

Заявление о рассмотрении протокола клинической апробации

1.	Наименование федеральной медицинской организации, научной или образовательной организации, осуществляющей деятельность в сфере охраны здоровья, являющейся разработчиком протокола клинической апробации	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
2.	Адрес места нахождения организации	197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8
3.	Контактные телефоны и адреса электронной почты	+7(921)953-06-02 karpova68@mail.ru
4.	Название предлагаемого для клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации	Клиническая апробация метода диагностики Ph-подобного острого В-лимфобластного лейкоза у взрослых и детей
5.	Число пациентов, необходимое для проведения клинической апробации	250 (2020г. – 20, 2021 г. -100, 2022г. - 130)

Приложение:

1. Протокол клинической апробации на 15 л.
2. Индивидуальная регистрационная карта наблюдения пациента в рамках клинической апробации на 1л.
3. Согласие на опубликование протокола клинической апробации на официальном сайте Министерства в сети «Интернет» на 1л.

Ректор ПСПбГМУ им.И.П. Павлова
академик РАН



С.Ф. Багненко

« 25 » февраля 2020г.
М.П.



В Департамент организации
медицинской помощи и санаторно-
курортного дела

СОГЛАСИЕ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации выражает согласие на опубликование протокола клинической апробации метода «Клиническая апробация метода диагностики Rh-подобного острого В-лимфобластного лейкоза у взрослых и детей» на официальном сайте Минздрава России в сети «Интернет».

Ректор ПСПбГМУ им.И.П. Павлова
академик РАН



С.Ф. Багненко

« 25 » февраля 2020г.
М.П.



Протокол клинической апробации метода профилактики, лечения, диагностики и реабилитации

Идентификационный № _____

Дата _____

I. Паспортная часть

1. Название апробируемого метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации (далее - метод)

Клиническая апробация метода диагностики Ph-подобного острого В-лимфобластного лейкоза у взрослых и детей.

2. Наименование и адрес федеральной медицинской организации, разработавшей протокол клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации (далее - протокол клинической апробации)

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

3. Фамилия, имя, отчество и должность лиц, уполномоченных от имени разработчика подписывать протокол клинической апробации и поправки к нему

Проректор по научной работе, академик РАН, д.м.н. профессор Ю.С. Полушин
Проректор по лечебной работе, д.м.н. О.А. Гриненко

II. Обоснование клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации

4. Аннотация метода

Данная клиническая апробация метода диагностики Ph-подобного острого В-лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у взрослых и детей предназначена для выявления группы пациентов с неблагоприятным прогнозом и высоким риском острого В-лимфобластного лейкоза (С91.0).

В апробацию планируется включать пациентов любого возраста (дети/взрослые) с впервые установленным диагнозом В-ОЛЛ, а также пациентов с костно-мозговым рецидивом или резистентным течением заболевания

Пациенты с Ph-подобным ОЛЛ составляют примерно 30% всех пациентов в группе В-ОЛЛ. Данная категория пациентов неоднородна, существует несколько подвариантов, каждый из которых требует индивидуального подхода к терапии с включением специфических таргетных препаратов.

60% пациентов с Ph-подобным ОЛЛ имеют вовлечение гена CRLF2, остальные мутации встречаются реже, поэтому в рамках данной клинической апробации на первом этапе всем пациентам, подозрительным в отношении Ph-подобного ОЛЛ методом проточной цитофлуориметрии будет проводиться определение уровня экспрессии CRLF2 в клетках костного мозга для последующего разделения пациентов на группы. В зависимости от уровня экспрессии CRLF2 на втором этапе будет выполняться флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) со специальными ДНК-зондами. Таким образом, после проведения второго этапа можно исключить или подтвердить диагноз Ph-

подобного В-ОЛЛ и определить пациента в ту или иную группу с целью последующего назначения таргетной терапии.

В сравнительный анализ будет включено 50 пациентов с диагнозом В-ОЛЛ, которым диагностика Rh-подобного В-ОЛЛ проводилась с использованием метода проточной цитофлуориметрии со стандартной панелью антител к В-ОЛЛ, стандартного кариотипирования клеток костного мозга и молекулярной диагностики на основе полимеразной цепной реакции. Диагноз Rh-подобного В-ОЛЛ с применением данных методов будет оцениваться ретроспективно.

5. Актуальность метода для здравоохранения, включая организационные, клинические и экономические аспекты

Острый В-лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) - гетерогенная группа злокачественных клональных заболеваний системы крови, происходящих из клеток-предшественниц гемопоэза преимущественно лимфоидной направленности дифференцировки, характеризуется поражением костного мозга опухолевыми клетками (бластами) с вытеснением нормального кроветворения, а также, в ряде случаев, вовлечением различных органов и систем организма.

В зависимости от генетических поломок в опухолевых клетках прогноз и риск в отношении заболевания может быть благоприятным, промежуточным и неблагоприятным. У детей чаще встречаются благоприятные поломки кариотипа, в связи с этим дети имеют лучший ответ на индукционную терапию, лучшую общую выживаемость и выживаемость без рецидива, а также в данном случае отсутствует необходимость проведения аллогенной трансплантации костного мозга в рамках консолидации ремиссии. С возрастом происходит изменение ландшафта генетических мутаций в сторону уменьшения количества благоприятных поломок и увеличения неблагоприятных, в связи с чем 5-летняя выживаемость без рецидива у взрослых пациентов не превышает 30-40%. Кроме того, частота достижения ремиссий при применении стандартной химиотерапии в первом и последующих рецидивах составляет всего 31-44% и 18-25%, соответственно. Такие неутешительные ответы на химиотерапию приводят к тому, что не более 5-30% пациентов с рецидивирующим/рефрактерным В-ОЛЛ могут рассчитывать на успешный исход алло-ТГСК, который является единственным методом, позволяющим добиться излечения заболевания.

У детей группа неблагоприятного прогноза составляет примерно 15%, у взрослых порядка 60%, сюда относятся комплексные поломки кариотипа, гиподиплоидный вариант, перестройки MLL гена, Rh+ ОЛЛ и Rh-подобный ОЛЛ.

Выделение Rh-положительного ОЛЛ и применение таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ в сочетании со стандартной химиотерапией позволило радикально изменить результаты выживаемости пациентов в данной подгруппе. Для наиболее частых вариантов Rh-подобных ОЛЛ также имеются препараты направленного действия, однако отсутствие рутинных методов диагностики не позволяет верифицировать данный подтип ОЛЛ и назначать специфическую терапию.

На сегодняшний день существует несколько принципиальных подходов для выявления Rh-подобного В-ОЛЛ, тем не менее, есть ряд различий, приводящих к отсутствию единого диагностического алгоритма, что затрудняет постановку диагноза в рутинной практике, а также интерпретацию результатов, таким образом, приводя к недостаточной эффективности скрининга и лечения части пациентов. Причины неудач, прежде всего, связаны с различными диагностическими возможностями, имеющимися в арсенале исследовательских центров, а также высоким уровнем материальных затрат.

В рамках данной клинической апробации нами предложен поэтапный алгоритм диагностики Rh-подобного В-ОЛЛ, основанный на использовании рутинных технологий: молекулярно-генетического метода FISH с использованием ДНК-специфичных зондов и

проточной цитофлуориметрии с применением антигенспецифичных антител. Предложенный метод представляет собой наиболее простой вариант верификации диагноза, с точки зрения имеющихся диагностических возможностей, кадровых ресурсов и материальных затрат.

Преимуществом метода является возможность диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ, с целью последующего назначения дифференцированной терапии направленного действия, что поможет улучшить долгосрочные результаты выживаемости и прогноза у пациентов с Ph-негативным В-ОЛЛ.

6. Новизна метода и (или) отличие его от известных аналогичных методов

В настоящее время в Российской Федерации данный метод диагностики не применяется и не финансируется в рамках существующих источников финансирования (ОМС, ВМП), в связи с отсутствием практических рекомендаций для постановки диагноза Ph-подобного В-ОЛЛ.

На сегодняшний день в общемировой практике существует алгоритм диагностики данной подгруппы ОЛЛ.

Первым появились два варианта экспрессионного анализа на биологических чипах высокой плотности [1]. Данный метод широко не применяется, так как представляет собой сложность, как с практической точки зрения, так и с точки зрения интерпретации результатов [2]. Австралийские и американские ученые исследовали профиль экспрессии генов с использованием нескольких зондов к наиболее часто вовлеченным генам [3,4]. Для выявления химерных генов с участием тирозинкиназ ABL1, ABL2, PDGFRB, JAK2, NTRK3, TYK2, цитокинов CSFR1 и цитокиновых рецепторов EPOR, CRLF2 рядом центров в США, Японии и Нидерландах разработан метод мультиплексной ПЦР, который, несмотря на высокую чувствительность, позволяет обнаруживать лишь ограниченный репертуар перестроек [5,6]. Еще одно диагностическое направление – секвенирование нового поколения. При помощи данного метода можно подтвердить диагноз Ph-подобного В-ОЛЛ, выявить точечные мутации в генах и охарактеризовать новые химерные гены, принимающие участие в работе сигнальных путей JAK-STAT и RAS. Сложностью метода является, прежде всего, длительность биоинформационной обработки получаемых данных, а, значит, невозможность рутинного применения технологии [1]. Для выявления мутаций в генах JAK1, JAK2, JAK3, IL7R, SH2B3, JAK1, JAK3, TYK2, IL2RB, а также KRAS и NRAS, NF1 и RPTN11 в настоящее время применяется секвенирование по Сэнгеру [7]. С учетом отсутствия единого метода, позволяющего верифицировать Ph-подобный В-ОЛЛ, был разработан алгоритм с включением различных методик, позволяющий провести скрининг и определить группу Ph-подобного В-ОЛЛ с применением минимального количества доступных диагностических тестов.

В рамках данной клинической апробации предлагается алгоритм диагностики, основанный на комбинации определения уровня экспрессии белка CRLF2 с наиболее часто встречающимися реаранжировками генов и последующим FISH-анализом [8]. Экспрессия белка CRLF2 на бластных клетках будет оцениваться методом иммунофенотипирования с применением проточной цитофлуориметрии, для которого существуют коммерчески доступные антитела. Данный высокотехнологичный метод лабораторной диагностики широко распространен в гематологической практике, используется для постановки диагноза ОЛЛ, мониторинга течения заболевания на фоне и после терапии, прост в исполнении и интерпретации результатов. Основными преимуществами являются высокая скорость выполнения анализа, возможность анализа большого количества клеток, а также строгая специфичность при использовании соответствующей панели антигенов с флюорохромами. Данный метод диагностики универсальный и не имеет аналогов для определения иммунофенотипа бластных клеток.

Метод FISH исследования, разработанный в 1980 годах и широко внедренный в онкологическую практику за последние 15 лет, представляет собой высокоспецифичную и

чувствительную технологию качественного и количественного анализа генетических перестроек, обладающий рядом преимуществ по сравнению со стандартным кариотипированием. Прежде всего, это отсутствие необходимости культивирования опухолевых клеток, а, значит, снижение времени на выполнение анализа, а также способность обнаруживать генетические изменения на уровне микроделетий, инсерций, дупликаций за счет применения специфичных к определенным локусам ДНК-зондов, что повышает диагностическую ценность метода. В настоящее время FISH исследование – это широко доступная высокоспецифичная и чувствительная технология качественного и количественного анализа, по результатам которой станет возможным распределение пациентов на группы в зависимости от характера аберрации для последующего применения таргетной терапии [9].

На основании применения данных методов диагностики множество генетических находок были разделены на несколько подгрупп, исходя из вовлечения тех или иных генов. Наиболее часто встречающимися поломками являются перестройки CRLF2 с или без мутаций в генах JAK (60%), перестройки ABL1 класса (15%), перестройки EPOR и JAK2 (10%), другие активирующие мутации JAK-STAT и мутации в сигнальном пути RAS (15-20%).

Таким образом, предлагаемый для клинической апробации алгоритм диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ является уникальным для нашей страны, в различных модификациях применяется в странах Европы и США и может быть клинически апробирован.

Радикальные отличия метода: применение специфичных антител для проточной цитофлуориметрии и ДНК-зондов для FISH исследования на основании наиболее часто встречающихся перестроек.

7. Краткое описание и частота известных и потенциальных рисков применения метода для пациентов, если таковые имеются, и прогнозируемых осложнений

Использование данного метода не сопряжено с широким спектром осложнений. Предложенный метод диагностики предполагает получение материала аспирата костного мозга при помощи пункционной биопсии. Биопсия костного мозга – рутинное исследование в гематологической практике, единственным потенциальным риском которого является кровотечение из места пункции, что случается крайне редко и не требует специальных методов коррекции. Данное осложнение быстро и легко купируется при помощи физиологических методов охлаждения.

8. Ссылки на литературные источники публикаций результатов научных исследований метода или отдельных его составляющих (в том числе собственных публикаций) в рецензируемых научных журналах и изданиях, в том числе в зарубежных журналах (названия журналов/изданий, их импакт-фактор)

1. Siegele B.J et al. Laboratory testing in BCR-ABL1-like (Philadelphia-like) B-lymphoblastic leukemia/lymphoma Am J Hematol 2018; 93 (7): 971–7. *Импакт-фактор: 8.731*
2. Boer J.et al. Expression profiling of adult acute lymphoblastic leukemia identifies a BCR-ABL1-like subgroup characterized by high non-response and relapse rates. Haematologica 2015; 100 (7): e261–4. *Импакт-фактор: 6.671*
3. Harvey R.et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. Blood 2010; 116 (23): 4874–84. *Импакт-фактор: 11.841*

4. Jain N. et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood* 2017; 129 (5): 572–81. *Импакт-фактор: 15.132*
5. Reshmi S. et al. Targetable kinase gene fusions in highrisk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. *Blood* 2017; 129 (25):3352–61. *Импакт-фактор: 15.132*
6. Roberts K. et al. Genomic and outcome analyses of Ph-like ALL in NCI standard-risk patients: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2018;132 (8): 815–24. *Импакт-фактор: 16.562*
7. Loh M. et al. Tyrosine kinome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group TARGET Project. *Blood* 2013; 121 (3): 485–8. *Импакт-фактор: 9.775*
8. Paria Tanasi et al. Efficacy of Tyrosine Kinase Inhibitors in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia harboring ABL class Rearrangements. *Blood* 2019 134 (16): 1351–1355 *Импакт-фактор: 16.562*
9. Linping Hu et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomarker Research* 2014, 2:3 *Импакт-фактор 42.31*

9. Иные сведения, связанные с разработкой метода

Апробацию планируется проводить в соответствии с протоколом клинической апробации, принципами надлежащей клинической практики и нормативными требованиями.

III. Цели и задачи клинической апробации

10. Детальное описание целей и задач клинической апробации

Цель: оценить клинико-экономическую эффективность метода диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ в сравнении со стандартными методами (кариотипирование, иммунофенотипирование клеток костного мозга и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени).

Задачи:

1. Оценить клиническую эффективность метода диагностики с применением панели антител для диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ в сравнении со стандартной панелью антител для выявления В-ОЛЛ с использованием проточной цитофлуориметрии.
2. Оценить клиническую эффективность FISH исследования в сравнении со стандартным кариотипированием клеток костного мозга для диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ
3. Выделить генетические группы Ph-подобного В-ОЛЛ в зависимости от вида мутаций и реаранжировки

IV Дизайн клинической апробации

11. Научная обоснованность и достоверность полученных на стадии разработки метода данных, включая доказательства его безопасности

С момента появления и внедрения различных методов, предназначенных для идентификации Ph-подобного В-ОЛЛ было охарактеризовано несколько подгрупп пациентов, описаны вовлеченные в патогенез развития заболевания гены и сигнальные пути, встречающиеся реаранжировки и гены-партнеры. Таким образом, к настоящему времени стало известно, что генетические aberrации, являющиеся неотъемлемой частью Ph-подобного В-ОЛЛ, приводят к ухудшению результатов выживаемости в данной группе пациентов, что отражено в целом ряде работ международных научно-исследовательских центров и подтверждает необходимость выработки алгоритма диагностики данной

подгруппы пациентов для последующего применения персонализированного подхода к лечению.

В распоряжении авторов имеются результаты исследований ведущих центров, занимающихся диагностикой и лечением ОЛЛ.

На основании применения алгоритма диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ множество генетических находок было разделено на несколько подгрупп, исходя из вовлечения тех или иных генов. Наиболее часто встречающимися поломками являются перестройки CRLF2 с или без мутаций в генах JAK (60%), перестройки ABL1 класса (15%), перестройки EPOR и JAK2 (10%), другие активирующие мутации JAK-STAT и мутации в сигнальном пути RAS (15-20%).

В нескольких исследованиях было продемонстрировано снижение частоты ремиссий, а также более низкая выживаемость у пациентов с Ph-подобным В-ОЛЛ в сравнении с другими В-ОЛЛ. В исследовании MD Anderson cancer center доказана значительно более низкая 5-летняя общая выживаемость у пациентов с Ph-подобным В-ОЛЛ по сравнению с остальными пациентами в группе В-ОЛЛ (23% против 59%, $p = 0,006$). Кроме того, исследование показало что в группе Ph-подобного В-ОЛЛ с гиперэкспрессией гена CRLF2 отмечалась значительно более низкая 5-летняя общая выживаемость (менее 20%), выживаемость без рецидива и продолжительность ремиссий по сравнению с другими генетическими подгруппами.

Доступны также данные об отсутствии влияния отрицательного статуса минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с Ph-подобным В-ОЛЛ на прогноз заболевания по сравнению с пациентами с другими подгруппами ОЛЛ. В исследовании достижение МОБ-негативного статуса у данной группы пациентов не приводило к улучшению общей выживаемости (продолжительность 26,2 месяца в группе пациентов с МОБ-негативным статусом и 23 месяца в группе пациентов с МОБ-позитивным статусом, $p=0,318$).

Heatley и соавт. продемонстрировал, что в группе пациентов с гиперэкспрессией гена CRLF2 отмечался самый высокий уровень рецидивов (78%). В исследовании Mullighan и соавт. есть данные о более высокой частоте рецидивов у пациентов с мутацией IKZF1, независимо от возраста пациентов, уровня лейкоцитов, цитогенетических поломок и статуса МОБ.

12. Описание дизайна клинической апробации

12.1 Указание основных и дополнительных (при наличии) исследуемых параметров, которые будут оцениваться в ходе клинической апробации

Основные параметры:

- Частота встречаемости Ph-подобного В-ОЛЛ

Вторичные параметры:

- Частота гиперэкспрессии CRLF2 по данным проточной цитофлуориметрии
- Частота обнаружения реаранжировок IGH, CRLF2, P2RY8, ABL1, ABL2, JAK2, EPOR, PDGFRb/CSFR1, CSF1A

12.2. Описание дизайна клинической апробации с графической схемой (этапы и процедуры, а также сроки и условия их проведения, иное)

Каждый пациент в дебюте заболевания, а также с рецидивом/рефрактерностью В-ОЛЛ может рассматриваться в качестве потенциального кандидата для включения в протокол данной клинической апробации. Для дальнейшего рассмотрения кандидата на включение в протокол необходимо выполнение следующих условий:

- необходимый уровень бластов в миелограмме должен составлять $\geq 20\%$ для дебюта заболевания и более 5% при подозрении на рецидив/резистентность;
- иммунофенотип В-ОЛЛ должен быть подтвержден данными проточной цитофлуориметрии;
- исключены маркеры хорошего и плохого прогноза (t(9;22), t(9;21), t(1;19), любые перестройки MLL гена, транскрипты BCR/ABL, ETV/RUNX1, TCF3/PBX1, MLL гена)

Проведение данной клинической апробации, представляющей собой диагностический алгоритм, предполагает нахождение пациента в условиях дневного стационара и занимает 7 дней.

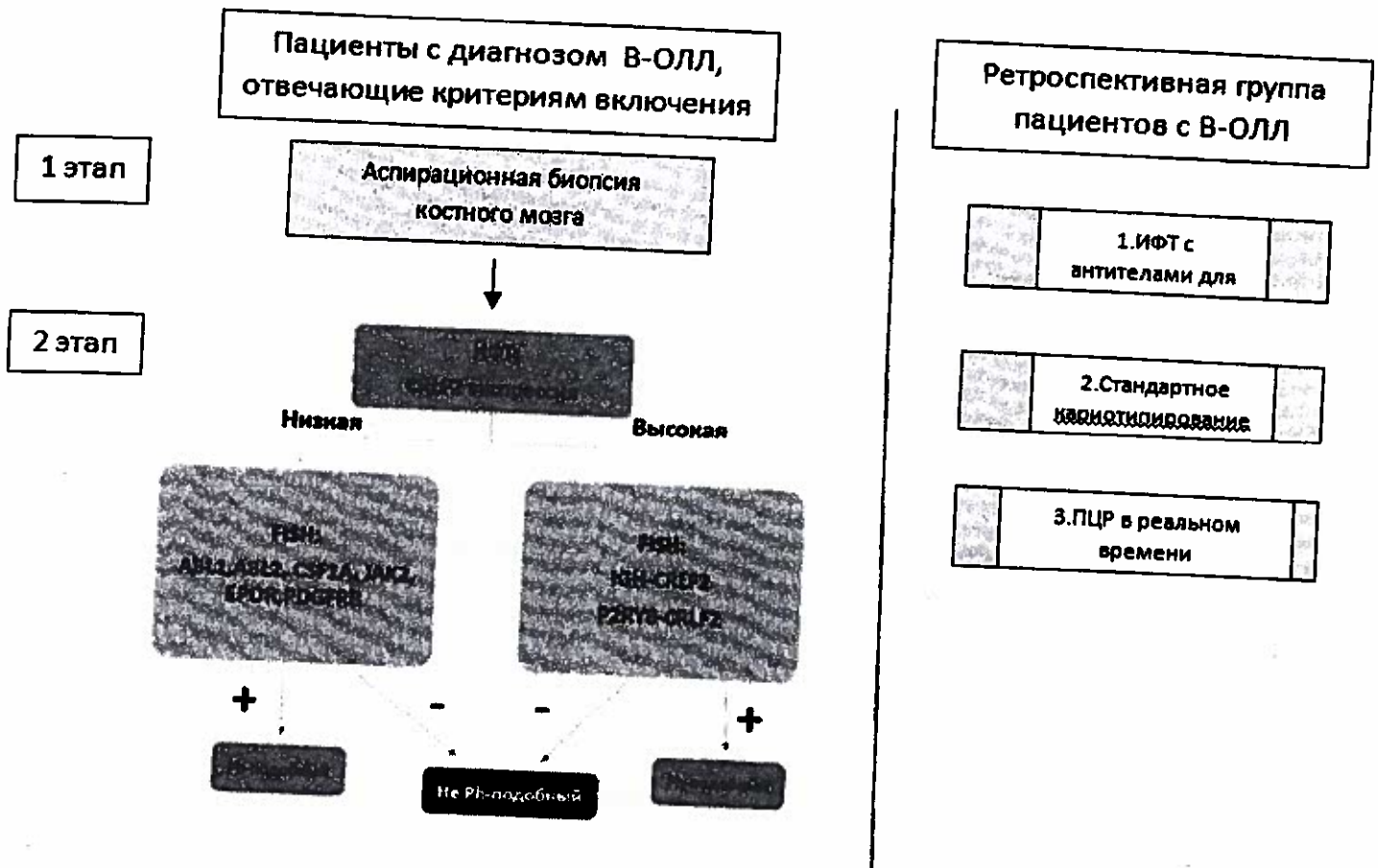
В сравнительный анализ будет включено 50 пациентов с диагнозом В-ОЛЛ, которым диагностика Ph-подобного В-ОЛЛ проводилась с использованием метода проточной цитофлуориметрии со стандартной панелью антител к В-ОЛЛ, стандартного кариотипирования клеток костного мозга и молекулярной диагностики на основе полимеразной цепной реакции. Диагноз Ph-подобного В-ОЛЛ с применением данных методов будет оцениваться ретроспективно.

Клиническая апробация включает в себя 2 основных этапа:

1 этап. Аспирационная биопсия костного мозга.

2 этап. Определение уровня экспрессии CRLF2 на поверхности бластных клеток В-линейной направленности в клетках костного мозга с последующим определением наличия перестроек с использованием ДНК-зондов к генам IGH, CRLF2, P2RY8, ABL1, ABL2, JAK2, EPOR, PDGFRb/CSFR1 методом FISH в клетках костного мозга.

Графическая схема апробации



12.3. Описание метода, инструкции по его проведению.

В рамках данной клинической апробации предусматривается диагностический этап с целью верификации диагноза Ph-подобного В-ОЛЛ с использованием технологий проточной цитофлуориметрии и FISH исследования.

1 этап. Аспирационная биопсия костного мозга пациентов.

2 этап. Определение уровня экспрессии CRLF2 на поверхности бластных клеток В-костном мозге линейной направленности в костном мозге (CD38/CD10/CD34/CD19/CD20/CD45/CD8/CD22) методом проточной цитофлуориметрии. Метод основан на выявлении и анализе антигенов с помощью конъюгированных с флуорохромами антител путем детекции флуоресцентного сигнала проточным цитофлуориметром. Определение экспрессии CRLF2 на В-лимфоцитах будет выполняться с набором антител CD38/CRLF2/CD34/CD19/CD10/CD45.

Пробы костного мозга пациентов будут подготовлены в соответствии со стандартным протоколом клиники для проведения проточной цитофлуориметрии с последующим анализом окрашенных клеток на проточном цитофлуориметре с использованием контролей.

Исследование наличия перестроек с использованием ДНК-зондов к генам IGH, CRLF2, P2RY8, ABL1, ABL2, JAK2, EPOR, PDGFRb/CSFR1, CSF1A методом FISH в клетках костного мозга.

В зависимости от уровня экспрессии CRLF2 (низкий/высокий) на бластных клетках В-линейной направленности предполагается выполнение FISH исследования с применением ДНК-специфичных зондов. У взрослых пациентов с гиперэкспрессией CRLF2 в первую очередь необходимо применение ДНК-зонда для определения реаранжировки IGH-CRLF2, у детей - ДНК-зонд для определения реаранжировки P2RY8-CRLF2, с учетом более высокой распространенности в данных группах. У пациентов с низким уровнем экспрессии CRLF2 сразу будут использованы ДНК-зонды для определения наличия aberrаций ABL1, ABL2, EPOR, JAK2, PDGFRb/CSFR1, CSF1A.

Пробы костного мозга пациентов будут подготовлены в соответствии со стандартным протоколом клиники для проведения FISH исследования:

- 1) подготовка цитологического препарата из материала костного мозга с использованием специальных осаждающих растворов и центрифугирования для получения концентрированной суспензии клеток;
- 2) предварительная обработка протеазами для гидролиза белковых соединений;
- 3) нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация зонда и образца;
- 4) гибридизация зонда и образца;
- 5) промывка раствором от не связавшихся зондов;
- 6) анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа.

Наличие любой реаранжировки/абберации, подтвержденное при помощи данных FISH исследования с использованием ДНК-зондов свидетельствует о диагнозе Ph-подобного В-ОЛЛ. Решение о выборе терапии данных пациентов принимается вне рамок клинической апробации.

12.4. Ожидаемая продолжительность участия пациентов в клинической апробации, описание последовательности и продолжительности всех периодов клинической апробации, включая период последующего наблюдения, если таковой предусмотрен.

Период набора пациентов – 2020-2022 года.

Продолжительность участия пациентов в клинической апробации – 7 дней.

Предполагается 1 госпитализация пациента в условиях дневного стационара.

12.5. Перечень данных, регистрируемых непосредственно в индивидуальной регистрационной карте клинической апробации метода (т.е. без записи в медицинской документации пациента) и рассматриваемых в качестве параметров, указанных в пункте 12.1. настоящего протокола клинической апробации.

В регистрационной карте пациента регистрируются следующие данные:

1. Фамилия, имя, отчество пациента
2. Возраст
3. Статус заболевания (дебют заболевания, изолированный костно-мозговой, комбинированный рецидив)
4. Номер рецидива, если есть
5. Количество бластных клеток в костном мозге (%) на момент включения в апробацию
6. Уровень экспрессии CRLF2 по данным проточной цитофлуориметрии на момент окончания апробации
7. Характер аберрации по данным FISH на момент окончания апробации
8. Статус пациента в апробации

Предполагается проведение контрольного обследования больных, при котором полученные результаты вносятся в регистрационную карту (табл.1)

Таблица 1. Список контрольных обследований

Контрольное обследование	Название этапа	Сроки заполнения регистрационной карты
КО1	Контрольный визит (дневной стационар) (забор костного мозга)	Д1
КО2	Контрольный визит (окончание апробации)	Д7

Ниже представлен план клинического обследования больных при контрольном обследовании (КО)

Таблица 2. План клинического обследования больных

Наименование услуги	КО1	КО2
Пункционная биопсия костного мозга	+	
Миелограмма	+	
Выявление профиля экспрессии антигенов для диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ методом проточной цитофлуориметрии	+	
Флуоресцентная гибридизация in situ с применением панели ДНК-зондов для диагностики Ph-подобного В-ОЛЛ	+	
Прием (осмотр, консультация) врача первичный	+	
Заполнение регистрационной карты	+	+

V. Отбор и исключение пациентов, которым оказывается медицинская помощь в рамках клинической апробации

13. Критерии включения пациентов

1. Лица от 0 лет
2. Дебют В-клеточного ОЛЛ
3. Первый и последующие костно-мозговые рецидивы, первично- и вторично-резистентные формы В-ОЛЛ
4. Отсутствие BCR/ABL, ETV/RUNX1, TCF3/PBX1, перестроек в MLL гене
5. Подписанное информированное согласие пациента или законных представителей

14. Критерии не включения пациентов

1. Т-клеточный ОЛЛ
2. Изолированный экстрамедуллярный рецидив ОЛЛ
3. Отсутствие добровольного информированного согласия пациента или его законного представителя на участие в апробации
4. Диагноз или лечение другого злокачественного новообразования
5. Соматическая или психическая патология, не позволяющая подписать информированное согласие
6. Оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации запрещается с участием в качестве пациентов:
 - а) детей, женщин в период беременности, родов, женщин в период грудного вскармливания
 - б) военнослужащих, за исключением военнослужащих, проходящих военную службу по контракту
 - в) лиц, страдающих психическими расстройствами
 - г) лиц задержанных, заключенных под стражу, отбывающих наказание в виде ограничения свободы, ареста, лишения свободы либо административного ареста

15. Критерии исключения пациентов из клинической апробации (т.е. основания прекращения применения апробируемого метода)

1. Отзыв согласия участия в исследовании

VI. Медицинская помощь в рамках клинической апробации

16. Вид, форма и условия оказания медицинской помощи.

Вид медицинской помощи: медицинская помощь в рамках клинической апробации.

Форма: плановая.

Условия оказания: дневной стационар

17. Перечень медицинских услуг (медицинских вмешательств)

№ п/п	Код услуги	Наименование	Количество	Кратность применения
1.	A08.05.001	Цитологическое исследование мазка костного мозга (миелограмма)	1	1
2.	A12.30.012.001	Иммунофенотипирование биологического материала для выявления маркеров гемобластозов	1	1

3.	A08.05.002.002	Патолого-анатомическое исследование биопсийного (операционного) материала тканей костного мозга с применением метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) (Флуоресцентная ин ситу гибридизация с локус-специфичным ДНК-зондом)	8	1
4.	A11.05.002	Получение цитологического препарата костного мозга путем пункции	1	1
5.	B01.005.001	Прием (осмотр, консультация) врача-гематолога первичный	1	1

18. Лекарственные препараты для медицинского применения, дозировка, частота приема, способ введения, а также продолжительность приема, включая периоды последующего наблюдения

В рамках данной клинической апробации не требуется.

Наименование специализированных продуктов лечебного питания, частота приема, объем используемого продукта лечебного питания:

В рамках данной клинической апробации не требуется.

Перечень используемых биологических материалов
В рамках данной клинической апробации не требуется.

Перечень используемых медицинских изделий, в том числе имплантируемых в организм человека

Номер	Наименование	Количество	Кратность использования
1	Игла для аспирационной биопсии костного мозга, одноразовая, стерильная PEN-BONE 15G	1	1

VII. Оценка эффективности метода

19. Перечень показателей эффективности

- Повышение показателя выявляемости Ph-подобного В-ОЛЛ по сравнению с группой сравнения

20. Перечень критериев дополнительной ценности:

- Не предусмотрено

21. Методы и сроки оценки, регистрации, учета и анализа параметров эффективности

Параметры эффективности будут оцениваться в соответствии с запланированными сроками их оценки. На каждого больного, включенного в исследование, заполняется индивидуальная регистрационная карта наблюдения пациента на бумажном и электронном носителе с соблюдением принципа защиты персональных данных. Диагностика наличия Rh-подобного В-ОЛЛ будет проводиться на основании анализа костного мозга предложенным выше методом, полученного методом аспирационной биопсии.

VIII. Статистика

22. Описание статистических методов, которые предполагается использовать на промежуточных этапах анализа результатов клинической апробации и при ее окончании. Уровень значимости применяемых статистических методов

Характеристика группы пациентов будет выполнена с помощью средств описательной статистики. В рамках апробации будет выполнено сравнение параметров эффективности между пациентами с установленным на основании применения предложенного метода диагнозом Rh-подобного В-ОЛЛ и пациентами из группы сравнения. Сравнение частоты выявления будет проводиться с помощью теста Хи-квадрат.

23. Планируемое количество пациентов, которым будет оказана медицинская помощь в рамках клинической апробации с целью доказательной эффективности апробируемого метода. Обоснование численности пациентов, включая расчеты для обоснования

Расчет числа пациентов основан на данных о выявляемости пациентов с В-ОЛЛ в Российской Федерации. При принятии уровня достоверности и уровня значимости <0.05 и размере группы выборки за три года в 250 и группой контроля в 50 пациентов сила исследования составит 85%.

В качестве параметра для определения размера выборки использован показатель частоты выявляемости.

В 2020 году - 20 пациентов, в 2021 - 100 пациентов, в 2022 – 130 пациентов.

IX. Объем финансовых затрат

24. Описание применяемого метода расчета нормативов финансовых затрат

Расчет нормативов финансовых затрат на оказание одной услуги одному пациенту проводили в соответствии с приказом Минздрава России от 13 августа 2015 г. № 556 «Об утверждении Методических рекомендаций по расчету финансовых затрат на оказание медицинской помощи по каждому протоколу клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации».

25. Стоимость лечения одного пациента в рамках клинической апробации.

Оплата стоимости диагностики пациентов из группы сравнения будет проводиться из другого источника финансирования и не входит в данную клиническую апробацию.

Расчетная стоимость медицинских услуг

№ п/п	Наименование	Цена, руб	Количество	Стоимость, руб	Источник сведений о стоимости
1.	Цитологическое исследование мазка костного мозга (миелограмма)	1 600,00	1	1 600,00	Прейскурант ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
2.	Иммунофенотипирование биологического материала для выявления маркеров гемобластозов	12000,00	1	12000,00	Прейскурант ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
3.	Патолого-анатомическое исследование биопсийного (операционного) материала тканей костного мозга с применением метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH)	80000	8	64000,00	Прейскурант ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
4.	Получение цитологического препарата костного мозга путем пункции	3000,00	1	3000,00	Прейскурант ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
5.	Статистическая обработка данных	10000,00	1	10000,00	Прейскурант ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
6.	Ведение индивидуальной регистрационной карты	20 000,00	1	20 000,00	Прейскурант ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
7.	Прием (осмотр, консультация) врача-гематолога первичный	1400,00	1	1400,00	Прейскурант ПСПбГМУ им. И.П. Павлова

Расчетная стоимость медицинских изделий

Номер	Наименование	Цена, руб	Кратность применения	Стоимость, руб	Источник сведений о стоимости
1	Игла для аспирационной биопсии костного мозга, одноразовая, стерильная PEN-BONE 15G	1500,00	1	1500,00	Государственный реестр предельных отпускных цен на медицинские изделия

Предварительная стоимость норматива финансовых затрат на 1 пациента рублей.

№ п/п	Наименование затрат	Сумма (руб.)
1	Затраты на оплату труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, непосредственно связанных с оказанием медицинской помощи по каждому протоколу клинической апробации	47 181,37
2	Затраты на приобретение материальных запасов (лекарственных препаратов, медицинского инструментария, реактивов, химикатов, мягкого инвентаря, прочих расходных материалов, включая импланты, вживляемые в организм человека, других медицинских изделий) и особо ценного движимого имущества, потребляемых (используемых) в рамках оказания медицинской помощи по каждому протоколу клинической апробации	63 952,40
3	Иные затраты, непосредственно связанные с реализацией протокола клинической апробации	
4	Затраты на общехозяйственные нужды (коммунальные услуги, расходы на содержание имущества, связь, транспорт, оплата труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, которые не принимают непосредственного участия в реализации протокола клинической апробации)	22 685,96
4.1	из них расходы на оплату труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, которые не принимают непосредственного участия в реализации протокола клинической апробации	18 872,55
5	Итого	133 819,73

Предварительный расчет нормативов финансовых затрат на лечение 250 пациентов составляет 33 454 932,5 рублей

В том числе:

2020 год (20 пациентов) – 2 676 394,6 рублей

2021 год (100 пациентов) – 13 381 973 рублей

2022 год (130 пациентов) – 17 396 564,9 рублей

Ректор ПСПбГМУ им.И.П. Павлова
академик РАН

С.Ф. Багненко

С.Ф. Багненко



2020г.

**Индивидуальная регистрационная карта наблюдения пациента в рамках
клинической апробации**
 Название метода: «Клиническая апробация метода диагностики Ph-подобного острого В-лимфобластного лейкоза у взрослых и детей»

Фамилия	
Имя	
Отчество	
Пол	
Дата рождения	
Лечебное учреждение	
Дата визита	
Статус заболевания	<input type="checkbox"/> дебют заболевания <input type="checkbox"/> рецидив
Характер рецидива (если есть)	<input type="checkbox"/> изолированный костно-мозговой <input type="checkbox"/> комбинированный
Вписать номер рецидива (если есть)	_____
Вписать % бластных клеток в костном мозге	_____
Вписать уровень экспрессии CRLF2 в костном мозге (на финальном визите)	_____
Вписать характер аберрации по данным FISH (на финальном визите)	_____
Осложнения процедуры аспирационной биопсии костного мозга	Вписать нежелательные явления, если есть
Статус пациента в апробации	<input type="checkbox"/> Включение в апробацию <input type="checkbox"/> Исключен преждевременно по причине (вписать) <input type="checkbox"/> Финальный визит