

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900457** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.03.31

(51) Int. Cl. *G01N 33/86* (2006.01)
A61B 5/145 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.09.27

(54) **СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ЖЕНЩИН ПРИ НОСИТЕЛЬСТВЕ МУТАЦИЙ ГЕНА ПРОТРОМБИНА [F2(20210)GA]**

(96) 2019000110 (RU) 2019.09.27

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ "НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ"
МИНЗДРАВА РОССИИ) (RU)**

(72) Изобретатель:
**Николаева Мария Геннадьевна,
Момот Андрей Павлович, Ясафова
Наталья Николаевна, Момот Ксения
Андреевна, Тараненко Ирина
Алексеевна, Зайнулина Марина
Сабировна (RU)**

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к лабораторной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования тромбоэмболических осложнений у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA] по определению активности фактора протромбина для формирования групп риска, нуждающихся в проведении антикоагулянтной профилактики. Описан способ прогнозирования развития тромбоэмболических осложнений у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA], отличающийся тем, что определяют активность протромбина, и при его значении 174,8% и выше прогнозируют риск развития ВТЭО. Заявляемый способ обладает высокой точностью, является высокоинформативным и позволяет формировать группу риска по развитию тромбозов до появления первых клинических симптомов и назначить персонализированную медикаментозную профилактику для уменьшения риска развития тромбоэмболии легочной артерии и связанной с ней инвалидизации и летальности.

A1

201900457

201900457

A1

Способ прогнозирования тромбоемболических осложнений у женщин,
при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA]

Изобретение относится к медицине, в частности к лабораторной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования венозных тромбоемболических осложнений (ВТЭО) у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA], по определению активности протромбина для формирования группы риска, нуждающихся в проведении антикоагулянтной профилактики.

Венозные тромбоемболические осложнения остаются одной из важных проблем клинической медицины. Несмотря на значительные достижения в области клинической практике и фармакологии эти заболевания по-прежнему остаются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения в развитых странах и представляют глобальную медико-социальную проблему.

Мутация гена протромбина [F2(20210)GA] встречается у 2-5% населения, увеличивая риск развития венозного тромбоза в 3 – 4 раза. Однако в настоящее время нет точных и объективных лабораторных критериев для отбора женщин с мутацией гена протромбина [F2(20210)GA] в группу риска развития ВТЭО, нуждающихся в персонализированной гепаринопрофилактике для предупреждения тромбозов.

Известен способ прогнозирования возникновения венозного тромбоза и тромбоемболии легочной артерии (Патент Казахстана № 17498, 14.07.2006). Сущность изобретения состоит в том, при исследовании крови выделяют ДНК, проводят анализ полиморфизма длины рестрикции фрагментов ДНК и, при выявлении мутации фактора 5 Лейден в гене F5 и/или мутации фактора F2 в гене протромбина, прогнозируют возникновение венозного тромбоза и тромбоемболии легочной артерии.

Недостатком известного способа является то, что он позволяет выявить лиц с наследственной предрасположенностью к венозным тромбозам, но не обеспечивает прогнозирование развития тромбоза в выделенной когорте.

Известен способ прогнозирования тромбоза в коронарном стенте при чрескожном коронарном вмешательстве у больных ишемической болезнью сердца (Патент РФ №218.016.7535; 26.07.2018), заключающийся в том, что у больного определяют содержание креатинфосфокиназы (КФК), протромбиновый индекс (ПТИ), активированное время рекальцификации (ABP). Полученные результаты обследования подставляют в математическую модель прогнозирования риска развития тромбоза в коронарном стенте: $p=1/(1+e^{ПТИ*0,06-0,076*КФК*-0,013*ABP+1,5})\cdot 100$.

Недостатком известного способа является определение прогностического показателя для развития тромбоза у ограниченного круга лиц, страдающих ишемической болезнью сердца с плановым стентированием коронарных сосудов. Данный способ позволяет прогнозировать осложнение уже имеющейся болезни, а не проводить первичную стратификацию пациентов и возможную профилактику.

Известен способ прогнозирования развития тромбоза (Патент СССР №1634249; 15.03.1991), заключающийся в том, что определяют отношение разницы максимальных амплитуд записанных тромбоэластограмм к разнице между исходным количеством тромбоцитов и количеством тромбоцитов после повторного центрифугирования. При увеличении этого показателя в 1,5 раза по отношению с контролем прогнозируют развитие тромбоза в 71% случаев.

Недостатком известного способа является использование дорогостоящего оборудования, трудоемкость процедуры.

Наиболее близким по достигаемому техническому результату (прототипом) является способ прогнозирования развития тромбоза глубоких вен голени путем определения экспрессии ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) (Китай; 2018) [Tang J., Zhu W., Mei X., Zhang Z.

(2018) Plasminogen activator inhibitor-1: a risk factor for deep vein thrombosis after total hip arthroplasty. J. Orthop. Surg. Res., 13(1):8]. Показано, что при медиане показателя PAI-1 $32,1 \pm 12,5$ ng/ml, риск венозного тромбоза увеличивается в 1,18 раза (OR 1,18, 95% DI 1,04–1,29; $p=0,011$).

Недостатком известного способа является его невысокая точность.

Авторы предлагают простой, доступный способ прогнозирования ВТЭО, обладающий высокой точностью у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA]. Способ прогнозирования развития тромбоэмболических осложнений у женщин, при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA] заключается в том, что определяют активность протромбина, и при его значении 174,8% и выше прогнозируют риск развития ВТЭО.

Данный способ позволяет сформировать группу риска по развитию тромбозов до появления первых клинических симптомов и назначить персонализированную медикаментозную профилактику для уменьшения риска развития тромбоэмболии легочной артерий и связанной с ней инвалидизацией и летальностью.

Техническим результатом заявляемого способа является повышение точности прогноза развития тромботических событий у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA], на основе установленной авторами активности протромбина с целью принятия решения о проведении антикоагулянтной профилактики.

Технический результат достигается тем, что, определяют активность протромбина (фактора II) путем использования дефицитной по субстрату плазмы.

Способ может быть осуществлен, например, следующим образом

Определяют время свертывания исследуемого образца бедной тромбоцитами плазмы в смеси, содержащей дефицитную по фактору II плазму, разведенную исследуемую плазму и реагент «Тромборель S».

Количественное определение активности коагуляционного фактора II выполняют по графику зависимости активности фактора II (в %) от протромбинового времени свертывания.

Оборудование, материалы, реагенты

- В соответствии с инструкцией к применяемому набору реагентов использовать автоматический или полуавтоматический коагулометр;
- Плазма субстратная с дефицитом фактора II (каталожный номер 5190). Лиофильно высушенная плазма крови человека, уровень фактора II в которой не выше 1%;
- Тромборель S (каталожный номер OUNP49). Лиофильно высушенная тромбопласти — кальциевая смесь из кроличьего мозга;
- Физиологический раствор 0,9% NaCl;
- Контрольная плазма (пулированная от 25 доноров лиофильно высушенная плазма крови человека с известным содержанием фактора II);
- Дистиллированная вода.

Приготовление анализируемых образцов

Кровь для исследования забирают утром, натощак, из локтевой вены в пробирки “VACUETTE” 9 мл, содержащие 3,8% раствор цитрата натрия, соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 минут, в результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Центрифугирование обычно проводится непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы крови, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 часов назад. Перед проведением анализа все исследуемые образцы развести 0,9% физиологическим раствором NaCl в 5 раз (0,1 мл образца + 0,4 мл физиологического раствора).

Приготовление реагентов и проведение анализа

1. Подготовка реагентов к работе

1.1. Разведение дефицитной по фактору II плазмы

Во флакон с дефицитной по фактору II плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °С) и легком покачивании (избегая образования пены) в течение 3 мин. Разведенную плазму перед исследованием выдержать не менее 25 - 30 мин при комнатной температуре.

1.2. Приготовление реагента Тромборель S

В один флакон с реагентом Тромборель S внести 2,0 мл дистиллированной воды. Флакон встряхнуть и выдержать при +37 °С (на водяной бане) в течение 20 минут. Перед каждым определением разведенный реагент перемешать во избежание выпадения осадка.

1.3. Разведение контрольной плазмы

Во флакон с контрольной плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °С) в течение 3 минут. Перед использованием контрольная плазма должна быть выдержана при комнатной температуре в течение 15 минут.

1.4. Приготовление разведений для построения калибровочного графика представлено в таблице 1.

Таблица. 1 Схема разведений калибровочного образца для построения контрольного графика.

Пробирка, №	1	2	3	4
Физиологический раствор 0,9% NaCl, мл	0,9	0,5	1,6	0,9
Контрольная плазма с аттестованным значением активности фактора II (100 %)	0,1 мл	-//-	-//-	-//-
Перемешать и перенести в другую пробирку	▼ ↳0,5мл=	▲▼ ↳0,4мл	▲▼ ↳0,1мл	▲
Получаемое разведение	1:10	1:20	1:100	1:1000
Активность фактора II	100 %	50 %	10 %	1%

1.5. Построение калибровочной кривой

Для каждого разведения контрольной плазмы выполнить определения дважды, средний результат отметить на калибровочной кривой. На оси Y отложить время свертывания каждого разведенного образца контрольной плазмы в секундах, на оси X – соответствующее значение активности коагуляционного фактора в процентах, %. Через полученные точки провести калибровочный график, который в билогарифмических координатах должен представлять собой прямую линию в диапазоне активности фактора II от 1 до 100%.

2. Проведение анализа

2.1. Мануальный вариант:

2.1.1. К 0,1 мл разведенной в 5 раз исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл разведенной дефицитной по фактору II плазмы.

2.1.2. Инкубировать при температуре +37 °С в течение 1 минуты.

2.1.3. Добавить 0,2 мл разведенного реагента Тромборель S, имеющего температуру +37 °С, и включить секундомер. Зарегистрировать время свертывания.

2.1.4. Используя калибровочную кривую, найти активность фактора II. Если время коагуляции исследуемой плазмы соответствует активности фактора II менее 100%, например, только 95%, результат, считанный с кривой, умножается на 0,95. В случае времени коагуляции, которое соответствует содержанию фактора коагуляции более 100%, требуются дополнительные определения с использованием более высоких разведений исследуемой плазмы (например, в 10 раз). В этом случае полученный результат в % должен быть умножен на коэффициент, соответствующий разведению; например, для разведения в 10 раз результат умножается на 2.

2.2. Коагулометрический вариант:

Исследование плазмы крови проводится на коагулометрах с механическим или оптическим (например, Siemens BCS XP) принципом регистрации результатов.

- 2.2.1. Выбрать на коагулометре программу для определения активности фактора II одностадийным клоттинговым методом;
- 2.2.2. Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра ;
- 2.2.3 Запустить программу построения калибровочной прямой (для каждой новой серии реагентов);
- 2.2.4 Поместить в кювету коагулометра контрольные и исследуемые образцы плазмы;
- 2.2.5 Запустить программу измерения;
- 2.2.6 Считать результаты.

Чтение результатов

Активность протромбина (фактора II) выражается в международных единицах (ME) или в процентах, причем 1ME/мл соответствует 100% активности. У здоровых пациентов, без носительства мутации гена протромбина, генотип [F2(20210)GG], активность протромбина (фактора II) составляет 70 - 120% [Fickenscher K. Analysis of individual coagulation factor. In: Thomas L, ed. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998: 607-9]. Референтные интервалы варьируются и зависят от исследуемой популяции, используемой техники, методов, оборудования и партии реагентов. Апробация заявляемого способа прогнозирования тромботических событий при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA].

Апробация заявляемого способа проведена на 140 пациентках, включенных в базу данных «Носители мутации протромбина [F2(G20210A)] на территории России» (Свидетельство №2018621494 от 19.09.2018) с установленным носительством мутации гена протромбина [F2(20210)GA].

Всем пациенткам проводилось исследование показателя активности протромбина один раз в три месяца. У 32 (22,8% от 140) пациенток при динамическом наблюдении развился эпизод ВТЭО, при этом медиана показателя активности протромбина за две недели до тромбоза составляла 178,2% (95%CI 170,4-204,6%), что достоверно больше ($p < 0,0001$), чем у пациенток без тромботического события - 148,8% (95%CI 145,3-156,9%).

Изобретение иллюстрируется фигурой 1, на которой изображена ROC-кривая, определяющая критический порог отсечки активности протромбина (%) и построенная при анализе чувствительности и специфичности у пациенток с развитием тромбоза при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA]. Площадь под кривой (AUC) у показателя активности протромбина 174,8% составляет 0,904 (95CI 0,825-0,955) при уровне значимости (p-level) $p < 0,0001$. Чувствительность предиктора – 81,8, специфичность – 91,5.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что заявляемый способ прогнозирования тромбоэмболического осложнения у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA], при активности протромбина 174,8% обеспечивает точность прогноза в 90,4% случаев (табл. 2)

Клинические примеры.

1. Пациентка В.Ю.А., 28 лет. Наблюдалась у гематолога в Алтайском филиале ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии». В анамнезе одни преждевременные роды в 33-34 недели, вторичное бесплодие 2 года. На этапе планирования беременности при обследовании выявлено носительство мутации гена протромбина [F2(20210)GA]. При очередном диспансерном наблюдении определена активность протромбина 198,2%. Через 3 дня после визита к гематологу пациентка заболела ОРВИ средней тяжести с гектической лихорадкой, выраженными симптомами интоксикации. Эпизод тромбоза реализовался на

этапе выздоровления (8 сутки от начала заболевания), с локализацией тромба в области глубоких вен голени. Пациентка госпитализирована в отделение сосудистой хирургии.

2. Пациентка Ч.О.Н., 32 года. Наблюдалась в центре сохранения и восстановления репродуктивной функции Алтайской краевой клинической больницы с диагнозом: первичное бесплодие в течение 8 лет. На этапе обследования выявлено носительство мутации гена протромбина [F2(20210)GA], с активностью протромбина 185,7%. В процессе подготовки к проведению протокола вспомогательных репродуктивных технологий выполнено исследование проходимости маточных труб (гистеросальпингография). На вторые сутки после проведения процедуры госпитализирована в отделение сосудистой хирургии с острым тромбозом подвздошно-подколенно-бедренного сегмента. В процессе лечения пациентке был имплантирован кава-фильтр

3. Пациентка Г.И.Г., 34 года. Наблюдалась в городском центре планирования семьи и репродукции на специализированном приеме по невынашиванию беременности. В анамнезе две неразвивающиеся беременности при сроке гестации 7-8 недель. На этапе планирования беременности при обследовании выявлено носительством мутации гена протромбина [F2(20210)GA], с активностью протромбина 187,2%. Без согласования с гематологом с целью регуляции менструального цикла пациентке были назначены эстрогенсодержащие комбинированные контрацептивы. После приема 13 таблетки у пациентки диагностирована тромбоэмболия легочных артерий.

4. Пациентка М.Н.В., 36 года. Наблюдалась в центре сохранения и восстановления репродуктивной функции Алтайской краевой клинической больницы с диагнозом: вторичное бесплодие в течение 5 лет. На этапе планирования беременности при обследовании выявлено носительством мутации гена протромбина [F2(20210)GA], с активностью протромбина

155,4%. Согласно индивидуальному плану ведения пациентке выполнена гинекологическая операция – лапароскопия эндометриоидных кист яичников. Течение послеоперационного периода благоприятное. В качестве профилактики ВТЭО использовались градуированные компрессионный трикотаж.

Таким образом, заявляемый способ прогнозирования ВТЭО у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA] по определению активности протромбина обладает высокой точностью, является высокоинформативным и позволяет формировать группу риска по развитию ВТЭО для проведения персонифицированной медикаментозной профилактики и терапии для уменьшения риска развития тромбоза легочной артерии

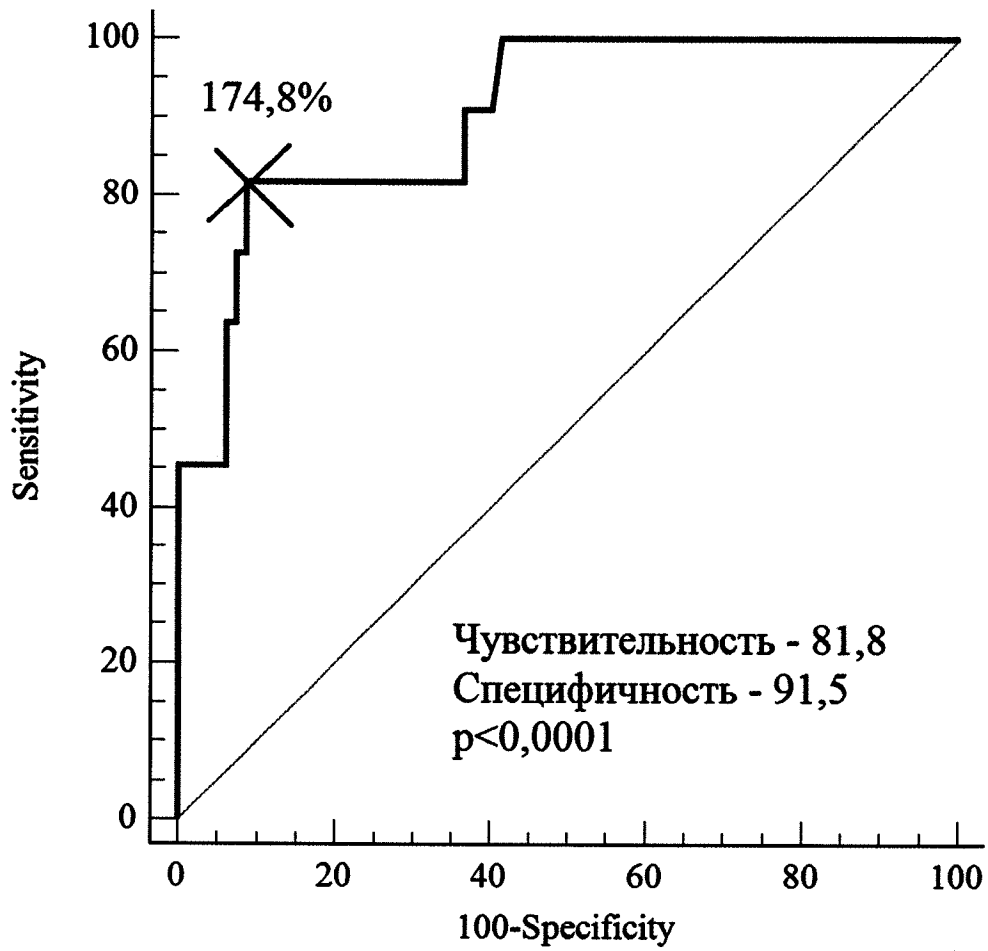
Таблица 2

Показатель	Количество обследованных
Всего женщин	140
истинно положительный результат	32
ложноположительный результат	2
истинно отрицательный результат	103
ложноотрицательный результат	3
Итого: точность заявленного способа – 90,4% чувствительность заявленного способа – 81,8% специфичность заявленного способа – 91,5%	

Формула изобретения

Способ прогнозирования развития тромбоэмболических осложнений у женщин, при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA], отличающийся тем, что определяют активность протромбина, и при его значении 174,8% и выше прогнозируют риск развития ВТЭО.

Способ прогнозирования тромбоэмболического осложнения
у женщин при носительстве мутации
гена протромбина [F2(20210)GA]



Фигура 1

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900457

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

G01N 33/86 (2006.01)
A61B 5/145 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
G01N 33/00, 33/48, 33/86, A61B 5/145, 5/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) Google, Embase, EAPATIS, Espasenet, Patentscope, RUPTO, Prothrombin, PT, Prottime, INR, International normalized ratio, venous thromboembolism, gene mutation 20210, Протромбин, протромбиновый индекс, активности фактора II (F2), венозные тромбозы, Мутация гена протромбина 20210 (rs1799963)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ADETOLA F LOIS-JACQUES et al. Prenatal Screening for Thrombophilias: Indications and Controversies, an Update// Clin Lab Med, 2016 Jun;36(2):421-34, реферат, раздел «Prothrombin Gene (G20210A)», табл2	1
Y	WO2012171949 A2 (GENDIAG EXE S L), 20.12.2012, реферат, описание с.7	1
Y	Т.В. ВАВИЛОВА. Лабораторные исследования системы гемостаза и поиск причин тромбозмболических осложнений// Новости хирургии, с. 145-155, реферат, с.148 правая колонка 7 абзац- с. 149 левая колонка 3 абзац, с. 149 раздел «Протромбиновое время», с.154 раздел «Молекулярно-генетические исследования»	1
A	RU 2652894 C1 (ФГБОУ ВО РязГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ), 03.05.2018, описание	1
A	UA 67672 A (ДОНЕЦКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ им. М.ГОРЬКОГО), 15.06.2004	1

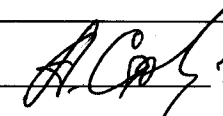
последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **20/05/2020**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины

 А.В.Чебан