозяйства в качестве референсного гена в мононуклеарных клетках периферической крови указанного пациента; и

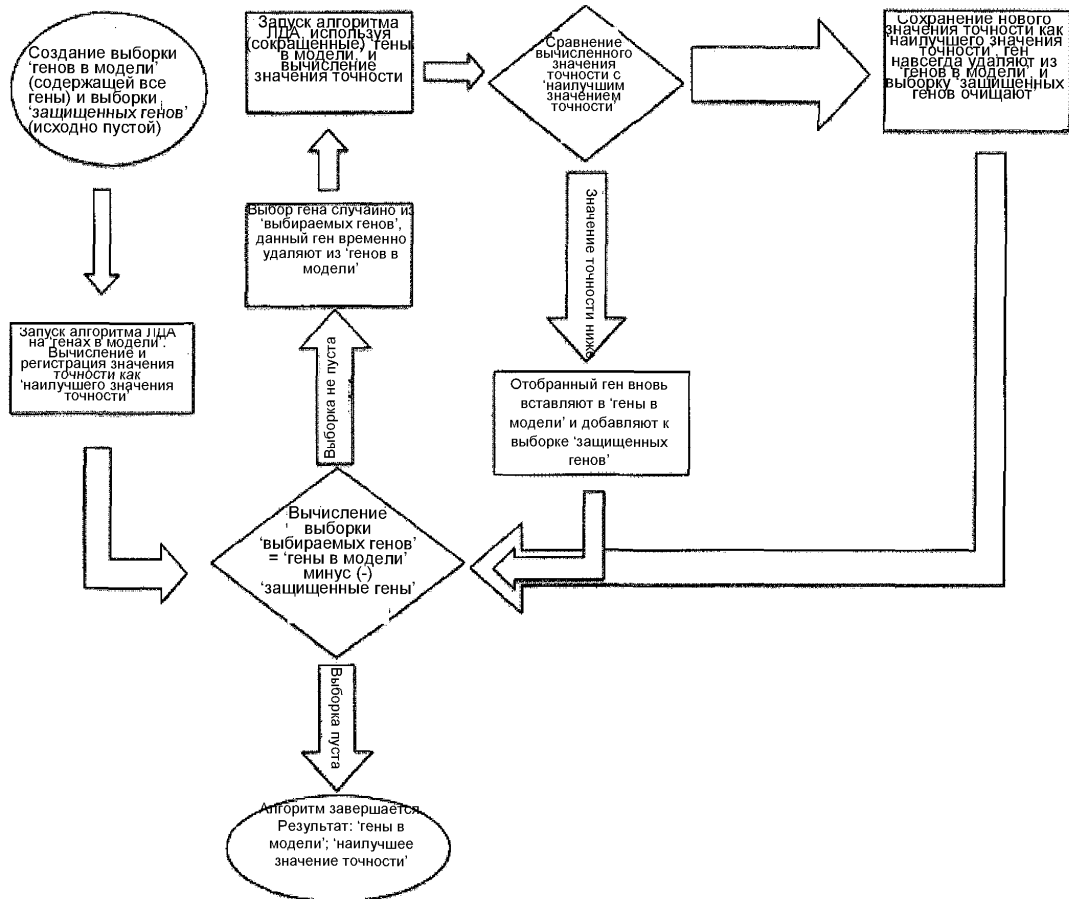
стадию сравнения уровня экспрессии указанных генов с референсными значениями, полученными от групп пациентов, отвечающих и не отвечающих на лечение, где результат сравнения уровня экспрессии указанных генов с указанными значениями экспрессии референсного гена указывает на то, что пациент будет отвечать или не будет отвечать на лечение,

где ингибитор TNF α представляет собой инфликсимаб.

2. Способ по п.1, где уровень экспрессии определяют путем количественного определения уровня мРНК указанных генов в образце крови.

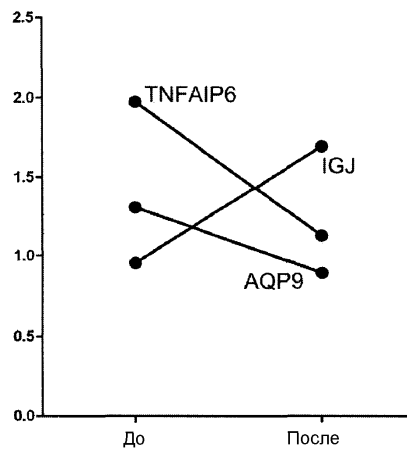


Фиг. 1

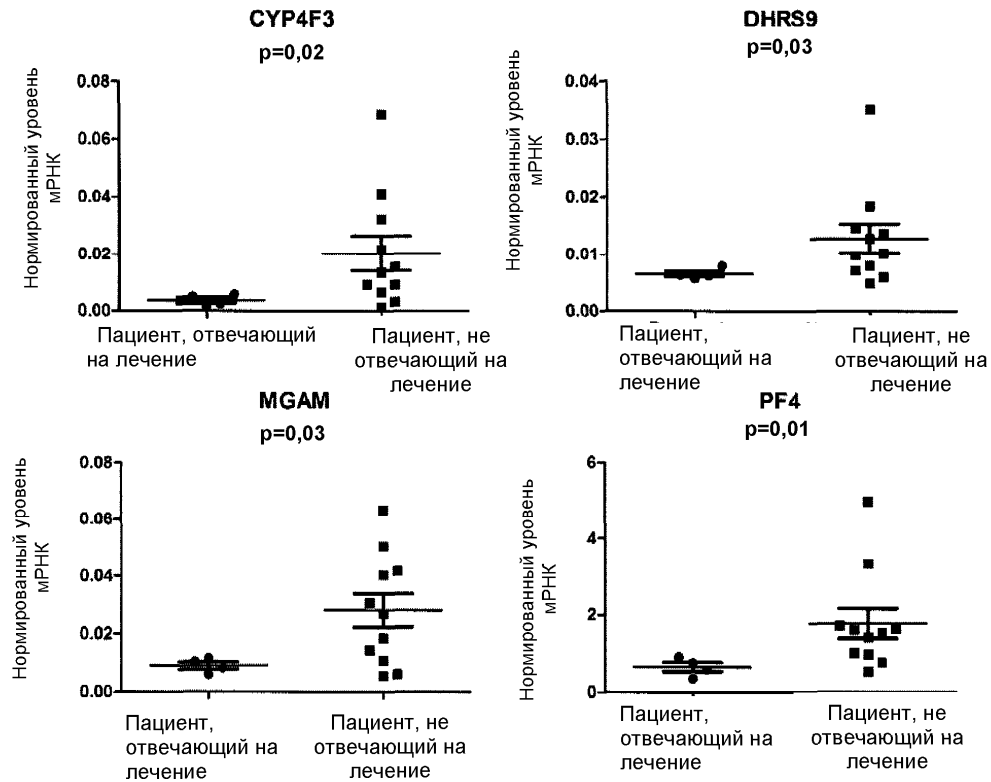


Фиг. 2

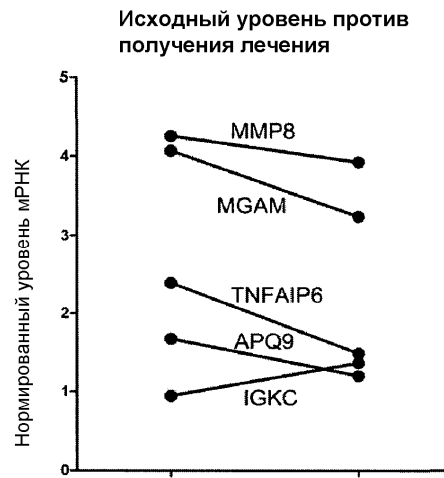
Исходный уровень против
получения лечения



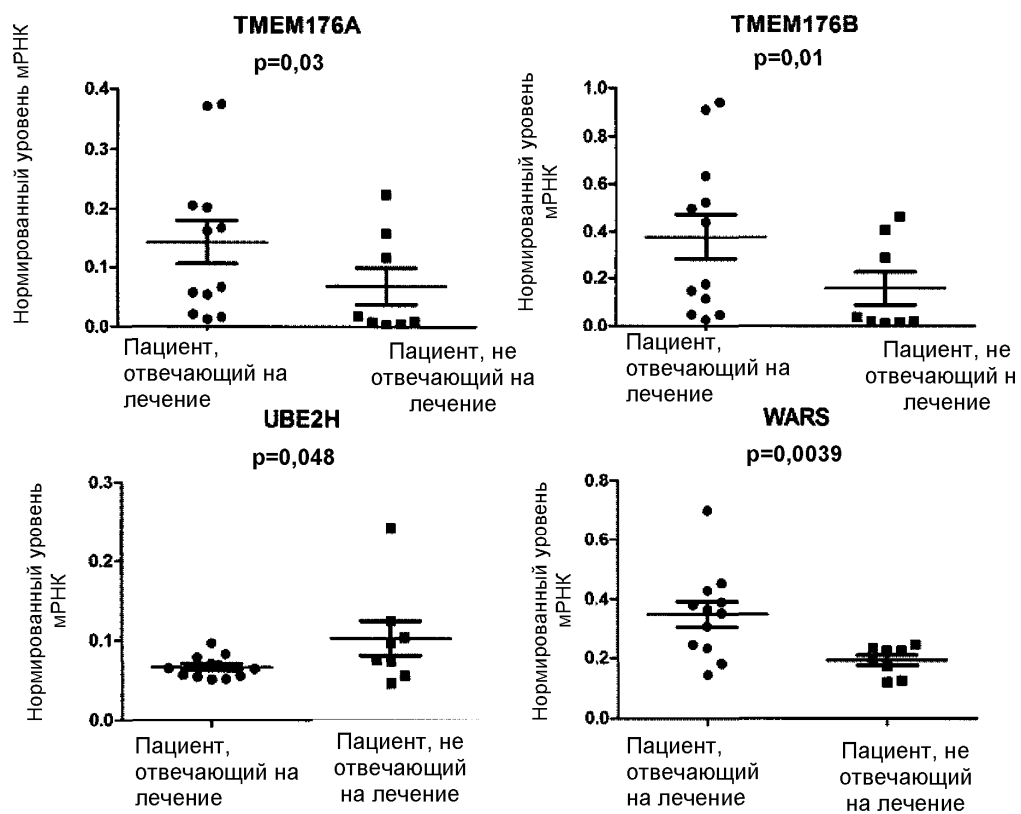
Фиг. 3



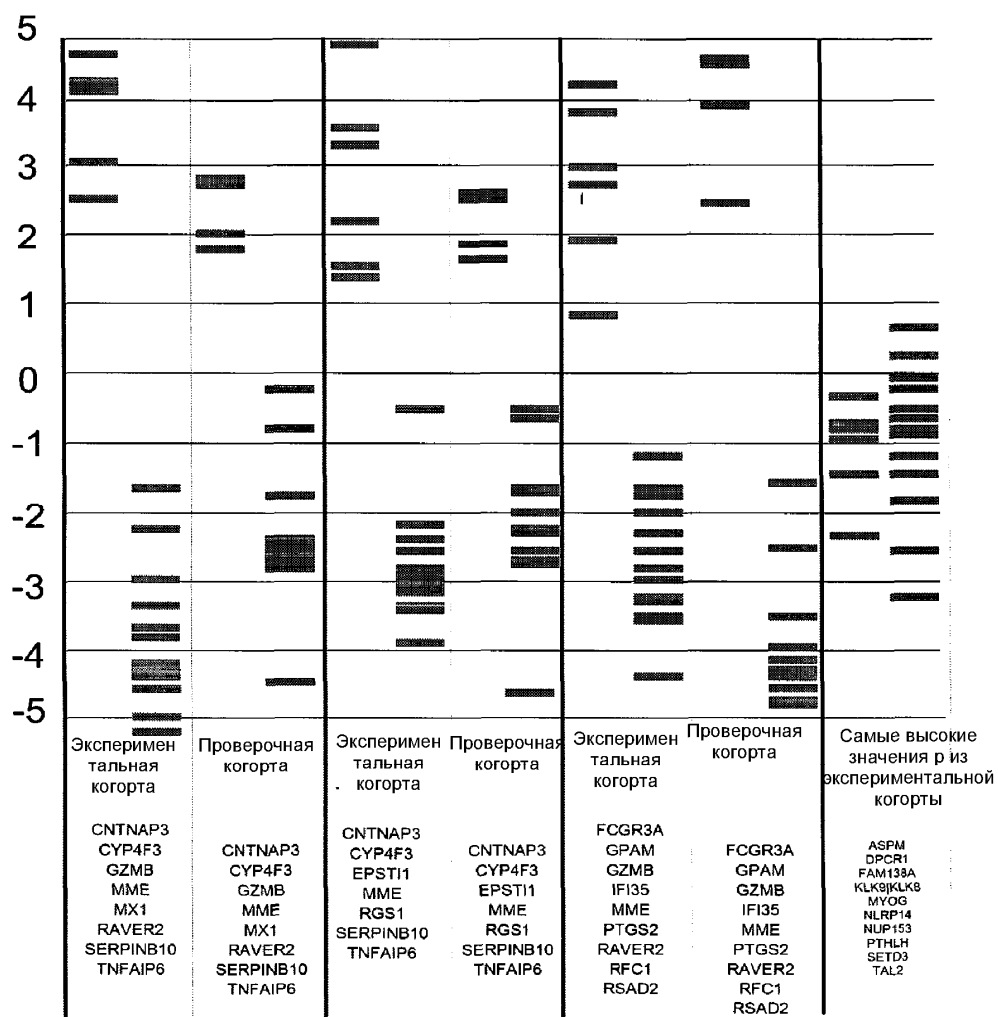
Фиг. 4



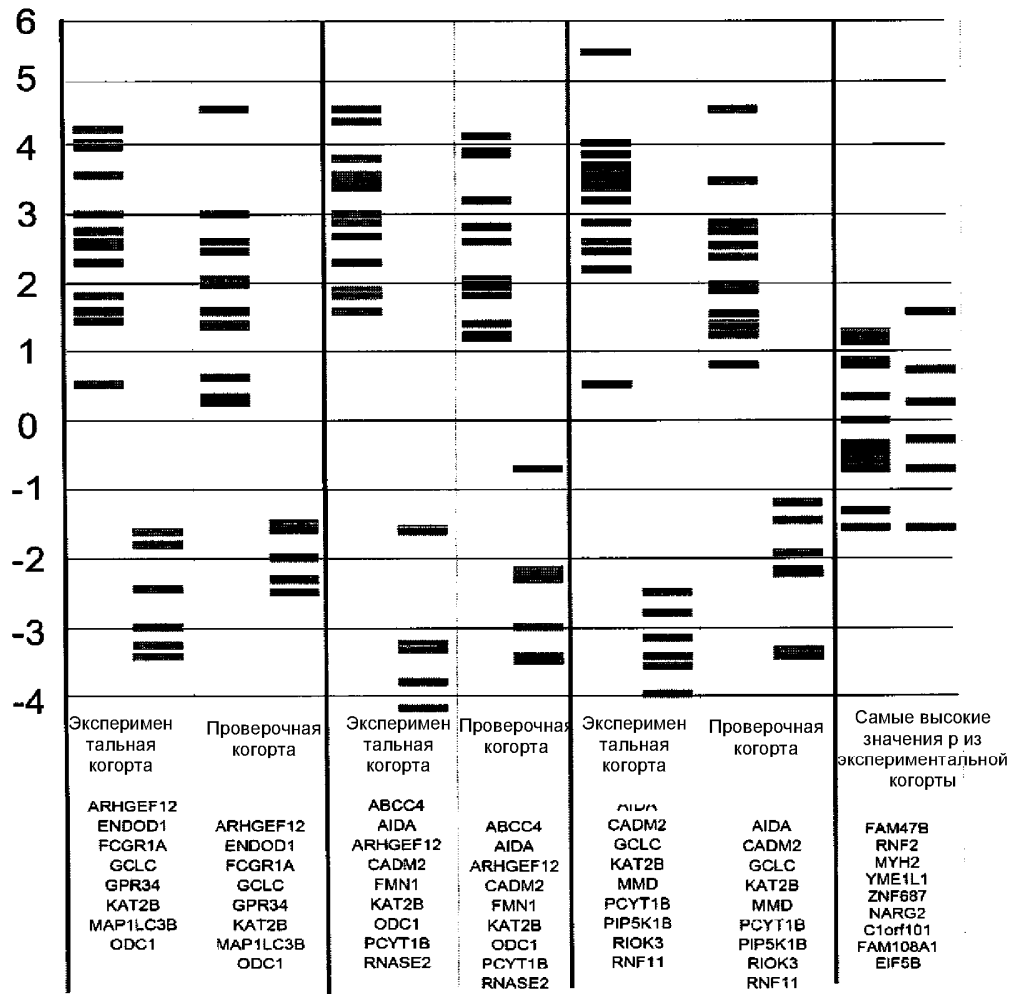
Фиг. 5



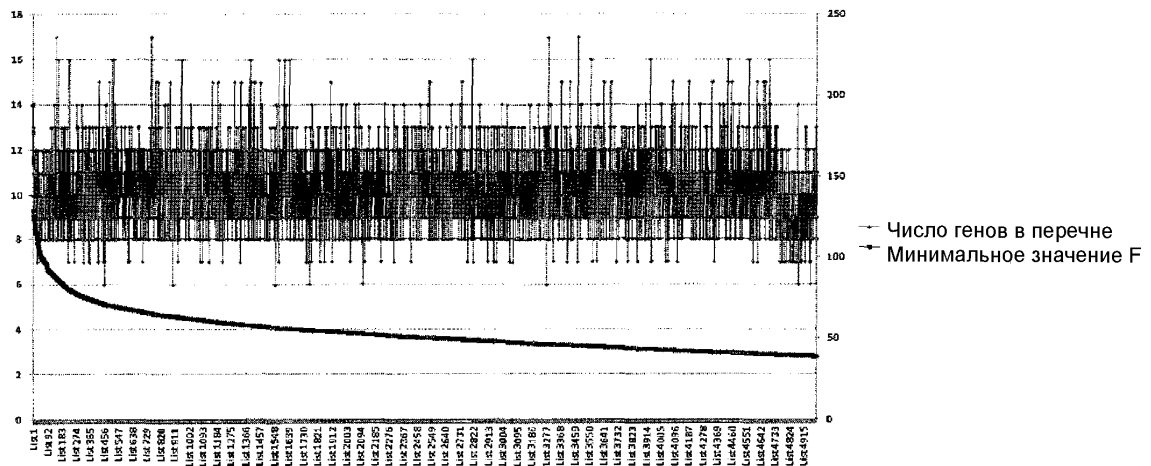
Фиг. 6



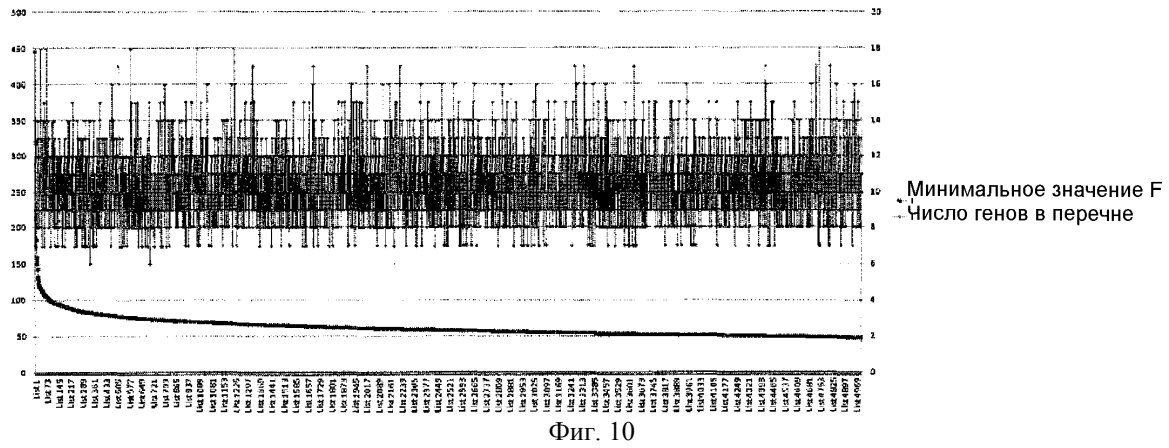
Фиг. 7



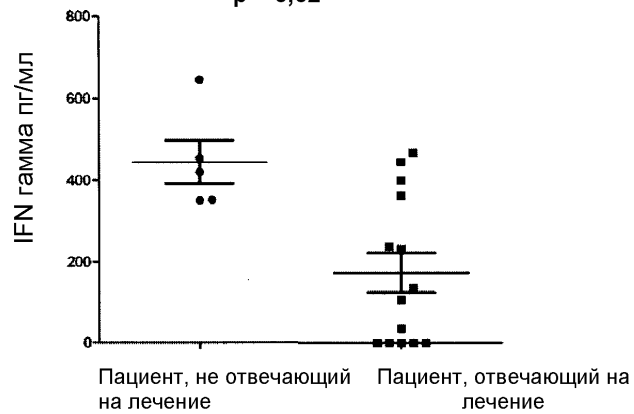
Фиг. 8



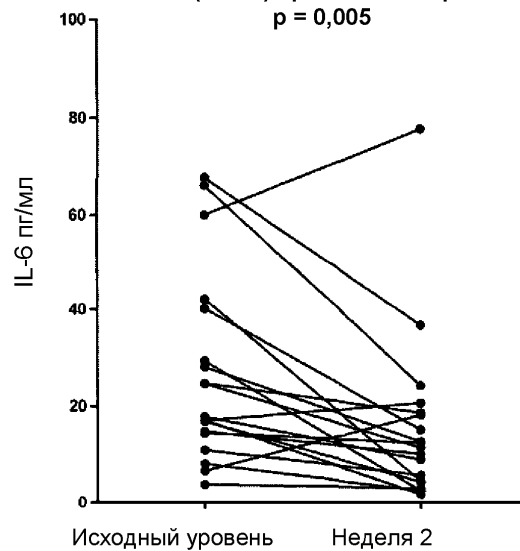
Фиг. 9

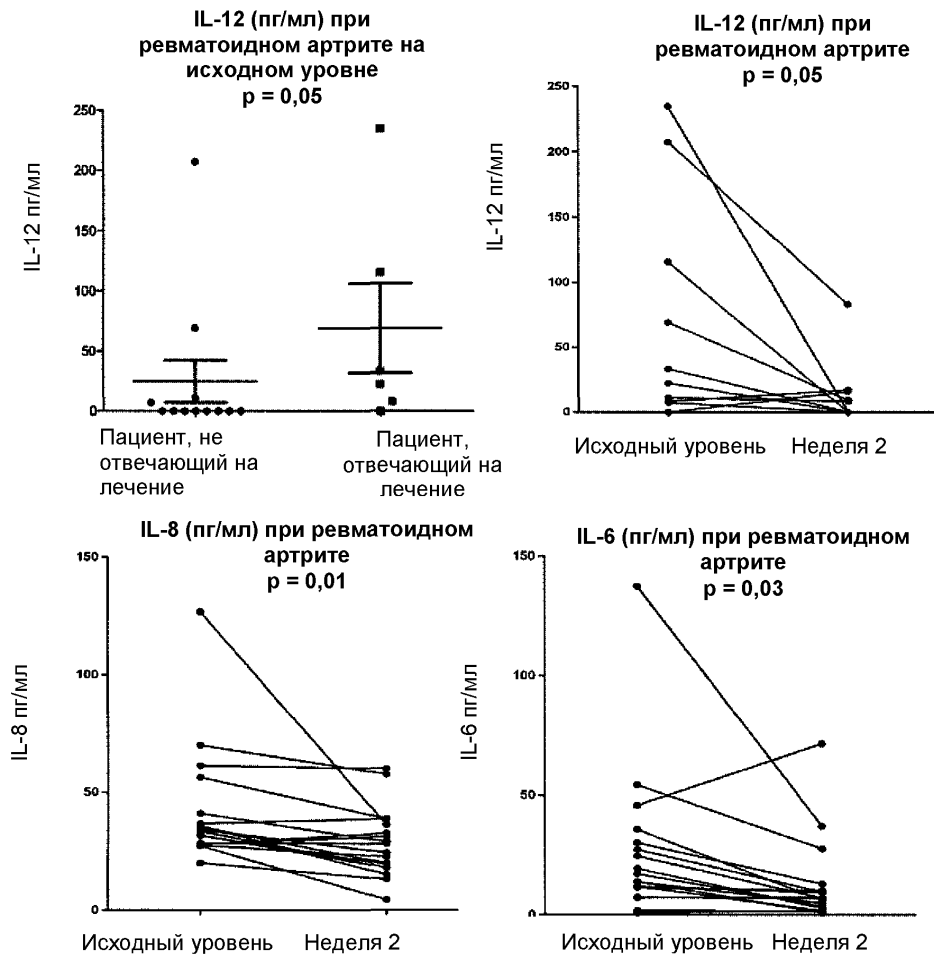


IFN гамма (пг/мл) при болезни Крона
на исходном уровне
 $p = 0,02$

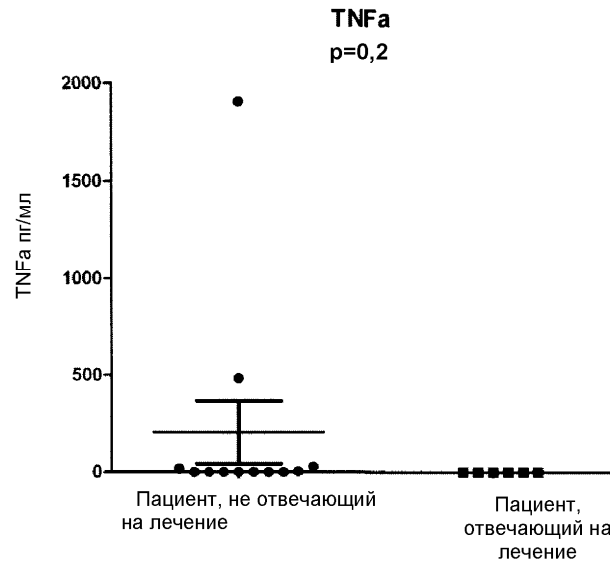


IL-6 (пг/мл) при болезни Крона
 $p = 0,005$

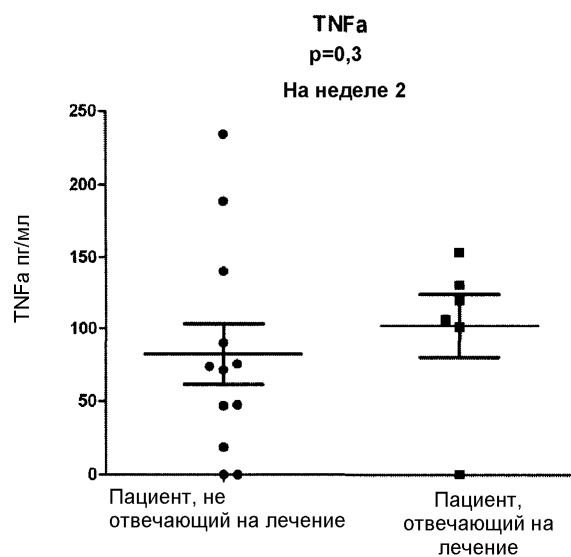




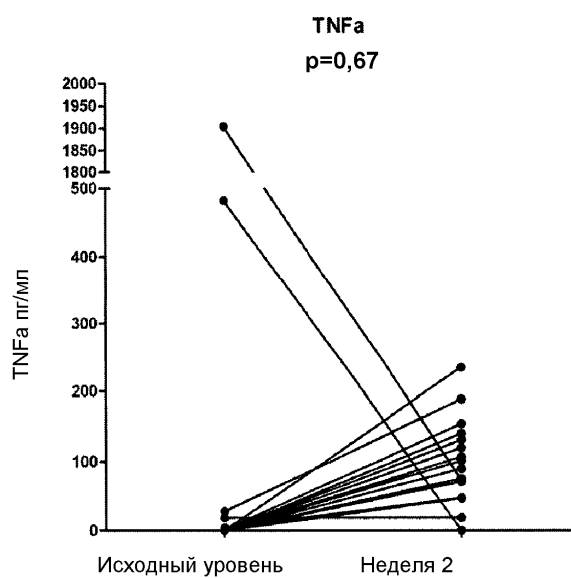
Фиг. 13



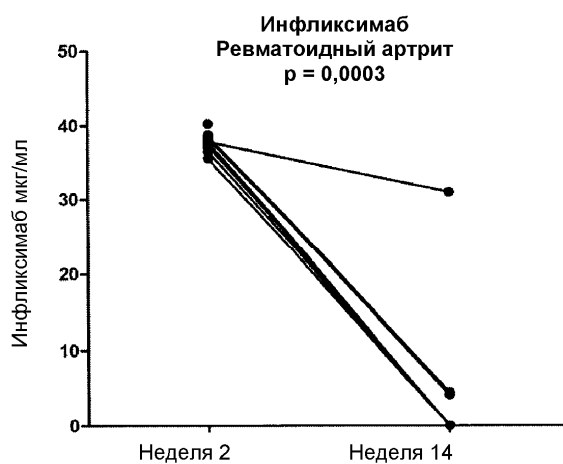
Фиг. 14



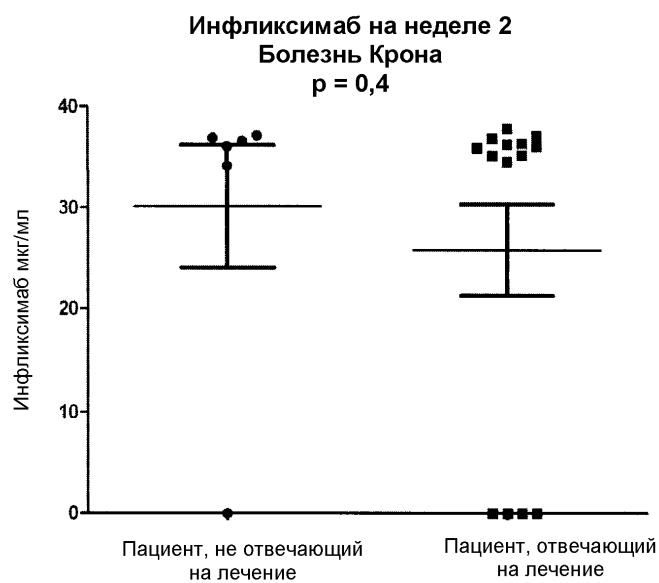
Фиг. 15



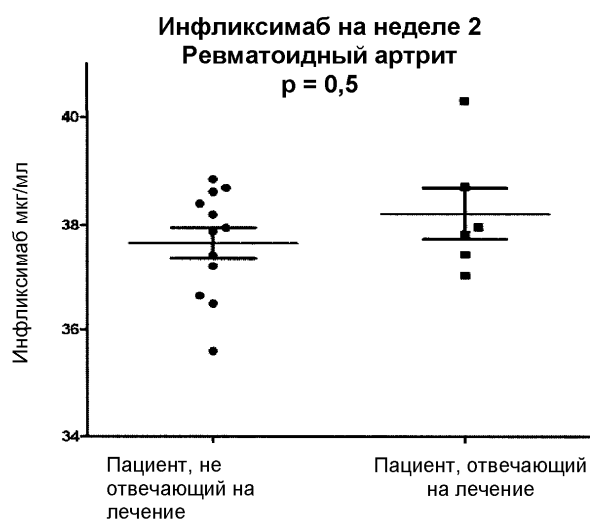
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2