



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98247** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 39/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 11271	(72) Винахідник(и): Чехун Василь Федорович (UA), Лук'янова Наталія Юріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.10.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.04.2015	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.04.2015, Бюл.№ 8	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ДО ЦИСПЛАТИНУ ТА ДОКСОРУБІЦИНУ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування резистентності пухлинних клітин до цисплатину та доксорубіцину включає імуногістохімічне дослідження експресії білків і подальшу оцінку препаратів за методом H-Score. Проводять визначення експресії трансферину або феритину і роблять висновок про резистентність пухлин до цисплатину та доксорубіцину.

UA 98247 U

Корисна модель, що заявляється, належить до галузі медицини, зокрема до клінічної онкології.

Однією з найбільших перешкод при лікуванні хворих на рак молочної залози, є лікарська резистентність пухлин до цитотоксичної дії протипухлинних препаратів [1]. На сьогодні у клінічній практиці наявність у пухлин фенотипу лікарської резистентності часто визначається як наслідок відсутності ефекту одного або декількох курсів хіміотерапії, що часто призводить до появи не виправданих тяжких побічних ефектів [2].

Відомі способи визначення резистентності пухлин до цитостатиків за допомогою вимірювання концентрації АТФ у пухлинних клітинах [3], дослідження спектра мікроРНК [4] або використання мікрочипів, на які нанесені антитіла, специфічні до різних білків [5]. Недоліком зазначених способів є їх працемісткість, вартість та можливість дати результат щодо резистентності пухлин лише до одного препарату.

У зв'язку з цим удосконалення існуючих та розробка нових молекулярних методів виявлення фенотипу резистентності пухлин дозволить оптимізувати схеми лікування пацієнтів та знизити токсичну побічну дію цитостатиків.

Найбільш близьким аналогом способу, що заявляється, вибраним як прототип, є спосіб прогнозування лікарської резистентності пухлин раку молочної залози людини [6], який передбачає імуногістохімічне визначення Р-глікопротеїну, глутатіон-S-трансферази та металотіонеїнів як маркерів резистентності до доксорубіцину та цисплатину. Позитивним у прототипі є те, що використання імуногістохімічного методу дозволяє на підставі експресії білків ефективно обирати персоналізований режим лікування хворих. Недоліком прототипу є необхідність імуногістохімічного визначення декількох білків для прогнозування чутливості пухлин для до цисплатину та доксорубіцину.

Власне опис корисної моделі, що заявляється.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу удосконалити спосіб прогнозування резистентності пухлинних клітин до цисплатину та доксорубіцину шляхом імуногістохімічного визначення експресії трансферину або феритину, що дасть змогу забезпечити точний прогноз резистентності пухлин до хіміотерапії з використанням цисплатину та доксорубіцину та підвищити ефективність протипухлинної терапії.

Поставлена задача вирішується тим, що прогнозування резистентності пухлинних клітин до цисплатину та доксорубіцину базується на імуногістохімічному визначенні експресії трансферину або феритину, і при значенні експресії будь-якого з цих білків більше 200 одиниць H-Score прогнозують резистентність пухлинних клітин до доксорубіцину та цисплатину, а при значенні експресії обох білків менше 200 одиниць H-Score - чутливість до цисплатину та доксорубіцину.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом корисної моделі наступний.

Оцінка наведеним способом прогнозу резистентності пухлинних клітин до цисплатину та доксорубіцину дає можливість кількісно оцінювати рівень експресії феритину та трансферину в динаміці лікування. Показники експресії трансферину та феритину в пухлинних клітинах знаходяться у обернено пропорційній залежності від ступеня ефективності протипухлинної хіміотерапії з використанням цисплатину та доксорубіцину. Високий рівень експресії феритину або трансферину свідчить про резистентність до цисплатину та доксорубіцину, а низький рівень експресії обох білків - про чутливість. Спосіб, що заявляється, забезпечує точний прогноз резистентності пухлинних клітин до цисплатину та доксорубіцину, що забезпечує можливість покращання результатів лікування хворих та знизити загальну токсичність.

Схема застосування способу, що заявляється.

Пухлинні клітини вирощують на покривних скельцях у культуральному середовищі протягом однієї доби, після чого фіксують в 4 %-ному розчині параформальдегіду протягом 20 хвилин. Проникнення реагентів імуноцитохімічної реакції всередину клітини забезпечують шляхом їх обробки 0,1 %-ним розчином тритону X100 впродовж 10 хвилин при температурі 37 °С. Для зменшення неспецифічного забарвлення клітини інкубують 30 хвилин з 1 %-ним розчином бичого сироваткового альбуміну.

Далі клітини інкубують з моноклональними антитілами, специфічними до трансферину або феритину, впродовж 1 години, після чого застосовують систему візуалізації EnVision (DakoCytomation, Данія), кон'юговану з пероксидазою. Через 30 хвилин проводять виявлення активності ферменту із застосуванням як субстрату 3-аміно-9-етилкарбазолу.

Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивають водою та дофарбовують гематоксиліном 1-2 хвилини та заключають у Faramount Aqueous Mounting Medium (DakoCytomation, Данія). Як позитивний контроль використовують моноклональні антитіла проти

пан-цитокератинів. Як негативний контроль замість моноклональних антитіл на клітини наносять забуферений фізіологічний розчин.

Експресію білків визначають за методом H-Score [7]. Експресія вважається сильною, якщо значення H-Score більше 200.

5 Приклади практичного застосування способу

Приклад 1

Вихідний штам клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7 (MCF-7/S) вирощували на покривних скельцях у культуральному середовищі протягом однієї доби, після чого фіксували в 4 %-ному розчині параформальдегіду протягом 20 хвилин. Імуноцитохімічне дослідження експресії трансферину та феритину показало їх слабку експресію ($72,0 \pm 1,8$ та $125,2 \pm 2,7$ одиниць H-Score, відповідно).

Дослідження цитотоксичної активності доксорубіцину за допомогою класичного МТТ-тесту показало, що величина IC_{50} складає $0,5$ мкг/мл.

Дослідження цитотоксичної активності цисплатину за допомогою класичного МТТ-тесту показало, що величина IC_{50} складає 4 мкг/мл.

15 Приклад 2

Резистентний до цисплатину штам клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7 (MCF-7/DDP) було отримано з вихідного штаму шляхом культивування у наростаючих концентраціях препарату. Клітини вирощували на покривних скельцях у культуральному середовищі протягом однієї доби, після чого фіксували в 4 %-ному розчині параформальдегіду протягом 20 хвилин. Імуноцитохімічне дослідження експресії трансферину та феритину показало їх слабку експресію ($215,3 \pm 5,5$ та $220,8 \pm 6,1$ одиниць H-Score, відповідно).

Дослідження цитотоксичної активності цисплатину за допомогою класичного МТТ-тесту показало, що величина IC_{50} складає 16 мкг/мл (Індекс резистентності порівняно з клітинами MCF-7/S складає 4).

25 Приклад 3

Резистентний до доксорубіцину штам клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7 (MCF-7/DOX) було отримано з вихідного штаму шляхом культивування у наростаючих концентраціях препарату. Клітини вирощували на покривних скельцях у культуральному середовищі протягом однієї доби, після чого фіксували в 4 %-ному розчині параформальдегіду протягом 20 хвилин. Імуноцитохімічне дослідження експресії трансферину та феритину показало їх слабку експресію ($205,5 \pm 5,4$ та $298,3 \pm 2,1$ одиниць H-Score, відповідно).

Дослідження цитотоксичної активності цисплатину за допомогою класичного МТТ-тесту показало, що величина IC_{50} складає 8 мкг/мл (Індекс резистентності порівняно з клітинами MCF-7/S складає 16).

Таким чином, імуногістохімічне визначення високої експресії феритину або трансферину у пухлинних клітинах дозволяє прогнозувати їх резистентність як до цисплатину, так і до доксорубіцину.

Джерела інформації:

40 1. Kasper M., Toftgård R. Smoothing out drug resistance. // *Cancer cel.* - 2013. - Vol. 23, N1. - P. 3-5.

2. Bray J., Sludden J., Griffin M. J. et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. // *British journal of cancer.* - 2010. - Vol. 102, N6. - P. 1003-1009.

45 3. Andreotti P.E., Cree I.A., Kurbacher C.M. et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. // *Cancer research.* - 1995. - Vol. 55, N22. - P. 5276-5282.

4. Yang H., Kong W., He L. et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. // *Cancer research.* - 2008. - Vol.68, N2. - P. 425-433.

5. Smith L., Watson M.B., O'Kane S.L. et al. The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. // *Molecular cancer therapeutics.* - 2006. - Vol. 5, N8. - P. 2115-2120.

6. Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. // *European Journal of Cancer.* - 1996. - Vol. 32, N6. - P. 912-920.

7. Pierceall W.E., Wolfe M., Suschak J. et al. Strategies for H-score normalization of preanalytical technical variables with potential utility to immunohistochemical-based biomarker quantitation in therapeutic response diagnostics. // *Analytical Cellular Pathology.* - 2011. - Vol. 34, N3. - P. 159-168.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб прогнозування резистентності пухлинних клітин до цисплатину та доксорубіцину, що включає імуногістохімічне дослідження експресії білків і подальшу оцінку препаратів за методом H-Score, який **відрізняється** тим, що проводять визначення експресії трансферину або феритину і роблять висновок про резистентність пухлин до цисплатину та доксорубіцину.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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