



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 87948

(13) C2

(51) МПК (2009)  
G01N 33/53МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЧУТЛИВОСТІ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ДО ГОРМОНАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА СПОЛУК ПЛАТИНИ

1

2

(21) а200810896

(22) 04.09.2008

(24) 25.08.2009

(46) 25.08.2009, Бюл.№ 16, 2009 р.

(72) МИКИТЕНКО ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ,  
МИКИТЕНКО ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА(73) МИКИТЕНКО ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ,  
МИКИТЕНКО ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

(56) RU 2 254 576 C2, 20.06.2005

RU 2 194 992 C1, 20.12.2002

RU 2 300 111 C2, 27.05.2007

Чешук В.Е., Захарцева Л.М., Бережная Н.М. Изучение чувствительности эксплантатов рака молочной железы к противоопухолевым препаратам. Онкология, т.4, №4, 2002

WO 2005/012568 A2, 10.02.2005

(57) Спосіб прогнозування чутливості раку молочної залози до гормональних препаратів та сполук платини, який включає забір матеріалу, що досліджують, виявлення експресії ключових молекулярних маркерів раку молочної залози та оцінювання чутливості тканини пухлини до лікувальних препаратів, який **відрізняється** тим, що як матеріал, що досліджують, використовують плазму крові, в якій визначають рівень гомоцистеїну, після чого встановлюють діапазон рівня експресії рецепторів естрогенів та металотіонеїнів за формулами:

для однієї межі діапазону:

$$RE = k_1 + k_2B + k_3H + k_4B^2 + k_5VxH + k_6H^2,$$

$$MT = k_7 + k_8B + k_9H + k_{10}B^2 + k_{11}VxH + k_{12}H^2,$$

де RE - рівень експресії рецепторів естрогенів;

MT - рівень експресії металотіонеїнів;

k - коефіцієнт пропорційності;

B - рік хвороби;

H - рівень гомоцистеїну в плазмі крові,

причому для I стадії захворювання  $k_1 = -242,28$ ;  $k_2 = 11,37$ ;  $k_3 = -1,15$ ;  $k_4 = -0,097$ ;  $k_5 = -0,067$ ;  $k_6 = 0,273$ ;  $k_7 = 22,19$ ;  $k_8 = 1,43$ ;  $k_9 = -1,53$ ;  $k_{10} = -0,034$ ;  $k_{11} = 0,22$ ;  $k_{12} = -0,46$ ;для IIa стадії захворювання  $k_1 = 71,98$ ;  $k_2 = -1,85$ ;  $k_3 = 4,45$ ;  $k_4 = 0,028$ ;  $k_5 = -0,074$ ;  $k_6 = -0,064$ ;  $k_7 = -30,05$ ;  $k_8 = -1,21$ ;  $k_9 = 17,8$ ;  $k_{10} = 0,04$ ;  $k_{11} = -0,2$ ;  $k_{12} = -0,24$ ;для IIb стадії захворювання  $k_1 = 196,37$ ;  $k_2 = -1,33$ ;  $k_3 = -8,06$ ;  $k_4 = 0$ ;  $k_5 = 0$ ;  $k_6 = 0$ ;  $k_7 = -247,74$ ;  $k_8 = -0,04$ ;  $k_9 = 70,41$ ;  $k_{10} = 0,08$ ;  $k_{11} = -1,0$ ;  $k_{12} = -0,98$ ;для III стадії захворювання  $k_1 = -97,29$ ;  $k_2 = 3,23$ ; $k_3 = -6,43$ ;  $k_4 = 0$ ;  $k_5 = 0$ ;  $k_6 = 0$ ;  $k_7 = 177,32$ ;  $k_8 = -3,21$ ;  $k_9 = 6,11$ ;  $k_{10} = 0$ ;  $k_{11} = 0$ ;  $k_{12} = 0$ ;

для другої межі діапазону:

$$PE = k_{13} \left( \frac{1,4B}{110,46} + \frac{0,4H}{19,5} + \frac{0,2Cm}{200} \right);$$

$$MT = k_{14} \left( \frac{0,4B}{110,46} + \frac{1,4H}{19,5} + \frac{0,2Cm}{200} \right);$$

де Cm - стандартизований показник стадії захворювання, що дорівнює 100 для I стадії захворювання, 200 - для IIa стадії, 250 - для IIb стадії, 300 - для III стадії,

 $k_{13} = 37,79$ , якщо рівень гомоцистеїну нижче 15мкМ, та 5, якщо рівень гомоцистеїну 15мкМ та вище, $k_{14} = 31,76$  для I-IIb стадій захворювання та 5 для III стадії захворювання, причому пухлину вважають чутливою до гормональних препаратів, якщо рівень експресії рецепторів естрогенів перевищує 10%, а до сполук платини - якщо рівень експресії металотіонеїнів є нижчим за 10%.

Винахід відноситься до області медицини, зокрема до онкології, і може бути використаний для точного прогнозу чутливості новоутворення у хворих на рак молочної залози до протипухлинних препаратів.

Відповідь пухлини на терапію обумовлена складними, в даний час ще не досить вивченими біохімічними механізмами, що лежать в основі її

чутливості до конкретних хіміопрепаратів. Це значно утрудняє індивідуалізацію лікувального процесу. В той же час можливість отримання інформації, що дозволяє до початку хіміотерапії передбачати відповідь новоутворення на дію протипухлинних препаратів, має велике значення для своєчасного вибору адекватної лікувальної тактики. У зв'язку з цим одним з актуальних напрямів досліджень в

(13) C2

(11) 87948

(19) UA

області клінічної онкології є розробка методів передуючої лікування оцінки реакції новоутворення на плановану протипухлинну терапію.

Підвищення ефективності цитостатичного лікування раку молочної залози при мінімізації токсичного впливу хіміопрепаратів являється однією з найбільш актуальних проблем сучасної клінічної онкології. Вирішення його можливе лише шляхом індивідуалізації лікування, тобто з урахуванням факторів, що передбачають ефект від лікування та прогноз перебігу захворювання. Такі фактори поділяються на прогностичні, що корелюють з виживаністю незалежно від лікування, та предиктивні, які пов'язані з відповіддю на лікування незалежно від прогнозу. Визначення тактики лікування хворих на рак молочної залози традиційно проводиться на основі клінічних та морфологічних характеристик пухлинного процесу. Так, один з відомих способів розробки тактики лікування хворих на різних стадіях розвитку новоутворення заснований на оцінці лише гістологічного типу пухлини, що не висвітлює взаємовідносини між перебігом захворювання на рак молочної залози та біологічними особливостями пухлини (див. патент US №6031930, МПК A61K31/11; 31/12; 35/12; A01N1/02; G06F19/00, опубл. 29.02.2000р.). Однак, не дивлячись на те, що поширеність злоякісного захворювання є найважливішим критерієм прогнозу, недоліком відомого способу є те, що далеко не завжди виявляється її кореляція з ефективністю та результатом лікування.

В даний час відомі методи визначення ефективності хіміотерапії на підставі оцінки ряду прогностичних факторів, таких як маркери проліферативної активності клітин пухлини (Ki-67, PCNA), рецептори фактору росту або регулятори клітинного росту (онкоген HER2/neu), пухлиносупресорні гени (p53). Дані методики є загально визначеними і використовувалися до теперішнього часу як єдиний спосіб в спробах прогнозування чутливості пухлини до хіміотерапії (див. Моисеєнко В.М. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы// В.М.Моисеєнко, В.Ф.Семиглазов, С.А.Тюляндин. -С.-Пб.: "Грифон", 1997.).

Відомий спосіб визначення експресії онкогена HER2/neu в пухлинній тканині, підвищена експресія якого свідчить про низьку чутливість новоутворення до хіміотерапії (див. Epstein M. and all. Overexpression of HER-2/neu proto-oncogen: predictor of local recurrence in patients with ductal breast carcinoma in situ. Breast cancer research and treatment. 19th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2000).

Не дивлячись на достатньо глибокі знання про прогностичні фактори, що визначають віддалені результати лікування та виживаність хворих на рак молочної залози, оцінити їх предиктивне значення з метою оцінки ефективності хіміотерапії виявилось важко через низьку відтворність результатів з вищезгаданими тестами (Ki-67, PCNA, p53, HER-2/neu). Основна причина цього полягає у відсутності специфічних маркерів, що дозволяють достовірно передбачити чутливість пухлини до окремих компонентів хіміотерапії.

Найближчим аналогом є спосіб визначення показань до комплексного лікування хворих на рак молочної залози, що включає проведення патогістологічного та імуногістохімічного дослідження пухлини і виявлення в ній експресії рецепторів естрогену та прогестерону, у якому додатково досліджують мікрометастази в лімфатичних вузлах за допомогою цитокератинів, визначають експресію bcl-2, білка c-erbB-2, онкобілка p53, рівень проліферативної активності - із застосуванням антитіл Ki-67, інвазію судин за допомогою антитіл CD31, CD34 та, при наявності гіперекспресії рецепторів стероїдних гормонів та інших онкомаркерів, призначають індивідуалізоване комплексне лікування з використанням гормональних препаратів і цитостатиків (див. патент України №8829, МПК G01N33/48, 15.08.2005р.).

Недоліком найближчого аналога є складність інтерпретації даних одночасного аналізу багатьох прогностичних факторів, відсутність одноваріантного опису достовірних результатів лікування на певний період упередження і, що найважливіше, отримання матеріалу для проведення імуногістохімічних досліджень можливе лише під час операції або застосування інвазивних діагностичних методик (наприклад, трепан-біопсії), що може негативно позначитись на подальшому перебігу пухлинного процесу.

В основу винаходу покладене завдання створити такий спосіб прогнозування ефективності хіміотерапії у хворих на рак молочної залози, в якому заміна чинників, які вивчають, дозволить побудувати достовірний прогноз на доопераційному етапі без застосування інвазивних діагностичних методик (інвазивного втручання).

Для вирішення завдання запропонований спосіб прогнозування чутливості раку молочної залози до гормональних препаратів та сполук платини, який включає забір матеріалу, що досліджують, виявлення експресії ключових молекулярних маркерів раку молочної залози та оцінювання чутливості тканини пухлини до лікувальних препаратів, за яким, згідно з винаходом, як матеріал, що досліджують, використовують плазму крові, в якій визначають рівень гомоцистеїну, після чого встановлюють діапазон рівня експресії рецепторів естрогенів та металотіонеїнів за формулами: для однієї межі діапазону

$$RE=k_1+k_2B+k_3H+k_4B^2+k_5BxH+k_6H^2,$$

$$MT=k_7+k_8B+k_9H+k_{10}B^2+k_{11}BxH+k_{12}H^2,$$

де RE - рівень експресії рецепторів естрогенів;

MT - рівень експресії металотіонеїнів;

k - коефіцієнт пропорційності;

B - рік хворої;

H - рівень гомоцистеїну в плазмі крові,

причому для I стадії захворювання  $k_1=-242,28$ ;

$k_2=11,37$ ;  $k_3=-1,15$ ;  $k_4=-0,097$ ;  $k_5=-0,067$ ;  $k_6=0,273$ ;

$k_7=22,19$ ;  $k_8=1,43$ ;  $k_9=-1,53$ ;  $k_{10}=-0,034$ ;  $k_{11}=0,22$ ;

$k_{12}=-0,46$ ;

для IIa стадії захворювання  $k_1=71,98$ ;  $k_2=-1,85$ ;

$k_3=4,45$ ;  $k_4=0,028$ ;  $k_5=-0,074$ ;  $k_6=-0,064$ ;  $k_7=-30,05$ ;

$k_8=-1,21$ ;  $k_9=17,8$ ;  $k_{10}=0,04$ ;  $k_{11}=-0,2$ ;  $k_{12}=-0,24$ ;

для IIb стадії захворювання  $k_1=196,37$ ;

$k_2=-1,33$ ;  $k_3=-8,06$ ;  $k_4=0$ ;  $k_5=0$ ;  $k_6=0$ ;

$k_7=-247,74$ ;  $k_8=-0,04$ ;  $k_9=70,41$ ;  $k_{10}=0,08$ ;

$k_{11} = -1,0$ ;  $k_{12} = -0,98$ ;  
для III стадії захворювання  $k_1 = -97,29$ ;  $k_2 = 3,23$ ;  
 $k_3 = -6,43$ ;  $k_4 = 0$ ;  $k_5 = 0$ ;  $k_6 = 0$ ;  $k_7 = 177,32$ ;  $k_8 = -3,21$ ;  
 $k_9 = 6,11$ ;  $k_{10} = 0$ ;  $k_{11} = 0$ ;  $k_{12} = 0$ ;

для другої межі діапазону

$$PE = k_{13} \left( \frac{1,4B}{110,46} + \frac{0,4H}{19,5} + \frac{0,2Cm}{200} \right);$$

$$MT = k_{14} \left( \frac{0,4B}{110,46} + \frac{1,4H}{19,5} + \frac{0,2Cm}{200} \right);$$

де Cm - стандартизований показник стадії захворювання, що дорівнює 100 для I стадії захворювання, 200 - для IIa стадії, 250 - для IIb стадії, 300 - для III стадії,

$k_{13} = 37,79$ , якщо рівень гомоцистеїну нижче 15мкМ та 5, якщо рівень гомоцистеїну 15мкМ та вище,

$k_{14} = 31,76$  для I-IIb стадій захворювання та 5 для III стадії захворювання, причому, пухлину вважають чутливою до гормональних препаратів,

якщо рівень експресії рецепторів естрогенів перевищує 10%, а до сполук платини - якщо рівень експресії металотионеїнів є нижчим за 10%.

Запропонований спосіб заснований на аналізі клініко-морфологічних, лабораторних параметрів пацієнтів та молекулярно-біологічних характеристик пухлин 117 хворих на рак молочної залози I-III стадій (навчальна вибірка), які перебували на лікуванні у відділенні пухлин молочної залози Інституту онкології АМН України та Київської міської онкологічної лікарні протягом 2005-2007рр.

Рівень гомоцистеїну визначався за допомогою комерційного набору "FHCY100 Axis® Homocysteine EIA kit" виробництва „Axis-Shield” (Великобританія). Експресія молекулярних маркерів оцінювалася шляхом традиційного імуногістохімічного аналізу з використанням моноклональних антитіл виробництва „DakoCytomation” (Данія).

Достовірність проведених розрахунків визначається за таблиці.

Таблиця

Встановлення вірогідності розрахунків експресії PE та MT у хворих на рак молочної залози в залежності від стадії захворювання та віку

захворювання стадія			Вік хворих						Сума за стадією	
			до 45 років		45-55 років		55 років та більше			
			PE	MT	PE	MT	PE	MT	PE	MT
1	доля хво- рих	%	33,3	66,7	50	45	77,8	40,7	62,3	45,3
Ila			40	100	37,5	79,2	59,1	59,1	47,1	74,5
Ilb			50	100	100	75,0	79,2	100	76,4	91,6
III			-	-	100	100	100	66,7	100	75
Разом			38/5	84.6	46.8	74.8	88,0	53.4	55.6	62.4

Для підтвердження ефективності запропонованого способу діагностики молекулярно-біологічних характеристик пухлин була здійснена перевірка на контрольній групі хворих на рак молочної залози, котрі перебували на лікуванні в Тернопільському обласному комунальному клінічному диспансері протягом 2007-2008рр.

Конкретні приклади виконання способу

Приклад 1.

Хвора А., 56 років, госпіталізована у плановому порядку з приводу підозри на рак молочної залози. Після обстеження встановлено діагноз: рак молочної залози IIb ст. Рекомендовано оперативне лікування.

З метою визначення чутливості пухлин до протипухлинних препаратів на доопераційному етапі у хворої був узятий аналіз венозної крові і визначений рівень гомоцистеїну в плазмі крові, що склав 9,5мкМ.

За відповідними формулами був визначений діапазон рівня експресії рецепторів естрогенів та металотионеїнів. Проведені наступні розрахунки: для однієї межі діапазону:

$$PE = 196,37 - 1,33 * 56 -$$

$$- 8,06 * 9,5 + 0 * 56^2 + 0 * 56 * 9,5 + 0 * 9,5^2 = 47,74\%;$$

$$MT = -247,74 - 0,04 * 56 +$$

$$+ 70,41 * 9,5 + 0,08 * 56^2 - 1,0 * 56 * 9,5 + 0,98 * 9,5^2 = 49,35\%;$$

для іншої межі діапазону:

$$PE = 37,79 \left( \frac{1,4 * 56}{110,46} + \frac{0,4 * 9,5}{19,5} + \frac{0,2 * 250}{200} \right) = 43,63\%;$$

$$MT = 31,76 \left( \frac{0,4 * 56}{110,46} + \frac{1,4 * 9,5}{19,5} + \frac{0,2 * 250}{200} \right) = 36,04\%;$$

Отже, рівень експресії рецепторів естрогенів за проведеними розрахунками прогнозується в діапазоні 43,63-47,74%, металотионеїнів - 36,04-49,35%.

Таким чином, оскільки всі отримані розрахунки перевищують значення 10%, то був зроблений висновок, що пухлина є рецептор-естроген- та металотионеїн-позитивною. Отже, естрогенно-визначена чутливість до гормональних препаратів та знижена чутливість до сполук платини. На доопераційному етапі призначено гормонотерапію.

Після проведення оперативного втручання та імуногістохімічного дослідження тканини пухлини встановлено, що рівень експресії рецепторів естрогенів в пухлині становив 45%, металотионеїнів - 40%. Таким чином, відзначений збіг прогнозних розрахунків та фактичних даних.

Приклад 2.

Хвора К., 78 років, госпіталізована у плановому порядку з приводу раку молочної залози. Діагноз: рак молочної залози IIIст. Рекомендовано оперативне лікування.

З метою визначення чутливості пухлин до протипухлинних препаратів на доопераційному етапі

визначено рівень гомоцистеїну в плазмі крові, що склав 13,0мкМ, та визначено діапазон рівня експресії рецепторів естрогенів та металотионеїнів. Проведені наступні розрахунки: для однієї межі діапазону:

$$\begin{aligned} PE &= -97,29 + 3,23 \cdot 78 - \\ &- 6,43 \cdot 13,0 + 0 \cdot 78^2 + 0 \cdot 78 \cdot 13,0 + 0 \cdot 13,0^2 = 71,06\%; \\ MT &= 177,32 - 3,21 \cdot 78 + 6,11 \cdot 13,0 + 0 \cdot 78^2 + \\ &+ 0 \cdot 78 \cdot 13,0 + 0 \cdot 13,0^2 = 6,37\%; \end{aligned}$$

для іншої межі діапазону:

$$PE = 37,79 \left( \frac{1,4 \cdot 78}{110,46} + \frac{0,4 \cdot 13,0}{19,5} + \frac{0,2 \cdot 300}{200} \right) = 58,64\%;$$

$$MT = 5 \left( \frac{0,4 \cdot 78}{110,46} + \frac{1,4 \cdot 13,0}{19,5} + \frac{0,2 \cdot 200}{200} \right) = 7,58\%;$$

Отже, рівень експресії рецепторів естрогенів за проведеними розрахунками прогнозується в діапазоні 58,64-71,06%, металотионеїнів - 6,37-7,58%. Отримані розрахунки перевищують значення 10% для рецепторів естрогенів та є нижчими за 10% для металотионеїнів, що свідчить про чутливість пухлини до гормонотерапії та препаратів платини. Призначене доопераційне лікування з застосуванням гормонотерапії та цисплатину. Після проведення операції та імуногістохімічного дослідження тканини пухлини встановлено, що рівень експресії рецепторів естрогенів в пухлині становив 70%, металотионеїнів - 7%. Таким чином, відзначений збіг прогнозних розрахунків та фактичних даних.

Приклад 3.

Хвора Л., 45 років, госпіталізована у плановому порядку з приводу підозри на рак молочної залози. Після обстеження встановлено діагноз: рак молочної залози ІІБ ст. Рекомендовано оперативне лікування.

З метою визначення чутливості пухлин до протипухлинних препаратів на доопераційному етапі визначено рівень гомоцистеїну в плазмі крові, що склав 16,5мкМ, та визначено діапазон рівня експресії рецепторів естрогенів та металотионеїнів. Проведені наступні розрахунки:

для однієї межі діапазону:

$$\begin{aligned} PE &= 196,37 - 1,33 \cdot 45 - 8,06 \cdot 16,5 + 0 \cdot 45^2 + \\ &+ 0 \cdot 45 \cdot 16,5 + 0 \cdot 16,5^2 = 3,53\%; \\ MT &= -247,74 - 0,04 \cdot 45 + 70,41 \cdot 16,5 + \\ &+ 0,08 \cdot 45^2 - 1,0 \cdot 45 \cdot 16,5 - 0,98 \cdot 16,5^2 = 64,92\%; \end{aligned}$$

для іншої межі діапазону:

$$PE = 5 \left( \frac{1,4 \cdot 45}{110,46} + \frac{0,4 \cdot 16,5}{19,5} + \frac{0,2 \cdot 250}{200} \right) = 5,79\%;$$

$$MT = 31,76 \left( \frac{0,4 \cdot 45}{110,46} + \frac{1,4 \cdot 16,5}{19,5} + \frac{0,2 \cdot 250}{200} \right) = 50,74\%;$$

Отже, рівень експресії рецепторів естрогенів за проведеними розрахунками прогнозується в діапазоні 3,53-5,79%, металотионеїнів - 50,74-64,92%.

Таким чином, оскільки всі отримані розрахунки нижчі за 10% для рецепторів естрогенів та перевищують 10% для металотионеїнів, то був зроблений висновок, що пухлина є рецептор-естроген-негативна та металотионеїн-позитивна. Отже, прогностично встановлена резистентність до гормональних препаратів та знижена чутливість до сполук платини. Була призначена доопераційна терапія без застосування зазначених груп препаратів.

Після проведення оперативного втручання та імуногістохімічного дослідження тканини пухлини встановлено, що рівень експресії рецепторів естрогенів в пухлині становив 5%, металотионеїнів - 60%. Таким чином, відзначене збіг прогнозних розрахунків та фактичних даних.

Перевірка запропонованого способу прогнозування ефективності протипухлинної терапії проведена на 12 хворих. Збіг розрахункових величин експресії молекулярних маркерів пухлинних клітин і фактичних даних за результатами імуногістохімічного дослідження, проведеного після оперативного втручання, для рецепторів естрогенів та металотионеїнів встановлено у 10 з 12 пацієнтів. За наведеними прикладами вірогідність розрахунків (відповідно до наведеної табл. 1) склала: приклад 1 - 79,2% для рівня експресії рецепторів естрогенів та 100% для рівня експресії металотионеїнів; приклад 2 - 100% та 66,7% відповідно; приклад 3 - 100% та 75% відповідно.

У порівнянні з найближчим аналогом, запропонований спосіб дозволяє на доопераційному етапі за рівнем гомоцистеїну в плазмі крові визначати діапазон рівня експресії рецепторів естрогенів та металотионеїнів, за ним зробити висновки про чутливість пухлини до гормональних препаратів та сполук платини, про доцільність їх призначення і почати хіміотерапевтичне лікування ще на цьому етапі. Це в ряді випадків значно підвищує ефективність лікування в цілому.

Крім того, використання запропонованого способу дозволяє завчасно індивідуалізувати схеми хіміотерапії хворих на рак молочної залози І-ІІІ стадій та надає можливість для розробки доступного для використання у клінічних установах цільового програмного забезпечення з метою вирішення методологічних, методичних і прикладних проблем лікування хворих на рак молочної залози.