



MD 4038 C1 2010.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4038** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.: **A61B 10/00** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2010 0035 (22) Data depozit: 2010.03.03	(45) Data publicării hotărării de acordare a brevetului: 2010.05.31, BOPI nr. 5/2010
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventator: POPESCU Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Reprezentant: VOZIANU Maria	

(54) **Procedeu de prognozare a riscului de dezvoltare a cancerului glandei
tiroide**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la medicină, în special la
medicina preventivă și poate fi utilizată la progno-
zarea riscului dezvoltării cancerului glandei tiroide.

Conform invenției, procedeul de prognozare a
riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide
constă în aceea că se prelevează un fragment de
țesut din tumoarea glandei tiroide, se extrage din
acesta ADN-ul genomic prin digerare enzimatică cu
proteinaza K, se modifică ADN-ul prin conversia
citozinei în uracil prin metoda *Qiagen EpiTect*
Bisulfite Kit, apoi ADN-ul modificat se amplifică cu
ajutorul unor praimeri corespunzători ADN-ului
genei *p15* metilate și celei nemetilate prin metoda

2

5 *Methylation Specific Polimerase Chain Reaction*,
producții se introduc într-un gel de electroforeză din
agaroză dizolvată în tris-borat-etilendiamintetra-
acetat și se colorează cu bromură de etidiu, gelul se
iradiază cu radiație ultravioletă cu lungimea de undă
de 312 nm, și în cazul, în care se vizualizează
10 numai banda AND-ului metilat, se prognozează
riscul de dezvoltare a cancerului glandei tiroide, iar
în cazul în care se vizualizează banda AND-ului
metilat și banda AND-ului nemetilat - lipsa riscului
de dezvoltare a cancerului glandei tiroide.

Revendicări: 1

15

MD 4038 C1 2010.05.31

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la medicina preventivă și poate fi utilizată la prognozarea riscului dezvoltării cancerului glandei tiroide.

5 Este cunoscut un procedeu de prognozare a riscului dezvoltării cancerului glandei tiroide, care constă în aceea că se prelevează un fragment de țesut din tumoarea glandei tiroide, se extrage din acesta ADN-ul genomic prin digerare enzimatică cu proteinaza K, se modifică ADN-ul prin conversia citozinei în uracil prin metoda *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit*, apoi ADN-ul modificat se amplifică cu ajutorul unor praimer corespunzători ADN-ului generi *Rassf1A*, *TSHR*, *RaRβ2*, *DAPK*, *S100*, *p16*, *CDH1*, *CALCA*, *TIMP3*, *TGF-β* și *GSTpi*, metilate și celei nemetilate prin metoda *Methylation Specific Polimerase Chain Reaction*, produșii se introduc într-un gel de electroforeză din agaroză dizolvată în tris-borat-etilendiamintetraacetat și se colorează cu bromură de etidiu, gelul se iradiază cu radiație ultravioletă cu lungimea de undă de 312 nm, iar în cazul în care se vizualizează numai banda AND-ului metilat, se prognozează riscul de dezvoltare a cancerului glandei tiroide, iar în cazul în care se vizualizează banda AND-ului nemetilat, iar cele metilate lipsesc, se prognozează lipsa riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide [1].

15 Dezavantajele acestui procedeu constau în următoarele: acest procedeu este genetic nespecific, adică presupune investigarea profilurilor metilice la nivelul genelor umane: *Rassf1A*, *TSHR*, *RaRβ2*, *DAPK*, *S100*, *p16*, *CDH1*, *CALCA*, *TIMP3*, *TGF-β* și *GSTpi* și nu permite de a atinge o reprezentativitate de până la 100% a diagnosticului, prognozarea prin acest procedeu a inițierii transformării maligne a glandei tiroide este incertă.

20 Problema invenției constă în elaborarea unui procedeu nou cu o specificitate genetică mai înaltă și o prognozare a malignizării tumorii glandei tiroide cu o certitudine de 100%.

Conform invenției, procedeul de prognozare a riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide constă în aceea că se prelevează un fragment de țesut din tumoarea glandei tiroide, se extrage din acesta ADN-ul genomic prin digerare enzimatică cu proteinaza K, se modifică ADN-ul prin conversia citozinei în uracil prin metoda *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit*, apoi ADN-ul modificat se amplifică cu ajutorul unor praimer corespunzători ADN-ului genei *p15* metilate și celei nemetilate prin metoda *Methylation Specific Polimerase Chain Reaction*, produșii se introduc într-un gel de electroforeză din agaroză dizolvată în tris-borat-etilendiamintetraacetat și se colorează cu bromură de etidiu, gelul se iradiază cu radiație ultravioletă cu lungimea de undă de 312 nm, iar în cazul în care se vizualizează doar banda AND-ului metilat, se prognozează riscul de dezvoltare a cancerului glandei tiroide, iar în cazul în care se vizualizează banda AND-ului metilat și banda AND-ului nemetilat - lipsa riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide.

35 Procedeul revendicat asigură o specificitate genetică înaltă (presupune doar obținerea profilului metilic al genei umane *p15*) și permite prognozarea cu certitudine de 100 % de malignizare a tumorii glandei tiroide.

Rezultatul invenției constă în obținerea unui procedeu cu o specificitate genetică înaltă și în prognozarea malignizării tumorii glandei tiroide cu o certitudine de 100%.

40 Procedeul se realizează în modul următor: se prelevează un fragment de țesut din tumoarea glandei tiroide, se extrage din acesta ADN-ul genomic prin digerare enzimatică cu proteinaza K, se modifică ADN-ul prin conversia citozinei în uracil prin metoda *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit*, apoi ADN-ul modificat se amplifică cu ajutorul unor praimer corespunzători ADN-ului genei *p15* metilate și celei nemetilate prin metoda *Methylation Specific Polimerase Chain Reaction*, produșii se introduc într-un gel de electroforeză din agaroză dizolvată în tris-borat-etilendiamintetraacetat și se colorează cu bromură de etidiu, gelul se iradiază cu radiație ultravioletă cu lungimea de undă de 312 nm, iar în cazul în care se vizualizează numai banda AND-ului metilat, se prognozează riscul de dezvoltare a cancerului glandei tiroide, iar în cazul în care se vizualizează banda AND-ului metilat și banda AND-ului nemetilat - lipsa riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide.

Exempu de realizarea procedurii

50 Pacientul X., 49 ani, cu diagnosticul de tumoare a glandei tiroide, a fost investigat conform procedurii revendicate. Ca rezultat s-a stabilit că gelul de electroforeză în lumină ultravioletă (la 312 nm) conține doar o bandă (amplificarea ADN-ului metilat) și se consideră că pacientul dat are risc de dezvoltare a cancerului glandei tiroide. Peste 12 luni, la examinarea morfologică și histochimică s-a determinat o formațiune malignă (cancer) a glandei tiroide.

55 Pacientul Z., 41 ani, cu diagnosticul de tumoare a glandei tiroide, a fost investigat conform procedurii revendicate. Ca rezultat s-a stabilit că gelul de electroforeză în lumină ultravioletă (la 312 nm) conține două benzi de amplificare: una a ADN-ului metilat și cealaltă a ADN-ului nemetilat. În acest caz se consideră că pacientul dat nu are risc de dezvoltare a cancerului glandei tiroide. Peste 12 luni, la examinarea morfologică și histochimică nu s-a determinat nici o formațiune malignă a glandei tiroide, nici un semn de malignizare.

60

MD 4038 C1 2010.05.31

4

Așadar, aplicarea procedurii revendicate de prognozare a riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide în Laboratorul de genetică al Universității de Medicină și Farmacie „N. Testemițanu” a demonstrat o specificitate genetică înaltă pentru prognozarea riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide cu o certitudine de 100%.

5

(57) Revendicări:

Procedeu de prognozare a riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide, care constă în aceea că se prelevează un fragment de țesut din tumoarea glandei tiroide, se extrage din acesta ADN-ul genomic prin digerare enzimatică cu proteinaza K, se modifică ADN-ul prin conversia citozinei în uracil prin metoda *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit*, apoi ADN-ul modificat se amplifică cu ajutorul unor praimeri corespunzători ADN-ului genei *p15* metilate și celei nemetilate prin metoda *Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*, produșii se amplacează într-un gel pentru electroforeză din agaroză dizolvată în tris-borat-etilendiamintetraacetat și se colorază cu bromură de etidiu, gelul se iradiază cu radiație ultravioletă cu lungimea de undă de 312 nm, și în cazul în care se vizualizează numai banda ADN-ului metilat, se prognozează risc de dezvoltare a cancerului glandei tiroide, iar în cazul în care se vizualizează banda ADN-ului metilat și banda ADN-ului nemetilat - lipsa riscului de dezvoltare a cancerului glandei tiroide.

20

(56) Referințe bibliografice:

1. Hoque M. O., Rosenbaum E. et al. Quantitative assesment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 90 (7), 2005, p. 4011-4018

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

UNGUREANU Mihail

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2010 0035	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2010.03.03	(86) Cerere internațională PCT:
(51) : Int. Cl.: A61B 10/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01) Alți indici de clasificare: (54) Titlul : Procedeu de prognozare a riscului de dezvoltare al cancerului glandei tiroide (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : a) limba română: glandă tiroidă, cancer, diagnostic, prognozare; b) limba engleză: thyroid gland, cancer, diagnostics, prognostication	
I. Minimul de documente consultate (sistemul clasificării și indici de clasificare Int. Cl.)	
Int. Cl. Int. Cl.: A61B 10/00 (2006.01), C12N 15/09 (2006.01), C12N 15/11 (2006.01), G01N 21/64 (2006.01), G01N 33/574 (2006.01) MD 1994-2010 – baza de date EA 1995-2010 – baza de date, www.eapo.org SU 1970-1991 – certificate de autor	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
1. Пачес А. И и др. Опухоли головы и шеи. Москва. 1971, с. 339- 367 2. Hoque M. O., Rosenbaum E. et al. 2005 Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90 (7): 4011-4018.	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
1 Bazele de date internaționale (Internet) ■ BD FIPS (RU) ■ Oficiul European de Brevete (ep. espacenet.com) ■ SUA (www.uspto.gov) ■ Romania (www.osim.ro) 2. CD-rom (Rusia, SUA)	

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	RU 225336 C1 2005.06.10	1
A	RU 2247376 C1 2005.02.27	1
A	RU 2190346 C1 2002.10.10	1
A	RU 2229262 C1 2004.05.27	1
A	SU 1807409 A 07.04.93	1
A	SU 1063390 A 07.01.82	1
A	UA 22831 U 2007.04.25	1
A	RU 2316260 C1 10.02.2008	1
A	RU 2300106 C1 2007.05.27	1
A	SU 619859 A 15.08.78	1
☐ Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2010.03.17
Examinatorul		IUSTIN Viorel