

71.761/PA

K I V O N A T

Eljárás rákbetegségek korai diagnosztizálására

A találmány a rákok és az azokat megelőző állapotok korai diagnózisára alkalmas eljárásra vonatkozik. Az eljárásnak megfelelően egy a testből vett mintában egy sejtciklust szabályozó fehérje túlzott mértékű kifejeződését határozzák meg. A találmány tárgya egy erre a célra használható kit is, amely

(a) egy sejtciklust szabályozó fehérje kimutatására alkalmas reagenst,

(b) szokásos segédanyagokat, például puffereket, hordozóanyagokat, markereket, és
kívánt esetben

(c) kontroll reakciókhoz alkalmazható eszközt tartalmaz.

P0102744

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Irodalmi Iroda
Andrássy út 113.
Budapest, Hungary
Tel: 34-34-050, Fax: 34-24-323

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



72

71.761/PA

Eljárás rákbetegségek korai diagnosztizálására

A jelen találmány tárgya eljárás rák és rákot megelőző állapotok korai diagnosztizálására, különösen a felső légutak és az anogenitális traktus megbetegedései esetén.

Az ötvenes évek közepe óta ajánlanak olyan programokat, amelyek célja különböző rákos megbetegedések megelőzése. A méhnyakrák megelőzése tekintetében ezek a programok lényegében a méhnyakból származó citológiai kenet citológiai és morfológiai vizsgálatán alapulnak, amit Pap tesztnek neveznek, ez mára a 20 éven felüli nők rendszeres időközönként végzett rutinszerű nőgyógyászati vizsgálatának alapját képezi. A sejtek morfológiája segítségével a keneteket különböző intenzitási fokú diszpláziás sejtváltozásokra osztották. A Pap I - V intenzitási fokok sorrendben a következők: normális, enyhe elváltozás, komolyabb elváltozás, komoly elváltozás és invazív rák. Ha a Pap teszt eredménye kedvezőtlen, akkor egy kis biopsziát vesznek és ezt kóronctani vizsgálatnak vetik alá, amivel a diszplázia fajtája és intenzitása meghatározható, és az elváltozás méhnyaki intraepiteliális neopláziaként osztályokba (cervical intraepithelial neoplasia, CIN I-III) sorolható.

Minden megelőző program ellenére a méhnyakrák évi 400 000 új megbetegedéssel a második leggyakoribb rák a nőknél. Ennek oka

többek között az, hogy a Pap teszt eredményeinek 30 %-a hamisan negatív.

Ezért a jelen találmány tárgya olyan eljárás, amellyel a méhnyakrák korai fázisban és megbízhatóan diagnosztizálható. Emellett ezzel a módszerrel lehetővé kell tenni a jóindulatú gyulladásoknak és a szövetátalakulással járó változásoknak a daganatképződést megelőző elváltozásoktól történő megkülönböztetését.

A jelen találmány értelmében ez a cél az igénypontokban meghatározott tárggyal elérhető.

A jelen találmány azon a felismerésén alapul, hogy a sejtciklust szabályozó fehérjék kifejeződése sokféle rákbetegségben, például a felső légutak és az anogenitális traktus rákos megbetegedéseinél, különösen a méhnyakráknál, valamint az ilyen rákokat megelőző állapotokban fokozott mértékű. Sejtciklust szabályozó fehérjék például a ciklinek. Különösen a ciklineket szabályozó ciklin-függő kinázokat említhetjük meg. Még fontosabb megemlíteni a ciklin-függő kináz gátlókat, amelyek viszont a ciklin-függő kinázokat szabályozzák. Ciklin-függő kináz gátlók többek között a következő fehérjék: p14, p15, p16, p19, p21 és p27. Felismertük, hogy a sejtciklust szabályozó fehérje fokozott mértékű kifejeződése összefüggésben van a sejt elváltozásának mértékével.

A jelen találmány értelmében ez a felismerés lehetővé tette a rák és a rákot megelőző állapotok kimutatására olyan eljárás kidolgozását, amely magában foglalja a sejt ciklus fehérjék fo-



kozott mértékű kifejeződésének meghatározását egy a testből származó mintában.

A "rák és a rákot megelőző állapotok" meghatározás minden fajtájú és eredetű rákra, illetve ezek megelőző állapotára vonatkozik. A rák lehet például felső légúti rák vagy az anogenitális traktusban keletkezett rák, különösen méhnyakrák. Az utóbbival kapcsolatban különösen megemlítendőek többek között a méhnyakrákot megelőző állapotok, például a méhnyaki intraepiteliális neopláziák (CIN I-III) és az *in situ* rákok (carcinoma *in situ*, CIS).

A "sejtciklust szabályozó fehérjék" meghatározás minden fajtájú és eredetű sejtciklust szabályozó fehérjére vonatkozik. Ilyen fehérjék például a ciklinek, különösen a ciklin-függő kinázok, amelyek a ciklineket szabályozzák. Ciklin-függő kinázok például a cdk4 és a cdk6 fehérjék. Még hangsúlyosabban említendőek a ciklin-függő kináz gátlók, amelyek viszont a ciklin-függő kinázokat szabályozzák. Ciklin-függő kináz gátlók például a p14, a p15, a p16, a p19, a p21 és a p27 fehérjék, amelyek közül előnyös a p16 fehérje.

A "test minta" meghatározás minden olyan test mintára vonatkozik, amelyből meghatározhatók a sejtciklust szabályozó fehérjék. Ilyen test minta például a vér, a kenet, a nyál, a vizelet, a széklet, a liquor, az epe, a gasztrointesztinális váladékok, a nyirok, a csontvelő, a szerv punkciók vagy aspirátumok és a biopsziák. Az anogenitális traktusban keletkezett rák, például a méhnyakrák kimutatásánál különösen előnyös minta a kenet és a biopszia.



A "sejtciklust szabályozó fehérje fokozott kifejeződésének kimutatása" kifejezés minden olyan eljárásra vonatkozik, amely alkalmas a sejtciklust szabályozó fehérje és az ezt kódoló mRNS-ek fokozott kifejeződésének, valamint a megfelelő gének nagyobb mértékű jelenlétének a kimutatására. Nyilvánvaló, hogy a fehérjék fokozott kifejeződésének kimutatása úgy történhet, hogy a testből vett vizsgálendő mintát összehasonlítjuk egy egészséges személy testéből származó mintával. Az ilyen mintából standard formájú mintát készíthetünk. A sejtciklust szabályozó fehérje (fokozott mértékű) kifejeződésének kimutatását végezhetjük nukleinsav szinten és fehérje szinten is. A fehérje szinten történő kimutatáshoz például a sejtciklust szabályozó fehérjék elleni antitesteket használhatunk. Az ilyen antitestek segítségével történő kimutatást a legkülönbözőbb eljárásokkal végezhetjük, ilyen eljárás például a Western blot, az ELISA és az immunprecipitáció. Előnyös lehet, ha az antitesteket szilárd hordozóra, például teszt csíkra vagy latex részecskékre rögzítjük.

A jelen találmány segítségével lehetővé válik a rák korai, azaz még a betegséget megelőző állapotban történő diagnosztizálása.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti eljárás megvalósítására alkalmas kit. Egy ilyen kit tartalmaz (a) egy reagenst a sejtciklust szabályozó fehérje kifejeződésének kimutatására, például ilyen fehérje elleni antitesteket vagy ilyen fehérjét kódoló nukleinsavat vagy ennek részeit, (b) szokásos adalékanyagokat, például puffereket, hordozóanyagokat, markereket, és



kívánt esetben

(c) kontroll reakciókhoz használható szereket, például sejtciklust szabályozó fehérjét, ilyen fehérjét kódoló nukleinsavat vagy ennek részeit vagy sejt készítményt, például szövetszövetet vagy lemezre rögzített sejteket.

A fenti meghatározások értelemszerűen alkalmazandók a kit egyes alkotórészeire. A kit az egyes alkotórészek egy vagy több képviselőjét tartalmazhatja.

A jelen találmány segítségével lehetővé válik a rák korai diagnózisa. Lényeges, hogy a rákot megelőző állapot korán kimutatható. Hangsúlyozni kell, hogy lehetséges a jóindulatú gyulladáshoz vezető elváltozásoknak és a szövet átalakulásokkal járó változásoknak a daganatképződést megelőző rendellenes elváltozásoktól történő megkülönböztetése. További jellemző, hogy a találmány szerinti eljárással kapott eredmény nem szubjektív kiértékelés tárgya, így elkerülhetők a Pap tesztnél és a kórszövet-tani vizsgálatoknál előforduló hamis negatív és hamis pozitív eredmények. A jelen találmány jellemzője továbbá a gyors és egyszerű kivitelezhetőség, ezért széleskörű szkrínelésekhez is alkalmazható, különösen a harmadik világ országaiban. A jelen találmány ezáltal fontos hozzájárulást jelent a rákos megbetegedések jelenlegi diagnosztikai eljárásaihoz.

A rajzok rövid leírása

1. ábra

A cdk4 fokozott kifejeződésének kimutatását ábrázolja HPV16-transzformált CaSki sejteken. A 4h, 8h, 12h, 24h jelek a sejt

eltávolítása után eltelt időt jelentik órákban kifejezve. A co a kontrollra, míg az arr a szérum hozzáadására utal.

2. ábra

A cdk6 és a p19 fokozott kifejeződésének kimutatását ábrázolja HPV16-transzformált NIH3T3 sejteken. A co a kontrollt jelöli.

A találmány magyarázatára a következő példákat mutatjuk be.

1. példa

A p16 fokozott mértékű kifejeződésének kimutatása méhnyaki biopsziákban

(A) Méhnyakból származó 20 biopsziából 3-5 mikrométer vastagságú paraffin metszeteket állítottunk elő, amelyek magukban foglalták a kóros elváltozások valamennyi fokozatát az egészséges szövetből (n=1) kezdve a CIN I (n=2), II (n=3), III (n=4) léziókon át az invazív rákig (n=5). A metszeteket kétszer tíz percen át xilolban tartottuk a paraffin eltávolítására, majd etanol segítségével újra hidrogéneztek. Az antigéneket 10 mM citrát pufferrel (pH 6,0) autoklávban 110°C-on 10 percen át végzett kezeléssel demaszkíroztuk. Ezután 0,25 %-os hidrogén-peroxid-oldattal PBS-ben az endogén peroxidázokat inaktiváltuk. A nem-specifikus kötőhelyek lószérummal (Vectastatin ABC detektáló kit, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, USA) szobahőmérsékleten, 20 percen át végzett blokkolását követően a metszeteket p16 specifikus monoklonális antitestekkel (Neomarkers, Fremont, Kalifornia, USA) 3 % magzati borjúsérum jelenlétében, szobahőmérsékleten 45 percen át inkubáltuk. A p16 antitest kötődésének kimutatására egy biotinilezett szekunder antitestet (ló

anti-egér IgG, Vectastain kit, ld. fentebb) adtunk a mintához. 30 perc eltelte után a megkötött szekunder antitestet a reagen-
sek segítségével, a Vectastain kit előírásainak megfelelően ki-
mutattuk, és egy mag ellenfestést végeztünk Mayer-féle hemalum-
-oldattal.

A kísérlet megmutatta, hogy a p16 fokozott mértékben kifeje-
ződött a kórosan elváltozott sejtekben. Megmutatta azt is, hogy
a p16-kifejeződés fokozódásának mértéke a sejt kóros elváltozá-
sának mértékével együtt nő.

(B) Paraffin metszeteket készítettünk méhnyakból származó 78
biopsziából. A következő biopsziákat vizsgáltuk: egészséges szö-
vet (n=12), kórosan elváltozott állapotok CIN I (n=15), II
(n=14) és III (n=18), valamint invazív rák (n=19). A paraffin
metszeteket az (A) alatt leírt módon kezeltük. Az 1. táblázatban
bemutatott adatokat kaptuk.

1. táblázat

A p16 kifejeződés intenzitása

Hisztologia	n	-	+	++	+++
egészséges	12	9	3		
CIN I	15	10	3	2	
CIN II	14	1	4	9	
CIN III	18			9	9
CxCa	19			1	18
összesen	78	20	10	21	27

Az 1. táblázat adataiból kitűnik, hogy a p16 a kórosan elváltozott sejtekben és az invazív rákos sejtekben is fokozott mértékben fejeződik ki, a kifejeződés fokozódásának mértéke az elváltozás mértékével együtt növekszik az invazív rák felé.

(C) 180 méhnyaki biopsziából készült paraffin metszetet az (A) alatt leírt módon kezeltünk. Emellett meghatároztuk az olyan sejtek százalékos arányát, amelyek a fent említett p16-specifikus monoklonális antitesttel reagálnak. Megkülönböztettük a HPV-pozitív és a HPV-negatív elváltozásokat és az invazív rákot is. A 2. táblázatban látható adatokat kaptuk.

2. táblázat

A p16-ot fokozott mértékben kifejező sejtek aránya

	n	%-os átlag ± a standard eltérés
CIN I	32	54,9 ± 24,0
HPV-negatív	17	54,0 ± 27,2
HPV-pozitív	15	55,9 ± 21,0
CIN II	32	70,8 ± 18,9
HPV-negatív	14	76,0 ± 15,8
HPV-pozitív	18	66,8 ± 20,5
CIN III	60	92,4 ± 10,2
HPV-negatív	9	94,4 ± 7,5
HPV-pozitív	51	92,1 ± 10,7
Invazív rák	58	97,8 ± 5,2
HPV-negatív	5	96,4 ± 8,1
HPV-pozitív	53	97,9 ± 4,9

A 2. táblázat adatai azt mutatják, hogy a p16 fokozott mértékben fejeződik ki a diszpláziák és az invazív rákok mind HPV-pozitív, mind HPV-negatív sejtjeiben. Ezt az eredményt megerősítik a kontrollként alkalmazott egészséges szövet vizsgálatával kapott adatok is. A kapott adatokból az is megállapítható, hogy a p16-tal reagáló sejtek százalékos aránya a kóros elváltozás mértékével együtt növekszik az invazív rákig.

2. példa

A sejtciklust szabályozó fehérjék fokozott kifejeződésének kimutatása HPV-transzformált sejtekben

(A) CaSki méhnyakrák sejteket HPV16-tal transzformáltunk és szérum nélkül tenyésztettünk 72 órán át. A szérum hozzáadását követően a különböző időpontokból származó sejt extraktumokat összegyűjtöttük, SDS-PAGE eljárásnak vetettük alá, majd PVDF (Du Pont) membránra vittük át. A cdk4 termelődést Santa Cruz gyártmányú poliklonális antiszérummal (1:1000) határoztuk meg. Ezután a HPV16-E7 fehérje termelődését Triton gyártmányú HPV16-E7 (1:50) elleni monoklonális antitesttel határoztuk meg. Az egyes immunválaszokat peroxidázhoz kötött szekunder antitestekkel és kemilumineszcencia jelző rendszerrel (NEN, Du Pont) mutattuk ki.

Az eredmények azt mutatták, hogy a cdk4 kifejeződése fokozott mértékű volt (ld. az 1. ábrát).

(B) NIH3T3 sejteket HPV16-tal transzformáltunk, azért, hogy HPV16-E7 fehérje termelődjön. A transzformált sejtekből sejt extraktumokat nyertünk ki, és ezeket az (A) alatt leírt módon

kezeltük. A cdk6 és p19 kifejeződésének kimutatására Santa Cruz gyártmányú poliklonális antiszérumot (1:1000) használtunk. A HPV16-E7 fehérje kifejeződésének kimutatását és az egyes immunválaszok meghatározását illetően az (A) alatt leírtakra utalunk (ld. a 2. ábrát).

Az eredmények azt mutatták, hogy a cdk6 és a p19 kifejeződése fokozott mértékű volt (ld. a 2. ábrát).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás rák és az azt megelőző állapotok korai diagnózisára, amely magában foglalja egy sejtciklust szabályozó fehérje kifejeződésének egy testből vett mintában történő kimutatását, ahol a sejtciklust szabályozó fehérje egy ciklin-függő kináz gátló.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a rák a felső légúti traktus rákja.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a rák anogenitális rák.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, ahol az anogenitális rák méhnyakrák.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a ciklin-függő kináz gátló p14, p15, p16, p18, p19, p21 vagy p27 fehérje.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a testből származó minta vér, kenet, nyál, vizelet, széklet, liquor, epe, csontvelő, gasztrointesztinális váladék, szerv punkció, biopszia és/vagy nyirok.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a fokozott mértékű kifejeződést nukleinsav szinten határozzuk meg.

8. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a fokozott mértékű kifejeződést fehérje szinten határozzuk meg.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, ahol a meghatározáshoz egy sejtciklust szabályozó fehérje elleni antitestet alkalmazunk.

10. Kit az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás megvalósítására, amely

(a) egy sejtciklust szabályozó fehérje kimutatására alkalmas reagenst,

(b) szokásos segédanyagokat, például puffereket, hordozóanyagokat, markereket, és kívánt esetben

(c) kontroll reakciókhoz alkalmazható eszközt tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti kit, ahol a reagens egy a sejtciklust szabályozó fehérje elleni antitest.

12. A 10. igénypont szerinti kit, ahol a reagens egy a sejtciklust szabályozó fehérjét kódoló nukleinsav vagy annak része.

13. A 10-12. igénypontok bármelyike szerinti kit, ahol az eszköz egy a sejtciklust szabályozó fehérje vagy az ezt kódoló nukleinsav vagy annak része.

14. A 10-12. igénypontok bármelyike szerinti kit, ahol az eszköz sejtpreparátum vagy lemezen rögzített sejtek.

12 oldal leírás
2 oldal rajz

14 oldal

A meghatalmazott:

Parragh Gáborné dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

PO102744

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

17373

A2

1/2

NIH3T3

8 E7

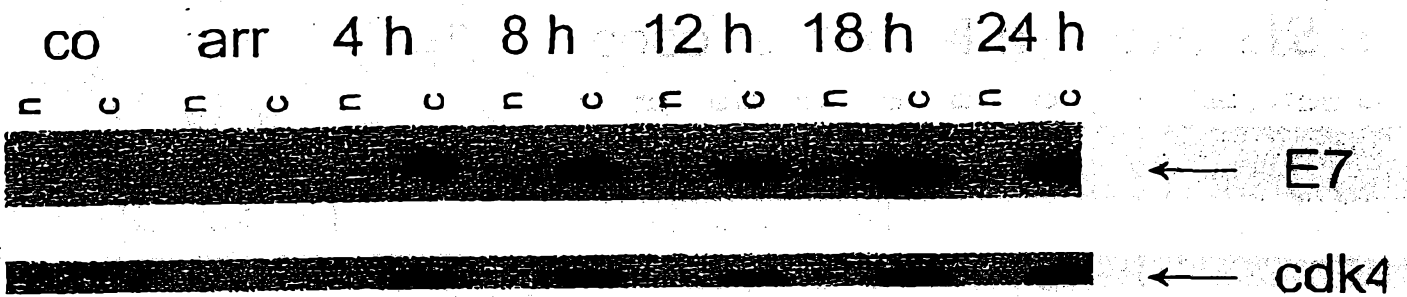


← p19



← cdk6

1. ábra



2. ábra