

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192826** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.30

(51) Int. Cl. **A61B 10/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.19

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

(31) **2020/0748.1**

(32) **2020.10.28**

(33) **KZ**

(96) **KZ2021/058 (KZ) 2021.10.19**

(71) Заявитель:
**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:
Малышева Л.А. (KZ)

(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-го 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 последовательное выявление мутаций каждого гена и определение статуса белка Her2/neu, что влияет на развитие течения заболевания и выбор тактики лечения колоректального рака.

A2

202192826

202192826

A2

СПОСОБ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

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 (RU2012100904А), 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 (RU2692555C2) 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 проводили 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

Способ молекулярно-генетической диагностики и лечения метастатического колоректального рака, включающий проведение биопсии и отличающийся тем что, путем последовательного алгоритма методом ПЦР производят обнаружение в опухолевой ДНК наличие мутаций гена RAS в Экзоне 2 по типу G12D, G12C, G12S, G12R, G12A, G12V, G13D и/или в Экзоне 3 по типу Q61H, Q61L, Q61R и/или в экзоне 4 по типу K117N, K117R, K117E, A146T, A146P, A146V, 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.