

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2674677

Способ прогнозирования течения заболевания у больных локальным почечно-клеточным раком почки

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018105822

Приоритет изобретения 15 февраля 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 12 декабря 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 15 февраля 2038 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/48 (2018.08); G01N 33/573 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018105822, 15.02.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.02.2018

Дата регистрации:
12.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.02.2018

(45) Опубликовано: 12.12.2018 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63,
РНИОИ, Ишониной О.Г.

(72) Автор(ы):

Кит Олег Иванович (RU),
Франциянц Елена Михайловна (RU),
Шевченко Алексей Николаевич (RU),
Бреус Анна Александровна (RU),
Нескубина Ирина Валерьевна (RU),
Шалашная Елена Владимировна (RU),
Ишонина Оксана Георгиевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
учреждение "Ростовский
научно-исследовательский онкологический
институт" Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2528100 C1, 10.09.2014.

LIONTOS M. et al., Expression and prognostic
significance of VEGF and mTOR pathway
proteins in metastatic renal cell carcinoma
patients: a prognostic immunohistochemical
profile for kidney cancer patients, World J
Urol. 2017 Mar;35(3):411-419, найдено
25.10.2018, найдено в Интернет (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования течения заболевания у больных локальным почечно-клеточным раком почки

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано для прогнозирования течения патологического процесса у больных локальным почечно-клеточным раком почки после хирургического лечения. Сущностью способа является то, что в образцах опухолевой ткани и в образцах ткани перифокальной зоны, взятых во время операции у больных локальным почечно-клеточным раком

почки, определяют уровень VEGF-A, рассчитывают соотношение VEGF-A в опухолевой ткани к VEGF-A в перифокальной зоне и при значении его менее или равном 1,0 прогнозируют отсутствие развития рецидивов и/или метастазов, а при значении его более 1,0 прогнозируют развитие рецидивов и/или метастазов в ближайшие сроки наблюдения.

(56) (продолжение):

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27395374>. БАНЫРА О.Б. и др., Маркеры опухолевого роста в диагностике рака почки, Экспериментальная и клиническая урология. RU2008121754 A, 2009-12-20.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/48 (2018.08); G01N 33/573 (2018.08)(21)(22) Application: **2018105822, 15.02.2018**

(24) Effective date for property rights:
15.02.2018

Registration date:
12.12.2018

Priority:

(22) Date of filing: **15.02.2018**(45) Date of publication: **12.12.2018** Bull. № 35

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, 14-ya liniya, 63,
RNIOI, Ishoninoj O.G.**

(72) Inventor(s):

**Kit Oleg Ivanovich (RU),
Frantsiyants Elena Mikhajlovna (RU),
Shevchenko Aleksej Nikolaevich (RU),
Breus Anna Aleksandrovna (RU),
Neskubina Irina Valerevna (RU),
Shalashnaya Elena Vladimirovna (RU),
Ishonina Oksana Georgievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Rostovskij
nauchno-issledovatel'skij onkologicheskij
institut" Ministerstva zdravookhraneniya
Rossijskoj Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING THE COURSE OF THE DISEASE IN PATIENTS WITH LOCAL RENAL CELL CARCINOMA OF THE KIDNEY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to oncology. Essence of the method is that in samples of tumor tissue and tissue samples of the perifocal zone, taken during surgery in patients with local renal cell carcinoma of the kidney, determine the level of VEGF-A, calculate the ratio of VEGF-A in the tumor tissue to VEGF-A in the perifocal area and if its

value is less than or equal to 1.0, the absence of relapse and/or metastasis is predicted, and if its value is more than 1.0, the development of relapse and/or metastasis is predicted deadlines of observation.

EFFECT: invention can be used to predict the course of the pathological process in patients with local renal cell carcinoma of the kidney after surgical treatment.

1 cl

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано для прогнозирования течения патологического процесса у больных локальным раком почки после хирургического лечения.

5 Заболеваемость раком почки возрастает по всему миру, а в России за последние 10 лет (2005-2015 гг.) отмечен один из самых высоких темпов прироста заболеваемости (см. Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М, ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» - филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
10 радиологический центр» Минздрава России, 2017. 250 с.). Максимум заболеваемости приходится на возрастную категорию 55-60 лет; у мужчин почечно-клеточный рак встречается в 2 раза чаще, чем у женщин. Светлоклеточный рак является самым распространенным типом почечно-клеточного рака - на его долю приходится 75% от общего числа больных (см. Chow W.H., Devesa S.S. Contemporary epidemiology of renal
15 cell cancer // Cancer J 2008; 14(5):288-301).

Бессимптомное протекание рака почки является причиной поздней его диагностики, в связи с этим зачастую данная онкопатология выявляется уже в виде местнораспространенного или метастатического процесса (см. Алексеев Б.Я., Калпинский А.С. Эффективность применения таргетной терапии в гетерогенной
20 популяции больных метастатическим раком почки // Онкоурология. 2012. №3. С. 37-43).

Основным методом лечения рака почки остается хирургический. Однако после радикального хирургического удаления локализованного почечно-клеточного рака у 30% больных в дальнейшем обнаруживают метастазы либо рецидивы заболевания.
25 Почечно-клеточные опухоли обладают низкой чувствительностью к стандартным схемам химио-лучевого лечения и гормонотерапии, что обусловлено гиперэкспрессией гена множественной лекарственной устойчивости MDR-1 (см. Герштейн Е.С. и др. Маркеры ангиогенеза в сыворотке крови больных раком почки // Вестник ТГУ. 2017. Т. 22. Вып. 2. С. 289-296).

30 Однако в последнее десятилетие, благодаря изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе опухолевой прогрессии, стал возможным синтез препаратов, обладающих таргетным действием в отношении почечно-клеточного рака (см. Гарин А.М., Базин И.О. Ангиогенные препараты в арсенале противоопухолевых средств // Эффективная фармакотерапия. 2014. Т. 47. С. 10-16). В первую группу таргетных
35 лекарственных средств входят антиангиогенные препараты (сунитиниб, сорафениб, пазопаниб, бевацизумаб, акситиниб), влияющие на различные внутриклеточные мишени, относящиеся к патогенетическому пути, связанному с инактивацией VHL (например, на VEGF, VEGFR, PDGFR и др.), в то время как вторая группа препаратов (эверолимус, темсиrolimus) оказывает влияние на mTOR-ассоциированные сигнальные пути (см.
40 Ковалева О.В. и др. Молекулярные особенности почечно-клеточного рака: ранняя диагностика и перспективы терапии // Успехи молекулярной онкологии. 2014. №2. С. 36-43). Следует отметить, что таргетная терапия не исключает, а дополняет хирургические методы лечения почечно-клеточных карцином, а также тот факт, что в зависимости от прогноза течения заболевания, применяют различные таргетные
45 препараты (см. Баныра О.Б., Шуляк А.В. Блокада ангиогенеза в терапии рака почки: механизмы, особенности и перспективы // Экспериментальная и клиническая урология. 2011. №1. С. 59-68).

В связи с этим несомненный интерес вызывает поиск маркеров прогнозирования

течения заболевания после хирургического лечения у больных локальным раком почки.

Из патентных источников известен «Способ прогнозирования метастазов и/или рецидивов рака почки» (см. Патент на изобретение RU 2064179 C1, опубл. 20.07.1996 г., Бюл. №20). Сущность изобретения: с целью доклинического выявления метастазов и рецидивов рака почки после радикального удаления основного очага опухоли определяют отношение свободных 17-оксикетостероидов (17-ОКС) к их сумме в суточной моче и при коэффициенте отношения от 0,01 до 0,07 прогнозируют наличие метастазов и рецидивов. Недостатком способа является, тот факт, что выявленное соотношение между свободными и общими фракциями 17-ОКС проводится после комбинированного лечения и уже указывает на распространенное опухолевое заболевание, таким образом, невозможно прогнозировать прогрессирование заболевания на этапе после оперативного вмешательства и, как следствие, отсутствует возможность своевременной коррекции химиотерапевтического лечения.

Также известен «Способ определения продолжительности жизни больных распространенным раком почки, осложненным венозной инвазией» (см. Патент на изобретение RU 2373864, опуб. 27.11.2009 г., Бюл. №33). В данном способе для прогнозирования течения заболевания предлагается учитывать объем оперативного вмешательства, наличие отдаленных метастазов и инвазии опухоли, размер тромба и концентрацию фибриногена в сыворотке крови. Способ обеспечивает возможность прогноза ожидаемой продолжительности жизни больных в месяцах путем определения показателей стандартного обследования больного и с учетом проведенного хирургического лечения. К недостаткам способа можно отнести то, что у больных раком почки уже изначально имеет место диссеминированный процесс, а также то, что авторами не учитываются параметры, характеризующие биологическое поведение опухоли.

Одним из таких параметров является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), являющийся важнейшим стимулятором опухолевого ангиогенеза и участвующий в ауто/паракринной регуляции пролиферации злокачественных клеток. Формирование собственного кровоснабжения опухоли способствует ее быстрому росту и метастазированию (см. Повешенко А.Ф., Кононенко В.И. Механизмы и факторы ангиогенеза // Успехи физиологических наук. 2010. Т. 41. №2. С. 68-89).

В доступной литературе содержатся достаточно противоречивые сведения о прогностической значимости содержания VEGF у больных раком почки. В работе К. Sato и соавт. (см. Sato K., Tsuchiya N., Sasaki R. et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with renal cell carcinoma // Jpn J Cancer Res. 1999. V. 90 (8). P. 874-9) при изучении VEGF в сыворотке крови было показано, что уровень его был значимо выше у больных раком почки, чем у здоровых лиц и зависел от показателей стадии процесса, таких как объем опухоли или наличие метастазов, в связи с чем, авторы предположили, что сывороточный VEGF может рассматриваться в качестве маркера рака почки. Напротив, Герштейн Е.С. и соавт. (см. Герштейн Е.С. и др. Маркеры ангиогенеза в сыворотке крови больных раком почки // Вестник ТГУ. 2017. Т. 22. вып. 2. С. 289-296) при исследовании содержания VEGF и его рецепторов 1 и 2 типа в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком и здоровых доноров было продемонстрировано значительное увеличение концентрации этих маркеров ангиогенеза, в первую очередь самого VEGF, в сыворотке крови больных не только злокачественными, но и доброкачественными новообразованиями почки. Однако чувствительность и специфичность VEGF в качестве маркера рака почки не превышали 70%, а его уровень не зависел от стадии заболевания. В этом исследовании не было

обнаружено значимой корреляции между содержанием VEGF в сыворотке крови и ткани опухоли.

В исследовании Djordjevic G. и соавт. (см. Djordjevic G., Mozetic V., Mozetic D.V. et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma // Pathol Res Pract. 2007; 203(2):99-106.) в образцах ткани светлоклеточного рака почки были сопоставлены уровень экспрессии VEGF и другие клинко-патологические параметры светлоклеточного рака почки. Результаты работы показали, что гиперэкспрессия VEGF является очень плохим прогностическим фактором при светлоклеточном раке почки.

Из патентных источников известно, что на основании изучения экспрессии VEGF и других молекулярных маркеров ангиогенеза был разработан «Способ прогнозирования гематогенных метастазов после комбинированного лечения рака почки» (см. Патент на изобретение RU 2528100, опуб. 10.09.2014 г., Бюл. №25). Авторы предлагают определять в ткани опухоли экспрессию NF-κB p50, HIF-1α, содержание сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF, рассчитывают дискриминантные функции Y1, Y2 по уравнениям: $Y1 = -3,2 + 0,026 \cdot X1 + 0,03 \cdot X2 - 0,02 \cdot X3 + 0,34 \cdot X4 + 0,3 \cdot X5$; $Y2 = -33,3 - 0,01 \cdot X1 + 0,11 \cdot X2 - 1,2 \cdot X3 + 1,57 \cdot X4 + 1,8 \cdot X5$, где X1 - тотальная активность протеасом $\cdot 10^{-3}$ МЕ/мг белка; X2 - содержание VEGF, пг/мг белка; X3 - экспрессия HIF-1, УЕ/мг белка в лунке; X4 - экспрессия NF-κB p50, УЕ/мг белка в лунке и при значениях Y1 > Y2 прогнозируют отсутствие, а при Y1 < Y2 - развитие гематогенных метастазов. К недостаткам данного способа можно отнести то, что прогнозируют только гематогенные метастазы, сложность использования формулы изобретения в рутинной практике, а также высокую стоимость проводимых исследований.

Следует отметить, что в научно-медицинской литературе большинство исследований VEGF при почечно-клеточном раке касаются изучения его экспрессии либо в опухоли, либо в интактной ткани. В тоже время, в последние годы выявлен целый ряд изменений, происходящих вблизи опухоли при раке различных локализаций (см. Авдалян А.М. и др. прогностическое значение исследования сосудов микроциркуляторного русла в опухоли и перитуморозной зоне по данным СД 31 и количества агрофильных белков области ядрышкового организатора (AgNOR) в эндотелии при лейомиосаркоме тела матки // Фундаментальные исследования. 2010. №5. С. 12-20; Франциянц Е.М. и др. Уровень некоторых опухолевых маркеров в ткани меланомы кожи, ее перифокальной зоны и по линии резекции // Молекулярная медицина - 2014. - №3. - С. 57-60). Изучение изменений тканей, граничащих с опухолью, важно для выявления фоновых процессов, способствующих развитию опухоли, перифокальная зона также может способствовать опухолевой прогрессии (см. Дзасохов А.С. Микроциркуляторное русло как новый объект терапии злокачественных новообразований (научный обзор) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. №1. Публикация 3-7. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/5095.pdf>). В доступной литературе мы не встретили данных относительно содержания VEGF в перитуморальной зоне при почечно-клеточном раке.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является прогнозирование течения заболевания у больных локальным раком почки после хирургического лечения, а именно отсутствие или наличие прогрессирования заболевания в ближайшие сроки наблюдения.

Технический результат достигается тем, что в образцах опухолевой ткани и в образцах ткани перифокальной зоны, взятых во время операции у больных локальным почечно-клеточным раком почки, определяют уровень VEGF-A, рассчитывают соотношение

VEGF-A в опухолевой ткани к VEGF-A в перифокальной зоне, и при значении его менее или равном 1,0 прогнозируют отсутствие развития рецидивов и/или метастазов, а при значении его более 1,0 прогнозируют развитие рецидивов и/или метастазов в ближайшие сроки наблюдения.

5 Способ осуществляется следующим образом. Во время оперативного вмешательства у больных локальным почечно-клеточным раком $T_{1-3} N_0 M_0$ забирают образцы опухолевой ткани и ткани перифокальной зоны. Образцы опухоли и ее перифокальной зоны замораживают для дальнейшего хранения при температуре -70°C , с последующим биохимическим исследованием. Перед исследованием образцы тканей гомогенизируют.
10 Затем, в 10% цитозольных фракциях, приготовленных на калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащим 0,1% Твин-20, методом ИФА с использованием стандартных тест-систем определяют уровень ростового фактора - VEGF-A (BenderMedSystem, Австрия) и рассчитывают соотношение VEGF-A в опухолевой ткани к VEGF-A в перифокальной зоне. При значении соотношения менее или равном 1,0 прогнозируют отсутствие
15 развития рецидивов и/или метастазов, а при значении его более 1,0 прогнозируют развитие рецидивов и/или метастазов в ближайшие сроки наблюдения.

Клинический пример №1.

Больная С., 1960 г. рождения, 08.02.2017 г. обратилась в РНИОИ с жалобами на боли тупого характера в левой поясничной области, где по результатам комплексного
20 обследования у нее был диагностирован рак левой почки, стадия $T_{1b} N_0 M_0$.

В отделении онкоурологии 16.02.2017 г. выполнена радикальная лапароскопическая нефрэктомия слева.

Результат гистологического исследования: почечно-клеточный рак светлоклеточный вариант с очаговыми кровоизлияниями, с инвазией фиброзной капсулы опухоли без
25 инвазии за ее пределы.

Установлен заключительный диагноз - Рак левой почки $pT_{1b} N_0 M_0$, G2 St.I, кл. гр.3.

После хирургического лечения было проведено исследование согласно предлагаемому способу. Для этого из операционного материала брали образцы опухолевой ткани и
30 ткани перифокальной зоны, а затем в цитозольных фракциях гомогенатов тканей определяли иммуноферментным методом с использованием стандартных тест-систем уровень ростового фактора VEGF-A (BenderMedSystem, Австрия). Уровень VEGF-A в опухолевой ткани составил 6176,2 пг/г тк, уровень VEGF-A в перифокальной зоне - 10912 пг/г тк. Соотношение VEGF-A в опухолевой ткани к VEGF-A в перифокальной
35 зоне оказалось равным 0,566, что указывало на благоприятное течение заболевания, и было в дальнейшем подтверждено результатами клинических наблюдений. При динамическом наблюдении в течение 10 месяцев после хирургического лечения не было выявлено прогрессирования заболевания.

Клинический пример №2.

40 Больной К., 1972 г. рождения, обратился в РНИОИ с жалобами на боли тупого характера в правой поясничной области, где по результатам комплексного обследования у него был диагностирован рак правой почки, стадия $T_{2-3} N_0 M_0$.

В отделении онкоурологии 27.06.2016 г. выполнена лапароскопическая радикальная нефрэктомия справа.

45 Результат гистологического исследования №52708-710/16 - G3 почечно-клеточный рак светлоклеточный вариант, ядерный индекс 2-3, очаги инвазии в капсулу опухоли, клетчатку почечного синуса, очаги коагуляционного некроза, кровоизлияний.

Установлен заключительный диагноз - Рак правой почки $pT_{3a} N_0 M_0$, G3 St.III, кл. гр.

3.

После хирургического лечения было проведено исследование согласно предлагаемому способу. Для этого из операционного материала брали образцы опухолевой ткани и перифокальной зоны, а затем в цитозольных фракциях гомогенатов тканей определяли

5 иммуноферментным методом с использованием стандартных тест-систем уровень ростового фактора VEGF-A (BenderMedSystem, Австрия). Уровень VEGF-A в опухолевой ткани составил 14128 пг/г тк, уровень VEGF-A в перифокальной зоне - 4881,3 пг/г тк. Соотношение VEGF-A в опухолевой ткани к VEGF-A в перифокальной зоне оказалось

равным 2,8, что указывало на риск развития рецидивов и/или метастазов.

10 При контрольном обследовании через 6 месяцев по данным МРТ органов брюшной полости малого таза выявлено: опухолевый узел в проекции верхнего пучка поясничной мышцы справа, опухолевый узел в под печеночном пространстве 33 мм с признаками инвазии в мышечный слой печеночного угла ободочной кишки, опухолевый узел в

15 листке париетальной брюшины в под печеночном пространстве по боковому флангу справа размерами 8 мм.

Левая почка без патологических образований.

По данным СРКТ органов грудной клетки в легких с обеих сторон единичные метастатические очаги до 0,4 см.

Было выполнено удаление рецидива, резекция большого сальника, ретрокавальная,

20 межаорто-кавальная лимфаденэктомия.

Результат гистологического исследования: множественные метастазы G3 почечно-клеточного рака светлоклеточный вариант, в париетальной брюшине, по правому боковому каналу, в ретрокавальных лимфоузлах, в межаортокавальных лимфоузлах, в клетчатке большого сальника.

25 Выполненное хирургическое пособие больной перенес удовлетворительно. В настоящее время проходит лечение таргетными препаратами.

Данным способом было обследовано 50 больных с гистологически подтвержденным почечно-клеточным вариантом рака почки, T₁₋₃N₀M₀. Стадирование рака почки проводилось в соответствии с классификацией TNM (версия 2017 г.).

30 Диагностика и лечение основывалось на результатах клинического и гистологического заключения в соответствии с отраслевыми стандартами и алгоритмами объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований почки. Гистологический анализ опухоли соответствовал требованиям, предъявляемым к заключению после хирургического лечения.

35 Критерием отбора больных являлся морфологически подтвержденный локальный почечно-клеточный рак почки. Тканью перифокальной зоны считали образцы на расстоянии 1 см от видимого края опухоли.

Средний возраст больных составил 57,8±7,9 лет. Обязательным условием включения в обследование было добровольное информированное согласие больных, поступивших

40 на противоопухолевое лечение в отделение онкоурологии РНИОИ. Все больные проходили обследование и лечение в стационаре ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России с 2015 по 2017 гг.

Технико-экономическая эффективность данного способа заключается в том, что способ позволяет прогнозировать течение злокачественного процесса у больных

45 локальным почечно-клеточным раком после хирургического вмешательства и при прогрессировании заболевания менять тактику лечения больных.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования течения заболевания у больных локальным почечно-клеточным раком почки, включающий определение уровня VEGF-A в образцах опухолевой ткани, взятых во время операции, отличающийся тем, что дополнительно в образцах ткани перифокальной зоны, также взятых во время операции, определяют
5 уровень VEGF-A, затем рассчитывают соотношение уровня VEGF-A в опухолевой ткани к уровню VEGF-A в перифокальной зоне и при значении этого соотношения менее или равном 1,0 прогнозируют отсутствие развития рецидивов и/или метастазов, а при значении его более 1,0 прогнозируют развитие рецидивов и/или метастазов в ближайшие
сроки наблюдения.

10

15

20

25

30

35

40

45