



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86355** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00
G01N 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|---|
| <p>(21) Номер заявки: u 2013 08500</p> <p>(22) Дата подання заявки: 08.07.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.12.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2013, Бюл.№ 24</p> | <p>(72) Винахідник(и): Храновська Наталя Миколаївна (UA), Іонкіна Наталія Валеріївна (UA), Свергун Наталія Миколаївна (UA), Скачкова Оксана Володимирівна (UA), Климнюк Григорій Іванович (UA), Павлик Сергій Володимирович (UA), Шайда Елена Вікторівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)</p> |
|--|---|

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АМПЛІФІКАЦІЇ ГЕНА MYCN У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА НЕЙРОБЛАСТОМУ

(57) Реферат:

Спосіб визначення ампліфікації гена MYCN у дітей, хворих на нейробластому включає дослідження методом полімеразно-ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів. Полімеразно-ланцюгову реакцію проводять з використанням специфічних TaqMan-зондів MGB-типу з детекцією результатів в режимі реального часу та при виявленні в пухлинній клітині ампліфікацію гена MYCN більше 10 копій, прогнозують несприятливий перебіг захворювання.

UA 86355 U

Корисна модель належить до медицини, а саме - онкології, і може бути використана для визначення наявності ампліфікації гена MYCN в пухлинних клітинах у дітей, хворих на нейробластоми.

5 Нейробластома складає 7-11 % загальної кількості злоякісних новоутворень у дітей, займаючи четверте місце у структурі онкологічної захворюваності дітей після гострих лейкозів, пухлин центральної нервової системи та злоякісних лімфом. Частота виникнення нейробластом становить 0,85-1,1 на 100 тисяч дітей віком до 15 років. Віковий розподіл неоднорідний, частота виявлення цієї пухлини з віком зменшується. 90 % хворих - новонароджені та діти віком до 6 років [1].

10 Важливе значення, особливо при використанні сучасної протокольної терапії, є виявлення специфічних онкогенів на молекулярно-генетичному рівні з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу. Головна перевага ПЛР - її унікальна чутливість при досить невисокій вартості проведення досліджень. Метод дозволяє встановити несприятливий прогноз перебігу захворювання і точно визначити "групи ризику" хворих, з

15 можливістю забезпечення оптимізації програм терапії вже на перших етапах лікування [2].

Нейробластома із агресивним перебігом характеризуються множинними сегментними абераціями хромосом та ампліфікацією гена MYCN. Ген MYCN є центральним стратифікаційним біологічним маркером, розташованим в дистальній частині короткого плеча 2-ої хромосоми (2p24) та ампліфікується в пухлинних клітинах нейробластоми. Ампліфікація гена MYCN зазвичай досягає від 10 до 400 копій гена в пухлинній клітині з відповідним високим рівнем експресії, спостерігається у 25 % первинних пухлин і корелює з прогресуючою стадією захворювання та резистентністю до лікування і дозволяє стратифікувати хворих дітей на нейробластоми за групами ризику [3].

25 За прототип вибрано спосіб визначення ампліфікації гена MYCN у зразках пухлинної тканини у дітей, хворих на нейробластоми [Quantitative Real-time PCR for quick simultaneous determination of therapy-stratifying markers MYCN amplification, deletion 1p and 11q / M. Boensch, A. Oberthuer, M. Fischer [et al.] // Diagn. Moï. Pathol.-2005. - Vol. 14, № 3. - P. 177-182], за яким використовують метод кількісної полімеразної ланцюгової реакції з використанням флуоресцентного барвника SYBRGreen. Проведення аналізу включає такі етапи: виділення ДНК з біологічного матеріалу, ампліфікацію досліджуваної ділянки методом ПЛР з використанням

30 двох пар специфічних праймерів та флуоресцентного барвника SYBRGreen, детекцію продуктів реакції методом кількісної ПЛР в режимі реального часу.

Позитивним в прототипі є те, що метод молекулярно-генетичного аналізу є досить чутливим та специфічним, і дозволяє виявити ампліфікацію гена у біологічному матеріалі.

35 Недоліком прототипу є те, що метод є трудомістким процесом та недостатньо чутливим при використанні флуоресцентного барвника SYBRGreen і допускає виникнення хибно позитивних результатів.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб визначення ампліфікації гена MYCN у дітей, хворих на нейробластоми, методом полімеразної ланцюгової реакції з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням специфічних TaqMan-зондів MGB-типу та з більш високою специфічністю гібридизації, що дасть можливість стратифікувати хворих за "групами ризику", підвищити точність прогнозування перебігу захворювання з

40 можливістю подальшої оптимізації програм терапії.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

45 Біоптат пухлини поміщали в мікропробірки, які містили 0,3 мл середовища для транспортування виробництва "Ambion", США, для стабілізації ДНК. Матеріал призначений для виділення ДНК, зберігався при температурі 2-8 °С протягом 1 доби або довготривало при -70 °С.

Парафінізовану тканину звільняли від парафіну методом депарафінізації за допомогою ксилолу, згідно з методичними рекомендаціями [5]. Генотипу ДНК з пухлинної тканини виділяли методом адсорбції нуклеїнових кислот на "silica" мембрані за допомогою колонок "QIAampDNA MiniKit" ("QIAGEN", США), згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Для роботи з ДНК використовували тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, з маркуванням "Rnase-free", "Dnase-free". Використаний пластиковий посуд (пробірки, наконечники) знезаражували в спеціальному контейнері, який містить дезінфікуючий 5 %-ний розчин хлораміну або 1N розчин соляної кислоти.

50

55

Отриманий зразок ДНК одразу використовували для постановки полімеразної ланцюгової реакції або зберігали (впродовж 7 днів при 2-8 °С, впродовж 1 року при температурі мінус 20 °С та довготривало при -70 °С).

Перед проведенням реакції ампліфікації концентрацію отриманої ДНК доводили до 10-20 нг/мкл. Вимірювання концентрації ДНК проводили методом спектрофотометрії на спектрофотометрі NanoDrop1000 ("ThermoScientific", США).

Послідовності праймерів та TaqMan зондів були підбрані нами з використанням програми Primer Express® Software v3.0 ("AppliedBiosystems", США) та синтезовані фірмою "AppliedBiosystems" (США):

- прямиий праймер β -actin – 5'TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA3'
 - зворотній праймер β -actin - 3'CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGAS'

- флюоресцентний зонд β -actin -

6-FAM-ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGGGT-TAMRA

- прямиий праймер MYCN - 5'CCCTGGGTCTGCCCCGTTT3'

- зворотній праймер MYCN - 3'GGCGAAGTAGAAGTCATCTT3'

- флюоресцентний зонд MYCN -

VIC-CCCACCCTCTCCGGTGTGTCTGTCCGGTT-TAMRA

Праймери використовували в концентрації 30 μ M/m1, та зонди в концентрації 20 μ M/m1. Для проведення реакції ампліфікації готували реакційну суміш: 1 мкл прямиий праймер (MYCN), 1 мкл зворотній праймер (MYCN), 1 мкл флюоресцентний зонд (MYCN), 1 мкл прямиий праймер (β -actin), 1 мкл зворотній праймер (β -actin), 1 мкл флюоресцентний зонд (β -actin) 1,5 мкл ПЛР-води, 12,5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix ("Applied Biosystems", США). До суміші додавали 5 мкл розчину ДНК.

Ампліфікацію проводили на приладі 7300/7500 Real-Time PCR Systems, "Applied Biosystems", (США), використовуючи наступний температурний режим: початок ампліфікації при 95 °С-5 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 50 циклів 94 °С-3 с, 58 °С-6 с. і 72 °С-27 с. та стадія дисоціації (розділення отриманих продуктів за температурою плавлення) 95 °С-15 с, 60 °С-30 с, 95 °С-15 с.

Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів в режимі реального часу, згідно з рекомендаціями фірми-виробника приладу. Кількість копій гена MYCN розраховують за формулою:

$$x = 2^{\Delta ct}$$

де x - кількість копій гена MYCN,

$\Delta ct = ct(\beta\text{-actin}) - ct(\text{MYCN})$ [6].

Як негативний контроль використовували ДНК, отриману з тканини головного мозку, а позитивний - ДНК зразків з верифікованою ампліфікацією гена MYCN.

Відсутність ампліфікації гена MYCN в пухлинній клітині свідчить про сприятливий перебіг захворювання та дозволяє оптимізувати програму терапії хворого. Виявлення більше 10 копій ампліфікації гена MYCN в пухлинній клітині свідчить про несприятливий перебіг захворювання та відносить хворих до "групи високого ризику".

Переконаливими прикладами ефективності запропонованого способу є представлені результати молекулярно-генетичних досліджень біологічного матеріалу хворих.

І. Хворий Б. Д. Д. 2007 р. н., (амб. медична карта № 113523). Госпіталізований на консультацію в Національний інститут раку з діагнозом нейробластома лівого наднирника, з метастазами в печінку, парааортальні лімфовузли, кістковий мозок. Патогістологічний висновок (ПГЗ) № 62117 від 02.12.201: нейробластома лівого наднирника, з метастазами печінку парааортальні лімфовузли, кістковий мозок, 4 стадія. В 2011 року було проведено операцію по резекції пухлини.

У хворого отримували біопсійний матеріал пухлини до лікування. Біоптат пухлини поміщали в мікропробірки, які містили 0,3 мл середовища для транспортування виробництва "Ambion", (США), для стабілізації ДНК. Матеріал призначений для виділення ДНК, зберігався при температурі 2-8 °С протягом 1 доби або довготривало при -70 °С.

Парафінізовану тканину звільняли від парафіну методом депарафінізації за допомогою ксилолу, згідно з методичними рекомендаціями. Геномну ДНК з пухлинної тканини виділяли методом адсорбції нуклеїнових кислот на "silica" мембрані за допомогою колонок "QIAampDNA MiniKit" ("QIAGEN", США), згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Для роботи з ДНК використовували тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, з маркуванням "Rnase-free", "Dnase-free". Використаний пластиковий посуд (пробірки, наконечники) знезаражували в спеціальному контейнері, який містить дезінфікуючий 5 %-ний розчин хлораміну або 1N розчин соляної кислоти.

Отриманий зразок ДНК одразу використовували для постановки полімеразної ланцюгової реакції або зберігали (впродовж 7 днів при 2-8 °С, впродовж 1 року при температурі мінус 20 °С та довготривало при -70 °С).

Перед проведенням реакції ампліфікації концентрацію отриманої ДНК доводили до 10-20 нг/мкл. Вимірювання концентрації ДНК проводили методом спектрофотометрії на спектрофотометрі NanoDrop1000 ("ThermoScientific", США).

Послідовності праймерів та TaqMan зондів були підбрані нами з використанням програми Primer Express® Software v3.0 ("AppliedBiosystems", США) та синтезовані фірмою "AppliedBiosystems" (США):

- прямиий праймер β -actin - 5'TCACCCACACTGTGCCCCATCTACGA3'

- зворотній праймер β -actin - 3'CAGCGGAACCCGCTCATTGCCAATGA5'

- флуоресцентний зонд β -actin -

6-FAM--ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT-TAMRA

- прямиий праймер MYCN - 5'CCCCTGGGTCTGCCCCGTTT3'

- зворотній праймер MYCN - 3'GGCGAAGTAGAAGTCATCTT5'

- флуоресцентний зонд MYCN -

VIC--CCCACCCCTCTCCGGTGTGTCTGTCCGGTT-TAMRA

15 Праймери використовували в концентрації 30 μ M/Лп1, та зонди в концентрації 20 μ M/м1.

Для проведення реакції ампліфікації готували реакційну суміш: 1 мкл прямиий праймер (MYCN), 1 мкл зворотній праймер (MYCN), 1 мкл флуоресцентний зонд (MYCN), 1 мкл прямиий праймер (β -actin), 1 мкл зворотній праймер (β -actin), 1 мкл флуоресцентний зонд (β -actin) 1,5 мкл ПЛР-води, 12,5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix ("Applied Biosystems", США). До суміші додавали 5 мкл розчину ДНК.

Ампліфікацію проводили на приладі 7300/7500 Real-Time PCR Systems, "Applied Biosystems", США, використовуючи наступний температурний режим: початок ампліфікації при 95 °C-5 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 50 циклів 94 °C-3 с, 58 °C-6 с і 72 °C-27 с. та стадія дисоціації (розділення отриманих продуктів за температурою плавлення) 95 °C-15 с, 60 °C-30 с, 95 °C-15 с

Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів в режимі реального часу, згідно з рекомендаціями фірми-виробника приладу. Кількість копій гена MYCN розраховують за формулою:

$$x=2^{\Delta ct}$$

30 де x - кількість копій гена MYCN,

$\Delta ct = ct(\beta\text{-actin}) - ct(\text{MYCN})$.

Як негативний контроль використовували ДНК, отриману з тканини головного мозку, а позитивний - ДНК зразків з верифікованою ампліфікацією гена MYCN.

В результаті досліджень у хворого не було виявлено ампліфікацію гена MYCN методом ПЦР в режимі реального часу, що свідчить про сприятливий перебіг захворювання. Хворому проведено 8 блоків хіміотерапії по протоколу СОЖЕК після операції. Спостерігається повна відповідь у хворого на лікування та 19 місячна ремісія.

40 II. Хворий В.А.В. 2006 р. н. (амб. медична картка № 900581). Госпіталізований на консультацію в Національний інститут раку з діагнозом нейробластома заочеревинного простору справа. ПГЗ № 4/2009 від 12.01.2009 нейробластома заочеревинного простору справа, 3 стадія.

45 У хворого отримували біопсійний матеріал пухлини до лікування. Біоптат пухлини поміщали в мікропробірки, які містили 0,3 мл середовища для транспортування виробництва "Ambion", (США), для стабілізації ДНК. Матеріал призначений для виділення ДНК, зберігався при температурі 2-8 °C протягом 1 доби або довготривало при -70 °C.

Парафінізовану тканину звільняли від парафіну методом депарафінізації за допомогою ксилола, згідно з методичними рекомендаціями.

50 Геномну ДНК з пухлинної тканини виділяли методом адсорбції нуклеїнових кислот на "silica" мембрані за допомогою колонок "QIAampDNA MiniKit" ("QIAGEN", США), згідно з рекомендацією фірми-виробника. Для роботи з ДНК використовували тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, з маркуванням "Rnase-free", "Dnase-free". Використаний пластиковий посуд (пробірки, наконечники) знезаражували в спеціальному контейнері, який містить дезінфікуючий 5 %-ний розчин хлораміну або 1N розчин соляної кислоти.

55 Отриманий зразок ДНК одразу використовували для постановки полімеразної ланцюгової реакції або зберігали (впродовж 7 днів при 2-8 °C, впродовж 1 року при температурі мінус 20 °C та довготривало при -70 °C).

Перед проведенням реакції ампліфікації концентрацію отриманої ДНК доводили до 10-20 нг/мкл. Вимірювання концентрації ДНК проводили методом спектрофотометрії на спектрофотометрі NanoDrop1000 ("ThermoScientific", США).

Послідовності праймерів та TaqMan зондів були підібрані нами з використанням програми Primer Express® Software v3.0 ("AppliedBiosystems", США) та синтезовані фірмою "AppliedBiosystems" (США):

- 5 - прямий праймер P-actin - 5'TCACCCACACTGTGCCCCATCTACGA3'
 - зворотній праймер P-actin - 3'CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGA5'
 - флуоресцентний зонд P-actin -
 6-FAM-ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT-TAMRA
 - прямий праймер MYCN -
 5'CCCCTGGGTCTGCCCCGTTT3'
 10 - зворотній праймер MYCN -
 3'GGCGAAGTAGAAGTCATCTT5'
 - флуоресцентний зонд MYCN -
 VIC-CCCACCCCTCTCCGGTGTGTCTGTCCGGTT-TAMRA

15 Праймери використовували в концентрації 30 μM/ml, та зонди в концентрації 20 μM/ml. Для проведення реакції ампліфікації готували реакційну суміш: 1 мкл прямий праймер (MYCN), 1 мкл зворотній праймер (MYCN), 1 мкл флуоресцентний зонд (MYCN), 1 мкл прямий праймер (β-actin), 1 мкл зворотній праймер (β-actin), 1 мкл флуоресцентний зонд (β-actin) 1,5 мкл ПЛР-води, 12,5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix ("Applied Biosystems", США). До суміші додавали 5 мкл розчину ДНК.

20 Ампліфікацію проводили на приладі 7300/7500 Real-Time PCR Systems, "Applied Biosystems", США, використовуючи наступний температурний режим: початок ампліфікації при 95 °C-5 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 50 циклів 94 °C-3 с, 58 °C-6 с. і 72 °C-27 с. та стадія дисоціації (розділення отриманих продуктів за температурою плавлення) 95 °C-15 с, 60 °C-30 с, 95 °C-15 с.

25 Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів в режимі реального часу, згідно з рекомендаціями фірми-виробника приладу. Кількість копій гена MYCN розраховують за формулою:

$$x = 2^{\Delta ct}$$

де x - кількість копій гену MYCN,

30 $\Delta ct = ct(\beta\text{-actin}) - ct(\text{MYCN})$.

Як негативний контроль використовували ДНК отриману з тканини головного мозку, а позитивного - ДНК зразків з верифікованою ампліфікацією гена MYCN.

В результаті досліджень методом ПЦР в режимі реального часу, у хворого було виявлено 512 копій гена MYCN, що свідчить про належність хворого до "групи високого ризику" та передбачає поганий прогноз. Після повторного проведення досліджень методом ПЦР в режимі реального часу з використанням парафінізованого операційного матеріалу було виявлено 512 копій гена MYCN. Хворий належить до "групи високого ризику". Йому проведено 8 блоків хіміотерапії за протоколом HR-NBL-1/ESIOP. Спостерігалась неповна відповідь на лікування. Через 1 рік у хворого розвився рецидив. Враховуючи належність хворого до "групи високого ризику" та ускладнень під час проведення хіміотерапії, прогноз захворювання несприятливий.

40 Таким чином, визначення наявності ампліфікації гена MYCN в пухлинній тканині за допомогою молекулярно-генетичних методів, а саме полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального, дозволяє передбачити ризик виникнення несприятливого прогнозу перебігу захворювання, своєчасно визначити "групи ризику" хворих та забезпечити можливість оптимізації програм терапії вже на перших етапах лікування.

Джерела інформації:

1. Trager C. Neuroblastoma: incidence, biology and outcome / C. Trager. - Stockholm: Karolinska Instituted, 2009. - 56 p.
2. Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system / C. Raggi, M. Bagnoni, G. Tonini [et al.] // Clin. Chem. - 1999. - Vol. 45, № 11. - P. 1918-1924.
3. Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group / J. Schneiderman, W. London, G. Brodeur [et al.] // J. Clin. Oncol. - 2008. - Vol. 26, № 6. - P. 913-918.
- 55 4. Quantitative Real-time PCR for quick simultaneous determination of therapy-stratifying markers MYCN amplification, deletion 1p and 11q / M. Boensch, A. Oberthuer, M. Fischer [et al.] // Diagn. Mol. Pathol. - 2005. - Vol. 14, № 3. - P. 177-182 (прототип).
5. Виділення нуклеїнових кислот з клінічного матеріалу: методичні рекомендації / Н.Г. Горovenko, З.І. Россоха, С.В. Подольська [та ін.]. - К., 2010. - 39 с.

6. Singal A. Tumor markers in pediatric solid tumors / A. Singal, S. Agarwala // J. Indian. Assoc. Pediatr. Surg. - 2005. - Vol. 10, № 3. - P. 183-190.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб визначення ампліфікації гена MYCN у дітей, хворих на нейробластому, що включає дослідження методом полімеразно-ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів, який **відрізняється** тим, що полімеразно-ланцюгову реакцію проводять з використанням специфічних TaqMan-зондів MGB-типу з детекцією результатів в режимі реального часу та при виявленні в пухлинній клітині ампліфікацію гена MYCN більше 10 копій, прогнозують несприятливий перебіг захворювання.

10

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601