

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2800265

Способ прогнозирования развития рецидива у больных с вирусом папилломы человека и немышечно- инвазивным раком мочевого пузыря

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение
"Национальный медицинский исследовательский центр онкологии"
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Кутилин Денис Сергеевич (RU), Димитриади Сергей
Николаевич (RU), Пулатова Алина Асланхановна (RU), Францияни
Елена Михайловна (RU), Зыкова Татьяна Алексеевна (RU), Хван
Виктор Кидюевич (RU), Розенко Андрей Дмитриевич (RU)*

Заявка № 2022133107

Приоритет изобретения 16 декабря 2022 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 19 июля 2023 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 16 декабря 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/68 (2023.05); C12Q 1/6876 (2023.05); C12Q 1/6886 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022133107, 16.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.12.2022

Дата регистрации:
19.07.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.12.2022

(45) Опубликовано: 19.07.2023 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
Ишонина О.Г.

(72) Автор(ы):

Кутилин Денис Сергеевич (RU),
Димитриади Сергей Николаевич (RU),
Пулатова Алина Асланхановна (RU),
Франциянц Елена Михайловна (RU),
Зыкова Татьяна Алексеевна (RU),
Хван Виктор Кидюевич (RU),
Розенко Андрей Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2662975 C1, 31.07.2018. EP
3763826 A1, 13.01.2021. WO 2010139810 A1,
09.12.2010. Borkowska EM, Konecki T,
Pietrusiński M, Borowiec M, Jabłonowski Z.
MicroRNAs Which Can Prognosticate
Aggressiveness of Bladder Cancer. Cancers
(Basel). 2019 Oct 14;11(10):1551. doi: 10.3390/
cancers11101551. PMID: 31615011; PMCID:
PMC6826751.

(54) Способ прогнозирования развития рецидива у больных с вирусом папилломы человека и немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря

(57) Реферат:

Изобретение относится к молекулярной биологии. Описан способ прогнозирования развития рецидива немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря у больных с вирусом папилломы человека, в котором используют высокоспецифичные праймеры для hsa-miR-7-5p и hsa-miR-143-3p. При осуществлении способа проводят амплификацию, анализируют первичные данные и рассчитывают коэффициент относительной экспрессии К, сравнивают полученные значения К с интервалом прогностического коэффициента. При значении

$K_{miR-143} \leq 5,07 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют развитие рецидива немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря в первые 18 месяцев после трансуретральной резекции мочевого пузыря. При значении $K_{miR-143} \geq 20,09 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют течение заболевания без рецидива, а при значениях коэффициента К между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным. Техническим результатом заявляемого изобретения является создание способа, позволяющего прогнозировать рецидив

немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря
в первые 18 месяцев после трансуретральной

резекции (ТУР) мочевого пузыря у пациентов с
ВПЧ. 2 з.п. ф-лы, 2 табл., 2 пр.

R U 2 8 0 0 2 6 5 C 1

R U 2 8 0 0 2 6 5 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/68 (2023.05); *C12Q 1/6876* (2023.05); *C12Q 1/6886* (2023.05)(21)(22) Application: **2022133107, 16.12.2022**(24) Effective date for property rights:
16.12.2022Registration date:
19.07.2023

Priority:

(22) Date of filing: **16.12.2022**(45) Date of publication: **19.07.2023** Bull. № 20

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
Ishonina O.G.**

(72) Inventor(s):

**Kutlin Denis Sergeevich (RU),
Dimitriadi Sergei Nikolaevich (RU),
Pulatova Alina Aslankhanovna (RU),
Frantsiiants Elena Mikhailovna (RU),
Zykova Tatiana Alekseevna (RU),
Khvan Viktor Kidiuevich (RU),
Rozenko Andrei Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii
issledovatel'skii tsentr onkologii» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**(54) **METHOD OF PREDICTING THE DEVELOPMENT OF RELAPSE IN PATIENTS WITH HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND NON-MUSCLE-INVASIVE BLADDER CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology.

SUBSTANCE: method of predicting the development of recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer in patients with human papillomavirus is described, in which highly specific primers for hsa-miR-7-5p and hsa-miR-143-3p are used. When implementing the method, amplification is carried out, primary data are analyzed and the coefficient of relative expression K is calculated, the obtained values of K are compared with the interval of the prognostic coefficient. With a value of $K_{miR-143} \leq 5.07 \cdot 10^{-3}$ the development of recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer is

predicted in the first 18 months after transurethral resection of the bladder. With a value of $K_{miR-143} \geq 20.09 \cdot 10^{-3}$ the course of the disease without recurrence is predicted, and with the values of the coefficient K between the indicated intervals, the result is considered uncertain.

EFFECT: creation of a method of predicting the recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer in the first 18 months after transurethral resection (TUR) of the bladder in patients with HPV.

3 cl, 2 tbl, 2 ex

Изобретение относится к онкологии, молекулярной биологии и может быть использовано для прогнозирования развития рецидива у больных с вирусом папилломы человека (ВПЧ) и немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря.

Рак мочевого пузыря (РМП) - полиэтиологическое заболевание. Основное развитие РМП связано с влиянием на уротелий канцерогенных веществ, выделяемых с мочой. Как известно, немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (НМИРМП) определяется как поверхностная неоплазия, ограниченная слизистой оболочкой (включая стадию Ta, которая представляет собой неинвазивный папиллярный уротелиальный рак, рак in situ (Tis)) и собственной пластинкой слизистой оболочки (T1) по классификации TNM. Стадия T1 составляет большую часть НМИРМП (60 %), тогда как T1 и Tis составляют 30 и 10 % соответственно. Это заболевание отягощено рецидивом в 60-80 % случаев и прогрессированием в 10-30 % случаев в зависимости от стадии опухоли (см. Пшихачев А.М., Михалева Л.М., Гусниев М.А., Печникова В.В., Полянко Н.И., Сорокин Н.И., Камалов А.А. Клинико-морфологические особенности немышечноинвазивного рака мочевого пузыря: влияние на лечение, прогноз и рецидив заболевания (обзор литературы). Онкоурология. 2021;17(1):134-141).

Преобразование нормальной слизистой оболочки в опухоль происходит в несколько этапов, занимающих десятилетия (см. Tang XJ, Wang W, Hann SS. Interactions among lncRNAs, miRNAs and mRNA in colorectal cancer. Biochimie. 2019;163:58-72). Хотя многочисленные методы лечения, показали способность уменьшать частоту рецидивов, 5-летняя выживаемость больных все еще остается низкой (см. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal. Cancer statistics. CA A Cancer J. Clin. 2019, 69, pp. 7-34; W. Wang, R. Kandimalla, H. Huang, L. Zhu, Y. Li, F. Gao, A. Goel, X. Wang Molecular subtyping of colorectal cancer: recent progress, new challenges and emerging opportunities. Semin. Canc. Biol., 2019, 55, pp. 37-52). Большое количество исследований выявило, что нкРНК играют важную роль во многих биологических процессах, и нарушение их регуляции может привести к различным заболеваниям, включая рак толстой кишки (см. M. Weng, D. Wu, C. Yang, H. Peng, G. Wang, T. Wang, X. Li Noncoding RNAs in the development, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer Transl. Res., 2017, 181, pp. 108-120). Хорошо изученными нкРНК являются микро-РНК.

Микро-РНК - это короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов катализируя разрушение мРНК, либо ингибируя трансляцию мРНК в белок. Зрелая микро-РНК представляет собой одноцепочечную РНК размером порядка 22 нуклеотидов, получающуюся из первичного транскрипта. Микро-РНК являются эпигенетическими регуляторами, специфичны для определенной ткани и модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мРНК-мишеней (см. Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 1; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (дата обращения: 04.03.2020)).

МикроРНК вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает микро-РНК потенциальными биомаркерами для оценки прогрессирования и рецидива (см. Z.M. Abdelsattar, S.L. Wong, S.E. Regenbogen, D.M. Jomaa, K.M. Hardiman, S. Hendren. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. Cancer, 2016, 122, pp. 929-934).

Интеграция ВПЧ в эпителиальные клетки мочевого пузыря может значительно изменять паттерн экспрессии микро-РНК и оказывать существенное влияние на рецидив

заболевания (см. Borkowska EM, Konecki T, Pietrusiński M, Borowiec M, Jabłonowski Z. MicroRNAs Which Can Prognosticate Aggressiveness of Bladder Cancer. Cancers (Basel). 2019 Oct 14;11(10):1551).

Проведенный нами анализ данных Атласа генома рака (TCGA) позволил выделить 150 микро-РНК потенциальных маркеров рецидива рака мочевого пузыря, а последующая валидация этих результатов методом РТ-ПЦР в образцах мочи и математический анализ (использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию, оптимизированную при помощи множественных переборочных наборов данных), показали большой потенциал микро-РНК hsa-miR-143-3p в разделении больных на группы с рецидивом и без рецидива (чувствительность 95% и специфичность 90%, AUC 0,98).

Анализ патентных источников (www.fips.ru) показал отсутствие близких по тематике предлагаемому способу.

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание способа, позволяющего прогнозировать рецидив немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря в первые 18 месяцев после трансуретральной резекции (ТУР) мочевого пузыря у пациентов с ВПЧ.

Сущность способа заключается в том, что используют высокоспецифичные праймеры для hsa-miR-7-5p и hsa-miR-143-3p, проводят амплификацию, анализируют первичные данные и рассчитывают коэффициент (К) относительной экспрессии, сравнивают полученные значения К с интервалом прогностического коэффициента, и при значении $K_{\text{miR-143}} \leq 5,07 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют развитие рецидива немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря в первые 18 месяцев после трансуретральной резекции мочевого пузыря, при значении $K_{\text{miR-143}} \geq 20,09 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют течение заболевания без рецидива, а при значениях коэффициента К между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным.

С этой целью используют библиотеку комплементарной ДНК (кДНК), полученную на матрице тотальной РНК с помощью реакции обратной транскрипции с РТ-праймерами совмещенной с реакцией полиаденилирования РНК, проводят амплификацию библиотеки кДНК с высокоспецифичными праймерами для микро-РНК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-7-5p, анализируют первичные данные и вычисляют коэффициенты относительной экспрессии микро-РНК hsa-miR-143-3p в моче (К) (соотношение относительной экспрессии hsa-miR-143-3p относительно hsa-miR-7-5p), сравнивают полученные значения К с интервалом прогностического коэффициента. При значении $K_{\text{miR-143}} \leq 5,07 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют развитие рецидива (чувствительность 95%) в первые 18 месяцев после ТУР, а при значении $K_{\text{miR-143}} \geq 20,09 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют течение заболевания без рецидива (чувствительность 95%). При значениях коэффициента К между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным.

Заявленный анализ основан на определении относительной экспрессии hsa-miR-143-3p в моче больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (при наличии у больных ВПЧ инфекции) и последующем вычислении соотношения экспрессии относительно референсной микро-РНК hsa-miR-7-5p: $K_{\text{miR-143}} = E_{\text{miR-143}} / E_{\text{miR-7}}$.

Изобретение «Способ прогнозирования развития рецидива у больных с вирусом папилломы человека и немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря» является новым, так как относительная экспрессия микро-РНК hsa-miR-143-3p ранее не

использовалась для заявленной в способе цели, также как и последовательности праймеров в составе предлагаемого способа.

Заявленный способ включает следующие примы:

- получение кДНК на матрице тотальной РНК с помощью реакции обратной транскрипции с РТ-праймерами совмещенной с реакцией полиаденилирования РНК,
- амплификацию библиотеки кДНК с высокоспецифичными праймерами для микро-РНК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-7-5p,
- анализ первичных данных и вычисление коэффициентов относительной экспрессии hsa-miR-143-3p в моче, сравнение их значений со значениями коэффициентов экспрессии, характерными для групп пациентов с течением заболевания с рецидивом и без.

Для реализации способа были разработаны специфичные олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры для hsa-miR-7-5p и hsa-miR-143-3p. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (см. Таблица 1) осуществлялся с использованием алгоритма Balcells I. (см. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. BMC Biotechnol. 2011;11:70).

Таблица 1		
Наименование микро-РНК	Последовательность микро-РНК	Последовательность
hsa-miR-7-5p	TGGAAGACTAGTGATTTGTTGTT	F:CGTCAGTGGAAAGACTAGTGA (SEQ ID №1) R:GTCCAGT(15)AACAAACA (SEQ ID №2) RT:CAGGTCCAGT(15)AA (SEQ ID №3)
hsa-miR-143-3p	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC	F:CTAGTGAGATGAAGCACTGTAG (SEQ ID №4) R:GGTCCAGT(15)GAGA (SEQ ID №5) RT:CAGGTCCAGT(15)GGA (SEQ ID №6)

Способ осуществляют следующим образом:

Пациентам с верифицированным немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря и наличием ВПЧ инфекции за сутки до выполнения хирургической операции в объеме трансуретральной резекции мочевого пузыря выполняют забор утренней мочи для молекулярно-генетического исследования.

На первом этапе образцы утренней мочи объемом 10 мл центрифугируют при 3000 об. мин. в течение 20 минут. Осадок переносят в новую пробирку и хранят при -80°C.

- На втором этапе препараты РНК из мочи получают при помощи протокола, описанного Chomczynski и Sacchi (см. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction: twenty-something years on // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1, № 2. P. 581-585.). К осадку последовательно прибавляют 300 мкл денатурирующего буфера (6М гуанидин-изотиоцианат, 15 мМ Трис-ацетат, рН 6,5, 1% Sarkosyl, 2% 2-меркаптоэтанол) и 60 мкл 2М ацетата натрия, рН 4.0, перемешивают. К полученной смеси добавляют 700 мкл насыщенного водой фенола и перемешивают. Для разделения водной и органической фаз прибавляют 200 мкл смеси хлороформ: изоамиловый спирт (49:1), перемешивают в течение 10 сек. и инкубируют в течение 15 мин. при 4°C. Затем полученную смесь центрифугируют при 10 000g в течение 15 мин при 2°C. Верхнюю водную фазу отбирают и переносят в новую пробирку. К водной фазе прибавляют равный объем этанола и наносят на колонку с фильтром из диоксида кремния (использовали колонки из набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), РНК эффективно связывается с мембраной из диоксида кремния). Колонку дважды промывают буфером (4М гуанидин-изотиоцианат, 10 мМ трис-ацетат, 50% этанол, 1% 2-меркаптоэтанол) и центрифугируют. Затем колонку дважды промывают буфером (10 мМ трис-HCl, рН 7,5, 0,1 М NaCl, 75% этанол), центрифугируют при 400g, 1 мин. Для элюции РНК в колонку добавляют 120 мкл деионизированной воды с ингибитором РНКаз. Элюат собирают центрифугированием при 400g, 10 мин.

- На третьем этапе для выявления зрелых микро-РНК выделенную суммарную РНК подвергают реакции обратной транскрипции, которая проводится одновременно с полиаденилированием РНК, с использованием специфичных RT-праймеров (обратный праймер, который содержит олиго(dT)-последовательность и адаптерную последовательность на 5'-конце). Для обратной транскрипции используют реакционную смесь (объемом 20 мкл), содержащую 1-кратный поли(А) буфер, 10 единиц/мкл M-MuLV, 0,1 mM dNTPs, 1 mM АТФ, 1 мкМ RT-праймера, 0,5 единиц/мкл Poly(A)-полимераза и 0,2 мкг тотальной РНК. Реакцию проводят в течение 30 мин. при 20°C, 15 мин. при 42°C, затем обратную транскриптазу инактивируют в течение 5 минут при 85°C.

- На четвертом этапе полученную комплементарную ДНК (кДНК) используют в реакциях RT-qPCR. Амплификацию проводят в 20 мкл PCR-смеси, содержащей 1x PCR-буфер, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1x EvaGreen, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 450 нМ прямого и обратного праймеров. Постановку RT-qPCR каждого образца проводят в трех повторах. Полученные смеси инкубируют в RT-амплификаторе по следующей программе: 2 минуты 95°C, 45 циклов: денатурация при 95°C 10 с., отжиг и элонгация - 64 °C 30 с. Результаты, соответствующие C_t>38 признаются отрицательными.

Относительная экспрессия микро-РНК вычисляется следующим образом:

- рассчитывают среднее геометрическое C_t по трем повторам для целевой и референсной микро-РНК,

- далее рассчитывают величину $\Delta C_t = C_{t(\text{hsa-miR-143-3p})} - C_{t(\text{hsa-miR-7-5p})}$

- коэффициент относительной экспрессии (К) рассчитывают по формуле $1.9^{-\Delta C_t}$ (см. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком. Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 4. С. 580-595).

Далее сравнивают полученные значения К с интервалом прогностического коэффициента, и при значении при значении $K_{\text{miR-143}} \leq 5,07 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют развитие рецидива в первые 18 мес. после ТУР мочевого пузыря (чувствительность 95%), а при значении $K_{\text{miR-143}} \geq 20,09 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют течение заболевания без рецидива

(чувствительность 95%). При значениях коэффициента К между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным.

Предлагаемый способ применим только для больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря с наличием ВПЧ инфекции. ВПЧ инфекция может быть установлена любым доступным способом, включая ПЦР (например, набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL» для выявления, количественного определения и дифференциации ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов). Материал для определения ВПЧ - гистопрепараты, полученные при трансуретральной биопсии.

С помощью предлагаемого способа было осуществлено прогнозирование течения заболевания у 59 пациентов с диагностированным немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря и наличием ВПЧ инфекции. У 35 больных значения $K_{\text{miR-143}}$ попадали в прогностический интервал развития рецидива, у 29 из них в первый год после лечения зафиксировано состояние рецидива.

Для доказательства прогностической ценности предлагаемого способа приводим клинические примеры применения способа.

Пример 1.

Больной Ш., 66 лет, госпитализирован в декабре 2020 г. в отделение онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ с диагнозом рак мочевого пузыря T1N0M0, ст 1.

Выполнена ТУР. Гистологическое исследование: уротелиальный переходо-клеточный рак G2 с инвазией в собственную пластинку, в основании опухоли инвазии в мышечный слой не выявлено. В гистопрепарате обнаружен ВПЧ (HPV 16). Больной получил 6 курсов внутривульварной химиотерапии.

За сутки до операции выполняется забор утренней порции мочи для молекулярного анализа. Результаты молекулярного анализа образца мочи $K_{miR-143}=26,17*10^{-3}$ соответствуют прогностическим коэффициентам течения заболевания без рецидива.

По состоянию на октябрь 2022 года больной наблюдается без признаков рецидива.

Пример 2.

Больной М., 65 лет, госпитализирован в марте 2021 г. в отделение онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с диагнозом рак мочевого пузыря T1N0M0. Выполнена ТУР. Гистологическое исследование: уротелиальный переходо-клеточный рак G2 с инвазией в собственную пластинку, в основании опухоли инвазии в мышечный слой не выявлено. В гистопрепарате обнаружен ВПЧ (HPV 16). Больной получил 6 курсов внутривульварной химиотерапии

За сутки до операции выполняется забор утренней порции мочи для молекулярного анализа. Результаты молекулярного анализа образца мочи: $K_{miR-143}=1,89*10^{-3}$ соответствуют прогностическим коэффициентам развития рецидива.

Через каждые 2 месяца после завершения химиотерапии больной проходил обследование в ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ. Проводился забор мочи и анализ уровня hsa-miR-143-3p относительно hsa-miR-7-5p.

Данные по $K_{miR-143}$ приводятся в см. Таблице 2.

Таблице 2		
Дата	$K_{miR-143}$	Наличие рецидива
июнь 2021 г	$2,96*10^{-3}$	нет
август 2021 г	$4,90*10^{-3}$	нет
октябрь 2021 г	$2,01*10^{-3}$	нет
декабрь 2021 г	$2,02*10^{-3}$	нет
февраль 2022 г	$1,82*10^{-3}$	нет
апрель 2022 г	$1,54*10^{-3}$	нет
июнь 2022 г	$1,24*10^{-3}$	да

В июне 2022 года у больного при цистоскопии был диагностирован рецидив заболевания, подтвержденный гистологически.

Технико-экономическая эффективность изобретения. «Способ прогнозирования развития рецидива у больных с вирусом папилломы человека и немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря» позволяет с высокой точностью прогнозировать исход такого заболевания как немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря с наличием ВПЧ-инфекции. Заявляемый способ, включает разработанные нами праймеры и является экономически оправданным для уточнения особенностей течения заболевания и дает возможность скорректировать тактику лечения, осуществляется в условиях стандартной лаборатории молекулярной биологии (ПЦР), без использования специального дорогостоящего оборудования; обладает высокой чувствительностью, относится к малоинвазивной диагностике, осуществление анализа возможно с мочой и занимает не более 8 часов.

(57) Формула изобретения

1. Способ прогнозирования развития рецидива у больных с вирусом папилломы человека и немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря, отличающийся тем, что используют высокоспецифичные праймеры для *hsa-miR-7-5p* и *hsa-miR-143-3p*, проводят амплификацию, анализируют первичные данные и рассчитывают коэффициент относительной экспрессии - К, сравнивают полученные значения К с интервалом прогностического коэффициента и при значении $K_{miR-143} \leq 5,07 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют развитие рецидива немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря в первые 18 месяцев после трансуретральной резекции мочевого пузыря, при значении $K_{miR-143} \geq 20,09 \cdot 10^{-3}$ прогнозируют течение заболевания без рецидива, а при значениях коэффициента К между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для оценки уровня экспрессии *hsa-miR-7-5p* используют праймеры SEQ ID 1 и SEQ ID 2, для реакции ОТ - праймер SEQ ID 3.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для оценки уровня экспрессии *hsa-miR-143-3p* используют праймеры SEQ ID 4 и SEQ ID 5, для реакции ОТ - праймер SEQ ID 6.