

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044957**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.17

(21) Номер заявки
202192826

(22) Дата подачи заявки
2021.10.19

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
C12Q 1/686 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

**(54) СПОСОБ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
МЕТАСТАТИЧЕСКОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

(31) 2020/0748.1

(32) 2020.10.28

(33) KZ

(43) 2022.06.30

(96) KZ2021/058 (KZ) 2021.10.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"КАЗАХСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ И
РАДИОЛОГИИ" (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Смагулова Калдыгул Кабаковна,
Уколова Елена Андреевна,
Курманкулова Анел Жумашкызы,
Туркпенова Иннара Талгатовна,
Оразгалиева Мадина Гиниятовна,
Жунсбекова Арай Алмабековна (KZ)**

(74) Представитель:
Мальшева Л.А. (KZ)

(56) CUSTODIO Ana et al.: Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. Crit Critical Reviews in Oncology/Hematology 85 (2013) 45-81, реферат, стр. 54, 62, левая колонка, стр. 64, 68, левая колонка

UCAR Gokhan et al.: Prognostic and predictive value of KRAS mutation number in metastatic colorectal cancer. Medicine (Baltimore), 2020 Sep 25; 99(39) <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000022407>, стр. 2-3

WO-A1-2016144635

INGOLD Heppner B. et al.: HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. British Journal of Cancer (2014) 111, 1977-1984 doi: 10.1038/bjc.2014.483, стр.1977

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано в диагностике и лечении метастатического колоректального рака. Метод позволяет достоверно и с минимальными затратами времени определить наличие метастатического колоректального рака. Предполагается, что изучение молекулярно-генетических прогностических и предиктивных маркеров позволит персонализировано подойти к лечению конкретного пациента и рационально составить план терапии больного. Изобретение осуществляется путем выявления мутации генов RAS и экспрессии белка Her2/neu методом полимеразной цепной реакции у больных с метастатическим колоректальным раком. При наличии мутаций гена RAS в Экзонах 2-го, 3-го и 4 типов применяют таргетный препарат бевацизумаб; при отсутствии мутаций продолжают поиск мутаций гена BRAF и экспрессии белка Her2/neu; при обнаружении мутаций гена BRAF применяют анти-EGFR терапию, BRAF ингибиторы или моноклональные антитела к EGFR. Таким образом, задачей изобретения является выявление последовательное мутаций каждого гена и определение статуса белка Her2/neu, что влияет на развитие течения заболевания и выбор тактики лечения колоректального рака.

044957 B1

044957 B1

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано в диагностике и лечении метастатического колоректального рака. Метод позволяет достоверно и с минимальными затратами времени определить наличие метастатического колоректального рака.

Рак толстой кишки - полиэтиологическое заболевание, то есть может иметь под собой множество причин. К ним относятся: генетические факторы, факторы внешней среды (включая питание, канцерогены), воспалительный процесс в кишечнике.

Хотя генетика колоректального рака остается до конца не раскрытой, последние исследования показывают её большое значение в развитии болезни [Tomislav Dragovich, MD, PhD. Colon Cancer/Medscape]. Так, например, наследственная мутация в гене APC является причиной семейного аденоматозного полипоза при котором у пациента имеется почти 100% вероятность развития рака толстой кишки к возрасту 40 лет.

Существуют и другие данные, подтверждающие необходимость проведения генетических методов диагностики. К примеру, было показано, что пациенты с синдромом Линча (наследственный рак толстой кишки) зачастую имеют нарушение репликации в генах hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2 [Lynch H.T. et al. Etiology, natural history, management and molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes): genetic counseling implications//Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention].

Известен способ диагностики рака кишечника (RU 2012100904 А), где используют биомаркер, специфичный для желудочно-кишечного рака и включающий последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 1 или фрагмент или вариант указанной последовательности нуклеиновой кислоты, или молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит указанную последовательность нуклеиновой кислоты, или аминокислотную последовательность, включающую SEQ ID NO: 2 или фрагмент или вариант указанной аминокислотной последовательности, или аминокислотную молекулу, которая содержит указанную аминокислотную последовательность.

Основным недостатком данного способа является отсутствие последовательного изучения Экзонов 1-4 и, следовательно, низкая чувствительность, что не позволит точно определить последующую терапию.

Прототипом нашего метода считается способ (RU 2692555 С2), где описывается способ диагностики колоректального рака и/или аденоматозных полипов у человека. Метод основывается на количественном определении по меньшей мере одной последовательности бактериального гена 16S рДНК, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 10, или комплементарной ей последовательности рРНК из образца кала от указанного субъекта, а также на сравнении уровней в образце от субъекта с уровнями в контрольном образце.

Однако основным недостатком данного метода снижение информативности при заборе материала из кала, а также отсутствие возможности последовательного изучения Экзонов 1-4.

Таким образом, задачей нашего изобретения последовательное выявление мутации каждого гена и определение статуса белка Her2/neu, что влияет на развитие течения заболевания и выбор тактики лечения колоректального рака.

Таким образом, заявляемый метод диагностики и лечения осуществляется следующим образом: Материалом для анализа служат опухолевые клетки из биопсийного материала. ДНК из опухолевых клеток извлекается при помощи набора для выделения ДНК согласно инструкции производителя. Качественная и количественная оценка образцов ДНК проводится с использованием методов спектрофотометрии. Количество выделенной двухцепочечной ядерной ДНК должно быть не менее 20 ng. Для выявления мутаций проводят амплификацию ДНК методом ПЦР в режиме real-time с помощью наборов реактивов для KRAS тестирования. При обнаружении наличия мутации гена RAS применяют таргетный препарат - бевацизумаб, при отсутствии мутаций продолжают поиск мутаций гена BRAF и экспрессии белка Her2/neu, при определении мутаций гена BRAF применяют анти-EGFR терапию, BRAF ингибиторы или моноклональные антитела к EGFR.

Пример исполнения 1.

Пациент Д. 64 года, выполнена биопсия образования сигмовидной кишки. ДНК из опухолевых клеток извлекалась при помощи набора для выделения ДНК "NorGen". Качественная и количественная оценка образцов ДНК проводилась с использованием методов спектрофотометрии с помощью NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Количество выделенной двухцепочечной ядерной ДНК было не менее 20 ng. Для выявления мутаций производили амплификацию ДНК методом ПЦР в режиме real-time с помощью амплификатора RotorGene 6000, Qiagen и наборов реактивов для KRAS тестирования (компании EntroGen).

Были обнаружены мутации гена RAS в Экзоне 2 по типу G12C, G12R. применяют таргетный препарат - бевацизумаб. Дальнейшие поиски мутаций показали отсутствие мутаций гена BRAF и экспрессии белка Her2/neu. Лечение проведено своевременно.

Пример исполнения 2.

Пациент Т. 58 лет, произведена биопсия образования нисходящей ободочной кишки. ДНК из опухолевых клеток извлекалась при помощи набора для выделения ДНК "NorGen". Качественная и количественная оценка образцов ДНК проводилась с использованием методов спектрофотометрии с помощью NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Количество выделенной двухцепочечной ядерной ДНК было не менее

20 ng. Для выявления мутаций производили амплификацию ДНК методом ПЦР в режиме real-time с помощью амплификатора RotorGene 6000, Qiagen и с помощью наборов реактивов для KRAS тестирования компании EntroGen).

Мутации гена RAS в Экзоне 2 не были обнаружены. Дальнейшие поиски мутаций показали отсутствие мутаций гена BRAF и экспрессии белка Her2/neu. Морфологические исследования показали доброкачественный характер образования.

Таким образом, данный способ диагностики и лечения позволяет провести последовательное выявление мутации каждого гена и определение статуса белка Her2/neu, что значительно влияет на прогноз течения заболевания и выбор тактики лечения колоректального рака.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ диагностики метастатического колоректального рака, включающий проведение молекулярно-генетических исследований тканей опухоли и отличающийся тем, что путем последовательности действий производят обнаружение в опухолевой ДНК наличие мутаций гена RAS в Экзоне 2 по типам G12D, G12C, G12S, G12R, G12A, G12V или G13D и/или в Экзоне 3 по типам Q61H, Q61L или Q61R, и/или в экзоне 4 по типам K117N, K117R, K117E, A146T, A146P или A146V, при определении которых применяют таргетный препарат бевацизумаб, при отсутствии мутаций гена RAS продолжают поиск мутаций гена BRAF и экспрессии белка Her2/neu, при наличии которых применяют анти-EGFR терапию, BRAF ингибиторы или моноклональные антитела к EGFR.

