



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00719

(22) Data de depozit: 11/11/2019

(41) Data publicării cererii:
28/05/2021 BOPI nr. 5/2021

(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;
• SOARE DAN, STR.PRAGA, NR.4, SC.B,
AP.7, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• IONESCU VICTOR,
STR.ION CÂMPINEANU, NR.24, BL.18B,
SC.1, ET.2, AP.5, SECTOR 1, BUCUREȘTI,
B, RO;
• LAMBRESCU IOANA,
STR.GEORGES BIZET, NR.4, SC.B, AP.12,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) SET DE DOI PRIMERI ȘI O SONDĂ PENTRU DETECȚIA
ȘI DOZAREA EXPRESIEI GENEI NPM1 MUTANTĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție și dozare a celulelor canceroase purtătoare a mutațiilor NPM1cu aplicabilitate în diagnosticul molecular al leucemiei mieloid acute. Metoda, conform invenției, constă în aceea că, proba biologică este supusă unei singure proceduri PCR modificată, dependentă de endonucleaza H2, care utilizează o singură pereche de primeri: (P1 și Pmut) și o sondă (S), împreună cu o enzimă de tip endonucleaza H2 termorezistentă, naturală sau modificată, cu activitate de eliminare a ribozei din primeri, astfel că este detectată expresia NPM1 cu mutații din proba de sânge sau măduvă hematogenă cu o limită de detecție de minimum 10 copii NPM1 mutant.

Revendicări: 4
Figuri: 3

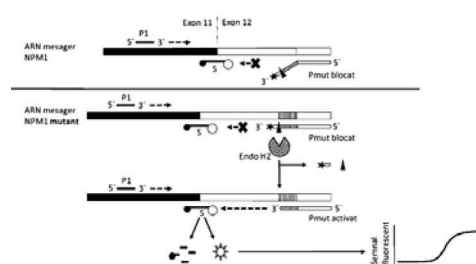


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. ... a. 219 ∞ 719
Data depozit ... 1.1. 2019.

Documentația tehnică

Descrierea invenției

a) Titlul invenției

SET DE DOI PRIMERI ȘI O SONDĂ PENTRU DETECȚIA ȘI DOZAREA EXPRESIEI GENEI *NPM1* MUTANTĂ

b) Domeniul tehnic și definirea termenilor tehnici

Invenția se înscrie în domeniul biologiei moleculare și al analizei genetice a leucemiei mieloidă acute sau a altor patologii asociate cu mutații în exonul 12 al genei *NPM1*. 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 este un progenitor hematopoietic care se multiplică). Majoritatea mutațiilor genetice determină ca unele dintre mecanismele celulare să se desfășoare anormal. Acumularea unui set de astfel de mutații în genomul aceleiași celule, crește numărul de mecanisme celulare afectate și, în final, determină 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 patogenică, al tratamentului, al gradului de severitate, al prognosticului și al speranței de viață a pacientului în funcție de natura mutațiilor. Prin urmare, identificarea mutațiilor 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 *NPM1*. Gena codifică o proteină, care are rol în multiple mecanisme celulare, cele mai relevante pentru patogeniza leucemiei mieloidă acute fiind proliferarea (multiplicarea) celulară și diferențierea.

Mutațiile *NPM1* întâlnite în leucemia mieloidă acută sunt variabile ca secvență, dar toate reprezintă inserția succesivă a patru sau mai multe nucleotide într-o regiune localizată în exonul 12. Indiferent de mărimea și secvența fragmentului ADN

inserat, consecința patologică este aceeași: mutația determină modificarea proteinei NPM1 la capătul terminal în așa fel încât proteina nu mai este localizată în nucleu și este abundentă în citoplasma celulelor (prin comparație cu celulele normale).

Unul dintre obiectivele studiilor clinice în domeniul oncologiei este acela de a stabili metode de prognostic privind evoluția ulterioară a pacienților. Acest obiectiv este în mod special important în cazul leucemiei mieloide acute, deoarece rata de recidivă este ridicată. Pentru a evalua riscul de recidivă este necesară monitorizarea și cuantificarea prezenței celulelor leucemice în preparatele biologice prelevate de la pacienții respectivi. În practică, detecția celulelor leucemice se realizează la nivel de ADN sau ARN, prin testarea prezenței mutațiilor specifice pacientului respectiv. Metodele de analiză moleculară cele mai utilizate se bazează pe procedura PCR, deoarece aceste metode sunt cele mai specifice și pot detecta cantități foarte mici ale țintei.

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 dublu catenar = 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 dublu catenar care vor fi detectate și multiplicare prin desfășurarea unei reacții PCR;

ADN polimeraza = proteină cu activitate enzimatică, care se leagă de structuri ADN dublu catenare formate dintr-o catenă a ADN-ului țintă (catenă cu rol de matriță) 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 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 atașati 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, interacțiunile 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;

Mutații NPM1 = mutații la nivelul genei NPM1, reprezentate de inserția aleatoare în anumite locuri ale exonul 12 a unor fragmente ADN cu secvențe și mărimi variabile;

c) Stadiul tehnologiei

Invenția se referă la o procedură de detecție și dozare a mutațiilor de tip inserție care pot apare în gena *NPM1*. Studiile clinice publicate în ultimii 10 ani au dovedit că acest tip de mutație este frecvent asociat cu leucemia mieloidă de tip acut: frecvența mutațiilor *NPM1* este cel puțin 20% din totalul cazurilor de leucemie mieloidă acută. În plus, monitorizarea mutațiilor *NPM1* 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.

O serie de laboratoare au dezvoltat tehnici PCR pentru analiza mutațiilor genei *NPM1* mutant, dar în majoritatea cazurilor tehnicile se aplică doar local, cu proceduri stabilite "in house". Astfel majoritatea studiilor publicate de către aceste laboratoare se bazează pe metoda TaqMan, în care detecția și dozarea se realizează cu seturi de primeri cuplate cu o sondă. Deoarece mutațiile *NPM1* sunt variabile ca secvență, analiza se realizează cu mai multe seturi de primeri, câte unul pentru fiecare mutație. Mai recent, s-a încercat simplificarea procedurii prin utilizarea unor primeri degenerați, adică primeri care sunt doar parțial complementari cu mutațiile respective. În acest fel se pot detecta mai multe tipuri de secvențe mutante cu un număr mai mic de primeri. Un alt grup a testat un PCR multiplex, adică o

reacție de amplificare în care sunt amestecați mai mulți primeri, fiecare cu secvență complementară pentru câte una din mutațiile NPM1 cunoscute. Încercări de quantificare a NPM1 mutant s-au realizat și în cazul PCR digital, o metodă în care rezultatul reacției se analizează la sfârșit. Au fost publicate două variante ale metodei: distincția între forma normală și forma mutantă s-a realizat la nivelul primerilor (ca și în cazurile qPCR de mai sus); identificarea formelor mutant sau normal s-a realizat la nivelul sondei, în funcție de secvențe. În cele mai recente teste publicate, PCR-ul digital a fost utilizat împreună cu PCR-ul multiplex. Toate aceste metode s-au dovedit eficiente în analiza NPM1, dar fiecare a prezentat și anumite limite tehnologice în situațiile când cantitatea de NPM1 mutant este redusă.

Alternativa la metodele bazate pe PCR o reprezintă secvențierea și identificarea mutației specifice fiecărui pacient. Deși această alternativă se utilizează în cercetarea medicală, ea nu este implementată clinic 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.

Invenția se referă la o procedură de detecție și dozare a mutațiilor genei NPM1 prin aplicarea unei proceduri de PCR modificată, denumită generic PCR dependent de endonucleaza H2. 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. O astfel de modificare este utilizarea endonucleazei H2, o enzimă capabilă de a desface o secvență de acizi nucleici care are o singură riboză flancată de minim 4 dezoxiribonucleotide pe ambele părți. Enzima desface legăturile covalente dintre riboză și dezoxiriboze dacă fragmentul respectiv este dublu-catenar. Procedura PCR dependentă de endonucleaza h2 este descrisă schematic în figura 1. În această metodă, primerii sunt modificați astfel: (i) conțin o riboză (figura 1 - triunghiul negru cu vârful în sus), poziționată cu 5 baze înainte de capătul 3'; (ii) la capătul 3' au o modificare (figura 1 – steaua neagră) care împiedică ADN polimeraza să polimerizeze și să extindă fragmentul ADN - astfel reacția de PCR este blocată. În acest context, reacția de amplificare PCR se va produce doar după ce primerii se vor activa: endonucleaza H2 termorezistentă (figura 1 – semicercul punctat) recunoaște doar primerii Pmut care sunt legați perfect la gena țintă (figura 1 – Pmut dispus

paralel cu ținta), desface legăturile covalente dintre riboză și deziribozele învecinate (flancuri) și elimină astfel modificarea de la capătul 3'. Eliminarea inhibitorului din capătul 3' determină activarea primerului (figura 1 – Pmut activat), care în această formă poate fi extins prin polimerizarea coordonată de către ADN polimeraza (figura 1 – săgețile orizontale cu linie întreruptă). Polimerizarea determină degradarea sondei (figura 1 – S) și astfel particula fluorescentă (figura 1 – cercul gol) se separă de inhibitorul fluorescenței (figura 1 – cercul negru). Semnalul fluorescent înregistrat în timp (figura 1 – graficul din dreapta, jos) este proporțional cu numărul de molecule țintă (figura 1 - NPM1 mutant).

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 secvența nucleotidelor regiunii ADN care cuprinde mutația analizată, tehnologia PCR se poate aplica doar dacă mutația analizată este bine cunoscută. Astfel, în cazurile în care regiunea mutantă a unei gene poate avea secvențe variabile, diferite între pacienți, este necesară stabilirea unui set de primeri pentru fiecare variantă de secvență. În această categorie este inclusă și mutația genei NPM1. Se cunosc peste 24 de variante ale genei mutante NPM1, dintre care 6 sunt mai frecvente. Diagnosticul molecular prin utilizarea PCR standard ar presupune realizarea a 24 reacții PCR separate pentru fiecare proba biologică.

A fost testată și varianta utilizării primerilor degenerați (un primer se poate atașa de mai multe variante de secvență) sau varianta în care mai mulți primeri sunt amestecați într-o singură reacție PCR (PCR multiplex). Principala problemă în astfel de cazuri este scăderea gradului de precizie al metodei și creșterea riscului de a obține rezultate false. Majoritatea metodelor sunt performante pentru testele de diagnostic, atunci când cantitățile de NPM1 mutant sunt sporite. În situația monitorizării evoluției leucemiei la pacienții sub tratament sau după tratament, atunci când cantitatea de NPM1 mutant este redusă substanțial în probele recoltate, toate aceste metode prezintă limite.

Alternativa tehnologică este reprezentată de secvențierea ADN a pacienților pentru identificarea secvenței mutante, urmată de monitorizare prin PCR cu primeri specifici pentru secvența repectiva. Această procedură este costisitoare și deocamdată se aplică doar în cercetarea medicală.

e) Expunerea invenției

Invenția prezintă o soluție tehnologică pentru detecția și dozarea celor mai frecvente mutații NPM1, variabile ca secvență, printr-o singură reacție PCR. Spre deosebire de metodele publicate în literatură, în acest caz, precizia metodei este mult crescută prin utilizarea primerilor activabili de către endonucleaza H2 termorezistentă.

Invenția reprezintă un set de doi primeri (figura 1 – primerul P1 și primerul Pmut) și o sondă (figura 1 – sonda S). Primerul P1 este complementar cu o zonă din exonul 11, care nu este afectată de apariția mutațiilor. Primerul P1 este necesar pentru amplificarea NPM1 și creșterea exponențială a cantității de produs.

Primerul Pmut este complementar cu regiunea din exonul 12 susceptibilă pentru apariția mutațiilor patogene (figura 1 – zona susceptibilă la mutații este marcată cu o linie verticală în exonul 12 al NPM1, iar zona care include efectiv o mutație este hașurată cu linii verticale în exonul 12 al NPM1 mutant). Acest primer este cel care asigură specificitatea reacției, în sensul că permite amplificarea PCR dacă există ținte mutante în proba analizată, fie blochează reacția PCR dacă toate moleculele NPM1 sunt normale. În cazul interacției dintre molecula NPM1 normală și primerul Pmut blocat, zona hașurată vertical a primerului (figura 1) nu are corespondent de secvență în țintă (deoarece lipsește mutația), astfel că zona respectivă cât și porțiunea 3' (cu riboza) nu se leagă la țintă. Deoarece zona cu riboză nu interacționează cu NPM1 normal și nu realizează structuri dublucatenare, endonucleaza H2 (figura 1 – arcul de cerc punctat) nu este capabilă de a elimina inhibitorul de PCR din capătul (figura 1 – steaua marcată în negru) și astfel primerul nu poate fi extins prin PCR (figura 1 – marcajul X). În acest fel se asigură precizia metodei: dacă nici una dintre moleculele NPM1 din proba analizată nu este mutantă atunci reacția nu are loc.

Când primerul Pmut (figura 1 – primerul Pmut-blocat) interacționează cu NPM1 mutant, acesta se aliază pe întreaga sa lungime cu molecula țintă cu formarea unei structuri dublucatenare, inclusiv regiunea cu riboză. În această situație, endonucleaza H2 termorezistentă recunoaște structura dublucatenară dintre Pmut și NPM1 mutant, digeră legăturile dintre riboza și dezoxiribozele învecinate și elimină capătul 3' al primerului. În acest mod, primerul Pmut este convertit din forma blocată în forma activă. Primerul Pmut activat induce activitatea ADN polimerazei conform săgeții (figura 1 – săgeata orizontală cu linie întreruptă), iar când enzima

întâlnește sonda S determină degradarea acesteia. În urma degradării sondei, realizată de către ADN polimerază, compusul fluorescent este eliberat și va emite semnalul fluorescent caracteristic. Intensitatea semnalului fluorescent este o măsură a numărului de molecule NPM1 mutante.

Sonda este complementară cu secvența formată prin alipirea exonului 11 la exonul 12, iar cei doi primeri sunt complementari cu exoni diferiți (figura 1 – primerul P1 este complementar cu secvența din exonul 11, iar primerul Pmut este complementar cu secvența existentă la nivelul exonului 12). În acest fel se evaluează expresia NPM1 mutant, prin dozarea ARN mesager transcris din gena NPM1. Datorită specificității de secvență a primerilor și a sondei, testul nu cuantifică NPM1 la nivelul genomului astfel că rezultatele reflectă cu mare precizie nivelul de expresie a genei.

Secvențele primerilor și sondelor sunt:

(primer P1) 5` - CAATTATGTGAAGAATTGCTTCCGGATGAC -3`

(primer Pmut blocat) 5` -

TACCACATTACACCACACACGAGAGACTTCCTCCACTGCCAGGCAGAG_aTCTTC(C3) -3`

(primer Pmut activat) 5` -

TACCACATTACACCACACACGAGAGACTTCCTCCACTGCCAGGCAGAG -3`

(sonda S) /56-FAM/ TAG+C+CTCTTGGT+C+AGT/3IABkFQ/,

unde: "a" este riboza, "6-FAM" este compusul fluorescent (fluoresceină), " IABkFQ" este inhibitorul de fluorescență, (C3) reprezintă inhibitorul de PCR, "+..." reprezintă nucleotide modificate LNA, iar restul sunt dezoxiribonucleotide.

f) Realizarea practică a invenției

Invenția a fost testată practic pentru mutațiile NPM1 A (secvența TCTG), B (secvența CATG) și D (secvența CCTG) folosindu-se setul de plasmide recomandat în clinică (denumite "NPM1 mut A cDNA MutaQuant Stds", nr catalog 677591, "NPM1 mut B&D cDNA MutaQuant Stds", nr catalog 677791, producator Ipsogen/Qiagen, Hilden, Germania). Aceste plasmide se folosesc în practica medicală pentru a permite dozarea numărului de copii NPM1 mutant, printr-o procedură recomandată de societățile europene de hematologie. Cele trei mutații testate, reprezintă aproximativ 70-89% dintre mutațiile NPM1. Testarea s-a realizat în triplicat, de către doi operatori. Testarea s-a realizat cu setul de reactivi furnizat de Thermo Fischer Scientific ("TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG", nr catalog

4440047, Statele Unite ale Americii), în acord cu indicațiile producătorului.

Concentrația de primeri este de 0,3 micromolari, iar sonda este de 0,5 micromolari, într-un volum final de 20 microlitrii. Pentru fiecare mutație s-a testat un număr variabil de copii de plasmide, așa cum sunt livrate de către producător (figura 2 – valorile de pe axa orizontală, care sunt următoarele, în ordine de la stânga la dreapta, 10 copii, 100 copii, 1.000 copii, 100.000 copii, 1.000.000 copii). Pentru fiecare reacție s-au adăugat 2,3 miliunitați enzimatică de endonucleaza H2 termorezistentă ("Rnase H2", clonată din organismul termofil extrem *Pyrococcus abyssi*, producător Integrated DNA Technologies, Inc., nr catalog 11-03-02-02, Statele Unite ale Americii). În figura 2 sunt prezentate rezultatele calibrării cu diluțiile seriale, pentru fiecare tip de mutație analizată. În toate cazurile, chiar dacă secvența mutației este diferită, precizia reacției PCR este mare (mutația A – R = 0,998; mutația B – R = 0,999, mutația D – R = 0,998). În figura 3 este prezentat profilul semnalului fluorescent înregistrat pe parcursul reacțiilor PCR care stau la baza curbei de calibrare a NPM1 mutA – cele 5 înregistrări fără săgeți. Rezultatele dovedesc că un singur set de primeri plus sondă este suficient pentru a detecta NPM1 mutant cu sevă variabilă.

Setul de primeri plus sondă a fost testat și pentru probe biologice (ARN total extras din sângele periferic și convertit în ADN complementar). Figura 3 prezintă un rezultat tipic pentru o probă leucemică cu mutație la NPM1 și pentru o probă cu NPM1 normal – doar curbele fluorescente marcate cu săgeți: săgeata orizontală indică proba mutantă, iar săgeata verticală indică proba normală. Rezultatul demonstrează că metoda este aplicabilă în domeniul medical.

g) Avantajele invenției

Avantajul principal al invenției este acela că printr-o singură reacție PCR se pot detecta și doza diferite mutații NPM1, variabile ca secvență. Nu mai este necesară proiectarea, sinteza și optimizarea primerilor și sondelor pentru fiecare mutație în parte. Practic toți pacienții pot fi testați printr-o singură reacție PCR. Rezultatul obținut are relevanță clinică, deoarece valoarea prognostică a genei mutante NPM1 este aceeași indiferent de secvența mutației.

Al doilea avantaj, este că, prin includerea etapei de activare a primerilor, prin digestia coordonată de către endonucleaza H2, precizia metodei este mult crescută. Activarea primerilor este strict dependentă de prezența secvenței mutante și astfel se elimină riscul ca testul să indice în mod eronat că proba analizată conține molecule NPM1 mutante.

Metoda ar permite reducerea costurilor diagnosticului NPM1 avînd în vedere că se reduce numărul de reacții PCR și consumul de materiale și reactivi. În al doilea rînd s-ar reduce costurile privind diagnosticul NPM1 prin secvențiere: s-ar putea realiza o selecție prealabilă a probelor prin testarea NPM1 cu metoda PCR expusă aici și doar probele pozitive să fie evaluate ulterior, dacă este relevant clinic, prin secvențiere.

h) Descrierea figurilor

În **figura 1** este prezentat schematic principiul de funcționare al reacției de PCR dependentă de endonucleaza H2. Astfel, primerii dependenți de activitatea endonucleazei H2 (Pmut inactiv) prezintă două trăsături specifice: la capătul 3' au o modificare structurală (marcată cu o steluță neagră) care inhibă legarea ADN polimerazei; tot în regiunea 3', dar cu 5 baze mai spre centrul secvenței, primerii au o riboză (marcată cu un triunghi negru), restul nucleotidelor fiind dezoxiriboze. Când primerul inactiv recunoaște și se leagă de secvența perfect complementară de pe molecula țintă (NPM1 mutant), se generează o structură ADN dublucatenară, care are o singură riboză în compunerea ei. Această structură și numai ea este digerată de către endonucleaza H2 termorezistentă (marcată cu semicerc punctat), proces în urma căruia riboza și capătul 3' sunt îndepărtate din componența primerului, care astfel devine activat (Pmut activ) și care este extins de către polimerază până la celălalt capăt al țintei. În timpul polimerizării are loc fenomenul de fragmentare a sondei S, ceea ce declanșează emiterea unui semnal fluorescent care este înregistrat în timp real de către instrument. Sonda S este un oligo ADN care are la capătul 5' un colorant fluorescent (cercul alb), iar la capătul 3' are un inhibitor de fluorescență (cercul negru). Cât timp sonda este întreagă, semnalul fluorescent este anulat de inhibitorul învecinat. În urma degradării sondei, realizată de către ADN polimerază, compusul fluorescent este eliberat și va emite semnalul fluorescent caracteristic (cercul cu raze). Intensitatea semnalului fluorescent este o măsură a numărului de molecule țintă din momentul înregistrării.

Dacă primerul interacționează cu o moleculă care nu are secvența caracteristică (în acest caz, NPM1 normal), atunci legarea acestuia la țintă este doar parțială (în figură, primerul nu este paralel cu ținta pe toată lungimea lui) și nu se formează structura dublucatenară care să includă și riboza. În această variantă, endonucleaza H2 termorezistentă nu poate digera primerul și nu poate elimina capătul 3', iar primerul rămâne în formă inactivă. Primerul inactiv (Pmut blocat) nu

poate fi extins prin polimerizare (fenomen marcat cu X în figură) și, în consecință, nu se petrece degradarea sondei, iar semnalul fluorescent este absent.

Termenul ADN complementar din figura 1 desemnează faptul că moleculele NPM1 sunt obținute din ARN prin conversia acestuia în ADN.

În **figura 2** sunt prezentate curbele de calibrare pentru detecția mutațiilor A (graficul din stânga), B (graficul din stânga) și D (graficul din stânga) ale NPM1. Pentru fiecare grafic, pe axa orizontală este indicată cantitatea de NPM1 (nr de copii), iar pe axa verticală sunt indicate valorile Ct produse de reacțiile de PCR. Fiecare punct este o reacție PCR corespunzătoare unei anumite cantități de țintă și unei valori Ct. Liniile reprezintă ecuația de calibrare stabilite de un soft specializat.

În **figura 3** sunt prezentate profilurile fluorescente ale unor reacții de PCR. Profilurile marcate cu săgeți au fost realizate cu probe biologice (săgeata verticală indică o probă fără mutații la NPM1, iar săgeata orizontală indică o probă cu mutația NPM1 mut A); celelalte reacții PCR au fost realizate cu plasmidele purtătoare de mutație NPM1 mut A existente în trusa de calibrare. Valorile Ct se determină automat de către instrument și reprezintă nr de cicluri de reacție (de pe axa orizontală) corespunzător punctului de interacție dintre curba de fluorescență și linia orizontală marcată, în acest caz, cu valoarea 0.315.

i) Aplicabilitatea invenției

Invenția este aplicabilă în diagnosticul molecular al leucemiei mieloide acute, pentru detecția și dozarea celulelor canceroase, purtătoare a mutațiilor NPM1. Testul se poate aplica pentru analiza ARN obținut din probele de sânge sau măduvă hematogenă.

Testul PCR se combină cu alte proceduri standard prin care ARN-ul este convertit în ADN complementar, etapă ce precede reacția de PCR. Alternativ, testul se poate aplica direct preparatelor ARN, în care ambele procese (conversia ARN și reacția PCR) se desfășoară într-o singură etapă.

Deoarece procedura are o limită de detecție de minim 10 copii NPM1 mutant, invenția este aplicabilă în orice procedură medicală prin care se monitorizează prezența celulelor leucemice, la nivel rezidual, în pacienții aflați în tratament sau post-tratament.

Testul se poate aplica într-o etapă de preselecție a probelor care să fie evaluate ulterior prin secvențiere, cu avantajul reducerii numărului de secvențieri pentru gena NPM1.

REVENDICĂRI

1. Set de doi primeri și o sondă pentru a detecta și doza mutațiile NPM1 întâlnite în leucemia mieloidă acută, care au următoarea structură:
 (primer P1) 5`- CAATTATGTGAAGAATTGCTTCCGGATGAC -3`
 (primer Pmut blocat) 5`-
 TACCACATTACACCACACACGAGAGACTTCCTCCACTGCCAGGCAGAGaTCTTC(
 C3) -3`

(primer Pmut activat) 5`-
 TACCACATTACACCACACACGAGAGACTTCCTCCACTGCCAGGCAGAG -3`
 (sonda S) /56-FAM/ TAG+C+CTCTTGGT+C+AGT/3IABkFQ/,
 unde: "a" este riboza, "6-FAM" este compusul fluorescent (fluoresceină), " IABkFQ" este inhibitorul de fluorescență, (C3) reprezintă inhibitorul de PCR, "+..." reprezintă nucleotide modificate LNA, iar restul sunt dezoxiribonucleotide.

2. Procedura de detecție și dozare a mutațiilor NPM1 întâlnite în leucemia mieloidă acută, fără a cunoaște în totalitate secvența mutantă și care implică primerii și sonda precizați în revendicarea 1, împreună cu utilizarea endonucleazei H2, naturală sau modificată sau utilizarea oricărei enzime cu activitate enzimatică similară endonucleazei H2, respectiv, activitatea de eliminare a ribozei din primerii precizați.

3. Revendicările 1 și 2 se realizează cu probe ARN după conversia lor în ADN complementar, indiferent de metoda de conversie și indiferent dacă sursa ARN este sânge sau măduvă hematogenă, recoltate în scop de diagnostic sau de monitorizare a evoluției populațiilor celulare leucemice în pacienți, înainte, în timpul sau după tratament.

4. Revendicările 1 și 2 se realizează cu orice kit comercial destinat reacțiilor PCR de tip TaqMan, precum și la utilizarea oricărui tip de ADN polimerază termofilă capabilă să degradeze sonda în timpul polimerizării.

Figura 1

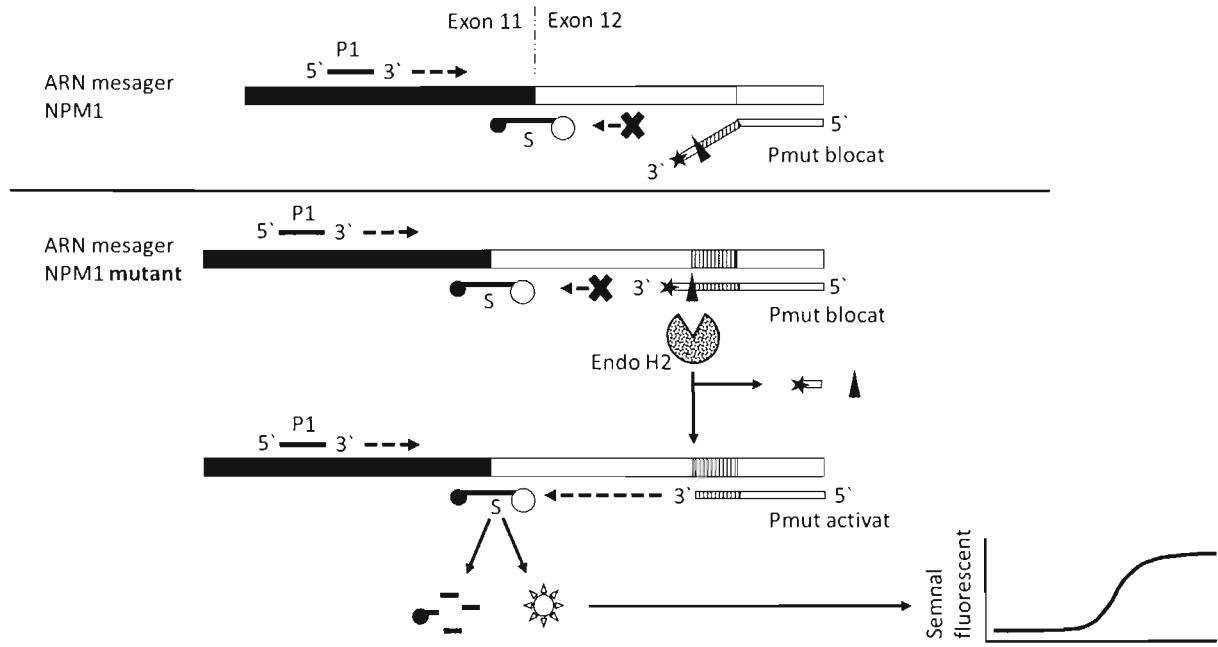


Figura 2

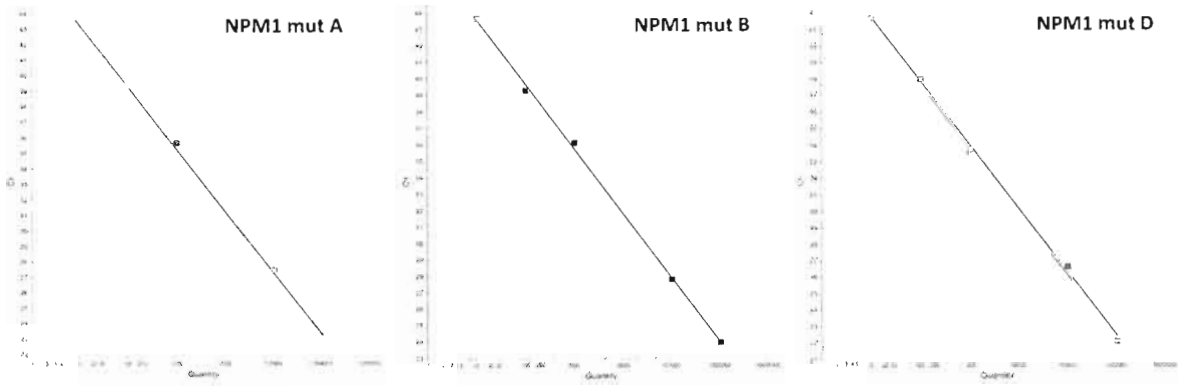


Figura 3

