



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01065**

(22) Data de depozit: **06/12/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2020 BOPI nr. **7/2020**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CISMASIU VALERIU,
STR.VALEA OLTULUI, NR.18, BL.A31,
SC.B, ET.2, AP.23, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GĂINĂ GISELA, STR.POPA ȘAPCA,
NR.7B, PITEȘTI, AG, RO;**
• **IONESCU VICTOR,
STR.ION CÂMPINEANU, NR.24, BL.18B,
SC.1, ET.2, AP.5, SECTOR 1, BUCUREȘTI,
B, RO**

(54) **SET DE DOI PRIMERI ȘI DOUĂ SONDE, ȘI O METODĂ PCR
DIGITAL ÎN EMULSIE, PENTRU DETECȚIA SPECIFICĂ,
ÎN EXONUL 14 AL GENEI FLT 3, A DUPLICĂRII
UNEI REGIUNI CU SECVENȚA TERMINALĂ
GAGAATATGAATATGATCTCA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție și dozare a mutațiilor de tip FLT3-ITD din gena *flt3*, aplicabilă pentru diagnosticul sau monitorizarea evoluțiilor patologiilor de natură hematologică asociate cu mutațiile FLT3-ITD. Metoda conform invenției constă în aceea că se realizează amestecuri de reacție conținând enzima ADN polimerază, clorură de sodiu, clorură de magneziu, 4 tipuri de dezoxinucleotide, două tipuri de primeri în concentrație de 2,5 micromolar fiecare, două tipuri de sonde, în concentrație de 350 nanomolar fiecare, după care se adaugă o soluție uleioasă, rezultând

o emulsie de picături uleioase care este supusă unei reacții PCR digital în emulsie, ddPCR, pentru detecția fluorescențelor caracteristice substanțelor eliberate prin degradarea sondelor, la nivelul fiecărei picături de ulei din amestecul de reacție, astfel că fluorescența markerului este o măsură a numărului total de molecule FLT3 din amestecul de reacție, și un control pozitiv al reacției PCR.

Revendicări: 12
Figuri: 1



18

Documentația tehnică

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARC	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2018 01065
Data depozit	06-12-2018

Descrierea invenției

a) Titlul invenției

SET DE DOI PRIMERI ȘI DOUĂ SONDE ȘI O METODĂ PCR DIGITAL ÎN EMULSIE, PENTRU DETECȚIA SPECIFICĂ, ÎN EXONUL 14 AL GENEI *FLT3*, A DUPLICĂRII UNEI REGIUNI CU SECVENȚA TERMINALĂ GAGAATATGAATATGATCTCA

b) Domeniul tehnic și definirea termenilor tehnici

Invenția se înscrie în domeniul biologiei moleculare și în domeniul diagnosticului molecular al leucemiei mieloide acute, precum și al altor patologii asociate cu mutații genetice de tip IDT. Leucemia mieloidă acută, ca orice alt tip de cancer, este consecința acumulării în celule a unor mutații genetice. Mutațiile genetice pot apărea oricând pe durata vieții unei celule. O parte sunt corectate de către mecanismele de reparare, iar altele persistă în celulă și se pot transmite descendenților celulari (dacă celula respectivă se multiplică). Unele dintre mutațiile genetice pot determina ca unele dintre mecanismele celulare să se desfășoare anormal. Acumularea unui set de astfel de mutații în genomul aceleiași celule, precum și combinarea aleatorie a mecanismelor celulare afectate, determină la un moment dat ca celula respectivă să devină tumorală. O paletă foarte largă de mutații genetice, deși diferite ca natură și locație în genom, pot conduce în final la apariția cancerului. Consecința acestui fenomen este aceea că leucemia mieloidă acută diferă ca manifestare patogenă, al tratamentului, al gradului de severitate, al prognosticului și al speranței de viață a pacientului în funcție de natura mutațiilor. Prin urmare, identificarea în biopsii a unor mutații cunoscute pentru diferite tipuri de cancer (inclusiv leucemia mieloidă acută) oferă informații esențiale medicului pentru a stabili un diagnostic precis, un tratament cât mai potrivit și un prognostic realist.

Ca urmare a dezvoltării tehnologiei de secvențiere, au fost descoperite foarte multe mutații asociate cu leucemia mieloidă acută. Pentru câteva dintre ele, s-a dovedit că apar foarte frecvent în leucemia mieloidă acută și, în același timp, au valoare prognostică (evoluția probabilă a pacientului după tratament). În această categorie se află și mutațiile care se petrec la nivelul genei *flt3* (fms related tyrosine kinase 3). Gena codifică o proteină, care are rol în multiple mecanisme celulare, cele mai relevante pentru patogeneza leucemiei mieloide acute fiind proliferarea (multiplicarea) celulară și hematopoieza.

Proteina codificată de gena *flt3* este localizată la suprafața celulară, fiind inclusă în categoria proteinelor transmembranare (adică au părți expuse în afara celulei, precum și părți citoplasmice). Proteina este organizată astfel: zona extracelulară, urmată de zona membranară, zona juxtamembranară (definită ca zona de lângă membrana celulară) și zona catalitică. În mod natural, zona juxtamembranară are rolul de a bloca funcționarea domeniului catalitic. Eliberarea domeniului catalitic se face controlat, doar atunci când proteina transmite în interiorul celulei un semnal pe care l-a recepționat din exteriorul celulei. Regiunea genei *flt3* cu cea mai mare rată de mutagenезă este zona exonului 14, care codifică partea juxtamembranară a proteinei. Mutațiile sunt denumite generic FLT3-ITD și sunt foarte variabile de la un pacient la altul. Toate mutațiile de tip FLT3-ITD au în comun faptul că fiecare dintre ele apare prin inserția unui fragment suplimentar de ADN într-un locus din exonul 14. Secvența fragmentului suplimentar este identică cu o parte din secvența exonului 14 localizată în amonte față de locul de inserție. Cu alte cuvinte, un fragment de ADN genomic este duplicat, iar duplicatul se inseră imediat după fragmentul original (de unde provine și denumirea de duplicare internă în tandem). Variabilitatea este generată de faptul că duplicarea se poate petrece în aproape orice locus a exonului 14, iar mărimea insertului poate fi de orice dimensiune pe un interval între 2 și 200 nucleotide. În consecință, secvența duplicatului variază în funcție de locusul inserării și al mărimii fragmentului ADN adăugat.

Definiții

ADN = acid dezoxiribonucleic = polimer format prin legarea covalentă a două sau mai multor dezoxiribonucleotide; există patru tipuri de dezoxiribonucleotide: adenină (A sau a), citozină (C sau c), guanină (G sau g), timină (T sau t);

Secvența ADN = ordinea în care cele patru tipuri de dezoxiribonucleotide se succed într-o moleculă ADN; prin convenție orice secvență scrisă are capătul 5 în stânga și capătul 3 în dreapta;

ADN dublucatenar = format din două catene complementare una față de cealaltă, care stau împreună la temperaturi de sub 45 grade Celsius, prin interacții de tip punți de Hidrogen; fiecare catenă este un fragment de ADN;

ADN țintă = molecule ADN dublucatenar care vor fi detectate și multiplicare prin desfășurarea unei reacții PCR;

ADN polimeraza = proteină cu activitate enzimatică, care se leagă de structuri ADN dublucatenare formate dintr-o catenă a ADN-ului țintă (catenă cu rol de matrită) și

primer-ul complementar; după atașarea la capătul 3 al primerului, enzima are capacitatea de lungi primerul prin adăugarea succesivă de dezoxiribonucleotide (polimerizare), pe care le leagă covalent, una câte una, de capătul 3 al secvenței în creștere; tipul de dezoxiribonucleotidă (A, C, G sau T) selectată de enzimă precum și ordinea lor de atașare la fragmentul ADN în creștere sunt astfel alese încât secvența noului ADN să fie perfect complementară cu catena matriță, atașată de primer; Primeri = fragmente monocatenare scurte de ADN (în general formate din mai puțin de 35 dezoxiribonucleotide) a căror secvențe sunt complementare cu ADN-ul țintă și care au rolul de a amorsa activitatea enzimatică a ADN polimerazei; totdeauna se folosesc cel puțin doi primeri, fiecare fiind complementar cu una din cele două catene.

Sonde = fragmente monocatenare scurte de ADN (în general formate din mai puțin de 35 dezoxiribonucleotide) ale căror secvențe sunt complementare cu ADN-ul țintă. Sonda are la capătul 5 o substanță cu proprietăți fluorescente, iar la capătul 3 o substanță cu rolul de a bloca fluorescența substanței de la capătul opus (capătul 5). Substanța cu proprietăți fluorescente nu poate emite nici un semnal semnal fluorescent atâta timp cât este legată de sondă, pentru că se află în apropierea compusului cu rol de a bloca fluorescența. Fiecare sondă funcționează doar împreună cu un primer, ambele fiind complementare cu aceeași catenă a ADN-ului țintă, adică catena matriță. În raport cu catena matriță, sonda este concepută astfel încât să fie complementară cu o regiune a matriței situată în amonte față de secvența complementară cu primerul. Astfel, în timpul etapei de polimerizare (vezi definiția PCR), pe măsură ce adaugă dezoxinucleotide la catena nascentă, ADN polimeraza se deplasează de-a lungul catenei matriță până întâlnește sonda legată de matrița respectivă. În acel moment, enzima desfășoară activitatea de degradare a capătului 5 al sondei și eliberarea în soluție a compusului cu proprietăți fluorescente. Substanța eliberată poate să emită semnalul fluorescent caracteristic, iar intensitatea semnalului este proporțională cu numărul de sonde degradate. Deoarece raportul stoichiometric dintre numărul de sonde degradate și numărul de molecule ADN țintă este 1:1, intensitatea semnalului fluorescent reprezintă o cale de a doza ADN-ul țintă. Proprietate fluorescentă = capacitatea unui compus chimic de a emite un semnal cu o anumită lungime de undă numai atunci când este stimulat printr-un alt semnal, cu o altă lungime de undă;

FAM, HEX = compuși chimici care au proprietăți fluorescente; fiecare emite un semnal cu lungime de undă distinctă;

IABkFQ = compus chimic cu rolul de a bloca emisia de fluorescență a compușilor atașați de sonde

TaqMan PCR (denumirea originală este „TaqMan polymerase chain reaction”) = metoda enzimatică ciclică prin care ADN-ul țintă este detectat cu mare specificitate și multiplicat. Amestecul de reacție pentru PCR conține minim următoarele tipuri de ingrediente: enzima DNA polimeraza (enzimă termorezistentă); primeri; sonde fluorescente; molecule ADN țintă; dezoxiribonucleotide din cele 4 categorii precizate mai sus; substanțe anorganice cu rolul de a asigura tăria ionică și pH-ul soluției de reacție, optime pentru funcționarea enzimei. Fiecare ciclu al PCR este format din 3 etape: etapa de desfacere a catenelor ADN; etapa de legare a primerilor și sondelor; etapa de polimerizare. În prima etapă, care corespunde unor temperaturi de peste 95 grade Celsius, interacțiile necovalente dintre catene dispar, iar ADN-ul țintă devine monocatenar. În a doua etapă, când temperatura scade la 60 grade Celsius, primerii și sondele se leagă de zonele complementare existente pe catenele ADN-ului țintă. În etapa a treia are loc polimerizarea primerilor atașați de catena matriță și generarea unei noi catene ADN (detalii la definiția ADN polimerazei). În general, temperatura etapei trei este de 72 grade Celsius; frecvent, etapele doi și trei coincid și se desfășoară la temperatura la care primerii și sondele se leagă de catena matriță (cel mai des, 60 grade Celsius). La sfârșitul etapei trei al unui ciclu, ca urmare a polimerizării, apare câte o catenă nouă pentru fiecare catenă matriță, astfel că după fiecare ciclu, numărul total de molecule ADN țintă se dublează. În paralel cu multiplicarea ADN țintă, în etapa a treia are loc și degradarea sondelor fluorescente și eliberarea compușilor cu proprietăți fluorescente (detalii la definiția sondelor). Semnalul fluorescent măsurat al compușii eliberați din sonde, este proporțional cu numărul de molecule ADN țintă (detalii la definiția sondelor). Deoarece ciclurile se repetă, în timpul desfășurării PCR are loc creșterea cantității de ADN țintă, iar din acest punct de vedere, numărul moleculelor sondă degradate, precum și intensitatea fluorescenței, cresc exponențial.

Aparatul PCR = dispozitiv dedicat reacțiilor PCR, care determină și controlează cu mare precizie temperatura amestecului de reacție;

Genom = totalitatea ADN dublucatenar din interiorul unui nucleu organizat sub formă de cromozomi;

Genă codificatoare = parte a genomului care codifică o proteină, adică prin transcripția genei se generează un ARN mesager, care, la rândul lui, este convertit în proteină prin translație.

Exon = regiune ADN dintr-o genă, care conține o parte din informația necesară sintezei proteinei codificate de gena respectivă; o genă poate avea un exon sau mai mulți, iar totalitatea exonilor unei gene se convertesc în ARN mesager și codifică întreaga proteină;

Mutație genetică = orice modificare a genomului, în sensul că succesiunea de dezoxiribonucleotide dintr-o regiune oarecare a ADN-ului este diferită față de succesiunea normală;

Leucemia mieloidă acută = patologie a sistemului hematopoietic uman, caracterizată prin existența în corpul pacientului a unor celule tumorale provenite din celule precursorale mieloide și care, datorită unor mutații genetice, au căpătat capacitatea de a se multiplica necontrolat; celulele precursorale mieloide sunt celulele imature din măduva oaselor care, în mod normal, se transformă în monocite, neutrofile sau ale celule albe ale sîngelui din categoria celulelor mieloide;

Diagnostic molecular = orice procedură tehnică moleculară prin care se detectează prezența unei mutații genetice, cu scopul de a caracteriza genetic patologia investigată și de a ajuta medicul să stabilească un prognostic privind evoluția ulterioară a pacientului;

Mutație de tip ITD (denumire originală a ITD este „internal tandem duplication”) = reprezintă o modificare a genomului normal (natural / sănătos) prin faptul că o porțiune de ADN genomic se repetă prin dublare; cele două fragmente ADN cu aceeași secvență se află în genom unul după celălalt fără a mai exista altceva între ele;

FLT3-ITD = mutații la nivelul genei flt3, reprezentate de inserția aleatoare în diferite locuri ale exonilor 14 și 15 a unor fragmente ADN cu secvențe și mărimi variabile;

ddPCR = PCR digital în emulsie („digital droplet PCR”) = metodă PCR în care amestecul de reacție este amestecat cu o soluție uleioasă și din care rezultă o emulsie formată din zeci de mii de picături lipidice. Fiecare picătură lipidică conține soluția apoasă a amestecului de reacție. Deoarece în timpul reacției PCR, picăturile își păstrează integritatea și nu fuzionează între ele, fiecare picătură poate fi considerată o reacție PCR independentă. Cu alte cuvinte, prin această metodă amestecul de reacție este împărțit în zeci de mii de reacții PCR separate, desfășurate

simultan. După terminarea reacției PCR, fiecare picătură este evaluată cu ajutorul unui dispozitiv special dacă este fluorescentă sau nu (PCR digitalizat). Emisia unui semnal fluorescent demonstrează că, la momentul partiționării, picătura respectivă a inclus cel puțin o moleculă de ADN țintă.

c) Stadiul tehnologiei

Invenția se referă la o procedură de detecție și dozare a mutațiilor de tip FLT3-ITD din gena *flt3*. Studiile clinice publicate în ultimii 10 ani au dovedit că acest tip de mutație este foarte frecvent asociat cu leucemia mieloidă de tip acut: frecvența mutațiilor FLT3-ITD este de 25-35% în cazul pacienților adulți și de 5-15% la copii (procente din totalul cazurilor cu acest tip de leucemie). Diagnosticul molecular pentru FLT3-ITD, corelat cu alte tipuri de analize medicale, este foarte util pentru stabilirea de către medic a tratamentului adecvat. În plus, monitorizarea prezenței mutațiilor FLT3-ITD în celulele din sângele periferic recoltate de la pacienți, în timpul și după tratament, oferă informații esențiale cu privire la eficacitatea tratamentului, precum și informații cu valoare prognostică despre evoluția ulterioară probabilă a pacientului.

Analiza literaturii de specialitate arată că nu există o metodă validată clinic și utilizată în diagnosticul molecular pentru detecția și dozarea mutațiilor FLT3-ITD. În baza tehnologiilor actuale, singura posibilitate ar fi identificarea secvenței și locației fragmentului mutant pentru fiecare pacient în parte, urmată de proiectarea unor primeri și sonde utilizabile pentru monitorizarea ulterioară a mutației în biopsiile prelevate de la pacientul respectiv. Dar această procedură nu se utilizează în scop clinic (numai în cercetare) datorită unor dezavantaje: schema de lucru este complexă și foarte costisitoare; procedurile pot fi aplicate doar de către specialiști cu foarte bună expertiză în biologia moleculară și bioinformatică; metoda trebuie aplicată diferit pentru fiecare pacient, iar instrumentele moleculare proiectate (primerii și sondele) nu se pot utiliza pentru mai mulți pacienți.

Invenția se referă la o procedură de detecție și dozare a mutațiilor de tip FLT3-ITD privind utilizarea unei metode denumită generic PCR digital în emulsie („digital droplet PCR”; ddPCR). Principiul de funcționare al metodei PCR a rămas neschimbat de la inventarea metodei (1983, dr. Kary Mullis – utilizarea primerilor; 1986, dr. Randall Saiki – utilizarea polimerazelor termorezistente). Totuși tehnologia bazată pe PCR a evoluat semnificativ în ultimii 20 ani, prin adăugarea de noi elemente funcționale. Cea mai recentă îmbunătățire a procedurii este ddPCR. În varianta PCR

standard, amestecul de reacție este supus direct protocolului de amplificare ADN prin PCR. În cazul ddPCR, amestecul de reacție este întâi fragmentat (partiționat) în 20000 de picături prin amestecare cu lipide și emulsionare, iar apoi se aplică protocolul PCR (detalii la definiția ddPCR). La final, proba sub formă de emulsie este introdusă într-un instrument care detectează fluorescența fiecărei picături în parte. Prezența unor picături cu fluorescență demonstrează existența ADN-ului țintă în proba biologică analizată, iar numărul total de picături fluorescente permite dozarea numărului de molecule de ADN țintă.

d) Problemele tehnologiei actuale

Diagnosticul molecular pentru detecția și caracterizarea mutațiilor genetice se bazează în marea majoritate a cazurilor pe tehnologia PCR. Deoarece primerii și sondele sunt proiectate în funcție de natura mutației analizate și de natura genei respective, tehnologia PCR se poate aplica doar dacă mutația analizată este bine caracterizată. Tehnologia PCR se utilizează în diagnosticul molecular deoarece pentru cele mai multe dintre mutațiile genetice cunoscute, proprietățile rămân neschimbate de la un pacient la altul și, implicit, o singură metodă PCR, după optimizare și validare, se poate aplica pentru analiza tuturor probelor biologice care au în structura genomului mutația respectivă.

Există mutații genetice pentru care procedurile actuale bazate pe metoda PCR nu se pot aplica la nivel clinic, în scopul detecției și dozării anomaliei genetice respective. Motivul principal este acela că mutațiile respective nu sunt identice de la un pacient la altul, chiar dacă sunt asemănătoare. În această categorie este inclusă și mutația de tip ITD de la nivelul genei *flt3* (detaliat în paragraful 2 de la secțiunea c. Stadiul tehnologiei). Cu alte cuvinte, nu există o metodă de diagnostic molecular pentru monitorizarea mutațiilor FLT3-ITD, deși prezența acestui tip de mutație genetică la pacienți are foarte mare importanță prognostică.

Cea mai recentă tehnologie PCR, denumită PCR digital în emulsie (ddPCR), este și cea mai performantă, cu o precizie de peste 100 de ori mai mare decât metoda PCR utilizată actual în practica medicală (PCR cu monitorizarea fluorescenței în timp real). Deși studiile privind tehnica ddPCR, majoritatea publicate după 2015, au dovedit avantajele metodei în raport cu cerințele diagnosticului molecular, procedura nu a fost încă optimizată pentru majoritatea testelor genetice clinice. Până în prezent nu a fost publicată în literatura de specialitate sau raportată

În alte baze de date publice, o metodă de detecție și dozare a mutațiilor FLT3-ITD cu ajutorul ddPCR.

În concluzie, invenția prezentată prezintă soluții tehnologice pentru detecția și dozarea mutațiilor de tip FLT3-ITD prin PCR, precum și pentru utilizarea metodei ddPCR în scopul detecției cu mare precizie a unei cantități cât mai mici de ADN cu mutația FLT3-ITD.

e) Expunerea invenției

Invenția are două componente: (1) protocolul pentru detecția unei mutații de tip ITD, adică o secvență care se repetă (a se vedea definiția ITD); (2) un set de fragmente ADN (denumite primeri sau sonde, în funcție de rolul lor în reacția PCR) proiectate și sintetizate pentru a fi folosite împreună cu tehnologia ddPCR pentru detecția oricărei mutații ITD din gene flt3, dacă fragmentul ADN repetitiv se termină cu secvența GAGAATATGAATATGATCTCA.

1) protocolul pentru detecția unei mutații de tip ITD

Invenția revendică procedura PCR cu două sonde (sonda-REF și sonda-MUT) și doi primeri (primer-REF și primer-MUT) pentru detecția unei mutații de tip IDT.

Invenția revendică procedura PCR în care un primer (denumit primer-MUT) și o sondă (denumită sonda-MUT) sunt fiecare complementare cu două porțiuni din aceeași catenă a ADNului țintă, iar cele două porțiuni se suprapun parțial, astfel încât primerul-MUT și sonda-MUT nu se pot lega, pe toată lungimea lor, simultan de catena complementară fără mutația ITD, dar se pot lega simultan de catena complementară cu mutația ITD. Astfel, degradarea sondei-MUT cu eliberarea substanței fluorescente se petrece doar când, atât sonda-MUT cât și primerul-MUT se leagă simultan de catena ADN țintă. În acest fel, semnalul fluorescent generat prin degradarea sondei-MUT, ca urmare a desfășurării reacției PCR, apare doar dacă în amestecul de reacție există una sau mai multe molecule ADN țintă care au o mutație de tip ITD. Schema pozițiilor relative ale primerului MUT și sondei MUT în raport cu catena ADN țintă este prezentată în figura 1.

Invenția revendică procedura PCR pentru detecția unei mutații de tip ITD care utilizează două sonde marcate cu substanțe fluorescente distincte: sonda-MUT este complementară cu o catenă a ADN țintă, iar sonda-REF este complementară cu cealaltă catenă a ADN țintă. Sonda-REF este complementară cu ADN țintă indiferent de prezența sau absența mutației ITD, iar semnalul fluorescent generat de degradarea sondei-REF, ca urmare a desfășurării reacției PCR, este parametrul de

dozare a numărului de molecule ADN țintă, atât natural cât și mutant. În același timp, sondei-REF are și rolul de control pozitiv al reacției, deoarece semnalul fluorescent generat de degradarea sonda-REF trebuie să apară dacă reacția PCR se desfășoară în mod corespunzător.

Invenția revendică procedura de detecție a mutației de tip ITD, cu două sonde (sonda-REF și sonda-MUT) și doi primeri (primer-REF și primer-MUT) prin utilizarea metodei ddPCR. Pentru ddPCR, amestecul de reacție, care conține toate componentele necesare unei reacții PCR, inclusiv primerii, sondele, ADN țintă și ADN polimeraza, este amestecat cu o soluție uleioasă (hidrofobă). Rezultatul amestecului, care este o emulsie de picături uleioase, este supus unei reacții PCR cu următorii parametri: inițierea prin incubarea amestecului la 95 grade Celsius timp de 10 minute, urmat de 40 cicluri repetate succesiv, fiecare ciclu fiind incubare la 94 grade Celsius pentru 30 secunde, urmat de 60 grade Celsius pentru 60 secunde. Reacția PCR se termină prin incubarea amestecului de reacție la 98 grade Celsius timp de 10 minute. Viteza de scădere sau creștere a temperaturii este de 2 grade Celsius per secundă. Volumul de reacție este de 20 microlitrii, concentrația primerilor este de 1 micromolar, iar concentrația sondelor este de 350 nanomolar. Rezultatul reacției PCR se realizează prin detecția fluorescențelor caracteristice substantelor eliberate prin degradarea sondelor, la nivelul fiecărei picături de ulei din amestecul de reacție. Interpretarea datelor se realizează prin raportarea numărului de picături fluorescente la numărul total de picături analizate.

2) protocol pentru detecția mutațiilor ITD din gene flt3, în care fragmentul ADN repetitiv se termină cu secvența GAGAATATGAATATGATCTCA

Invenția revendică un set de doi primeri și două sonde utilizate cu un protocol ddPCR descris la pct (1) pentru a detecta mutațiile FLT3-ITD în care fragmentul ADN repetitiv se termină cu secvența GAGAATATGAATATGATCTCA. Secvențele primerilor și sondelor sunt:

(primer FLT3-for) GGTGACCGGCTCCTCAG

(primer FLT3-MUT-rev) GGAAACTCCCATTTGAGATCATATTC

(sonda FLT3-REF) /56-FAM/TC+T+AC+G+TTGATT+T+C+AG/3IABkFQ/

(sonda FLT3-MUT) /5HEX/AT+CAT+ATTCA+T+AT+T+C+TC/3IABkFQ/

Primerul FLT3-MUT-rev și sonda FLT3-MUT se leagă simultan de catena ADN țintă doar pentru moleculele cu mutația FLT3-ITD, astfel că fluorescența markerului HEX este o măsură a numărului de molecule FLT3 mutante din amestecul de reacție.

Sonda FLT3-REF se leagă de ADN țintă indiferent de prezența sau absența mutației, astfel că fluorescența markerului (FAM) este o măsură a numărului total de molecule FLT3 din amestecul de reacție și un control pozitiv al reacției PCR.

f) Avantajele invenției

Avantajul principal al invenției este acela că permite detecția și dozarea unor mutații de tip ITD, care au variabilitate de secvență, fără a fi necesară proiectarea, sinteza și optimizarea primerilor și sondelor pentru fiecare mutație în parte.

Al doilea avantaj, este că primerii și sondele revendicate pentru detecția mutațiilor FLT3-ITD în care fragmentul ADN repetitiv se termină cu secvența GAGAATATGAATATGATCTCA funcționează eficient în reacția ddPCR. Acest tip de reacție PCR este mai eficient decât metodele bazate pe PCR folosite în prezent în diagnosticul molecular.

g) Descrierea figurilor

În figură este prezentat schematic principiul de funcționare al reacției de PCR care permite detecția și dozarea mutațiilor de tip ITD, inclusiv mutația FLT3-ITD. Substanța cu proprietăți fluorescente atașată sondei-REF / FLT3-REF este marcată printr-un cerc verde, iar substanța cu proprietăți fluorescente atașată sondei-MUT / FLT3-MUT este marcată printr-un cerc roșu. Substanța care anulează proprietățile fluorescente este marcată printr-un cerc negru. Primerii primer-REF / FLT3-for sunt segmentele cu culoarea negru exclusiv, iar primerii primer-MUT / FLT3-MUT-rev sunt segmentele cu culoarea negru și roșu. Catenele ADNului țintă, naturale sau cu mutația de tip ITD, sunt segmentele lungi de culoare albastră, care nu au atașate cercuri la capete. Segmentele de culoare roșie localizate pe catenele ADN, reprezintă secvența ADN care se duplică în cazul mutației de tip ITD. Segmentele de culoare roșie prezente pe sonde și primeri, reprezintă secvențele ADN complementare cu secvențele repetitive (tot roșii) de pe catenele ADN. Graficul de la mijlocul figurii, partea dreaptă, este o reprezentare schematică a evoluției semnalelor fluorescente (verde sau roșu) generate de compușii chimici marcați cu cerc verde sau, respectiv, roșu, eliberați prin degradarea sondelor, pe măsură ce numărul de cicluri ale reacției PCR crește (linia orizontală a graficului reprezintă numărul de cicluri, care crește de la stânga la dreapta). Figura explică de ce sonda-MUT / FLT3-MUT nu se va degrada și nu va elibera substanța fluorescentă simbolizată cu cerc roșu prin legare la zona complementară de pe catena ADN naturală (fără mutația ITD): dacă se leagă de catena naturală atunci împiedică steric legarea primerului-

MUT / FLT3-MUT, iar în lipsa primerului nu are loc polimerizarea și degradarea sondei; dacă primul care se leagă de catena naturală este primerul (primerul-MUT / FLT3-MUT), atunci acesta împiedică legarea sondei (sonda-MUT / FLT3-MUT), astfel că, deși polimerizarea se petrece, sonda nu se degradează (nefiind legată de catenă). În cazul catenei cu mutația ITD (secvența repetitivă, marcată cu roșu pe catenă, este prezentă de două ori), atunci, cum este indicat și în figură, primerul (primerul-MUT / FLT3-MUT) și sonda (sonda-MUT / FLT3-MUT) se pot lega simultan, astfel că polimerizarea are loc și când enzima ajunge în dreptul sondei, o degradează. Figura explică rolul sondei-REF / FLT3-REF, care este acela de a detecta și doza totalitatea moleculelor ADN țintă din proba biologică: deoarece atât primerul-REF / FLT3-for cât și sonda-REF / FLT3-REF se pot lega simultan de catena ADN țintă, indiferent de prezența sau absența mutației, degradarea sondei și eliberarea substanței cu proprietăți fluorescente, marcată cu cerc verde, este proporțională cu numărul total de catene țintă cu sau fără mutație. În același timp, sondei-REF / FLT3-REF are și rolul de control pozitiv al reacției, deoarece semnalul fluorescent al compusului marcat cu cerc verde trebuie să apară dacă reacția PCR are loc în mod corespunzător.

h) Realizarea practică a invenției

Invenția a fost testată practic pentru mutația FLT3-ITD folosindu-se fragmente de ADN corespunzătoare exonului 14 al genei flt3, care au (ADN mutant) sau nu (ADN normal) mutația. Testele s-au făcut cu tehnica ddPCR, în care amestecul de reacție (cu toate componentele necesare – enzima, nucleotide, primeri, sonde și ADN țintă) a fost amestecat cu ulei și partiționat în cel puțin 17000 de picături lipidice. Reacția de PCR s-a desfășurat conform protocolului descris la pct. e.1, ultimul paragraf. Rezultatul reacției de PCR a fost evaluat automat, cu ajutorul unui program de calculator, prin determinare și înregistrarea fluorescenței sau fluorescențelor pentru fiecare picătură lipidică în parte. Au fost comparate probe care aveau doar ADN natural cu probe care aveau ADN natural și cantități variabile de ADN mutant. Pentru dozare și analiza cantitativă, s-au realizat diluții seriale ale probelor, astfel încât cantitatea totală de ADN țintă să fie aceeași în probe, iar cantitatea de ADN mutant să descască constant de la o probă la alta (de 10 ori diferența între oricare două probe succesive). Testele, realizate în mod repetat, de operatori diferiți, au arătat că fluorescența produsului din sonda FLT3-REF este constantă și reflectă cu mare acuratețe cantitatea totală de ADN țintă. Testele, realizate în mod repetat, de

operatori diferiți, au arătat că au arătat că nici o picătură lipidică nu emite fluorescența produsului din sonda FLT3-MUT în probele care nu au ADN mutant, iar în probele generate prin diluția serială, numărul de picături cu fluorescență crește sau scade de aproximativ 10 ori de la o probă la alta.

i) Aplicabilitatea invenției

Invenția este aplicabilă în diagnosticul molecular pentru detecția și dozarea celulelor purtătoare a mutațiilor FLT3-ITD în genomul lor, în probele biologice de sânge periferic sau măduva oaselor. Invenția este aplicabilă în orice procedură medicală care presupune detecția și/sau dozarea mutațiilor FLT3-ITD în care fragmentul ADN repetitiv se termină cu secvența GAGAATATGAATATGATCTCA.

Invenția este aplicabilă în orice procedură medicală care presupune detecția și/sau dozarea mutațiilor de tip ITD în genomul lor, în probele biologice de sânge periferic sau măduva oaselor.

Invenția este aplicabilă pentru detecția și dozarea ADN țintă din probele biologice, atât în cazul ADNului genomic cât și în cazul ADNului generat din ARN, prin transcriere inversată.

REVENDICĂRI

1. Procedura de detecție și dozare a unei mutații genetice de tip IDT, în care o porțiune de ADN genomic se repetă prin dublare și cele două fragmente ADN cu aceeași secvență se află în genom imediat unul după celălalt, fără a cunoaște în totalitate secvența care se repetă, prin reacția de polimerizare ciclică (PCR) în prezența a două tipuri de primeri ADN și a două tipuri de sonde ADN, fiecare sondă fiind cuplată cu un compus cu proprietăți fluorescențe distincte.

2. Set de doi primeri și două sonde pentru a detecta și doza mutațiile de tip ITD în care secvența ADN repetitivă se termină cu GAGAATATGAATATGATCTCA, de la nivelul exonului 14 al genei *flt3* și de la nivelul regiunii din ARN-ul mesager corespunzătoare exonului 14 al genei *flt3*, prin reacția de polimerizare ciclică (PCR).

3. Revendicările 1 și 2 se realizează cu amestecuri de reacție apoase fracționate în mici picături independente, prin emulsionare cu o soluție uleioasă (hidrofobă). Analiza cantitativă a rezultatelor se face în funcție de numărul total al picăturilor existente la sfârșitul reacției, numărul de bile fluorescențe existente la sfârșitul reacției, cantitatea de ADN existentă în probă.

4. Secvențele primerilor și sondelor corespunzătoare revendicării 2 sunt:

(primer FLT3-for) GGTGACCGGCTCCTCAG

(primer FLT3-MUT-rev) GGAAACTCCCATTGAGATCATATTC

(sonda FLT3-REF) /56-FAM/TC+T+AC+G+TTGATT+T+C+AG/3IABkFQ/

(sonda FLT3-MUT) /5HEX/AT+CAT+ATTCA+T+AT+T+C+TC/3IABkFQ/

5. Revendicările 1 și 2 se realizează cu amestecuri apoase de reacție de 20 microlitrii, care conțin minim următoarele: enzima ADN polimeraza, clorură de sodiu, clorură de magneziu, dezoxinucleotide (toate cele 4 tipuri), două tipuri de primeri (fiecare la concentrația 2,5 micromolar), două tipuri de sonde (fiecare la concentrația 350 nanomolar), proba ADN.

6. Revendicările 1 și 2 se realizează cu primeri care amorează ADN polimeraza și, astfel, participă la multiplicarea catenelor ADN țintă, cu sau fără mutație.

7. Revendicările 1 și 2 se realizează cu o sondă (sonda-REF sau FLT3-REF) care se alipește de catena ADN țintă, cu sau fără mutație, iar după degradarea ei, indusă de ADN polimerază, eliberează un compus cu proprietăți fluorescențe. Fluorescența compusului atașat de sonda-REF, este o măsură a numărului total de molecule ADN țintă, cu sau fără mutație.

8. Revendicările 1 și 2 se realizează cu o sondă (sonda-MUT sau FLT3-MUT) care se alipește de catena ADN țintă împreună cu primerul-MUT sau FLT-MUT-rev doar dacă mutația de tip ITD este prezentă în catena respectivă. Sonda-MUT sau FLT3-MUT nu se poate degrada în timpul polimerizării catenelor ADN țintă fără mutație; degradarea ei, este indusă de ADN polimerază doar în cazul catenelor ADN complementare cu ea și care au mutația de tip IDT. Fluorescența compusului atașat de sonda-MUT sau FLT3-MUT, este o măsură a numărului total de molecule ADN țintă cu mutație.

9. Revendicările 1 și 2 se realizează cu probe ADN provenite din ADN-ul genomic sau ADN-ul generat din ARN prin transcriere inversată.

10. Revendicările 1 și 2 se aplică probelor biologice recoltate în scop de diagnostic sau de monitorizare a evoluției patologiilor respective în pacienți.

11. Revendicarea 2 se aplică probelor biologice recoltate în scop de diagnostic sau de monitorizare a evoluției patologiilor de natură hematologică asociate cu mutațiile FLT3-ITD. Probele biologice pot fi sânge, maduvă hematogenă sau din altă sursă de celule cu mutația FLT3-ITD.

12. Revendicările 1 și 2 se realizează cu un protocol PCR cu următoarea configurație: etapa 1, incubare între 5 și 10 minute la temperaturi între 95 și 98 grade Celsius; etapa 2 subetapa-1, incubare între 15 și 30 secunde la 95 grade Celsius; etapa 2 subetapa-2, incubare între 30 și 60 secunde la 60 grade Celsius; etapa 3, incubare 10 minute la 98 grade Celsius. Etapa 2 începe doar după ce s-a terminat etapa 1, iar etapa 3 începe doar după ce s-a terminat etapa 2. Subetapele din cadrul etapei 2 se repetă ciclic de 40 ori: după terminarea subetapei 2 se repetă subetapa-1, atâta timp cât subetapa-2 s-a desfășurat de maxim 39 ori. Viteza de scădere sau creștere a temperaturi între oricare două etape sau subetape este de 2 grade Celsius per secundă.

Figura

