



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118658** (13) **C2**
(51) МПК
C12Q 1/68 (2018.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

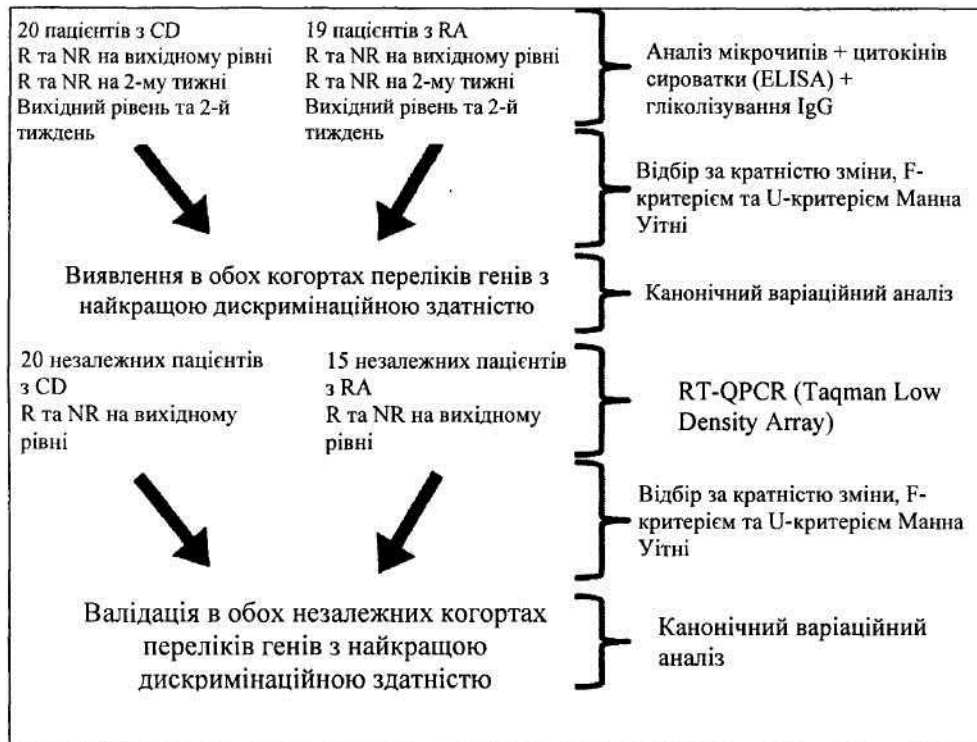
(21) Номер заявки:	а 2015 04849	(72) Винахідник(и):	Надь Ласло (HU), Мєшко Берталан (HU), Штєінер Ласло (HU), Захуцкі Габор (HU), Холло Жолт (HU)
(22) Дата подання заявки:	18.10.2013	(73) Власник(и):	ЕГІШ ДЬОДЬСЗЕРДЬЯР ЗРТ., Keresztúri út 30-38., 1106 Budapest, Hungary (HU)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.02.2019	(74) Представник:	Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	P1200607	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	EP 1857559 A1, 21.11.2007 WO 2012/061620 A1, 10.05.2012 ANTONIO JULIÀ ET AL, "An Eight-Gene Blood Expression Profile Predicts the Response to Infliximab in Rheumatoid Arthritis", PLOS ONE, vol. 4, no. 10, 01.01.2009, page e7556 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, 03.07.2006, page R105 WO 2008/132176 A2, 06.11.2008 WO 2004/091657 A2, 28.10.2004
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	19.10.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	HU		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.09.2015, Бюл.№ 18		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.02.2019, Бюл.№ 4		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/HU2013/000101, 18.10.2013		

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПРОГНОЗУ ВІДПОВІДІ НА ІНГІБІТОР TNF α

(57) Реферат:

Винахід стосується способу *in vitro* прогнозування того, чи відповідатиме пацієнт, який має ревматоїдний артрит, на лікування інгібітором TNF α , при цьому спосіб включає визначення рівня експресії генів CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVR2, SERPINB10 та TNFAIP6 або рівня експресії генів CNTNAP3, CYP4F3, EPSTI1, MME, RGS1, SERP1NB10 та TNFAIP6, або рівня експресії генів FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVR2, RFC1 та RSAD2, в зразку крові згаданого пацієнта.

UA 118658 C2



Фігура 1

Область винаходу

Даний винахід відноситься до області способів діагностики. Розкриті нові способи *in vitro* прогнозування того, чи відповідатиме пацієнт на лікування інгібітором TNF α .

Передумови винаходу

5 Фактор некрозу пухлин (TNF) активує запальну відповідь, яка в свою чергу викликає багато клінічних проблем, пов'язаних з аутоімунними розладами, такими як ревматоїдний артрит, анкілозуючий спондиліт, хвороба Крона, псоріаз, гнійний гідраденіт та рефрактерна астма. Ці розлади іноді лікуються за допомогою інгібітору TNF.

10 Ревматоїдний артрит (RA) вважається хронічним системним запальним аутоімунним розладом, який може пошкоджувати багато тканин та органів, однак, в основному вражає рухомі суглоби. RA являє собою болісний та часто інвалідизуючий стан, який може призвести до втрати рухомості. В той же час хвороба Крона являє собою тип запальної хвороби кишечника (IBD), яка може пошкоджувати будь-яку частину кишково-шлункового тракту від рота до анального отвору, призводячи до безлічі симптомів. Вона переважно викликає біль в животі, діарею, блювоту або втрату ваги, однак, також може викликати ускладнення за межами кишково-шлункового тракту.

20 Види лікування, що доступні на даний час для вищезгаданих захворювань, засновані на популяціях пацієнтів в цілому. Як результат, відомі види лікування можуть призводити до проходження певних пацієнтів крізь неефективні види лікування до виявлення ефективної терапії. Таким чином, існує необхідність в персоналізованій медицині для кращого лікування пов'язаних з TNF-альфа захворювань (наприклад, RA або IBD) та виявлення варіантів ефективного лікування для того чи іншого пацієнта.

25 У EP 1857559 розкривають *in vitro* спосіб прогнозування того, чи відповідатиме пацієнт на лікування блокуючим TNF α засобом, при цьому спосіб включає визначення рівня експресії восьми генів в біологічному зразку пацієнта, де згаданими генами є EPS 15, HLA-DPB1, AKAP9, RASGRP3, MTCBP-1, PTNP12, MRPL22 та RPS28.

30 У WO 2011/097301 розкривають спосіб прогнозування реакції відповіді суб'єкта, хворого на ревматоїдний артрит (RA), на лікування інгібітором TNF α , при цьому спосіб включає визначення наявності алеля спільного епітопу HLA-DRB 1 (HLA-DRB 1 SE) в зразку від суб'єкта, де наявність щонайменше однієї копії алеля HLA-DRB1 SE вказує на те, що суб'єкт відповідатиме на лікування інгібітором TNF α .

35 Незважаючи на той факт, що WO 2011/097301 та EP 1857 559 розкривають способи прогнозування реакції відповіді на лікування інгібітором TNF-альфа, залишається необхідність для додаткових більш ефективних та точних способів визначення того, чи відповідатиме пацієнт, який має пов'язане з TNF-альфа захворювання, на різні варіанти лікування.

Короткий опис винаходу

40 До кінця 2010 р. більш ніж 2000000 пацієнтів у всьому світі отримали, окрім іншого, лікування біологічними блокаторами TNF α , такими як інфліксимаб, адалімумаб та етанерцепт, при станах, таких як ревматоїдний артрит (RA) або хвороба Крона (CD), однак, ефективність їх є різною (M.P. Karampetsou et al., QJM (2010) 103 (12): 917-928.).

45 Основну проблему терапії моноклональними антитілами (mAb) при хронічних запальних захворюваннях можна сумарно визначити за допомогою висновків двох останніх публікацій. 1) Значний відсоток, приблизно 30 % пацієнтів з RA, не відповідають на біологічну терапію (Van Baarsen et al., Genes and Immunity 11,622-629). 2) Результати декількох великих досліджень, які приділяють увагу видам терапії при аутоімунних захворюваннях, також вказують, що ефективність може знижуватися після проходження лікування другим інгібітором TNF (Rubbett-Roth et al., Arthritis Research & Therapy 2009).

50 Таким чином, прогнозування того, чи пацієнт відповідатиме на терапію перед першим або другим вибором терапії, є незадоволеною потребою в клінічних умовах та мало б великий вплив на використання цих лікарських препаратів, роблячи лікування більш економічно ефективним та пропонуючи пацієнтам можливість отримання персоналізованої терапії.

55 Спосіб даного винаходу заснований на використанні алгоритму, що базується на біоінформатиці, для визначення наборів генів, профілі комбінованої експресії яких дозволяють розмежування пацієнтів, які відповідають, та пацієнтів, які не відповідають на лікування інгібітором TNF α .

60 Зокрема, для вирішення вищезгаданої проблеми автори даного винаходу розробили *in vitro* спосіб прогнозування того, чи відповідатиме пацієнт на лікування інгібітором TNF α , при цьому спосіб включає визначення в біологічному зразку згаданого пацієнта рівня експресії щонайменше 6 генів, обраних з генів 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 або з 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. Відповідно до переважного варіанту здійснення відносний рівень експресії обраних генів визначається порівняно з геном домашнього господарства. Переважно згаданим геном домашнього господарства є ген циклофіліну, більш переважно, ген циклофіліну А (PPIA). Переважно згаданим біологічним зразком є периферична кров, більш переважно рівень експресії визначається в мононуклеарних клітинах периферичної крові (PBMC).

Відповідно до першого переважного варіанту здійснення даного винаходу рівень експресії генів ELOVL7, IFI44L, IFIT1, IFIT3, MICA, OR2A9P та RAVR2 або рівень експресії генів APOBEC3A, IFI44, IFI44L, IFIT1, IFITM1, MICA та RGS1, або рівень експресії генів APOBEC3A, DHRS9, IFI35, IFI44, IFI44L, MICA та RFC1 визначається в згаданому біологічному зразку, переважно у пацієнта, який має ревматоїдний артрит.

Відповідно до другого переважного варіанту здійснення даного винаходу рівень експресії генів BMP6, CD300E, CYP1B1, ODC1, RNF11 та UBE2H або рівень експресії генів ARHGEF12, CADM2, CD300E, GCLC, RIOK3 та UBE2H або рівень експресії генів CADM2, CD300E, CYP1B1, MMD, ODC1, RNF11 та UBE2H визначається в згаданому біологічному зразку, переважно у пацієнта, який має запальну хворобу кишечника, наприклад, хворобу Крона.

Відповідно до третього переважного варіанту здійснення спосіб даного винаходу здійснюється для підтримки ефективності згаданого лікування інгібітором TNF α .

Відповідно до переважного варіанту здійснення даного винаходу згаданий інгібітор TNF α являє собою антитіло до TNF α , злитий білок TNF або рекомбінантний TNF-зв'язуючий білок, більш переважно згаданим інгібітором є адаліумаб, цертолізумаб пегол, етанерцепт, голіумаб, інфліксимаб, пегсунерцепт або будь-які варіанти їх біосимілярів, навіть більш переважно, згаданий інгібітор TNF α є інфліксимабом або будь-яким варіантом його біосиміляру.

В іншому аспекті спосіб даного винаходу також включає етап порівняння рівня експресії вищезгаданих генів з референтними величинами, отриманими в групах пацієнтів, які відповідають та не відповідають на лікування.

Переважно в способі даного винаходу рівень експресії визначається за допомогою кількісного визначення рівня мРНК згаданих генів в біологічному зразку. Для визначення рівня експресії згаданих генів особливо ефективними є технологія ДНК-мікрочипів та кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі зі зворотною транскрипцією (RT-QPCR).

Відповідно до додаткового переважного варіанту здійснення даного винаходу спосіб також включає етап визначення рівня біомаркерного білку. Переважно згаданий біомаркерний білок являє собою прозапальний цитокін, хемокін або антитіло до лікарського препарату.

Крім цього, даний винахід відноситься до інгібітору TNF α для використання в лікуванні пов'язаного з TNF α захворювання, при цьому пацієнт, який отримує лікування, був класифікований як особа, яка відповідає на лікування інгібітором TNF α відповідно до способу даного винаходу, переважно згаданим інгібітором TNF α є адаліумаб, цертолізумаб пегол, етанерцепт, голіумаб, інфліксимаб або пегсунерцепт.

Короткий опис графічних матеріалів

Фігура 1: Послідовність дій та дизайн дослідження даного винаходу.

Фігура 2: Схематичний шлях автоматичного створювання панелі генів.

Фігура 3: Нормалізовані рівні мРНК генів, які значуще змінюються в групах пацієнтів з ревматоїдним артритом (RA) до та після терапії (величини р для AQP9: 0,02, TNFAIP6: 0,028, IGJ: 0,012). Дані були розраховані на основі вимірювань мікрочипів.

Фігура 4: Нормалізовані рівні мРНК 4 генів, які, як було виявлено, статистично значуще змінюються відносно порівняння NR (особи, які не відповідають на лікування) з R (особи, які відповідають на лікування) при RA.

Фігура 5: Нормалізовані рівні мРНК генів, які значуще змінюються в групах пацієнтів з хворобою Крона (CD) до та після терапії (величини р для MMP8: 0,018, AQP9: 0,011, IGKC: 0,001, TNFAIP6: 0,005, MGAM: 0,011). Дані були розраховані на основі вимірювань мікрочипів.

Фігура 6: Нормалізовані рівні мРНК 4 генів, які, як було виявлено, статистично значуще змінюються відносно порівняння NR з R при CD.

Фігура 7: Перелік трьох генів при ревматоїдному артриті (RA), отриманих за допомогою лінійного дискримінантного аналізу (LDA). Столпчики ліворуч представляють осіб, які не відповідають на лікування, столпчики праворуч представляють осіб, які відповідають на

лікування. Чим більше відстань між групами та менше перекривання між зразками, тим вищим є ступінь розподілу переліку генів. Панель генів з експерименту з мікрочипами (досліджувана когорта) знаходиться ліворуч, панель генів з експериментів з RT-QPCR (валідаційна когорта) знаходиться праворуч, і перелік генів з найвищими величинами p у вигляді негативного контролю на основі даних з мікрочипами знаходиться праворуч.

Фігура 8: Перелік трьох генів при хворобі Крона (CD), отриманих за допомогою лінійного дискримінантного аналізу (LDA). Столпчики ліворуч представляють осіб, які не відповідають на лікування, столпчики праворуч представляють осіб, які відповідають на лікування. Чим більше відстань між групами та менше перекривання між зразками, тим вищою є ступінь розподілу переліку генів. Панель генів з експерименту з мікрочипами (досліджувана когорта) знаходиться ліворуч, панель генів з експериментів з RT-QPCR (валідаційна когорта) знаходиться праворуч для кожної панелі генів, і перелік генів з найвищими величинами p у вигляді негативного контролю на основі даних з мікрочипами знаходиться праворуч.

Фігура 9: Кореляція між числом генів в кожній панелі генів та мінімальним F-критерієм розрахована для цієї панелі або в досліджуваній, або в валідаційній когортах при RA.

Фігура 10: Кореляція між числом генів в кожній панелі генів та мінімальним F-критерієм розрахована для цієї панелі або в досліджуваній, або в валідаційній когортах при CD.

Фігура 11: Рівні IFN γ , виміряні за допомогою ELISA при CD (досліджувана когорта).

Фігура 12: Рівні IL-6, виміряні за допомогою ELISA при CD (досліджувана когорта).

Фігура 13: Діаграми розсіювання цитокінів сироватки, які показують значущі відмінності при RA (досліджувана когорта).

Фігура 14: Рівні TNF α , виміряні за допомогою ELISA в вихідних зразках групи RA з досліджуваної когорти.

Фігура 15: Рівні TNF α , виміряні за допомогою ELISA в зразках 2-го тижня групи RA з досліджуваної когорти.

Фігура 16: Рівні TNF α , виміряні за допомогою ELISA в вихідних зразках та зразках 2-го тижня групи RA з досліджуваної когорти.

Фігура 17: Рівні інфліксимаба, виміряні за допомогою ELISA у пацієнтів з RA на 2-му та 14-му тижнях (досліджувана когорта).

Фігура 18: Рівні інфліксимаба, виміряні за допомогою ELISA у пацієнтів з CD на 2-му тижні (досліджувана когорта).

Фігура 19: Рівні інфліксимаба, виміряні за допомогою ELISA у пацієнтів з RA на 2-му тижні (досліджувана когорта).

Детальний опис винаходу

Загальне профілювання експресії генів в периферійній крові являє собою доведену технологію описання патогенетичної передумови аутоімунних розладів та розподілу захворювань. Периферійна кров являє собою доступне джерело біологічного матеріалу, що включає клітини та має явні переваги використання її для процесів скринінгу. Крім цього, оскільки циркулюючі мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) являють собою ключові клітини запалення, декілька дослідницьких груп вивчали PBMC в експериментах з мікрочипами. Патерни експресії генів в циркулюючих моноцитах, Т-клітинах та В-клітинах можуть відображати, але не обов'язково, механізми захворювання, що означає, що існує проблема розширення фармакогеномних маркерів на мультигенні діагностичні тести на основі панелей генів, які прогнозують відповідь на види лікування або прогресування захворювання. Профілювання експресії генів PBMC забезпечує менш дорогу та менш інвазивну альтернативу біопсії або іншим інвазивним методам. Однак до теперішнього часу не проведено порівняння патернів експресії генів різних аутоімунних захворювань з акцентом на конкретній терапії.

Біомаркери або набори комбінованих біомаркерів, які прогнозують відповідь на терапію, в даний час широко використовуються для підвищення специфічності лікування. Використання найменш інвазивного забору периферійної крові також має явні переваги. Однак обмеження включають складність забору щодо лабораторної обробки зразків, і для того, щоб мінімізувати гетерогенність зразків, необхідно чітко дотримуватись керівництв клініцистів, які збирають, та дослідників, які обробляють зразки.

Автори даного винаходу визначали панелі генів з найбільшою дискримінаційною здатністю за допомогою загального профілювання експресії генів периферичної крові в когорті досліджуваних пацієнтів та валідували результати на незалежній когорті пацієнтів.

Таким чином, спосіб даного винаходу в одному аспекті можна узагальнити, як указано нижче. Периферійну кров брали у пацієнтів з RA або CD та необов'язково відділяли PBMC. З периферійної крові або ізольованих PBMC виділяли РНК, а потім зворотно транскрибували у кДНК. Для визначення відносних рівнів експресії обраних генів відповідно до даного винаходу

одночасно використовували метод RT-QPCR.

Підхід, якого дотримувались автори даного винаходу, передбачав виконання загального аналізу експресії генів в досліджуваній когорті за допомогою технології мікрочипів Affymetrix для визначення переліку генів, які можна було валідувати в незалежній когорті за допомогою більш чутливого методу qPCR в реальному часі (RT). Технологія RT-QPCR являє собою найбільш надійний засіб для вимірювань експресії генів (щодо чутливості, діапазону динаміки, стандартизації, продуктивності та ціни), що також робить її ідеальною в якості засобу діагностики.

Однак було припущено, що не тільки вихідні дані, але й дані, отримані на 2-му тижні, можна використовували для валідації. Таким чином, до набору генів для валідації також додавали гени, які визначають статус особи, яка відповідає на лікування статистично значущим чином на 2-му тижні, а також декілька генів з відповідних літературних джерел.

Щодо порівнянь зразків вихідного рівня та 2-го тижня за допомогою мікрочипу в обох умовах ефекти самої терапії представляли за допомогою 5 генів при CD, з яких AQP9 та TNFAIP6 були виявлені раніше в якості маркерів IBD на рівнях експресії генів; було виявлено, що MGAM у загальногеномних асоціаціях є предиктором відповіді на блокуючу TNF α терапію при IBD у дітей, в той час як експресія MMP8 була показана в активно запальній ділянці на дні виразки зразків товстого кишечника при IBD, а її наявність в стромі передбачає етіологію IBD. При RA кожний ген, який, як було виявлено, значуще змінюється в перші два тижня терапії, має відношення до свого патогенезу: за AQP9 та TNFAIP6 пацієнти з RA відрізнялися від контрольних здорових осіб за допомогою профілювання експресії генів PBMC, а IGG (імуноглобулін J) показав значуще вищий рівень експресії мРНК у близнюків з RA порівняно з їх здоровими партнерами з близнюкової пари.

Валідація за допомогою RT-QPCR в незалежній когорті також призвела до утворення переліку генів зі значущими відмінностями між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування. При CD ці гени включають TMEM176B та TMEM176A, які вважаються мішенями функції дендритних клітин в зв'язку з утворенням мультимерів та утриманням дозрівання дендритних клітин, UBE2H, по відношенню до якого TNF-а є відомим регулятором активації залежної від UBE2H кон'югації убіквітину, та WARS, триптофаніл-тРНК-синтетазу. CYP4F3 при RA, який пов'язаний з патомеханізмами остеоартриту; DHRS9, MGAM та PF4 при RA, який був виявлений в якості предиктору відсутності відповіді на лікування для інфліксимабу, в протеомному дослідженні були виявлені значущими.

Незважаючи на те, що поодинокі гени могли показувати значущі відмінності між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування, відповідні відмінності, які відповідають за більш велику ступінь прогнозу, можна було виявити тільки за допомогою аналізу панелей генів.

Для виявлення панелей генів з найвищою дискримінаційною здатністю використовували канонічний варіаційний аналіз (CVA) або лінійний дискримінантний аналіз (LDA), оскільки у порівнянні з одномірним аналізом, який може не врахувати потенційні взаємодії між генами, вони можуть виявити відповідні відмінності при використанні генів одночасно в якості панелі генів, що забезпечує точний розподіл в багатовимірному просторі.

Відомо, що набори пов'язаних з результатами панелей генів, які виявлені за допомогою подібних досліджень експресії генів, мали тільки декілька спільних генів, які можна було віднести до різних способів приготування зразків, виділення мРНК або аналізу даних, а також індивідуальних відмінностей та гетерогенностей, пов'язаних з маркерами, навіть в клінічно гомогенній когорті пацієнтів. Включення до переліку генів зі статистично значущими відмінностями між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування, не обов'язково вказує на важливість гену в патогенезі захворювання або терапії, відповідно, для виявлення потенційних мішеней для лікування необхідно аналізувати повний перелік генів, пов'язаних з відповіддю.

Автоматизування обирання панелей генів з високою дискримінаційною здатністю між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування, в обох когортах та при обох захворюваннях за допомогою побудови заснованого на біоінформатиці алгоритму призвело до утворення приблизно 4700 панелей генів при кожному стані зі 100 % розподілом відповідно до статусу особи, що відповідає на лікування. Серед них були виявлені панелі генів 3-3 з найвищою дискримінаційною здатністю, враховуючи F-критерії панелей, дані перехресної валідації та межі між розподіленими групами.

Автори даного винаходу несподівано виявили, що:

1) при хронічних запальних захворюваннях, наприклад, при CD та RA, профілі експресії генів периферійної крові придатні для визначення панелей предиктивних генів, рівні експресії яких

при вимірюванні до терапії інфліксимабом виявляють пацієнтів, які чутливі до терапії;

2) несподівано цілком різні панелі генів потребуються для прогнозу статусу особи, яка відповідає на лікування, при CD та RA, незважаючи на факт, що ці стани мають подібну патогенетичну передумову; а також

3) було виявлено декілька панелей генів, які показують точний розподіл в досліджуваній та валідаційній когорті, а також чіткий розподіл в аналізах з перехресної валідації.

Забір зразків є ключовим пунктом в способі даного винаходу. Одним з основних критеріїв способу, що застосовується, є те, що він повинен стабілізувати РНК, таким чином роблячи можливим зберігання та перенесення зразків. Такі способи є комерційно доступними, однак, вони утворюють більш або менш різні популяції клітин порівняно з тим, який використовували в дослідженні (PBMC/Trizol). Забір зразків має забезпечувати щонайменше 120-140 зразків, що є необхідним для відповідної статистики. Обробка зразків, вимірювання QC та RT-QPCR являють собою загальноприйняті технології.

Окрім описаного способу забору зразків PBMC/Trizol були досліджені інші способи забору зразків. Серед них спосіб забору PAXGene (Quiagen Corp., США) та LeukoLock (Life Technologies Corp., США) показали належну кореляцію зі способом PBMC/Trizol. Однак в клінічній практиці найбільш переважним способом забору зразків був би спосіб забору зразків PAXGene, оскільки цей спосіб потребує менше лабораторного обладнання та навичок від особи, яка виконує забір зразків.

Набір генів відповідно до даного винаходу, який був виявлений та валідований авторами даного винаходу, заповнює незадоволену потребу у геномному методі, який однозначно розрізняє осіб, які відповідають на лікування, від осіб, які не відповідають на лікування щодо терапії інгібітором TNF α (наприклад, інфліксимабом) або при хворобі Крона (CD), або при ревматоїдному артриті (RA). Спосіб діагностики відповідно до даного винаходу дає можливість введення персоналізованого медичного обслуговування в цій області, що сприятливо впливає на всіх пацієнтів. Крім цього, він є ефективним не тільки для пацієнтів, у яких можна попередити отримання неефективної терапії, а потім перехід до відповідної терапії, а також для клініцистів, органів регулювання та реімбурсації та постачальників, які також отримують користь від підвищеної ефективності та безпеки терапії.

ПРИКЛАДИ

Дизайн дослідження

Для експериментів з мікрочипами до дослідження в досліджувану когарту було включено 20 пацієнтів з хворобою Крона (CD) та 19 пацієнтів з ревматоїдним артритом (RA) (формування вибірок перед терапією та через 2 тижня після терапії).

Для процесу валідації зразки від 15 пацієнтів з RA на 0-му тижні з валідаційної когорти, 5 пацієнтів з досліджуваної когорти (для технічної валідації) та 20 пацієнтів з CD на 0-му тижні з валідаційної когорти були включені в експерименти RT-QPCR. На схематичній діаграмі фігури 1 показана послідовність дій та дизайн дослідження.

Набір пацієнтів

A) Ревматоїдний артрит

Критерії включення:

- клінічно діагностований ревматоїдний артрит (критерії Американської асоціації ревматизму від 1987 р.);

- вік від 20 до 60 років;

- нездатність відповідати щонайменше на два протиревматичні лікарські засоби, які модифікують перебіг захворювання, включаючи метотрексат;

- активна хвороба (визначена як така, що має показник активності хвороби, виміряний за 28 суглобами (DAS28), $>3,2$);

- пацієнти, що не зазнавали дії терапії блокаторами TNF;

- терапію преднізонпреднізоном з 10 мг/добу дозволяли за умови, що доза була стабільною протягом щонайменше 2 місяця перед включенням;

- пероральні кортикостероїди (максимальна доза 10 мг/добу - преднізон) та нестероїдний протизапальний лікарський засіб дозволяли при стабільному вживанні протягом щонайменше 1 місяць до етапу включення;

- пацієнти знаходились на максимально стерпному лікуванні метотрексатом (5-30 мг/тиждень), яке повинно було бути стабільним протягом щонайменше 4 тижнів до етапу включення;

- співвідношення жінки:чоловіки дорівнює 3:1.

Критерії виключення:

- курець або колишній курець; вагітність або годування груддю; злоякісна пухлина в даний або

недавній час; клінічно значущі супутні захворювання; активне інфекційне захворювання; пацієнти з гострим запальним захворюванням суглобів різного походження.

Зібрані параметри:

5 вік, діагноз RA (рік), DAS28, CRP, We, RF, супутні захворювання, лікарські засоби (наприклад, DMARD) після 14 тижнів лікування, клінічна відповідь на лікування встановлювалася за допомогою обох критеріїв: EULAR і зменшення DAS28 щонайменше до 1,2.

В) Хвороба Крона

Критерії включення:

- 10 • клінічно діагностована хвороба Крона;
- вік від 20 до 60 років;
- CDAI >250;
- відсутність попереднього терапії блокаторами TNF;
- терапія метотрексатом (MTX), але <20 мг/добу;
- 15 • терапія преднізолоном, але <10 мг/добу;
- співвідношення жінки:чоловіки дорівнює 1:1.

Критерії виключення:

курець або колишній курець; вагітність або годування груддю; злоякісна пухлина в даний або недавній час; клінічно значущі супутні захворювання; активне інфекційне захворювання; пацієнти з історією гострої запальної хвороби кишечника різного походження.

20 Зібрані параметри:

вік, діагноз CD (рік), CDAI (якщо CDAI впав нижче 150, пацієнти вважаються особами, які відповідають на лікування, інакше особами, які не відповідають на лікування), CRP, We, супутні захворювання, лікарські засоби, коротка характеристика біопсії кишечника (при наявності), реакція відповіді на 14-му тижні.

25 Забір, обробка та зберігання зразків пацієнтів (PBMC/Trizol)

Реакцію відповіді на терапію визначали за допомогою клініцистів через 14 тижнів після терапії на основі вищеписаних критеріїв. Для відділення PBMC зразки периферійної крові (10 мл) збирали у вакуумні пробірки для забору венозної крові, які містили EDTA (BD Vacutainer K2E), а для екстракції зразків сироватки 10 мл периферійної крові збирали в прості пробірки. Всі зразки обробляли протягом однієї години після забору зразків.

30 PBMC відділяли за допомогою градієнтного центрифугування з Ficoll. Коротше кажучи, периферійну кров розбавляли 10 мл фізіологічного розчину та нашаровували на 10 мл Ficoll. Центрифугування виконували при 2500 об./хв. протягом 20 хвилин, а після цього збирали шар PBMC. Клітини двічі відмивали за допомогою фізіологічного розчину (1700 об./хв., 7 хвилин) та лізували в реагенті Trizol, та зберігали при температурі -70 °C до виділення РНК.

35 Статистика клінічних параметрів

Клінічні параметри когорт пацієнтів порівнювали за допомогою GraphPad Prism, а також використовували U-критерій Манна-Уїтні ($p < 0,05$ вважався статистично значущим).

Виділення РНК

40 РНК виділяли з моноклеарних клітин периферійної крові (PBMC) за допомогою реагенту Trizol (Invitrogen) відповідно до протоколу виробника. Кількість та якість РНК перевіряли на приладах: УФ-фотометрі NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) та Agilent BioAnalyzer (Agilent Technologies).

Мікрочип

45 Для загального аналізу патерна експресії 28869 добре анотованих генів використовували мікрочип Affymetrix GeneChip Human Gene 1,0 ST. Для ампліфікації та мічення 250 нг зразків РНК використовували Ambion WT Expression Kit (Applied Biosystems) та GeneChip WT Terminal Labeling, та Control Kit (Affymetrix). Зразки гібридизували при температурі 45 градусів за Цельсієм протягом 16 годин, а потім виконували стандартний протокол по відмиванню за допомогою GeneChip Fluidics Station 450 та сканували мікрочипи на GeneChip Scanner 7G (Affymetrix).

Аналіз даних мікрочипів

Дані мікрочипів аналізували за допомогою Genespring GX10 (Agilent Biotechnologies). Файли з даними Affymetrix імпортували за допомогою алгоритму RMA та виконували нормалізацію медіан. Стосовно порівняння зразків на вихідному рівні та 2-му тижні, то на першому етапі відбирали 20 % наборів зондів з найменшими рівнями експресії, потім відбирали з переліку наборів зондів, що залишилися, шляхом кратності зміни (1,2-кратне відсічення) та виконували статистичний аналіз за допомогою парного U-критерію Манна-Уїтні з поправкою Бенджаміні-Хокберга для множинних порівнянь.

60 Стосовно порівняння осіб, які відповідають на лікування, та осіб, які не відповідають на

лікування, то на першому етапі відбирали 20 % наборів зондів з найменшими рівнями експресії, потім перелік наборів зондів, що залишився, відбирали шляхом кратності зміни (1,2-кратне відсічення) та виконували статистичний аналіз з використанням непарного Т-тесту з поправкою Бенджаміні-Хокберга для множинних порівнянь. Функціональну категоризацію генів виконували за допомогою системи класифікації Panther (<http://www.pantherdb.org/>).

RT-QPCR

Дані експресії генів отримували за допомогою TaqMan Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems), який являє собою мікрорідинну платформу на 384 лунки, яка дозволяє виконувати 384 одночасних робочих циклів PCR в реальному часі та яку використовували для профілювання експресії генів в декількох дослідженнях. Ця мікрорідинна платформа з продуктивністю від низької до середньої забезпечує виконання паралельних циклів для 2 зразків по відношенню до 96 мішеней TaqMan® Gene Expression Assay, які попередньо завантажують в кожну з лунок на платформі. кДНК отримували за допомогою набору для зворотної транскрипції кДНК високої ємності відповідно до протоколу виробника. В циклах RT-QPCR використовували 1 мікрограм РНК на зразок. В кожному зразку використовували 400 нг (4 мкл) кДНК. Для вимірювань кількісної PCR в реальному часі додавали 196 мкл безводної нуклеази та 200 мкл 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Потім ця суміш була порівну розподілена між чотирма портами TLDA для завантаження зразків, кожний з яких був пов'язаний з одним набором 96 генів, що досліджувалися. Мікрочипи одноразово центрифугували (1', 1300 об./хв. при кімнатній температурі) для рівномірного розподілу зразку по лунках. Згодом платформу запечатували для запобігання обміну між лунками. Ампліфікацію RT-QPCR виконували за допомогою системи детекції послідовностей Applied Biosystems Prism 7900HT при наступних умовах термоциклера: 2 хв. при температурі 50 °C та 10 хв. при температурі 94,5 °C, з наступними 40 циклами по 30 с при температурі 97 °C та 1 хв. при температурі 59,7 °C. На основі попереднього експерименту з мікрочипами було обрано 91 ген, а 5 генів, що залишилися, були генами домашнього господарства для нормалізації.

Аналіз даних RT-QPCR

Файли з даними RT-QPCR імпортували за допомогою комп'ютерної програми Data Assist (Applied BioSystems), а первинні дані нормалізували за методом ACt. В якості гену для нормалізації було обрано ген циклофіліну А (PPLA), оскільки його експресія показала менше різноманіття між зразками. Для пошуку генів, що експресуються різним чином у групах осіб, які відповідають на лікування, та осіб, які не відповідають на лікування, використовували непараметричний статистичний критерій (U-критерій Манна-Уїтні) та канонічний варіаційний аналіз (CVA).

Канонічний варіаційний аналіз (CVA) або лінійний дискримінантний аналіз (LDA)

Розподіл між попередньо визначеними групами об'єктів найкращим чином виявляється за допомогою канонічного варіаційного аналізу (CVA). CVA являє собою узагальнення лінійного дискримінантного аналізу (LDA), в даному дослідженні два вирази використовуються еквівалентним чином. CVA використовували для визначення того, чи групи осіб, які відповідають на лікування, та осіб, які не відповідають на лікування, здатні розподілятися в багатомірному просторі, з'єднаному за допомогою генетичних змінних, і, якщо так, то які підкласи генів мають найкращу дискримінаційну здатність. Результати CVA являють собою так звані канонічні оцінки, отримані з канонічних функцій, отриманих в процесі аналізу власних значень, які виконують функцію координат спостережень в канонічному просторі.

Автоматичне створення панелей генів

Лінійний дискримінантний аналіз (LDA) (Hamadeh HK et al. Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. Toxicol Sci. 2002 Jun;67(2):232-40.) використовували для автоматичного створення панелей генів, які показують 100 % розподіл між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування, за обох умов та в обох когортах (досліджуваних та валідаційній) відповідно до наступного алгоритму (було використано 40 генів при CD та 41 ген при RA, які були попередньо відібрані протягом експериментів з досліджуваними когортами та валідовані в валідаційних когортах).

1) Створюють набір "модельних генів". Спочатку цей набір містить всі гени. Також створюють набір з так званими "захищеними генами". Спочатку цей набір пустий.

2) Для кожного гену розраховують F-критерій, який являє собою співвідношення міжгрупового різноманіття та внутрішньогрупового різноманіття.

3) Як в досліджуваних, так і в валідаційних когортах за допомогою набору "модельних генів" запускають цикл алгоритму класифікатора (LDA). В обох випадках величину відсотку точності записують у вигляді "величин найкращої точності".

4) Набір "генів, які селектують" визначають як:

"гени, які селектують" = "модельні гени" мінус "захищені гени"

Якщо група "генів, які селектують" не є пустою, то алгоритм продовжують на етапі 5, інакше алгоритм переходить до етапу 7.

5) Гени селектують з набору "генів, які селектують" відповідно до наступних моделей:

- а) випадково з рівними ймовірностями (однорідна модель);
- б) випадково з ймовірністю, яка зворотно пропорційна їх F-критерію (модель F_prop);
- с) гени з найменшими F-критеріями (модель min F).

В будь-якому випадку ген, який селектують, тимчасово видаляють з набору "модельних генів".

- 10 Перевага використання стохастичних моделей замість моделі min F полягає в тому, що вони можуть забезпечити кращий розподіл груп пацієнтів. Однорідна модель та модель F_prop представляють стохастичні алгоритми, в той час як модель min F є детермінованою.

б) Класифікатор запускають за допомогою (тимчасово зменшеного) набору "модельних генів".

- 15 а) Якщо будь-яка з величин відсотку точності стає меншою, то ген, який селектують, повторно вставляють в набір "модельних генів" та додають до набору "захищених генів".

- б) Якщо обидві величини відсотку точності щонайменше такі ж самі, як "величини найкращої точності", то ген, який селектують, назавжди видаляють з "модельних генів", а набір "захищених генів" спустошують. "Величини найкращої точності" перезаписують розрахованими величинами точності.

Алгоритм повертають до етапу 4.

- 7) Алгоритм закінчують. Результати являють собою набір "модельних генів" та "величини найкращої точності". Лінійний дискримінантний аналіз виконували за допомогою комп'ютерної програми 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>.) з пакетом MASS (Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York) та пакетом хмарки терів (Ian Fellows (2012). wordcloud: Word Clouds. R package version 2.0. <http://CRAN.R-project.org/package=wordcloud>) для візуалізації.

- 30 Ферментні імуносорбентні аналізи (ELISA)

- Для визначення в сироватці рівнів IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ , TNF α , інфліксимабу та антитіла до інфліксимабу виконували імуноферментні аналізи (ELISA). Відповідно до протоколу виробника для вимірювань IL-6, IL-8, IL-12 та IFN γ використовували набори ELISA Quantikin (R&D Systems). Рівні TNF α , інфліксимабу та антитіл до інфліксимабу вимірювали за допомогою набору LISA-TRACKER Premium Infliximab (BioMedical Diagnostics). Результати були представлені в пг/мл. Дані аналізували за допомогою GraphPad Prism, а також використовували U-критерій Манна-Уїтні ($p < 0,05$ вважався статистично значущим).

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

- 40 Загальний аналіз експресії генів зразків досліджуваних когорт з ревматоїдним артритом

Групи пацієнтів досліджуваних когорт з ревматоїдним артритом

- В експерименти з мікрочипами було включено зразки від 19 пацієнтів на вихідному рівні та 2-му тижні. Клініцистами було виявлено 6 осіб, які відповідають на лікування, та 13 осіб, які не відповідають на лікування або відповідають на лікування помірно. Кожний пацієнт мав однакову базисну терапію та не був курцем. Між групами осіб, які не відповідають на лікування (NR), та групами осіб, які відповідають на лікування (R), значущих відмінностей щодо віку, DAS28, HAQ, CRP, ревматоїдного фактору, антитіл до CCP або DMARD виявлено не було (таблиця 1).

Таблиця 1

Зведені клінічні параметри груп пацієнтів при RA в досліджуваній когорті

На 0-му тижні		Особа, які відповідають на лікування (ACR70-50)	Особа, які не відповідають на лікування, або відповідають на лікування помірно (ACR20-0)
		6	13
Стать	Чоловік/жінка	1/5	2/11
Вік	н.	44,33	47,08
DAS28	н.	5,63	5,26
HAQ	н.	1,27	2,06
CRP (мг/л)	н.	16,83	28,31
DMARD	н.	2,83	2,69
RF (МЕ/мл)	н.	105,83	148,62
ССР (МЕ/мл)	н.	675,78	756,31

"н." означає незначущі, DAS28, HAQ та DMARD представлені даними в балах.

Аналіз мікрочипів

Загальне профілювання експресії генів виявило гени на вихідному рівні зі статистично значущими відмінностями між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування. Аналіз зразків, отриманих на 2-му тижні, показав гени зі статистично значущими відмінностями між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування. Експресія деяких генів значуще відрізнялась навіть на вихідному рівні (EPSTI1, IFI44, IFIT1, IFIT2, IFIT3, RFC1 та RSAJD2); в той час як інші гени експресували іншим чином на 2-му тижні (FCGR3A, GPAM, MICA, ELOVL7, PF4, RGS1 та SNORD41). Відповідно до літературних джерел багато з цих генів мають відношення до RA (FCGR3A, MICA, PF4, IFIT1 тощо)

Порівняння зразків на вихідному рівні та на 2-му тижні призвело до утворення переліку з 3 генів (AQP9, IGJ та TNFAIP6) зі статистично значущими відмінностями навіть з поправкою Бенджаміні-Хокберга для множинних порівнянь. Ці гени відображають ефекти терапії протягом часу (фігура 3).

Приклад 2

Валідація RT-QPCR панелей генів ревматоїдного артриту

Групи пацієнтів валідаційних когорт з ревматоїдним артритом

Клініцистами було виявлено 4 осіб, які відповідають на лікування, та 11 осіб, які не відповідають на лікування або відповідають на лікування помірно. Кожний пацієнт мав однакову базисну терапію та не був курцем. Між групами осіб, які не відповідають на лікування (NR), та групами осіб, які відповідають на лікування (R), значущих відмінностей щодо віку, DAS28, HAQ, CRP або DMARD виявлено не було (таблиця 2).

Таблиця 2

Зведені клінічні параметри груп пацієнтів при RA в валідаційній когорті

На 0-му тижні (досліджувана когорта)		Особа, які відповідають на лікування	Особа, які не відповідають на лікування або відповідають на лікування помірно
		4(6)	11(13)
Стать	Чоловік/жінка	0/4 (1/5)	3/8 (2/11)
Вік	Незначущі	54 (44,33)	56,2 (47,08)
DAS28	Незначущі	5,23 (5,63)	5,44 (5,26)
HAQ	Незначущі	1,59 (1,27)	1,93 (2,06)

На 0-му тижні (досліджувана когорта)		Особи, які відповідають на лікування	Особи, які не відповідають на лікування або відповідають на лікування помірно
		4(6)	11(13)
CRP(мг/л)	Незначущі	18,9 (16,83)	9,58 (28,31)
DMARD	Незначущі	3 (2,83)	2,7 (2,69)

В дужках також представлені дані досліджуваної когорти. DAS28, HAQ та DMARD представлені даними в балах.

Аналіз RT-QPCR

Зразки від 15 пацієнтів на 0-му тижні та 5 пацієнтів з досліджуваної когорти для технічної валідації - 2 особи, які відповідають на лікування, 3 особи, які не відповідають на лікування - були включені в експерименти RT-QPCR. Конфігурацію аналізів валідації q-PCR виконували наступним чином: на основі мікрочипів досліджуваної когорти зв'язувалось, що 29 наборів зондів є статистично значущими на вихідному рівні щодо порівняння осіб, які відповідають на лікування, з особами, які не відповідають на лікування, з яких 27 генів (гени без анотації та малі ядерцеві РНК були виключені) були включені в платформи TLDA, також як 6 генів з порівняння NR та R на 2-му тижні, а 10 генів було обрано з літературних джерел. З них 41 ген використовували в кінцевому аналізі, як описано нижче (гени, які показували відсутність відмінностей, було виключено). Експерименти RT-QPCR призвели до знаходження 4 генів, які показували статистично значущі відмінності (односторонній U-критерій Манна-Уїтні) між NR та R (фігура 4). Також було виконано технічну валідацію, та вона виявилась успішною.

Приклад 3

Загальний аналіз експресії генів зразків досліджуваних когорт з хворобою Крона

Групи пацієнтів досліджуваних когорт з хворобою Крона

В експерименти з мікрочипами було включено зразки від 20 пацієнтів на вихідному рівні та 2-му тижні (досліджувана когорта). Клініцистами було виявлено 14 осіб, які відповідають на лікування, та 6 осіб, які не відповідають на лікування.

Кожний пацієнт мав однакову базисну терапію та не був курцем. Між групами осіб, які не відповідають на лікування (NR), та групами осіб, які відповідають на лікування (R), значущих відмінностей щодо віку, CDAI, CRP, гемоглобіну, лейкоцитів та нейтрофілів виявлено не було (таблиця 3).

Таблиця 3

Зведені клінічні параметри груп пацієнтів при CD в досліджуваній когорті

На 0-му тижні		Особи, які відповідають на лікування 14	Особи, які не відповідають на лікування 6
Стать	Чоловік/жінка	8/6	3/3
Вік	Незначущі	36,2	36
CDAI	Незначущі	319,6	351,5
CRP (мг/л)	Незначущі	22,78	13,59
Гемоглобін (г/л)	Незначущі	125,1	120,6
Лейкоцити (Г/л)	Незначущі	9,02	8,01
Нейтрофіли (%)	Незначущі	70,0	74,5

CDAI, індекс активності хвороби Крона, представлений в балах.

Аналіз мікрочипів

Загальне профілювання експресії генів виявило гени на вихідному рівні зі статистично значущими відмінностями між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не

відповідають на лікування. Аналіз зразків, отриманих на 2-му тижні, показав гени зі статистично значущими відмінностями між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування. Деякі з цих генів значуще змінювались також на вихідному рівні (DDX11L2, BMP6, THEM5 та ABCC4); в той час як інші вперше виявлялись на 2-му тижні (GPR34, PRDM1, IL1RL1, CA2, MMD, SCL7A5, CADM2 та RAD23A). Відповідно до літературних джерел багато з цих генів мають відношення до CD (BMP6, ABCC4, CA2, IL1RL1 та PRDM1). Порівняння зразків на вихідному рівні та на 2-му тижні призвело до утворення переліку з 5 генів (AQP9, IGKC, MGAM, MMP8 та TNFAIP6) зі статистично значущими відмінностями. Ці гени відображають ефекти терапії протягом часу (фігура 5).

Приклад 4

Валідація RT-QPCR панелей генів хвороби Крона

Групи пацієнтів валідаційних когорт з хворобою Крона

В експерименти з RT-QPCR було включено зразки від 20 пацієнтів на вихідному рівні (валідаційна когорта). Клініцистами було виявлено 13 осіб, які відповідають на лікування, та 7 осіб, які не відповідають на лікування. Кожний пацієнт мав однакову базисну терапію та не був курцем. Між групами осіб, які не відповідають на лікування (NR), та групами осіб, які відповідають на лікування (R), значущих відмінностей щодо віку, CDAI, CRP, гемоглобіну, лейкоцитів та нейтрофілів виявлено не було (таблиця 4).

Таблиця 4

Зведені клінічні параметри груп пацієнтів при CD в валідаційній когорті

На вихідному рівні (досліджувана когорта)		Особа, які відповідають на лікування	Особа, які не відповідають на лікування
		13(14)	7(6)
Стать	Чоловік/жінка	8/5 (8/6)	4/4 (4/3)
Вік	Незначущі	26,8 (36,2)	30,2 (36)
CDAI	Незначущі	338,3 (319,6)	370,7 (351,5)
CRP (мг/л)	Незначущі	27,2 (22,78)	16,5(13,59)
Гемоглобін (г/л)	Незначущі	130 (125,1)	127 (120,6)
Лейкоцити (Г/л)	Незначущі	7,58 (9,02)	9,24 (8,01)
Нейтрофіли (%)	Незначущі	74,0 (70,0)	72,83 (74,5)

В дужках також представлені дані досліджуваної когорти. CDAI, індекс активності хвороби Крона, представлений в балах.

Аналіз RT-QPCR

Конфігурацію аналізів валідації q-PCR виконували наступним чином: на основі 40 мікрочипів в досліджуваній когорті зв'язувалось, що 49 наборів зондів були статистично значущими на вихідному рівні щодо порівняння осіб, які відповідають на лікування, з особами, які не відповідають на лікування, з яких 36 генів (гени без анотації та малі ядерцеві РНК були виключені) були включені в платформи TLDA, також як 8 генів з порівняння NR та R на 2-му тижні, а 7 генів було обрано з літературних джерел. З них 40 генів використовували в кінцевому аналізі, як описано нижче (гени, які показують відсутність відмінностей, було виключено). Експерименти RT-QPCR призвели до знаходження 4 генів, які показували статистично значущі відмінності (односторонній U-критерій Манна-Уїтні) між NR та R (фігура 6).

Приклад 5

Біостатистичний аналіз даних експресії

Статистичний аналіз виконували за допомогою даних експресії генів попередньо відібраних 40/41 (RA/CD) генів в обох когортах за допомогою автоматичного створення панелей генів, детально описаних вище, алгоритм розробляли для пошуку найкращих панелей генів, які відрізняють осіб, які відповідають на лікування, від осіб, які не відповідають на лікування.

Алгоритм запускали з детермінованою моделлю minF та 5000 разів з обома стохастичними моделями. При RA модель F_rgor призвела до утворення 4747 комбінацій панелей генів, які показують 100 % розподіл між групами осіб, які відповідають на лікування, та групами осіб, які не відповідають на лікування в досліджуваних та валідаційних когортах (з використанням даних мікрочипів та RT-QPCR, відповідно), в той час як однорідна модель призвела до утворення

навіть більше, 4909 панелей генів. При CD ці числа склали 4657 для моделі F_prop та 4878 для однорідної моделі. Модель min_F також призвела до 100 % розподілу, однак, слід відзначити, що стохастичні моделі призводили до набагато більш вираженого розподілу при обох захворюваннях з позицій показників точності. Велика кількість панелей генів, що забезпечують 100 % розподілу, створених шляхом 5000 циклів, вказує, що існують інші панелі зі 100 % розподілом, за оцінками, загальна кількість цих панелей перевищує 50000.

Перехресна валідація являє собою спосіб прогнозування відповідності моделі гіпотетичного набору валідації, коли певний набір валідації не доступний. Використовували перехресну валідацію з виключенням (LOOCV), яка включає використання одного спостереження з вихідної вибірки в якості валідаційних даних та решту спостережень в якості даних режиму навчання. Її повторювали таким чином, що кожне спостереження в вибірці використовували одноразово в якості валідаційних даних. Для візуалізації було обрано панелі генів 3-3 з найвищою дискримінаційною здатністю, враховуючи F-критерії панелей, дані з перехресної валідації та межі між розподіленими групами. Перелік генів з найвищими r-величинами в експерименті з мікрочипами виконував функцію негативного контролю, який показує відсутність розподілу (таблиця 5).

Панель генів для RA з найкращою дискримінаційною здатністю включала гени, такі як CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVR2, SERPINB10 та TNFAIP6 (RA1); в той час як друга панель генів містила CNTNAP3, CYP4F3, EPSTI1, MME, RGS1, SERPINB10 та TNFAIP6 (RA2); третя панель генів складалась з FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVR2, RFC1 та RSAD2 (RA3) (фігура 7).

Панель генів для CD з найкращою дискримінаційною здатністю включала гени, такі як ARHGEF12, ENDOD1, FCGR1A, GCLC, GPR34, KAT2B, MAP1LC3B та ODC1 (CD1); в той час як друга панель генів містила ABCC4, AIDA, ARHGEF12, CADM2, FMN1, KAT2B, ODC1, PCYT1B та RNASE2 (CD2); третя панель генів складалась з AIDA, CADM2, GCLC, KAT2B, MMD, PCYT1B, PIP5K1B, RIOK3 та RNF11 (CD3) (фігура 8).

Таблиця 5

Показники точності панелей генів, обраних для візуалізації

Панель генів №	RA1		RA2		RA3		Негативний контроль
Когорта з ревматоїдним артритом	Досліджу-вана когорта	Валідацій-на когорта	Досліджу-вана когорта	Валідацій-на когорта	Дослід-жувана когорта	Валіда-ційна когорта	Досліджу-вана когорта
Розподіл груп	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	53 %
Результат перехресної валідації	100 %	87 %	95 %	93 %	95 %	87 %	-
Джерело даних	Мікрочип	RT-QPCR	Мікрочип	RT-QPCR	Мікрочип	RT-QPCR	Мікрочип
Панель генів №	CD1		CD2		CD3		Негативний контроль
Когорта з хворобою Крона	Досліджу-вана когорта	Валідацій-на когорта	Досліджу-вана когорта	Валідацій-на когорта	Дослід-жувана когорта	Валіда-ційна когорта	Досліджу-вана когорта
Розподіл груп	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	55 %
Результати перехресної валідації	95 %	80 %	90 %	85 %	90 %	80 %	-
Джерело даних	Мікрочип	RT-QPCR	Мікрочип	RT-QPCR	Мікрочип	RT-QPCR	Мікрочип

Дані розподілу та перехресної валідації представлені за кожною обраною панеллю генів, а також за негативним контролем.

На фігурах 9 та 10 число генів в кожній панелі, яка показує 100 % розподіл між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування, та найменший F-

критерій, розраховані для кожної групи пацієнтів (чим вище F-критерій, тим краще розподіл, що означає, що вибір мінімального F-критерію представляє найслабшу точку моделі) представлені розміщеними за F-критерієм для виявлення розрахованого числа панелей генів з найвищою дискримінаційною здатністю. Точка перегину мінімального F-критерію показує, що при RA приблизно 350, в той час як при CD 200 панелей генів призводили до утворення сильної дискримінації, вказуючи, що всі панелі генів на графіку призводили до 100 % диференціації між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування.

Приклад 6

ELISA-аналіз

Вимірювання ELISA виконували для визначення в сироватці рівнів білків п'яти прозапальних цитокінів (TNF α , IL6, IL8, IFN γ та IL12), терапевтичного моноклонального антитіла інфліксимабу та антитіла до лікарського засобу (антитіла до інфліксимабу). В таблиці 6 показано, що заснована на статистичному аналізі значуща відмінність була виявлена при RA між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування, на вихідному рівні в рівні IL-12, в той час як при CD рівень IFN γ виявився статистично значущим. В когорті RA TNF α вимірювали за допомогою набору TRACKER Premium Infliximab. Детальні діаграми розсіювання значущих порівнянь представлені на фігурах 11-13.

Таблиця 6

Статистику р-величин вимірювань ELISA цитокінів отримували за допомогою статистичного аналізу даних порівняння рівнів цитокінів груп NR та R та груп вихідного рівня та 2-го тижня з використанням U-критерію Манна-Уїтні.

	Ревматоїдний артрит		Хвороба Крона	
	NR та R на вихідному рівні	На вихідному рівні та 2-му тижні	NR та R на вихідному рівні	На вихідному рівні та 2-му тижні
IL6	0,2	0,03	0,2	0,005
IL8	0,3	0,01	0,9	0,06
IL12	0,05	0,05	0,6	0,8
IFN γ	0,5	0,5	0,02	0,06
TNF	0,2	0,67		

. Числа, виділені жирним шрифтом, представляють статистично значущі величини. Для тестування набору LISA-TRACKER Premium Infliximab також були виконані розвідувальні експерименти з дослідження методом ELISA TNF α , інфліксимабу та антитіла до інфліксимабу. В зв'язку з обмеженою кількістю набору можна було включати тільки зразки з досліджуваних когорт. Були включені наступні зразки:

TNF α	17RA на вихідному рівні	17 RA на 2-му тижні	7RA на 14-му тижні
Інфліксимаб	16CD на 2-му тижні	19 RA на 2-тижні	7 RA на 14-му тижні
Антитіло до інфліксимабу	17CD на 2-му тижні	19 RA на 2-му тижні	7 RA на 14-му тижні

Таким чином, TNF α вимірювали тільки в зразках від пацієнтів з RA досліджуваної когорти, однак, не можна було виявити відмінності між особами, які відповідають на лікування, та особами, які не відповідають на лікування як на вихідному рівні так і на 2-му тижні, або при порівняннях на вихідному рівні та 2-му тижні (фігури 14-16).

Інфліксимаб та антитіло до інфліксимабу вимірювали в зразках RA та CD на 2-му тижні та 14-тижні (досліджувана когорта) (фігури 17-19). Рівні антитіла до інфліксимабу можна було виявити тільки в 3 зразках, що представляють пацієнтів, які показали нульові рівні інфліксимабу на 14-му тижні.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб *in vitro* прогнозування того, чи відповідатиме пацієнт, який має ревматоїдний артрит, на лікування інгібітором TNF α , при цьому спосіб включає визначення рівня експресії генів CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVR2, SERPINB10 та TNFAIP6, або рівня експресії генів CNTNAP3, CYP4F3, EPSTI1, MME, RGS1, SERPINB10 та TNFAIP6, або рівня експресії

генів FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVR2, RFC1 та RSAD2, в зразку крові згаданого пацієнта.

2. Спосіб за п. 1, де відносні рівні експресії вибраних генів визначають порівняно з конститутивним геном.

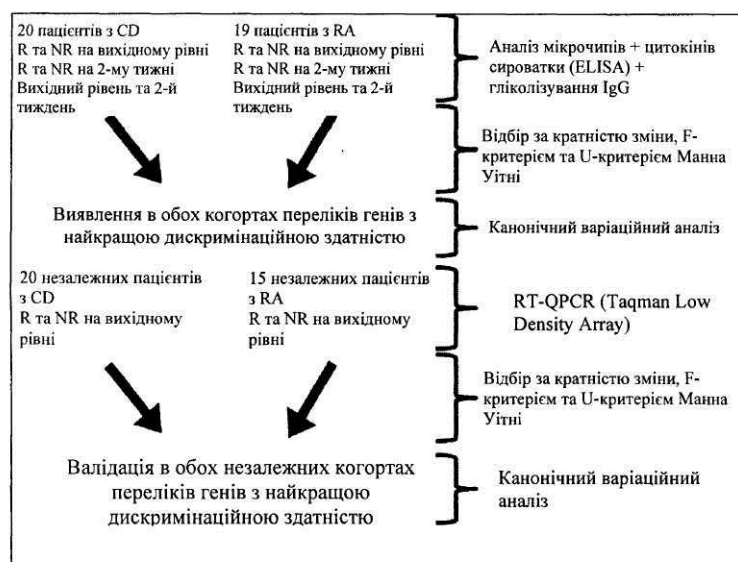
3. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітором $TNF\alpha$ є антитіло до $TNF\alpha$, злитий білок TNF або рекомбінантний TNF -зв'язуючий білок.

4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітором $TNF\alpha$ є адаліумаб, цертолізумаб пегол, етанерцепт, голіумаб, інфліксимаб або пегсунерцепт.

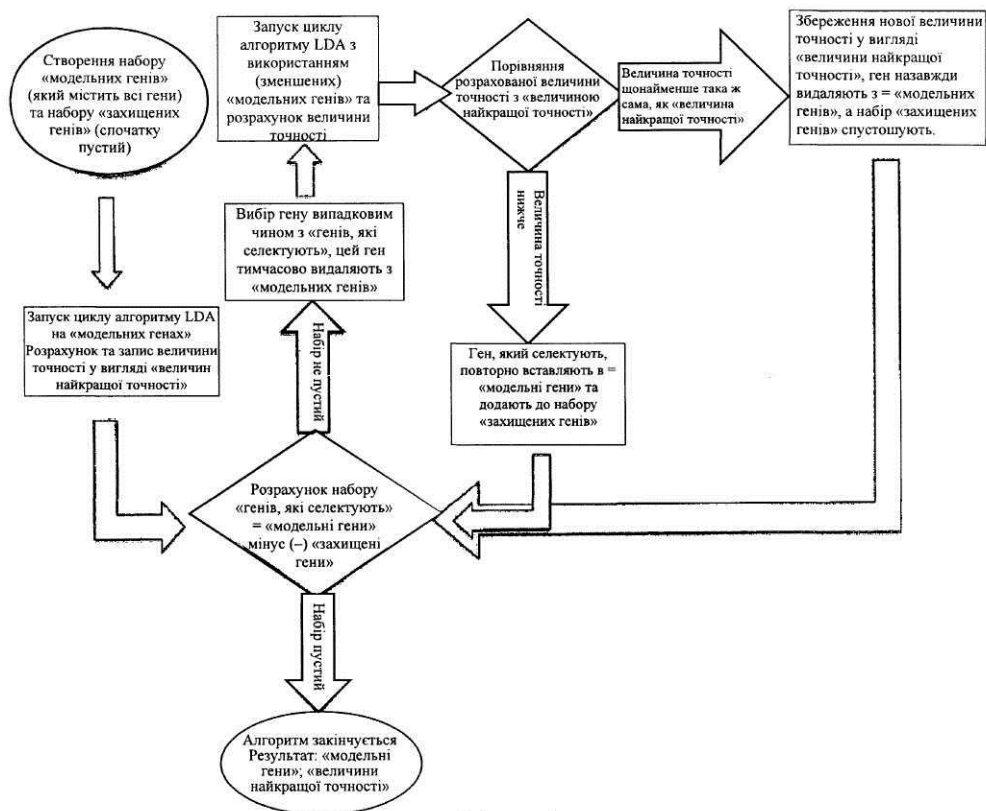
5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який також включає етап порівняння рівня експресії згаданих генів з референтними величинами, отриманими від груп пацієнтів, які відповідають на лікування, та груп пацієнтів, які не відповідають на лікування.

6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де рівень експресії визначають за допомогою кількісного визначення рівня мРНК згаданих генів в біологічному зразку.

7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який також включає етап визначення рівня біомаркерного білка.

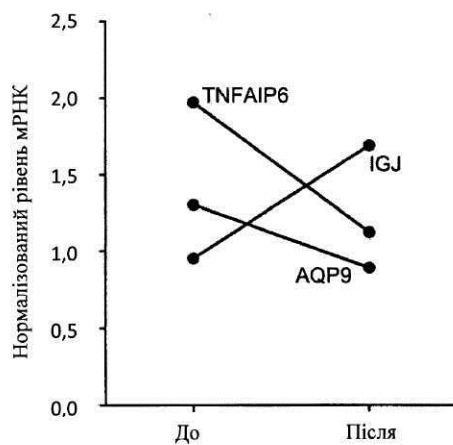


Фігура 1

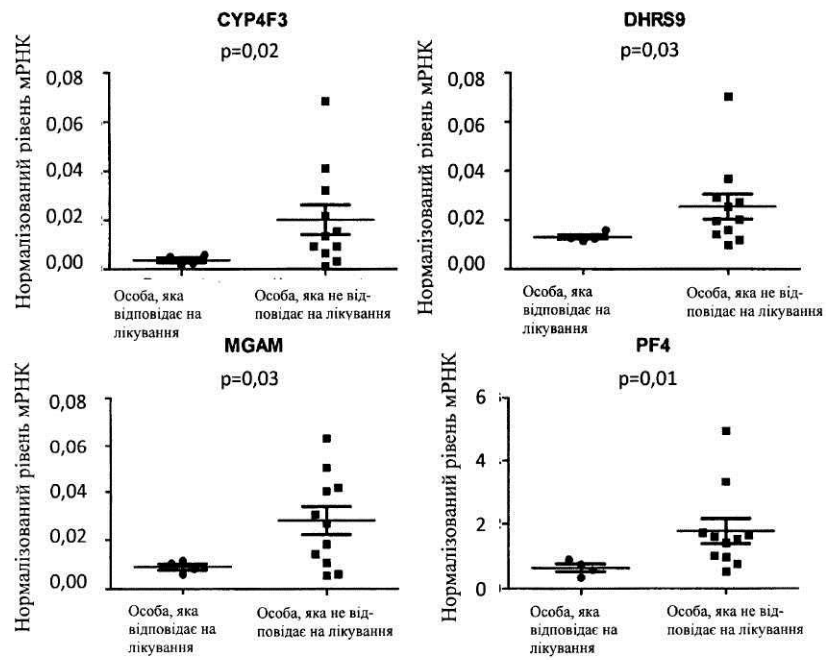


Фігура 2

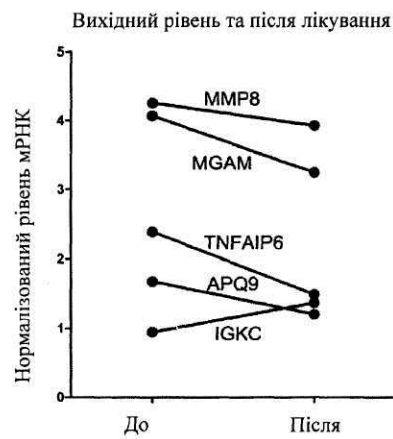
Вихідний рівень та після лікування



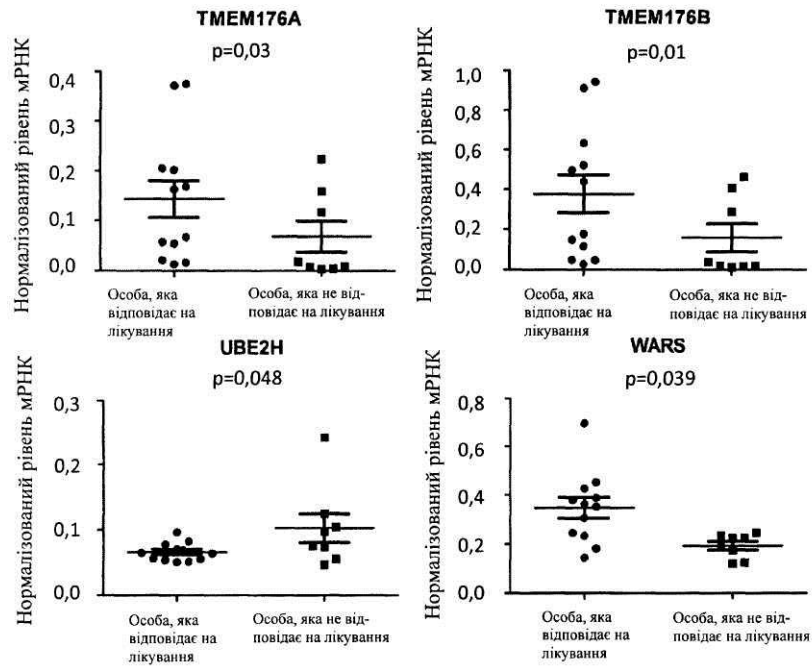
Фігура 3



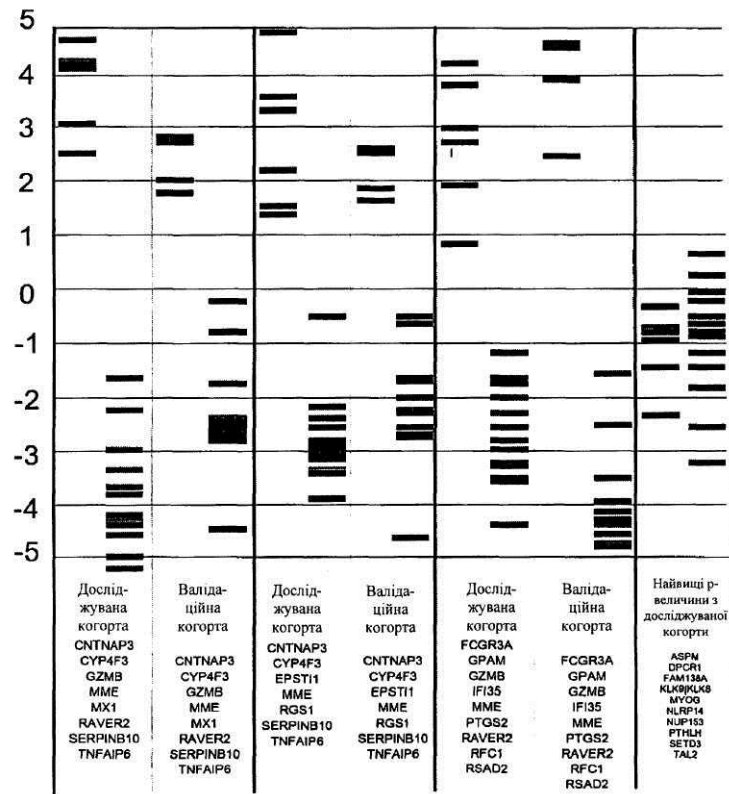
Фігура 4



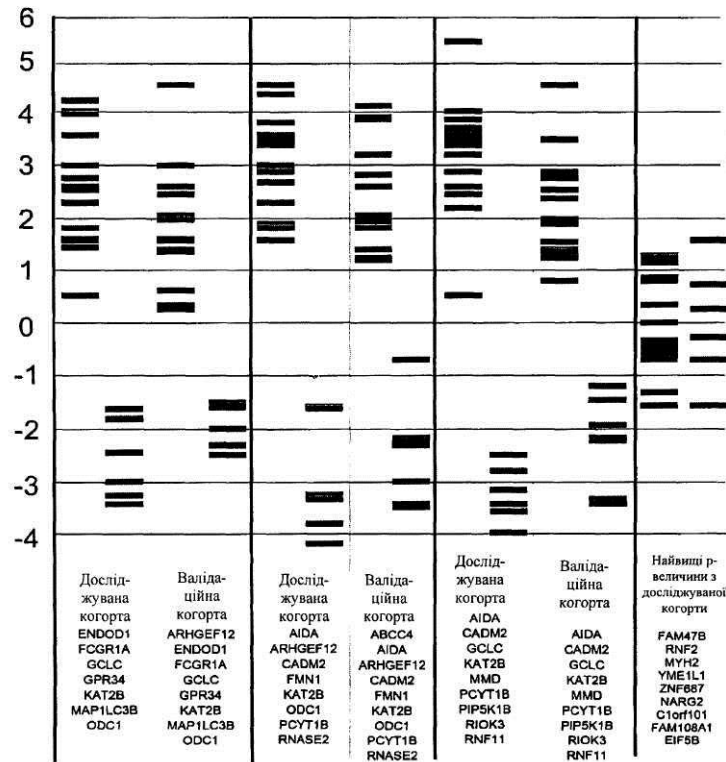
Фігура 5



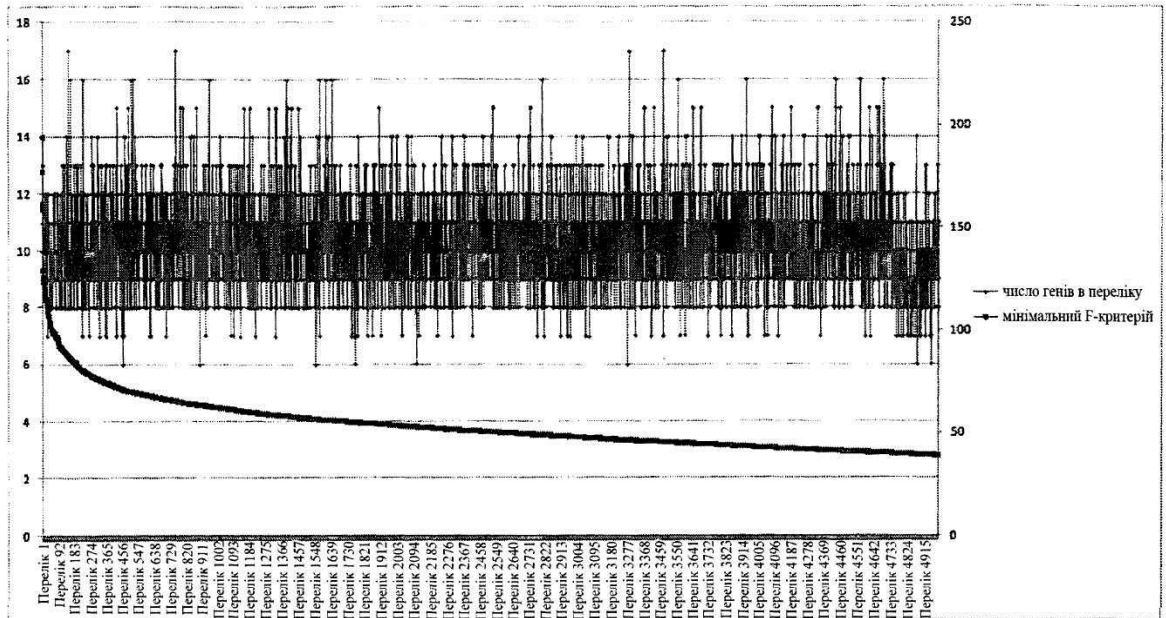
Фігура 6



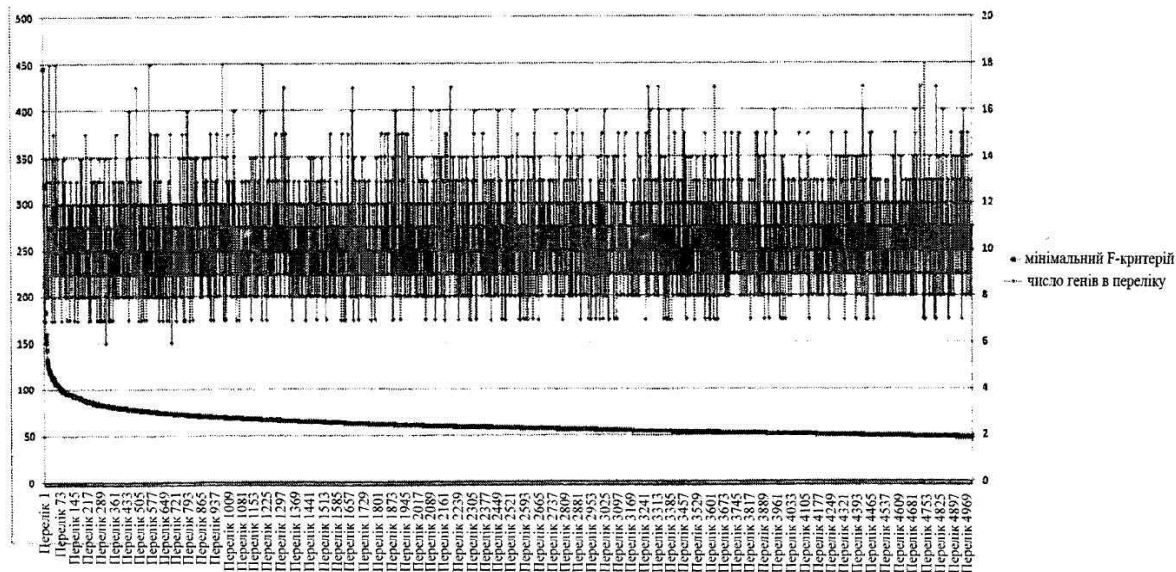
Фігура 7



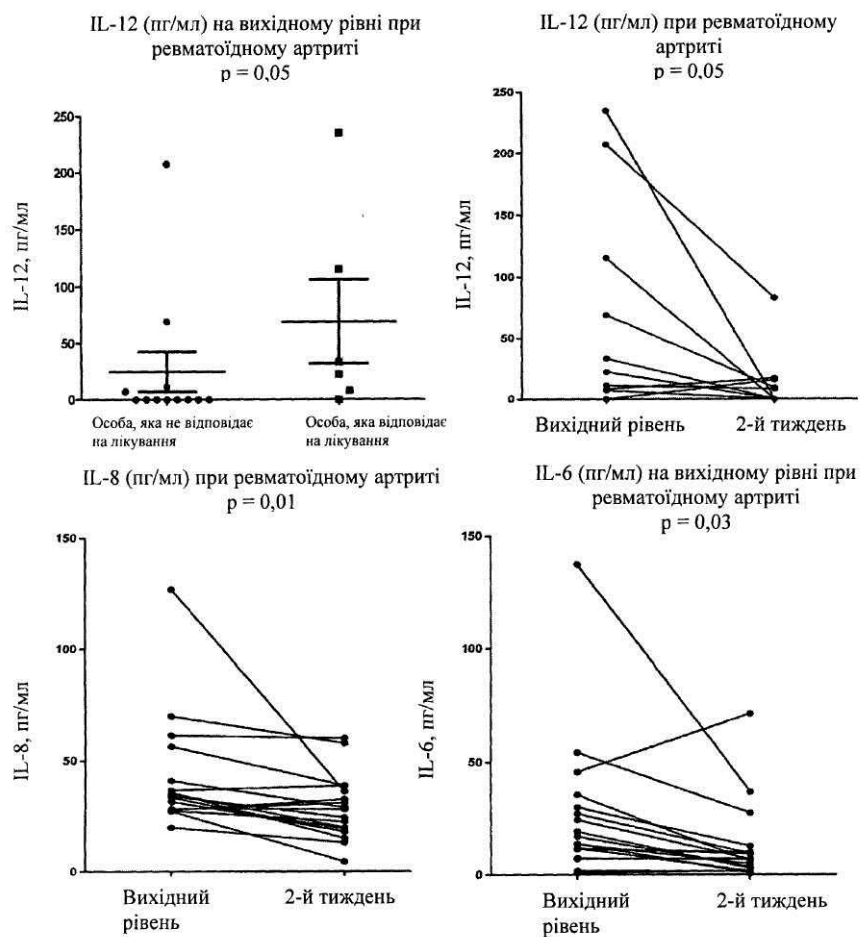
Фігура 8



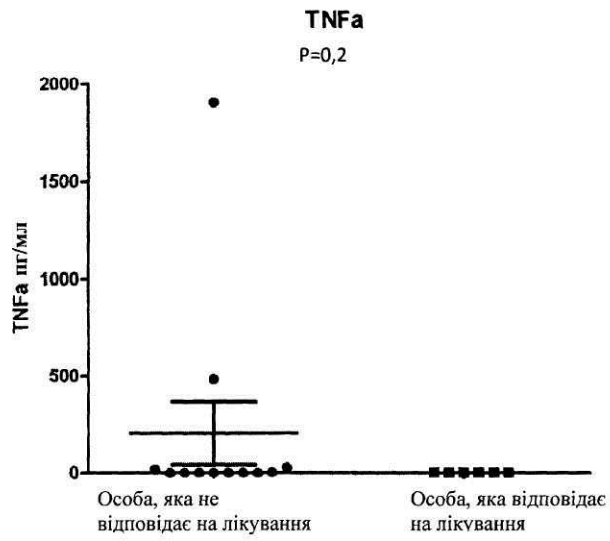
Фігура 9



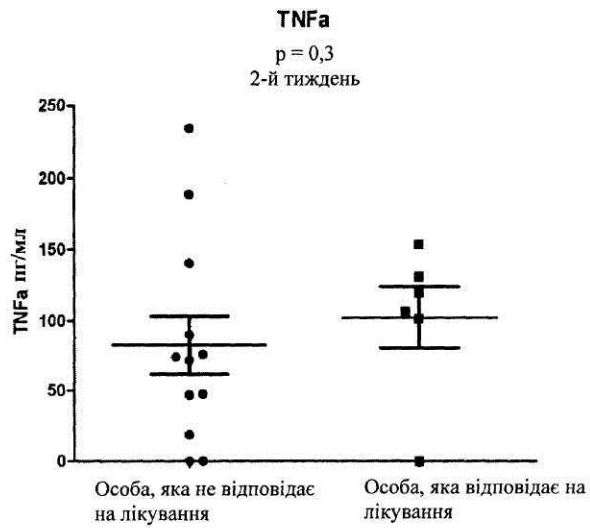
Фігура 10



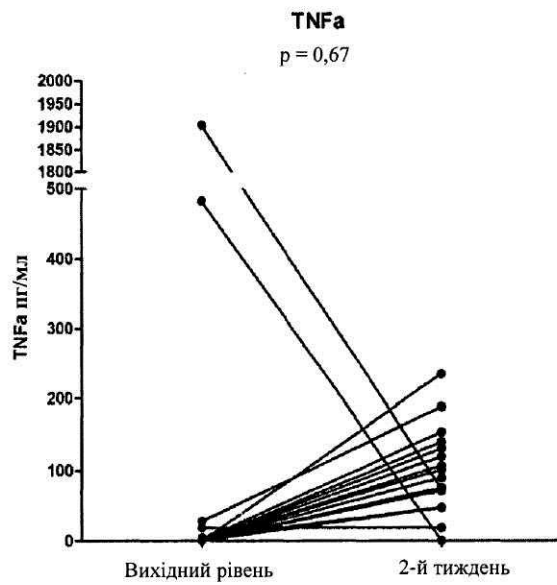
Фігура 13



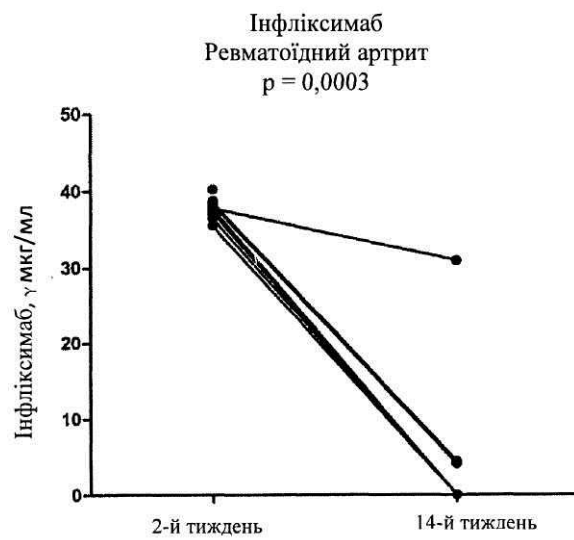
Фігура 14



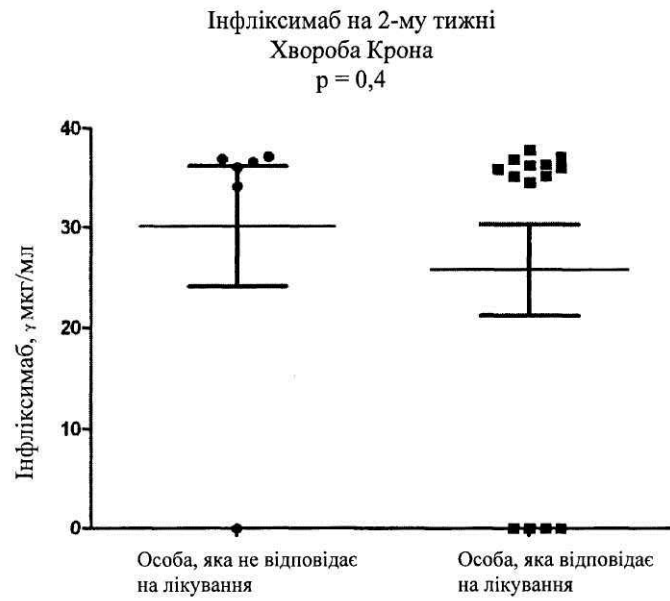
Фігура 15



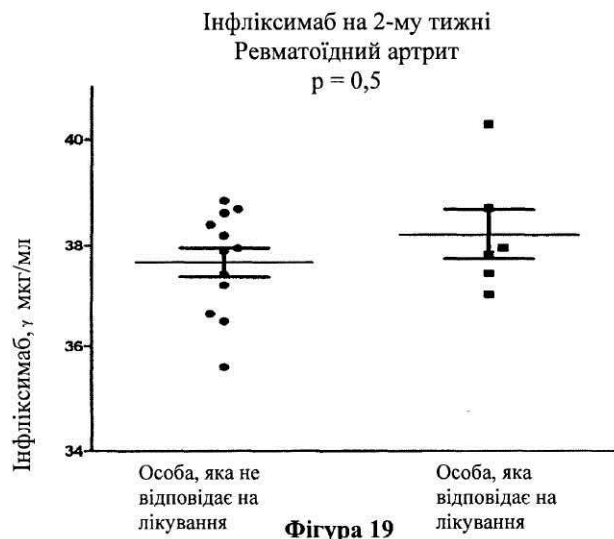
Фігура 16



Фігура 17

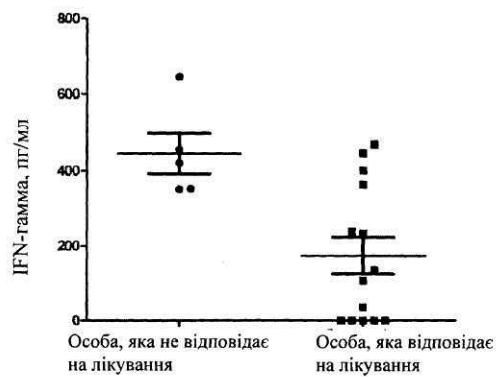


Фігура 18

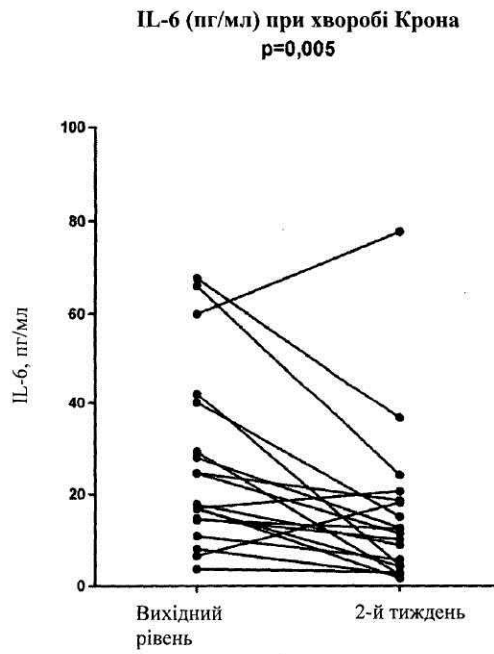


Фігура 19

IFN-гамма (пг/мл) на вихідному рівні при хворобі Крона
 $p = 0,02$



Фігура 11



Фігура 12

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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