



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104120** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

G01N 21/00**G01N 33/48** (2006.01)**G01N 33/53** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 07640**

(22) Дата подання заявки: **17.06.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.12.2013**

(41) Публікація відомостей **25.09.2013, Бюл.№ 18**
про заявку:

(46) Публікація відомостей **25.12.2013, Бюл.№ 24**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Колеснік Олексій Петрович (UA),
Шевченко Анатолій Іванович (UA),
Каджоян Артем Валерійович (UA)**

(73) Власник(и):

**ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035
(UA),
Колеснік Олексій Петрович,
вул. Нижньо-Дніпровська, 4/238, м.
Запоріжжя, 69005 (UA),
Шевченко Анатолій Іванович,
вул. Чумаченка, 34/146, м. Запоріжжя,
69104 (UA),
Каджоян Артем Валерійович,
вул. Перемоги, 75/29, м. Запоріжжя, 69001
(UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K et al.
Prognostic and Predictive Importance of p53
and RAS for Adjuvant Chemotherapy in Non-
Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2007;
25: 5240-5247.

Ken A. Olaussen, Ariane Dunant, Pierre
Fouret, et al. DNA Repair by ERCC1 in Non-
Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based
Adjuvant Chemotherapy // N Engl J Med
2006;355:983-91.

UA 69728 U, 10.05.2012. 3 стор.

Celine Mascaux et al. Early Detection and
Screening of Lung Cancer. Expert Rev Mol
Diagn. 2010;10(6):799-815.

Tsunehiro O. Molecular Genetic Tumor
Markers in Non-small Cell Lung Cancer.
Review. ANTICANCER RESEARCH, 2005,
25: 1193-1196.

Harpole DH Jr, Herndon JE A prognostic
model of recurrence and death in stage I non-
small cell lung cancer utilizing presentation,
histopathology, and oncoprotein expression.
Cancer Res. 1995 Jan 1;55(1):51-56.

Zhu C-Q. Et al. Immunohistochemical markers
of prognosis in non-small cell lung cancer: a
review and proposal for a multiphase approach
to marker evaluation. J Clin Pathol
2006;59:790-800.

Зборовская И.Б., Татосян А.Г.

Молекулярные маркеры различных стадий
развития немелкоклеточного рака легкого.
Молекул. биол.. 2004. 38, N 2, с. 191-202.

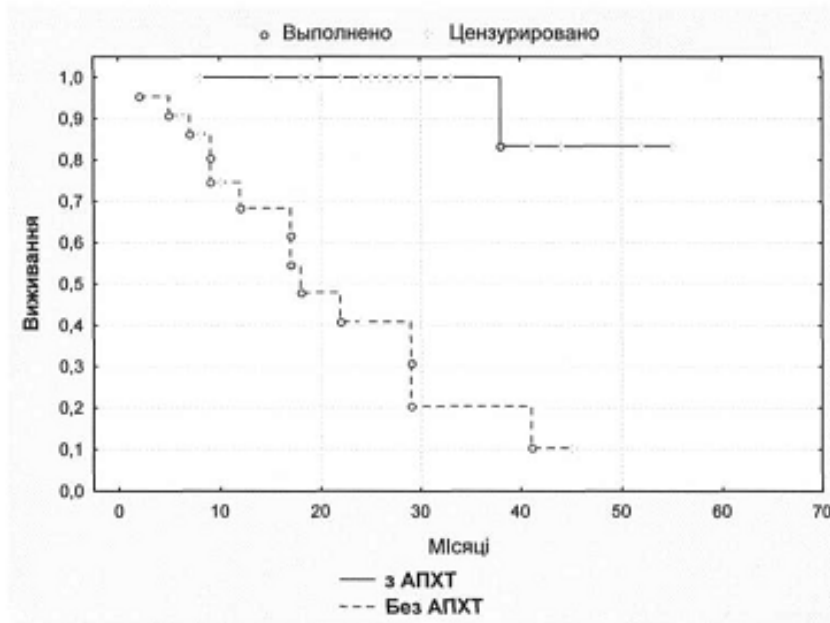
Пономарева А.А. и соавт. Молекулярно-
генетические маркеры в диагностике рака
легкого. Молекул.биол. 2011. 45, №2, С.203-
217.

Андрешкина И.И. Факторы агрессии
опухолевого роста: HER2 NEU, Ki67, P53
при метастазировании рака молочной
железы в легкие. Науч. ведомости БелГУ.
Сер. Мед. Фармация. 2011, N 15, с. 53-57.

UA 104120 C2

(54) СПОСІБ ВИБОРУ ТАКТИКИ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З РАННІМИ СТАДІЯМИ НЕДРІБНОКЛІТИННОГО РАКУ ЛЕГЕНІ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу вибору тактики післяопераційного лікування хворих з ранніми стадіями недрібноклітинного раку легені і передбачає визначення рівня експресії p53, Ki-67, Her2-neu у гістологічних препаратах первинної пухлини. Якщо експресія p53 складає $\leq 25\%$ клітин, експресія Ki-67 $\leq 25\%$ клітин, та експресія Her2-neu - "++", "+++" призначають хіміотерапію за схемою: цисплатин 80мг/м^2 1 день, етопозид 120мг/м^2 з 1 по 3 дні. Заявлений спосіб забезпечує покращення безпосередньої ефекту лікування та виживаності хворих.

**Фіг. 1**

Вживання хворих з ранніми стадіями НДКРЛ з p53+, Ki-67+, Her2-neu-статусом пухлини в залежності від проведення додаткового лікування

Патент на винахід стосується медицини, а саме, онкології, і може бути використаний у лікуванні хворих на недрібноклітинний рак легені (НДКРЛ) I-II стадій.

Незважаючи на вагомі досягнення у ранній діагностиці та лікуванні злоякісних новоутворень, захворюваність онкопатологією залишається високою. Так, з 2000 до 2020 року в Україні передбачається підвищення захворюваності на злоякісні новоутворення більше ніж на 25 %. Рак легенів є одним із найпоширеніших злоякісних новоутворень у всьому світі. Щороку в Україні реєструється понад 19 тисяч нових випадків захворюваності на рак легенів. Більше половини захворівших гинуть протягом року від прогресування захворювання.

Виконати оперативне втручання, що дає надію на видужання, можливо лише у 20-30 відсотків хворих. Однак навіть виконання операції не забезпечує 100 % гарантії і 50-60 % прооперованих хворих гинуть протягом 2-х років від прогресування захворювання.

Незадовільна виживаність у хворих на рак легенів є приводом для проведення досліджень, спрямованих на пошук нових методів лікування, та покращення існуючих. Одним із напрямків лікування, що тривалий час дискутується серед онкологів, є призначення ад'ювантної хіміотерапії хворим із ранніми стадіями НМКРЛ.

Все частіше у дослідженнях вказується на необхідність використання молекулярних маркерів для визначення пацієнтів, у яких буде ефективним використання ад'ювантної хіміотерапії. Однак таких досліджень мало і проведені вони з використанням незначної кількості прогностичних маркерів та з участю невеликої кількості хворих.

Нами було проведено дослідження індивідуалізації призначення АПХТ з використанням молекулярних маркерів, що дозволило покращити виживання хворих із I-II стадією НДКРЛ.

Аналогічний відомий спосіб - дослідження прогнозування ефективності АПХТ у хворих на НДКРЛ за допомогою молекулярного маркеру ERCC1 [Ken A. Olaussen, Ariane Dunant, Pierre Fouret, et al. DNA Repair by ERCC1 in Non-Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy // N Engl J Med 2006;355:983-91]. Однак визначення експресії маркеру автори проводили після завершення основного етапу дослідження. Для підтвердження отриманих даних необхідно проведення проспективного дослідження.

Спільні ознаки:

- використання прогностичного маркеру для прогнозування ефективності АПХТ;
- проведення імуногістохімічного методу аналізу для оцінки експресії маркеру;
- проведення платиновмісної АПХТ.

Недоліками цього дослідження є використання одного прогностичного маркеру, що не в повній мірі може охарактеризувати молекулярні особливості пухлини. Також, у дослідження були включені хворі з III стадією хвороби, для яких проведення АПХТ є необхідним стандартним методом лікування.

Найбільш близьким за технічною сутністю та результатом, що досягається, є спосіб вибору тактики лікування хворих на НДКРЛ Ib-IIb стадій шляхом визначення рівня експресії прогностичних маркерів p53, RAS, та їх інтерпретації. Якщо рівень експресії p53 високий (вище 15 % клітин), та визначається дикий тип RAS, призначали ад'ювантну поліхіміотерапію за схемою цисплатин/вінорельбін [Tsao MS, Aviell-Ronen S, Ding K et al. Prognostic and Predictive Importance of p53 and RAS for Adjuvant Chemotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2007; 25: 5240-5247.].

Спільними суттєвими ознаками прототипу і корисної моделі, що заявляється, є такі:

- проведення імуногістохімічного визначення експресії 53;
- призначення хворому ад'ювантної поліхіміотерапії.

Але спосіб-прототип має певні недоліки. Пропонується визначення мутації RAS, що є дорогим методом. Високою експресією p53 вважається рівень 15 %, що за даними літератури є досить низьким рівнем експресії. Пропонується проведення поліхіміотерапії за схемою цисплатин/вінорельбін, що є не зручним для пацієнта, тому, що вінорельбін вводиться у 1-й, 8-й, та 15-й дні циклу, окрім того, використання вінорельбіну, окрім загальних негативних реакцій, викликає флебіт, що значно знижує якість життя хворих.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу лікування недрібноклітинного раку легені I-II стадій шляхом визначення додаткових маркерів - Ki-67 (маркер проліферації), Her2-neu (маркер рецепторів до епідермального фактора росту), та проведення хіміотерапії за схемою цисплатин/етопозид, що забезпечить підвищення ефективності лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає проведення імуногістохімічного визначення експресії p53, та призначення хворому ад'ювантної поліхіміотерапії, новим є те, що додатково визначають маркери Ki-67, Her2-neu. Хіміотерапію призначають хворим, у яких експресія p53 визначається у ≤ 25 % клітин пухлини, експресія Ki-67

визначається у $\leq 25\%$ клітин пухлини, та експресія Her2-neu складає "++", "+++", при цьому хворому призначають хіміотерапію за схемою цисплатин/етопозид.

Як видно з представленої таблиці 1, усі хворі, що прийняли участь у дослідженні, були рандомізовані в залежності від морфологічної будови пухлини та проведення лікування. Хворі з позитивною чи негативною експресією маркеру включали підгрупи пацієнтів, яким проводили додаткове лікування, та пацієнтів, яких лише спостерігали після операції. Після того було проведено аналіз виживаності у кожній групі. Так, пацієнти з p53 негативним статусом, яким проведено АПХТ, мали медіану виживаності 7, 8 місяці, в той час як група хворих з тим самим морфологічним статусом, але без додаткового лікування жили довше, медіана виживання не досягнена (НД).

Таблиця 1

Вживаність хворих з I-II стадією НДКРЛ в залежності від рівня експресії молекулярних маркерів та проведеного лікування. Прототип (Tsao)

Маркер	№ пацієнтів	Медіана виживання	p
p53 IGX (-)			
Спостереження	48	НД	0,26
АПХТ	73	7,8	
p53 IGX (+)			
С постереження	71	4,0	0,02
АПХТ	61	НД	
p53 дикий тип			
Спостереження	136	6,2	0,04
АПХТ	137	7,8	
p53 мутантний			
Спостереження	64	5,4	0,35
АПХТ	60	НД	
RAS дикий тип			
Спостереження	169	6,2	0,03
АПХТ	164	НД	
RAS мутантний			
Спостереження	42	6,5	0,70
АПХТ	46	6,2	

Таким чином, проведення АПХТ у хворих, що мають p53 (-) статус є не доцільним. В той же час у хворих, у яких виявлена позитивна експресія p53 у пухлині, додаткове лікування значно покращувало виживання: медіана виживання у групі хворих, що отримували АПХТ, не досягнена, а у пацієнтів групи спостереження склала лише 4 місяці. Таким чином, експресія p53 дозволяє виділити хворих, яким потрібно проведення АПХТ. Також було проведено генетичний аналіз мутації гену p53. За даними цього аналізу видно, що хворі з диким типом гену, яким проведено АПХТ, мали кращу виживаність, ніж хворі у групі спостереження (7,8 проти 6,2 місяців, $p=0,04$). У пацієнтів з мутантним типом гену p53 вірогідна різниця у виживаності не досягнена ($p=0,35$).

Ще один маркер, який було оцінено - мутація гену RAS. Показано, що у хворих на НДКРЛ з диким типом RAS виживаність була кращою у групі з додатковим лікуванням, ніж у групі спостереження ($p=0,03$). У хворих з мутантним RAS різниці виживання між двома групами спостереження не відмічено ($p=0,7$). Таким чином, проведення АПХТ має сенс у хворих з p53+, p53 диким типом, RAS диким типом.

Таблиця 2

Вживання хворих з I-III стадією НДКРЛ в залежності від рівня експресії ERCC1 та проведеного лікування Прототип (Olaussen)

Маркер	№ пацієнтів	Медіана виживання	P
ERCC1-negative group			
Спостереження	202	42	0,002

Продовження таблиці 2

АПХТ	224	56	
ERCC1-positive group			
Спостереження	170	55	0,40
АПХТ	165	50	

Дані дослідження за аналогом (таблиця 2) вказують на різницю ефективності АПХТ в залежності від експресії ERCC1. Відмічено, що виживання після проведеного додаткового хіміотерапевтичного лікування значно покращується у хворих ERCC1 (-) групи. Тобто проведення АПХТ показано саме таким хворим, та не потрібно хворим з ERCC1 (+).

У нашому дослідженні (таблиця 3), проаналізовано вплив 3-х прогностичних маркерів на ефективність АПХТ. Відмічено, що АПХТ покращує виживання хворих з p53+, Ki-67+, Her2-neu(-). У хворих з Her2-neu (-) статусом медіана виживання не досягнена, а у хворих з Her2-neu (-) у групі з АПХТ не досягнено навіть 75-й процентиль виживаності, в той час у пацієнтів групи спостереження цей показник склав 42 місяці. Використання кожного маркеру окремо дозволяє виділити групу хворих серед пацієнтів з ранніми стадіями НДКРЛ, яким буде ефективне проведення АПХТ.

Використання даних маркерів разом дозволяє найбільш точно прогнозувати ефективність АПХТ. Так у групі хворих з p53+, Ki-67+, Her2-neu (-) відмічено найбільшу різницю у виживаності при проведенні АПХТ у порівнянні з хворими, що мали аналогічну морфологічну будову пухлини, але додаткове лікування не проводилось.

Таблиця 3

Маркер	№ пацієнтів	Медіана виживання	P
p53 ІГХ (-)			
Спостереження	38	НД	0,00947
АПХТ	56	24,8	
p53 ІГХ (+)			
Спостереження	84	30,8	p<0,001
АПХТ	42	НД	
Her-2-neu ІГХ (-)			
Спостереження	115	НД	0,017
АПХТ	58	НД	
Her-2-neu ІГХ (+)			
Спостереження	40	21,4	0,87
АПХТ	30	19,8	
Ki-67 ІГХ (-)			
Спостереження	63	НД	p<0,001
АПХТ	34	20,3	
Ki-67 ІГХ (+)			
Спостереження	61	19,6	p<0,001
АПХТ	58	НД	

Використання даних маркерів простіше ніж в способі за прототипом тому, що не використовується генетичний аналіз, який є дорогим та не доступним в усіх онкологічних центрах, та краще ніж у способі за аналогом - використання 3-х маркерів дозволяє з великою точністю прогнозувати ефективність АПХТ.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому.

Визначається три предиктивних маркера p53, Ki-67, Her2-neu, що дозволяє ретельніше відібрати групу хворих для проведення АПХТ, ніж за допомогою одного (ERCC1), або визначення двох маркерів (p53, RAS).

Призначається хіміотерапія з використанням етопозиду, що викликає меншу кількість негативних реакцій.

Призначення ад'ювантної поліхіміотерапії дозволяє покращити виживання хворих із I-II стадією НДКРЛ з певною морфологічною будовою пухлини, а саме з p53+, Ki-67+, Her2-neu(-).

Таким чином, сукупність вищезазначених позитивних впливів дозволить підвищити ефективність лікування, знизити кількість ускладнень та подовжити виживаність хворих.

Спосіб здійснюють таким чином.

Хворому проводиться радикальне оперативне втручання. Після операції виконується імуногістохімічне визначення експресії p53, Ki-67, Her2-neu. Якщо експресія p53 визначається у $\leq 25\%$ клітин пухлини, експресія Ki-67 у $\leq 25\%$ клітин пухлини, та експресія Her2-neu складає „++“, „+++“ пацієнту проводиться ад'ювантна поліхіміотерапія. Лікування проводять за схемою: цисплатин+етопозид. Цисплатин вводять у дозі 80 мг/м² на добу внутрішньовенно крапельно у 1-й день циклу. Етопозид призначають у дозі 120 мг/м на добу внутрішньовенно крапельно у 1-3 дні циклу. Проводять 3 курси хіміотерапії з інтервалом 21 день. Приклад 1.

Хворий К. 1950 р.н., історія хвороби № 873, амбулаторна картка № 16409 Діагноз: Центральний рак верхньої частки лівої легені pT2N1M0 стадія 2Б, ксг 3. Гістологічний висновок: № 8573-90 (25.02.2009) - Плоскоклітинний рак легені з некрозом pT2N1M0 G2. З анамнезу: вважає себе хворим з листопада 2008 року, коли з'явилась задишка, кашель, почав втрачати вагу. За даними лунокардіоскопії (20.02.2009) - склеротичні зміни стінки аорти. Гіпертрофія лівого шлуночка. Діастилична дисфункція лівого шлуночка за 1 типом. Дилатація правого передсердя, правого шлуночка. Мітральна та трикуспідальна регургітація 1 ступеня. УЗО органів черевної порожнини (17.02.2009) - дисметаболічна нефропатія. КТ органів грудної клітки (13.02.2009) - ліворуч в першому та другому сегментах визначається новоутворення 37×41×72 мм з чіткими нерівними контурами. Рентгенологічне дослідження органів грудної клітки (13.02.2009) - зліва в верхівковому сегменті верхньої долі визначається новоутворення 7×5 см з нечіткими контурами. ФБС (13.02.2009) - зліва бронхи 1-2 обтуровані екзофітною пухлиною. Цитологія № 1240 (13.02.2009) - плоскоклітинний рак.

Операція 24.02.2009 - Лівобічна верхня лобектомія з клиновидною резекцією головного бронху з лімфодисекцією D1.

Визначено високий рівень експресії p53 (50 %), Ki-67 (90 %) та відсутність експресії Her2-neu (0) проведено 3 курси АПХТ за схемою цисплатин 80 мг/м, етопозид 120 мг/м 1-3 дні. Виживання 52 місяці.

Приклад 2.

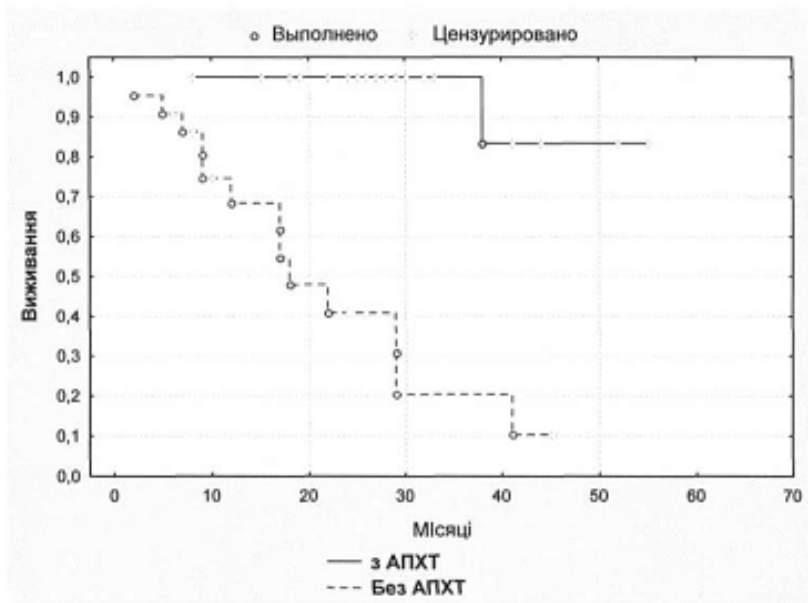
Хворий Т. 1951 р.н., історія хвороби № 477, амбулаторна картка № 16048 Діагноз: Центральний Са верхньої частки правої легені pT2N0M0 стадія 1Б, ксг 3. Гістологічний висновок: № 6205-20 (10.02.2009) - Плоскоклітинний рак легені з інфільтрацією станки головного бронху. У лімфатичних вузлах та операційному краю бронха елементів злоякісного росту не виявлено G2.

Данні клінічного обстеження: Захворювання виявлене при проф. огляді у січні 2009 р. після R-графії хворий направлений у ЗОКОД. При первинному огляді хворий скаржиться на кашель, втрату ваги. УЗО органів черевної порожнини (23.01.2009) - патології не знайдено. ФБС (19.01.2009) - Праворуч БЗ вражений екзофітною пухлиною. Рентгенологічне дослідження органів грудної клітки (28.01.2009): Праворуч у корені легені визначаються збільшені лімфатичні вузли, тінь пухлини у проекції головки кореня легені загальним розміром 5×4 см, збільшені лімфатичні вузли трахеальної групи, ателектаз переднього сегменту верхньої частки з наявністю порожнини деструкції. Цитологія № 369 (20.01.2009) - низькодиференційований плоскоклітинний рак. Операція 22.04.2009-04.02.2009 - правобічна верхня лобектомія з лімфодисекцією D1.

Визначено високий рівень експресії p53 (50 %), Ki-67 (75 %) та відсутність експресії Her2-neu (0) АПХТ не проводилась. Виживання 18 місяців.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб вибору тактики післяопераційного лікування хворих з ранніми стадіями недрібноклітинного раку легені шляхом проведення імуногістохімічного визначення експресії p53 в гістологічних препаратах та призначення хворому ад'ювантної поліхіміотерапії, який **відрізняється** тим, що додатково визначають експресію Ki-67, Her2-neu і хіміотерапію призначають хворим, у яких експресія p53 визначається у $\leq 25\%$ клітин пухлини, експресія Ki-67 у $\leq 25\%$ клітин пухлини, та експресія Her2-neu складає „++“, „+++“, при цьому хворому призначають хіміотерапію за схемою цисплатин/етопозид.



Фіг. 1

Вживання хворих з ранніми стадіями НДКРЛ з p53+, KI-67+, Her2-неу-
статусом пухлини в залежності від проведення додаткового лікування

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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

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