



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК  
[G01N 33/68 \(2006.01\)](#)  
[G01N 33/577 \(2006.01\)](#)  
[C12Q 1/6841 \(2018.01\)](#)  
(52) СПК  
[G01N 33/68 \(2023.05\)](#)  
[G01N 33/577 \(2023.02\)](#)  
[C12Q 1/6841 \(2023.02\)](#)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 10.08.2023)  
Пошлина: Установленный срок для уплаты пошлины за 3 год: с 03.11.2023 по 02.11.2024. При  
уплате пошлины за 3 год в дополнительный 6-месячный срок с 03.11.2024 по 02.05.2025  
размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: [2022128423](#), 02.11.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
02.11.2022

Дата регистрации:  
01.08.2023

Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 02.11.2022

(45) Опубликовано: [01.08.2023](#) Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO 2021161245 A1, 19.08.2021.  
Клинические рекомендации  
"Множественная миелома", АОР, 2020. - 81  
с.. MURASE T. et al. Immunohistochemistry  
for identification of CCND1, NSD2, and MAF  
gene rearrangements in plasma cell myeloma.  
Cancer Sci. 2019 Aug; 110(8): 2600-2606.  
Epub 2019 Jul 11. FIRSOVA M.V. et al.  
Plasmacytoma in patients with multiple  
myeloma: morphology and  
immunohistochemistry. BMC Cancer. 2020;  
20: 346.

Адрес для переписки:  
125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4,  
ФГБУ (НМИЦ гематологии) Министерства  
здравоохранения РФ, Паровичникова  
Елена Николаевна

(72) Автор(ы):

Соловьева Майя Валерьевна (RU),  
Соловьев Максим Валерьевич (RU),  
Ковригина Алла Михайловна (RU),  
Обухова Татьяна Никифоровна (RU),  
Менделеева Лариса Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Национальный медицинский  
исследовательский центр гематологии"  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации (RU)

(54) Способ определения группы риска для пациентов с множественной миеломой, осложненной плазмоцитомой

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к гематологии, и может быть использовано для определения группы риска для пациентов с множественной миеломой (ММ), осложненной плазмоцитомой. Осуществляют получение и подготовку образца плазмоцитомы от пациента. Проводят анализ биоптата плазмоцитомы иммуногистохимическим методом для выявления экспрессии маркеров CCND1, NSD2, MAF. Пациента относят к группе высокого риска при выявлении экспрессии белков NSD2 и/или MAF. В случае отсутствия экспрессии трех белков или выявления только экспрессии белка CCND1 пациента относят к группе стандартного риска. Способ обеспечивает повышение эффективности определения группы риска при ММ, протекающей с плазмоцитомой, сокращение сроков проведения анализа, возможность ретроспективной оценки группы риска при использовании

парафинового блока плазмоцитомы, а также расширение арсенала способов, позволяющих определить группу риска за счет иммуногистохимического исследования экспрессии маркеров CCND1, NSD2, MAF в биоптате плазмоцитомы. 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 3 табл., 5 пр.

Изобретение относится к области биотехнологии, медицины, в частности к гематологии, предназначено для определения группы риска пациента с множественной миеломой, протекающей с плазмоцитомой (ММ с плазмоцитомой), и может быть использовано при назначении своевременного и адекватного лечения.

Множественная миелома (ММ) - одна из наиболее распространенных гематологических опухолей, ее частота составляет 10-15% всех гемобластозов. У части больных ММ плазматические клетки приобретают способность функционировать вне костного мозга, имплантируются в солидные органы и мягкие ткани, формируя плазмоцитому. В зависимости от локализации выделяют два типа плазмоцитом: костную (>50% случаев) и экстрамедуллярную (2-5% случаев) [1].

При ММ существуют различные факторы неблагоприятного прогноза, многообразие которых формирует понятие «миелома высокого риска». Такими факторами являются мутации определенных генов, некоторые цитогенетические aberrации, продвинутые стадии согласно актуальным системам стадирования ISS и R-ISS, фенотипические признаки высокого риска - наличие плазмоцитомы, рефрактерное течение болезни.

Патогенетические механизмы формирования плазмоцитомы при ММ малоизучены. Предполагается, что развитию плазмоцитомы способствует разобщение плазматической клетки и стромального микроокружения костного мозга посредством утраты молекул клеточной адгезии, хемокиновых рецепторов. Интерес к изучению механизмов диссеминации плазматической клетки и имплантации в солидные органы вызывают результаты проведенных исследований, подтвердивших гетерогенность генетических изменений опухолевых клеток, локализованных в анатомически разобщенных областях тела. В 2017 г. докладывались результаты секвенирования генома плазматических клеток, взятых из различных локализаций у одного и того же больного (костный мозг, плазмоцитома, очаг деструкции); проанализировано множество образцов тканей у 51 пациента с ММ. Авторы продемонстрировали пространственную геномную гетерогенность более чем у 75% больных. В очагах поражения, удаленных от костного мозга, могут существовать субклоны, которые отличаются от родоначального клона костномозговых опухолевых клеток. В очагах плазмоцитомы наблюдались новые хромосомные аномалии и мутации, что свидетельствует о необходимости прицельного изучения субстрата плазмоцитомы для понимания биологии экстрамедуллярного поражения [2].

Li и соавторы применили комплексный подход к изучению гетерогенности ММ. Различными методами исследовался опухолевый субстрат костного мозга и плазмоцитомы, однако выборка больных была представлена только десятью пациентами. Авторы показали, что, по сравнению с костным мозгом, более сложные геномные нарушения выявлялись в плазмоцитомах - еще одно свидетельство анатомической гетерогенности клональных клеток [3].

В литературе результаты исследований плазмоцитомы часто представлены на малых выборках больных. Сложности в исследовании патогенеза экстрамедуллярной миеломы обусловлены несколькими причинами. Так, опухоли, возникающие вследствие гематогенного распространения плазматической клетки, крайне редки. Кроме того, биопсия плазмоцитомы не входит в алгоритм диагностики ММ - если нет сомнений в диагнозе, гистологическое подтверждение плазмоцитомы не требуется. В соответствии с критериями диагноза, разработанными Международной рабочей группой по диагностике и лечению ММ, диагноз устанавливают при выявлении в костном мозге более 10% плазматических клеток или гистологически подтвержденной плазмоцитоме в сочетании с признаками симптомокомплекса CRAB или маркерами активности опухоли. И, наконец, в ряде случаев анатомическое расположение плазмоцитомы создает технические сложности для выполнения биопсии.

Для ММ характерен многоступенчатый механизм трансформации опухолевой клетки. Выделяют иницирующие (первичные) и вторичные хромосомные нарушения. К первичным генетическим событиям относятся транслокации с вовлечением локуса генов тяжелых цепей иммуноглобулинов на хромосоме 14 и множественные трисомии. В настоящее время первичные генетические события распределены в четырех больших субтипах ММ, к которым может быть отнесено более 80% всех больных ММ. Они включают: ММ с трисомиями, ММ с t(11;14), ММ с t(4;14), MAF-миелома: транслокации с вовлечением *c-MAF* - t(14;16) и *MAF-B* -

t(14;20) [4]. К вторичным генетическим событиям, связанным с опухолевой трансформацией, относят такие аберрации, как делеция 17p13, амплификация 1q, делеция 1p, делеция 13q / моносомия 13.

В соответствии с принятой в 2015 г. системой стадирования R-ISS, хромосомные аберрации t(4;14), t(14;16) и del17p13 в CD138+ клетках костного мозга являются цитогенетическими аномалиями высокого риска [5]. Согласно классификации клиники Мауо, к аберрациям высокого риска относятся t(4;14), t(14;16), t(14;20), делеция 17p13, амплификация 1q21. При сочетании двух или трех этих аберраций констатируется Double Hit или Triple Hit миелома, соответственно, что отражает ультравысокий риск [6].

В транслокациях с вовлечением локуса генов тяжелых цепей иммуноглобулинов на хромосоме 14 участвуют 5 основных хромосомных локусов-партнеров (4p16, 6p21, 11q13, 16q23 и 20q11), реже наблюдаются транслокации с неустановленным хромосомным партнером.

В изучении механизмов активации онкогенов могут применяться различные методы исследования: цитогенетические (FISH, сравнительная геномная гибридизация на микроматрице), молекулярно-биологические (секвенирование нового поколения), иммуногистохимический метод.

При этом важно отметить, несмотря на то, что FISH-исследование является стандартной методикой стратификации риска больных ММ, в реальной клинической практике РФ оно проводится ограниченному числу больных.

Показано, что у 38% больных ММ с костными плазмоцитомами опухолевое поражение костного мозга нерезко выражено, представлено рыхлой интерстициальной инфильтрацией единичными плазматическими клетками [7]. Это создает трудности в определении цитогенетических факторов неблагоприятного прогноза - в ряде случаев не удается выделить адекватное для цитогенетического анализа количество CD138+ клеток костного мозга. При успешном цитогенетическом исследовании выявленные аберрации в клетках костного мозга могут не совпадать с таковыми в клетках плазмоцитом вследствие анатомической гетерогенности опухоли.

Принимая во внимание анатомическую гетерогенность ММ, неярко выраженное поражение костного мозга при наличии плазмоцитом, а также тот факт, что плазмоцитомы встречаются у трети больных в дебюте заболевания, остро стоял вопрос о разработке эффективного и доступного диагностического метода определения маркеров высокого риска при этом типе заболевания.

При проведении исследований нами были выбраны три транслокации - t(11;14), t(4;14), t(14;16), две из которых - t(4;14) и t(14;16) - отнесены к аберрациям высокого риска.

При t(11;14)(q13;q32) локусом-партнером является 11q13 (ген *CCND1*, кодирующий белок CCND1). Эта аберрация встречается примерно у четверти больных ММ и в настоящее время относится к цитогенетическим аномалиям стандартного риска [4].

При t(4;14)(p16;q32), являющейся аберрацией высокого риска, задействован онкоген *NSD2(MMSET)*, находящийся в локусе 4p16. Частота встречаемости этой транслокации в общей популяции больных ММ примерно 15%, однако эта аберрация гораздо чаще наблюдается при ММ, осложненной плазмоцитомами [8].

При t(14;16)(q32;q23) локусом-партнером является 16q23, в этом регионе расположен ген *c-MAF*, кодирующий одноименный продукт. Эта аберрация, также являющаяся цитогенетической аберрацией высокого риска, встречается только у 5% пациентов с ММ [9]. Тем не менее, существуют другие механизмы активации онкогена *MAF*, пока остающиеся малоизученными. Так, в эксперименте на клеточных линиях ММ методом ПЦР было показано, что частота встречаемости гиперэкспрессии гена *c-MAF* составляет 46% [10]. По данным другого исследования у 30,5% больных ММ отмечалась экспрессия белка с-MAF в костном мозге иммуногистохимическим методом, при этом отмечалась корреляция между наличием экспрессии белка с-MAF и неблагоприятными факторами: высокими значениями  $\beta$ -2 микроглобулина и худшим ответом на индукционную терапию по сравнению в больными, в костном мозге которых отсутствовала экспрессия белка [11]. Неблагоприятное влияние онкогенов *NSD2* и *c-MAF* на параметры выживаемости было показано и при изучении профиля экспрессии генов GEP70 на когорте 1217 пациентов с ММ [12].

Таким образом, помимо транслокаций, существуют альтернативные механизмы гиперэкспрессии онкогенов: трисомии хромосом, амплификация локуса гена, эпигенетические нарушения [13], [14], [15].

Murase T. и соавторы в 2019 г. опубликовали результаты своей научной работы, посвященной сопоставлению FISH и иммуногистохимического (ИГХ) методов исследования при ММ. Исследователи показали, что выявление экспрессии белков

NSD2, с-MAF и CCND1 в костном мозге ИГХ методом с высокой чувствительностью и специфичностью отражает присутствие t(4;14), t(14;16) и t(11;14) в костном мозге при FISH-исследовании [16]. Анализируя литературу, мы не обнаружили работ, посвященных изучению экспрессии белков-продуктов онкогенов NSD2, с-MAF и CCND1 в субстрате плазмоцитомы. Определение экспрессии этих белков иммуногистохимическим (ИГХ) методом на биопсийном материале плазмоцитомы может рассматриваться как косвенный признак хромосомных aberrаций t(4;14), t(14;16), t(11;14), соответственно.

Технический результат предлагаемого изобретения заключается в повышении эффективности определения группы риска при ММ, протекающей с плазмоцитомой, в сокращении сроков проведения анализа, возможности ретроспективной оценки группы риска при использовании парафинового блока плазмоцитомы, а также расширении арсенала способов, позволяющих определить группу риска. Реализация способа направлена на дальнейшее назначение своевременного и адекватного лечения. Этот метод относительно прост в исполнении, доступен и экономически выгоден, что может позволить применять его в рутинной практике.

Технический результат достигается разработкой предлагаемого способа определения группы риска при множественной миеломе в субстрате плазмоцитомы с помощью иммуногистохимического метода.

Способ определения группы риска для пациентов с множественной миеломой, осложненной плазмоцитомой, включает следующие этапы:

- получение и подготовку образца плазмоцитомы от пациента;
- проведение анализа биоптата плазмацитомы ИГХ методом;
- определение группы риска на основании результатов анализа ИГХ методом.

Для определения группы риска проводят анализ экспрессии маркеров NSD2, MAF, CCND1, соответствующих наличию хромосомных aberrаций t(4;14), t(14;16), t(11;14).

При этом пациента относят к группе высокого риска при выявлении экспрессии белков NSD2 и/или MAF. В случае отсутствия экспрессии трех белков или выявлении только экспрессии белка CCND1 пациента относят к группе стандартного риска.

Указанная выше совокупность существенных признаков необходима и достаточна для получения технического результата.

Сущность предлагаемого изобретения пояснена на графических материалах:

Фиг. 1 - Локализация костных плазмоцитом у больных ММ;

Фиг. 2 - Пример гистологического (А) и ИГХ-исследований (Б, В, Г) биоптата костной плазмоцитомы крестца, где:

А - инфильтрация зрелыми плазматическими клетками, стрелками указаны 2-и 3-ядерные формы, г/э, ×200,

ИГХ-исследование с АТ к NSD2, CCND1, с-MAF. Иммуноферментный метод, ×200,

Б - ядерная экспрессия NSD2 в 90% опухолевых клеток,

В - ядерная экспрессия CCND1 в 90% опухолевых клеток,

Г - ядерная экспрессия с-MAF в 80% опухолевых клеток.

Сущность изобретения пояснена примерами реализации и использования, которые не ограничивают объем правовой охраны.

### **Пример 1. Подготовка к исследованию, проведение и интерпретация результатов**

Разработанный способ осуществляется следующим образом.

Биопсия плазмоцитомы выполняется хирургом до начала противоопухолевой терапии в дебюте заболевания. Для выполнения гистологического исследования биоптат плазмоцитомы сначала фиксируют в формалине (10% раствор), затем декальцинируют с использованием муравьиной кислоты. После этого производится проводка по спиртам восходящей концентрации и заключение в парафин. Срезы с парафиновых блоков толщиной 3 мкм окрашивают гематоксилином и эозином. Биоптаты плазмоцитомы исследуют с помощью ИГХ метода с использованием антител к CyclinD1(CCND1), NSD2, с-MAF. ИГХ-исследование проводят, например, на иммуногистохимическом стейнере LEICA BOND-MAX с использованием стандартной системы детекции BOND Polymer Refine Detection с увеличенным до 40 минут временем демаскировки и инкубации с первичными антителами. Демаскировку проводят с использованием буфера с pH9. Необходимый оптимальный титр антител определяют заранее методом разведения, как титр, при котором наблюдается максимальное специфическое окрашивание при наименьшей фоновой реакции. Характеристика некоторых антител приведена в таблице 1.

Таблица 1 Характеристика некоторых антител для исследования			
Название антитела	Клон	Разведение	Производитель
NSD2	29D1	1:150	Abcam

Cyclin D1	SPA4	1:40	Cell Marque
c-MAF	ERP16484	1:150	Abcam

Анализ экспрессии маркеров CCND1, NSD2, MAF проводят двойным «слепым» методом с использованием микроскопа, например, LEICA DM4000B. Для определения экспрессии белков просматривают 10 полей зрения при 400-кратном увеличении. Оценку экспрессии маркеров осуществляют полуколичественным методом.

Подсчитывают процентное содержание клеток, экспрессирующих исследуемый белок, по отношению к общему числу клеток опухолевого субстрата. Критерии оценки реакции с антителами к CCND1, NSD2, MAF разработаны на основании анализа данных научных исследований, в которых представлены клинические и патоморфологические сопоставления с определением порогового значения. Клоны антител, использованные в настоящем способе и в представленные в научных исследованиях, были идентичны [16]. При окрашивании антителами положительным результатом экспрессии считают следующие значения:

- для CCND1  $\geq 5\%$  и/или
- для NSD2 и/или MAF  $\geq 10\%$ .

**Пример 2. Модификация определения группы риска ММ с применением ИГХ метода исследования биоптатов плазмоцитом**

Для определения частоты встречаемости белков NSD2, c-MAF и CCND1 в субстрате костной плазмоцитомы методом ИГХ было проведено ретроспективное исследование, в которое включено 39 пациентов с ММ (13 мужчин, 26 женщин) в возрасте от 24 до 67 лет (медиана 57 лет), у которых в дебюте заболевания выявлены костные плазмоцитомы. Диагноз установлен в соответствии с критериями IMWG-2014. Всем пациентам выполнены рутинные лабораторные исследования, инструментальные методы обследования (низкодозная КТ/КТ черепа, всех отделов позвоночника, таза). Плазмоцитомы локализовались в различных костях скелета, преимущественно - в позвонках, черепе, костях таза (Фиг. 1).

В таблице 2 представлена характеристика больных. Как видно из таблицы 2, отмечалось невыраженное поражение костного мозга: медиана выявленных в миелограмме плазматических клеток составила 10%. Закономерно, что в этой группе больных без тотальной инфильтрации костного мозга не отмечена и глубокая анемия - медиана гемоглобина составила 121 г/л. У большинства больных диагностирована III стадия по Durie-Salmon и I стадия по ISS (87% и 71,8%, соответственно). У большинства пациентов (76,9%) отмечались множественные костные плазмоцитомы.

Исследуемые параметры	Клинико-лабораторные показатели
Доля плазматических клеток в костном мозге, %	10,0 ± 2,5
Гемоглобин, г/л	121,0 ± 2,5
Кальций, ммоль/л	2,4 ± 0,1
Креатинин, мкмоль/л	75,0 ± 28,3
Частота выявления типа парапротеина, %	51,4
G	18,9
A	27
только СЛЦ	2,7
несекретирующая форма	
$\beta 2$ -микроглобулин, мг/л	2,9 ± 0,4
ЛДГ, Ед/л	323,0 ± 22,4
Альбумин, г/л	42,0 ± 3,9
Стадия по Durie-Salmon, (% больных)	
I / II / III	7,7 / 5,3 / 87
Стадия заболевания по ISS, (% больных)	
I / II / III	71,8 / 12,8 / 15,4
Процент больных с плазмоцитомой, единственной	23,1
множественными	76,9

Всем пациентам выполнена биопсия костной плазмоцитомы с последующим гистологическим исследованием, подтвердившим плазматическую природу опухоли. ИГХ исследование 39 образцов плазмоцитом выполнено с использованием антител к NSD2, c-MAF, CCND1.

В дебюте заболевания только 15 больным (38,5%) проведена позитивная иммуномагнитная селекция CD138+ клеток костного мозга с использованием моноклонального антитела к CD138 (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу производителя. Далее выполняли FISH-исследование полученных клеток с использованием ДНК-зондов для выявления t(11;14), t(4;14), t(14;16), 8q14/MYC, делеций 17p13/TP53, 13q14, 1p32, амплификации 1q21 и множественных трисомий (MetaSystems, Германия).

По результатам ИГХ исследования биоптатов костных плазмоцитом экспрессия белка NSD2 выявлена у 17 больных (43,6%), экспрессия CCND1 - у 20 больных

(51,3%). Изолированная экспрессия белка c-MAF не выявлена ни в одном наблюдении. У 7 больных (18%) обнаружена сочетанная экспрессия 2-х или 3-х маркеров. Пример экспрессии белков NSD2, CCND1, c-MAF в субстрате костной плазмцитомы представлен на рисунке 2.

### **Пример 3. Сопоставление результатов FISH-исследования костного мозга и ИГХ исследования биоптатов плазмцитом у больных ММ**

У 15 пациентов сопоставлены результаты цитогенетического исследования клеток костного мозга и ИГХ исследования биоптатов костных плазмцитом, данные приведены в таблице 3.

В случаях № 1-6 выявлена положительная корреляция между двумя методами, что характеризует метод ИГХ как высокочувствительный способ определения группы риска при ММ. Так, в костном мозге у трех больных определена t(4;14), в плазмцитоме отмечалась экспрессия белка NSD2. Еще у трех пациентов в костном мозге выявлена t(11;14), в плазмцитоме подтверждена экспрессия белка CCND1. Помимо этого, в трех из 6 биоптатах плазмцитом выявлена сочетанная экспрессия белков NSD2/ CCND1/ c-MAF.

В случаях № 7-13 FISH-исследование не выявило t(4;14), t(14;16) или t(11;14) в костном мозге. При этом у 4 больных в плазмцитоме определялась экспрессия NSD2, у 5 пациентов - CCND1, сочетанная экспрессия двух белков выявлена в двух наблюдениях (№ 8,9).

В случаях № 14-15 цитогенетическое исследование неинформативно ввиду малого количества выделенной фракции CD138+ клеток. При этом в одном случае определена экспрессия NSD2 в субстрате плазмцитомы.

Принимая во внимание данные FISH-исследования CD138+ клеток костного мозга, у 20% больных определена группа высокого риска. При этом, ориентируясь на ИГХ метод, в группу высокого риска можно отнести уже 60% больных (у 9 из 15 больных выявлена экспрессия NSD2 в плазмцитоме).

№ пац.	t(4;14) / NSD2		t(11;14) / CCND1		t(14;16)/c-MAF		Amp.1q21	del17p13	Определение риска, метод	
	FISH	ИГХ	FISH	ИГХ	FISH	ИГХ			FISH	ИГХ
1	+	+	-	+	-	+	-	+	высокий	высокий
2	+	+	-	-	-	+	+	+	высокий	высокий
3	+	+	-	-	-	-	+	-	высокий	высокий
4	-	-	+	+	-	-	-	-	станд.	станд.
5	-	-	+	+	-	-	-	-	станд.	станд.
6	-	+	+	+	-	-	-	-	станд.	высокий
7	-	+	-	-	-	-	-	-	станд.	высокий
8	-	+	-	+	-	-	+	-	станд.	высокий
9	-	+	-	+	-	-	-	-	станд.	высокий
10	-	+	-	-	-	-	-	-	станд.	высокий
11	-	-	-	+	-	-	-	-	станд.	станд.
12	-	-	-	+	-	-	-	-	станд.	станд.
13	-	-	-	+	-	-	-	-	станд.	станд.
14	Не информ.	+	Не информ.	-	Не информ.	-	Не информ.	-	-	высокий
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	станд.

Согласно FISH-исследованию CD138+ клеток костного мозга, у 20% больных выявлена t(11;14), однако по данным ИГХ метода у 60% пациентов детектирована экспрессия белка CCND1 в плазмцитоме. Обнаружение t(11;14) при ММ в настоящее время не является фактором высокого риска. Тем не менее, выявление этой аберрации крайне важно ввиду того, что существует таргетный препарат, эффективность назначения которого показана для этой категории больных ММ.

Проведенное сопоставление хромосомных аберраций, выявленных методом FISH в костном мозге, и экспрессии белков - продуктов онкогенов методом ИГХ в субстрате костной плазмцитомы, свидетельствует об анатомической гетерогенности ММ и активации разных опухолевых клонов при формировании плазмцитом.

### **Пример 4. Клинический случай 1**

Пациент В., 23 года, в мае 2013 г. впервые заметил опухоль в затылочной области; по данным МРТ головного мозга было выявлено объемное новообразование затылочной кости. В Федеральном центре нейрохирургии (г. Новосибирск) было проведено удаление опухоли. При гистологическом исследовании новообразования выявлен инфильтрат, состоящий из зрелых плазматических клеток. Диагноз множественной миеломы был установлен на основании гистологического исследования опухоли затылочной кости, миелограммы (плазматические клетки 3,6%); иммунохимического исследования белков сыворотки и мочи (моноклональная

секреция Gk 4,0 г/л, содержание бета2-микроглобулина в сыворотке в пределах нормы). Показатели гемограммы, биохимии были в пределах нормальных значений. Цитогенетическое исследование клеток костного мозга не выполнялось. По данным КТ костей выявлены единичные очаги разрежения костной ткани в теле Th9 позвонка и грудина. Установлена I стадия по ISS.

Индукционная терапия начата в октябре 2013 г, проведено 4 курса VCD, достигнута очень хорошая частичная ремиссия заболевания.

В январе 2014 г. пациент поступил в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Для уточнения риска множественной миеломы выполнено ИГХ исследование плазмоцитомы черепа с антителами к CCND1, NSD2, MAF. Обнаружена экспрессия NSD2 клетками плазмоцитомы, больной отнесен к группе высокого риска. Учитывая молодой возраст, высокий риск множественной миеломы, принято решение о необходимости более интенсивного лечения: проведении тандемной ауто-ТГСК. В мае и декабре 2014 г. выполнены две ауто-ТГСК в условиях высокодозного мелфалана. В течение 7,5 лет больной не получает специфическое лечение, сохраняется полная ремиссия множественной миеломы.

В этом клиническом примере показана возможность определения риска множественной миеломы на архивном материале - парафиновом блоке плазмоцитомы. Как уже упоминалось, в реальной клинической практике не всегда выполняется цитогенетическое исследование костного мозга. ИГХ метод является ценным инструментом для определения группы риска у больных ММ при наличии биоптата плазмоцитомы.

#### **Пример 5. Клинический случай 2**

Больная П., 61 год, в октябре 2017 г. отметила появление новообразования в области нижней челюсти справа. Обращалась в различные стационары, неоднократно выполнялась биопсия, диагноз не уточнен.

В январе 2018 г. в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России выполнена биопсия новообразования нижней челюсти справа. По данным гистологического исследования биоптата опухоли - картина плазмоцитомы. Диагноз множественная миелома установлен в феврале 2018 г. на основании гистологического исследования биоптата новообразования нижней челюсти, миелограммы (плазматические клетки 2,6%); цитогенетического исследования клеток костного мозга: t(4;14), t(11;14), t(14;16), del(1p36), amp(1q21), del(13q), перестройки гена c-MYC не обнаружены; гемограммы (анемия - Hb 103 г/л), биохимического анализа крови: (креатинин 52 мкмоль/л, 45,3 г/л; кальций 2,37 ммоль/л, ЛДГ 330 Е/л), иммунохимического исследования крови и мочи (κ-СЛЦ 1720 мг/л, κ/λ=939,9, экскреция B<sub>2</sub> 0,033 г/сут, β<sub>2</sub>-микроглобулин 2,68 мг/л). По данным ПЭТ/КТ выявлены деструкции в ребре и позвонках. На основании данных установлена I стадия по ISS, II стадия по R-ISS за счет повышенной активности ЛДГ, цитогенетические aberrации высокого риска не выявлены. С целью уточнения риска множественной миеломы, выполнено ИГХ исследование плазмоцитомы с антителами к CCND1, NSD2, MAF. Обнаружена экспрессия NSD2 клетками плазмоцитомы, что позволило отнести больную к группе высокого риска.

В марте 2018 г. проведен 1 курс VCD, однако на фоне проводимой химиотерапии отмечался рост опухоли. Учитывая, что по данным ИГХ исследования плазмоцитомы определена группа высокого риска, принято решение об интенсификации лечения, переведена на вторую линию терапии леналидомидом. На фоне лечения - уменьшение плазмоцитомы нижней челюсти справа в два раза, достижение иммунохимической ремиссии. В марте 2019 г. выполнена ауто-ТГСК в условиях высокодозного мелфалана (200 мг/м<sup>2</sup>). При контрольном обследовании через 100 дней после трансплантации сохранялся частичный ответ. В июле-августе 2019 г. выполнена локальная лучевая терапия на область плазмоцитомы в суммарной очаговой дозе 36 Гр. С октября 2019 г. в течение года проводилась поддерживающая терапия леналидомидом. В результате лечения достигнута полная ремиссия заболевания, сохраняющаяся по настоящее время. За пациенткой продолжено динамическое наблюдение, специфическая терапия не проводится.

Этот клинический пример демонстрирует важность определения аномалий высокого риска не только в клетках костного мозга, но и в клетках плазмоцитомы. При FISH-исследовании опухолевых клеток костного мозга не выявлены aberrации высокого риска, но в клетках плазмоцитомы обнаружена экспрессия NSD2. Это позволило нам отнести больную к группе высокого риска, на ранних этапах интенсифицировать лечение, благодаря чему удалось добиться глубокого длительного противоопухолевого ответа.

Таким образом, стратификация риска, основанная только на цитогенетическом исследовании клеток костного мозга у больных ММ, протекающей с плазмоцитомой,

приводит к ложноотрицательным результатам. Так, в костном мозге могут отсутствовать генетические аномалии высокого риска, в то время как в биоптате плазмцитомы они определяются, что обусловлено активацией другого, более агрессивного, опухолевого клона. В этом случае больной рассматривается в качестве пациента из группы стандартного риска, что является ошибочным и может привести к неверной тактике терапии. Дополнительное исследование клеток плазмцитомы выявляет прогностически неблагоприятные aberrации, соответственно отнесение пациента к группе высокого риска требует интенсифицированного лечения. Разработанный способ зарекомендовал себя как высокочувствительный способ определения маркеров высокого риска в субстрате плазмцитомы у больных ММ.

Кроме того, предлагаемый способ является частью дальнейшего фундаментального исследования генетической гетерогенности опухолевых клеток при ММ и позволяет сформировать базовое понимание механизмов развития плазмцитом, что необходимо для последующего персонализированного лечения ММ, осложненной плазмцитомой.

Разработанный способ экономически оптимизирован, установленные параметры достоверны и обоснованы теоретически и экспериментально.

Источники информации, принятые во внимание при составлении описания изобретения к заявке на выдачу патента РФ на изобретение «Способ определения группы риска для пациентов с множественной миеломой, осложненной плазмцитомой»:

1. L. Rosiñol, M. Beksac, E. Zamagni et al. Expert review on soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: definition, disease assessment and treatment considerations. *Br. J. Haematol.*, vol. 194, no. 3, pp. 496-507, Aug. 2021. DOI: 10.1111/bjh.17338
2. L. Rasche S S Chavan, O W Stephens et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-00296-y
3. Y. Liu, F. Jelloul, Y. Zhang et al. Genetic Basis of Extramedullary Plasmablastic Transformation of Multiple Myeloma. *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 44, no. 6, 2020. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001459
4. S. V. Rajkumar and S. Kumar, "Multiple myeloma current treatment algorithms," *Blood Cancer J.*, vol. 10, p. 94, 2020. doi: 10.1038/s41408-020-00359-2.
5. A. Palumbo, H. Avet-Loiseau, S. Oliva, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 26, pp. 2863-9, Sep. 2015. doi: 10.1200/JCO.2015.61.2267
6. S. V. Rajkumar. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.*, vol. 95, no. 5, pp. 548-567, May 2020. doi: 10.1002/ajh.25791.
7. М. В. Фирсова. Автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. мед. наук "Клинико-морфологическая характеристика и молекулярно-биологические особенности опухолевого субстрата у пациентов с множественной миеломой, протекающей с плазмцитомой" Москва, 2017.
8. M. Bhutani, D. M. Foureau, S. Atrash, et al. Extramedullary multiple myeloma. *Leuk.* 2019 341, vol. 34, no. 1, pp. 1-20, Nov. 2019. doi: 10.1038/s41375-019-0660-0.
9. J. R. Sawyer. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet.*, vol. 204, no. 1, pp. 3-12, Jan. 2011. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.11.002.
10. H. Chang, Q. Qi, W. Xu, and B. Patterson. c-Maf nuclear oncoprotein is frequently expressed in multiple myeloma. *Leukemia*, vol. 21, no. 7, pp. 1572-1574, 2007. doi: 10.1038/sj.leu.2404669.
11. GQ Wei, LJ Wang, HJ Yang et al. Clinical implications of c-maf expression in plasma cells from patients with multiple myeloma. *Exp. Hematol. Oncol.*, vol. 6, no. 1, May 2017. doi: 10.1186/s40164-017-0076-3.
12. N. Weinhold, CJ Heuck, A Rosenthal et al. Clinical value of molecular subtyping multiple myeloma using gene expression profiling. *Leukemia*, vol. 30, no. 2, pp. 423-430, Feb. 2016. doi: 10.1038/leu.2015.309.
13. W. Hoechtlen-Vollmar, G. Menzel, R. Bartl, et al. Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance. *Br. J. Haematol.*, vol. 109, no. 1, Apr. 2000. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.02007.x.
14. C. M. Annunziata, L. Hernandez, R E Davis et al. A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockade of MAF oncogene expression. *Blood*, vol. 117, no. 8, pp. 2396-2404, Feb. 2011. doi: 10.1182/blood-2010-04-278788.
15. A. Wiestner, M. Tehrani, M. Chiorazzi et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased



proliferation rate and shorter survival. *Blood*, vol. 109, no. 11, pp. 4599-4606, Jun. 2007. doi: 10.1182/blood-2006-08-039859

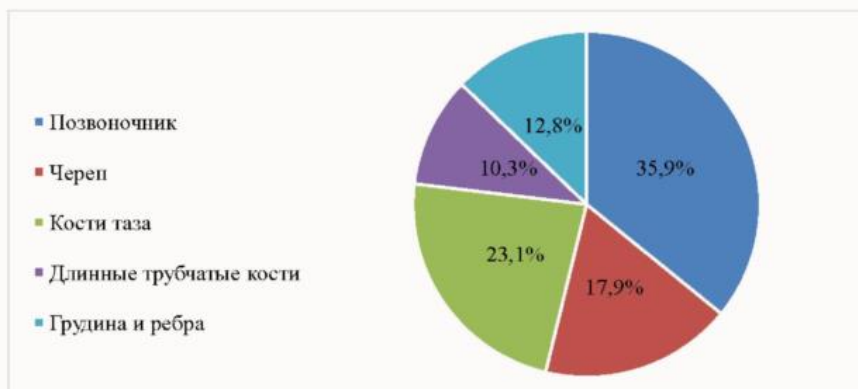
16. T. Murase, M. Ri, T. Narita et al. Immunohistochemistry for identification of CCND1, NSD2, and MAF gene rearrangements in plasma cell myeloma. *Cancer Sci.*, vol. 110, no. 8, pp. 2600-2606, Aug. 2019. doi: 10.1111/cas.14109.

#### Формула изобретения

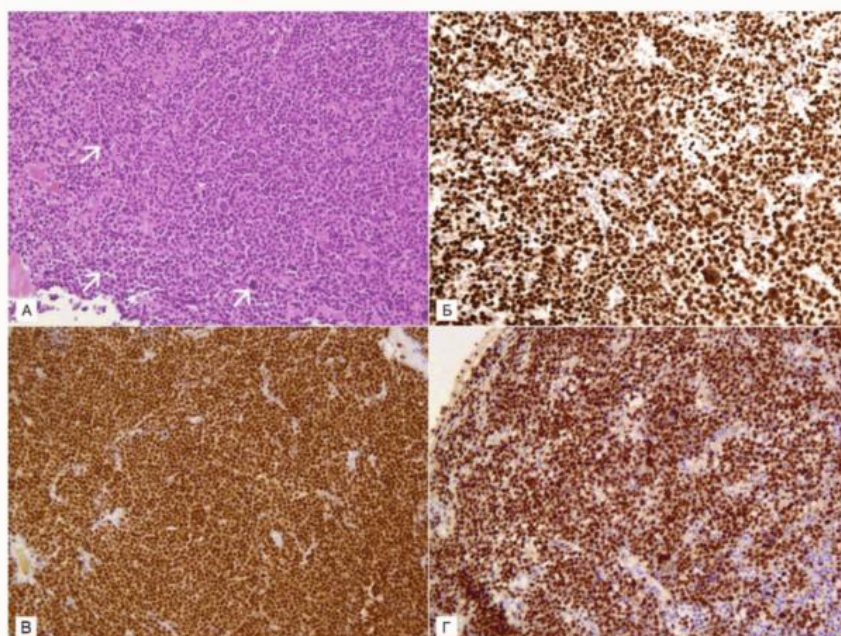
1. Способ определения группы риска для пациентов с множественной миеломой, осложненной плазмочитомой, включающий:

- получение и подготовку образца плазмочитомы от пациента;
- проведение анализа биоптата плазмочитомы иммуногистохимическим методом (ИГХ) для выявления экспрессии маркеров CCND1, NSD2, MAF;
- определение группы риска на основании результатов анализа ИГХ методом, при этом пациента относят к группе высокого риска при выявлении экспрессии белков NSD2 и/или MAF, в случае отсутствия экспрессии трех белков или выявления только экспрессии белка CCND1 пациента относят к группе стандартного риска.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что анализ экспрессии маркеров NSD2, MAF, CCND1 соответствует наличию хромосомных aberrаций t(4;14), t(14;16), t(11;14) соответственно.



Фиг. 1



Фиг. 2