



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00820**

(22) Data de depozit: **09/12/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2022 BOPI nr. **6/2022**

(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;**
• **GRUIANU ALEXANDRA, STR.SFINȚII
VOIEVOZI, NR.30-32, CORP B, AP.5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IONESCU VICTOR,
STR.ION CĂMPINEANU, 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) **AMPRENTAREA GENETICĂ UMANĂ PRIN DETECȚIA
ȘI DOZAREA UNOR MUTAȚII DE TIPUL INSERȚIILOR
ȘI DELEȚIILOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de amprentare genetică umană prin detecția și dozarea unor mutații de tipul inserțiilor și delețiilor care există în genomul uman, aplicată în domeniul biologiei moleculare și al analizei genetice. Metoda, conform invenției, utilizează tehnica PCR cu fluorescență qPCR pentru mutațiile de tip SNP și tehnica PCR cuplată cu electroforeza capilară pentru mutațiile de tip STR pentru evaluare genetică a unor probe biologice, cu capacitate crescută de discriminare

dintre moleculele ADN care includ secvența mutantă și alte molecule ADN cu grad mare de omologie, metoda având specificitate și sensibilitate crescute ale detecției și dozării unor mutații genetice existente în cantități reduse în probele biologice.

Revendicări: 4
Figuri: 3



Documentația tehnicăDescrierea invenției

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI BREVETE
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 22 ee 82
Data depozit 0.9 -12- 2020

57

a) Titlul invenției

**AMPRENTAREA GENETICĂ UMANĂ PRIN DETECȚIA ȘI DOZAREA UNOR
MUTAȚII DE TIPUL INSERȚIILOR ȘI DELEȚIILOR**

b) Domeniul tehnic și definirea termenilor tehnici

Invenția se înscrie în domeniul biologiei moleculare și al analizei genetice. Genomul este constituit din fragmente lungi de ADN dublu catenar, fiecare catenă reprezentând o succesiune a patru tipuri de baze (A, T, C, G) denumită secvență. Datorită imperfecțiunilor aparatului de replicare ADN și a mecanismelor celulare de reparare a erorilor, genomul uman acumulează permanent mutații genetice, consecința directă fiind schimbarea secvențelor de nucleotide din regiunile respective. Majoritatea mutațiilor sunt neutre, adică apariția lor nu determină disfuncții celulare semnificative sau patologice. Prin urmare aceste mutații sunt mai puțin expuse unui proces de eliminare prin selecție naturală, astfel că se pot păstra în genomul celulelor germinale și se pot transmite descendenților. Mutațiile sunt clasificate structural în funcție de diferențele de secvență pe care le produc în genom în raport cu secvența de referință: mutații în care o nucleotidă este schimbată cu o altă nucleotidă (cel mai frecvent tip de mutație, denumit polimorfism mono-nucleotidic sau SNP); mutații prin care una sau mai multe nucleotide succesive sunt eliminate (denumite deleții) sau introduse în genom (denumite inserții); mutații prin care părți (secvențe) ADN ale genomului, de marime variabilă, sunt duplicate sau multiplicare în genom și sunt localizate în vecinătate sau la distanță față de secvența originală (denumite duplicații). Prin convenție, secvența ADN considerată ancestrală se numește secvența de referință. Secvența ADN care include orice schimbare în raport cu secvența de referință este denumită secvența alternativă (sau variantă).

Dezvoltarea tehnicilor de identificare a secvențelor ADN a permis descoperirea unui număr enorm de mutații și confirmarea faptului că fiecare organism are o combinație unică de mutații. Conceptul este aplicabil chiar și în cazul gemenilor dezvoltăți din același ovul fecundat, deoarece fenomenul de mutageneză se petrece continuu, inclusiv pe parcursul dezvoltării embrionare. Acest principiu al variabilității genomice reprezintă fundamentul teoretic al metodelor de identificare genetică a persoanelor.

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;

Secvența de referință = este secvența ADN dublu sau monocatenară, determinată cu frecvența cea mai mare la nivelul speciei și care este considerată ancestrală;

Secvența alternativă = este secvența ADN dublu sau monocatenară, care are cel puțin o modificare în raport cu secvența de referință;

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 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

56

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, interațiile 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 atașati 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 existentă într-o secvență de referință (forma ancestrală);

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;

Amprentare genetică = procedura tehnică moleculară de analiză calitativă și cantitativă a unor mutații ADN specifice prin care se stabilește apartenența unei celule sau a unui grup de celule la un organism;

Chimerism = distribuția calitativă și cantitativă într-o probă biologică, a două sau mai multe populații celulare, fiecare cu propria amprentă genetică

c) Stadiul tehnologiei

Invenția se referă la detecția și dozarea unor mutații de tip inserție sau deleție care există în genomul uman. Analiza genomului din punctul de vedere al variabilității genetice implică atât metode adecvate pentru identificarea mutațiilor și caracterizarea lor, cât și metode pentru detecția și dozarea precisă a acestora. Deși s-a dezvoltat o gamă foarte diversificată de metodele destinate analizei genomului, aplicabilitatea lor este limitată doar la unele dintre atributele menționate anterior. Astfel tehnicile moderne de secvențiere permit identificarea mutațiilor noi, dar sunt mai puțin performante în ceea ce privește dozarea acestor mutații. În schimb, metodele genetice bazate pe tehnologia PCR permit analiza cantitativă precisă a mutațiilor, dar nu pot fi aplicate decât în cazul mutațiilor cunoscute.

Invenția se referă la o procedură de detecție și dozare a mutațiilor de tip inserție sau deleție cunoscute și caracterizate, care sunt precizate în bazele de date. Majoritatea procedurilor pentru detecția și dozarea mutațiilor cunoscute se bazează pe tehnologia PCR („polymerase chain reaction”). Elementele cheie ale PCR sunt primerii, sondele și ADN polimeraza, care funcționează concertat într-o succesiune de temperaturi care se repetă ciclic. Astfel, la temperaturi de 95 grade Celsius moleculele țintă ADN dublucatenare sunt desfăcute, iar în timpul scăderii temperaturii amestecului de reacție către valori din intervalul 63 – 50 grade Celsius, primerii și sondele se pot lega specific de zonele complementare ale țintelor monocatenare. Ulterior, structura dublucatenară formată prin alipirea dintre primer și țintă este recunoscută de ADN polimeraza, care, activată în acest fel, realizează polimerizarea – procedura prin care se adaugă succesiv nucleotide la capătul 3 al primerului, astfel încât fragmentul ADN nou format este perfect complementar cu catena ADN țintă. Dacă în timpul polimerizării ADN, enzima întâlnește sonda (legată prin complementaritate de aceeași moleculă ADN țintă ca și primerul, dar în alt loc), are loc fenomenul de degradare enzimatică a respectivei sonde. Tehnica PCR folosește cel puțin 2 primeri, cu următoarele proprietăți: fiecare primer este complementar cu câte o catenă a țintei ADN, diferită de catena complementară cu primerul pereche; complementaritatea primerilor este aleasă astfel încât orientarea capetelor (simbolizate 5' și 3') respectă principiul simetriei în oglindă. În reacțiile PCR cu sondă, aceasta va fi concepută astfel încât să se lege de una dintre catenele țintei, în

52

zona amplificabilă. Rezultatul final al PCR este producerea de fragmente ADN dublucatenare, care vor avea o secvență identică (sau aproape identică, dacă avem în vedere erorile de activitate ale ADN polimerazei) cu secvența din ținta amplificată, cuprinsă între zonele complementare cu primerii. În cazul metodelor PCR fără sonde, produsul amplificării poate fi vizualizat în geluri de agaroză, prin marcarea specifică cu o substanță fluorescentă (de exemplu, bromura de etidiu) sau poate fi vizualizată direct în amestecul de reacție dacă acest conține o substanță capabilă de a emite fluorescent după interacția cu structurile ADN dublucatenare (de exemplu, SYBRgreen sau EVAgreen). În cazul procedurilor PCR cu sondă, activitatea enzimatică și, implicit, amplificarea țintei sunt vizualizate prin fluorescența emisă de substanța fluorescentă, eliberată de sondă în urma degradării.

Metodele bazate pe tehnologia PCR care permit detecția și dozarea unei anumite mutații genomice au la bază faptul că se pot sintetiza primeri și sonde capabile de a recunoaște specific și de a complementariza doar moleculele ADN care conțin mutația investigată și fără a avea vreun efect asupra altor molecule ADN. Astfel amplificarea este posibilă doar dacă în amestecul de reacție există molecule ADN purtătoare a mutației testate. Analiza cantitativă este raportată la intensitatea semnalului fluorescent, proporțional cu numărul de molecule cu mutație. Metodele PCR sunt clasificate în două părți: metode în care secvența cu mutație este recunoscută de unul dintre primeri și metode PCR în care secvența cu mutație este recunoscută de sondă. În primul caz, se amplifică doar fragmentele ADN purtătoare ale mutației, iar aceasta este procedura aleasă în special în situația în care frecvența mutației este mică. În al doilea caz, se amplifică toate moleculele ADN existente în amestecul de reacție, complementare cu primerii, indiferent de prezența sau absența mutației. Prezența mutației este evidențiată prin degradarea sondei și emiterea semnalului fluorescent. Avantajul tehnicii PCR cu sondă este acela că se pot doza simultan mai multe mutații (PCR multiplex)

Invenția se referă la o procedură de detecție a mutațiilor genetice cu ajutorul metodelor de PCR cu fluorescența, realizate standard sau în emulsie. Metoda standard PCR cu fluorescență, denumită generic PCR în timp real sau qPCR, este procedura în care evoluția semnalului fluorescent este monitorizată permanent după finalizarea fiecărui ciclu de temperaturi. Cuantificarea semnalului fluorescent se realizează prin determinarea numărului de cicluri necesare pentru ca amplificarea semnalului să ajungă într-o fază de creștere exponențială (denumită valoarea Ct). Cu

cât numărul de molecule țintă este mai mare cu atât numărul de cicluri este mai redus. Metoda qPCR necesită realizarea unei curbe de calibrare: prin diluție serială se realizează o serie de probe în care numărul de molecule țintă este cunoscut și pentru fiecare probă se determină valoarea Ct. Distribuția grafică a valorilor Ct în funcție de numărul teoretic de molecule țintă conduce la stabilirea unei ecuații matematice prin care se poate calcula numărul necunoscut de molecule țintă dintr-o probă în raport cu valoarea Ct determinată experimental.

Tehnologia PCR digital în emulsie (ddPCR) este o metodă modernă care prezintă o serie de avantaje în raport cu metoda qPCR: precizia ddPCR este de cel puțin 10 ori mai mare decât qPCR; ddPCR nu necesită realizarea unor curbe de calibrare; atenuarea activității enzimatică a ADN polimerazei de către inhibitorii chimici din amestecurile de reacție este semnificativ mai redusă la ddPCR. În cazul ddPCR, amestecul de reacție este întâi fragmentat (partiționat) în 20000 de picături prin amestecare cu lipide și emulsionare. Practic, moleculele ADN țintă sunt distribuite în picăturile lipidice, iar fiecare picătură este considerată ca o reacție PCR independentă. Iar apoi se aplică protocolul PCR (detalii la definiția ddPCR). Emulsia astfel generată este supusă protocolului PCR, iar la finalul etapei are loc evaluarea fluorescenței fiecărei picături. Detectarea semnalului fluorescent într-o picătură de ulei este interpretată în sensul că aceasta conține cel puțin o moleculă ADN țintă. Trăsătura definitorie a metodei este faptul că distribuția moleculelor ADN țintă în picăturile de ulei se realizează conform statisticii Poisson, astfel că determinarea numărului total de bile fluorescente și numărului total de bile non-fluorescente este suficient pentru a stabili numărul inițial de molecule țintă.

Amprentarea genetică este utilă într-o serie de domenii, cum sunt medicina (determinarea chimerismului post-transplant), criminalistica (identificarea originii unor probe biologice) și juridic (testele de paternitate), precum și orice alt domeniu similar. În majoritatea cazurilor, procedurile au la bază detecția și cuantificarea mutațiilor de tip SNP sau repetițiile de secvențe scurte (STR). În cazul mutațiilor SNP, metoda ce mai utilizată este qPCR, unde sonda este astfel concepută încât va interacționa doar cu moleculele ADN purtătoare ale mutației evaluate. În cazul mutațiilor STR, tehnica PCR este cuplată cu electroforeza capilară: fragmentele ADN generate în PCR sunt separate după mărime prin migrarea într-un câmp electric. În ultimii ani se observă tendința de a proceduri echivalente folosindu-se detecția mutațiilor de tip inserții sau deleții (INDELS).

d) Scopul invenției și problemele tehnologiei actuale ameliorate în invenție

Scopul invenției este de a crește precizia detecției și dozării mutațiilor genetice și, în acest mod, de a permite evaluarea genetică a unor probe biologice, inclusiv în situațiile în care metodele existente nu sunt suficient de eficiente. Invenția are ca scop ameliorarea unora dintre limitările tehnice ale metodelor actuale bazate pe metoda PCR, utilizate în detecția și dozarea variantelor genetice ale genomului uman.

Parametrii tehnici care influențează semnificativ sensibilitatea și specificitatea unei metode bazate pe tehnologia PCR sunt: (1) gradul de selectivitate al primerilor și sondelor, care trebuie să interacționeze exclusiv cu zona țintă (cu 100% complementaritate) și să evite interacția nespecifică cu alte regiuni ADN (chiar dacă aceste zone au mare grad de omologie cu zona țintă); (2) precizia enzimei ADN polimeraza, care trebuie să recunoască doar primerii corect poziționați pe țintă și care să nu producă erori la replicarea țintei ADN. Eficiența acestor parametrii depinde, printre altele și de natura mutațiilor alese ca markeri pentru identificarea genetică. În principiu, în cazul mutațiilor SNP primerii sunt concepuți astfel încât nucleotida corespunzătoare mutației să fie localizată la capătul 3 al primerului, adică acolo unde ADN polimeraza inițiază elongarea primerului prin polimerizare. Deoarece, în cazul SNP-urilor, diferența dintre secvența mutantă țintă și secvența ancestrală este limitată doar la o singură nucleotidă, în practică, un procent redus de primeri se poate atașa nespecific de secvența ancestrală, iar ADN polimeraza, în mod eronat, să realizeze polimerizarea primerului. În acest context, cu cât diferențele de secvență între o mutație și alela de referință (ancestrală) implică mai multe nucleotide cu atât mai mult precizia reacției PCR ar fi mai bună. Acesta este cazul mutațiilor de tipul inserțiilor și delețiilor, inclusiv a celor descrise în prezenta invenție.

Deși mutațiile de tipul inserțiilor și delețiilor pot fi mai precis analizate prin metodele bazate pe tehnologia PCR, utilizarea lor în domeniile care necesită amprentarea genetică este rară. Principala cauză este aceea că numărul mutațiilor cunoscute de tipul inserțiilor și delețiilor este mult mai mic decât acela al mutațiilor de tip SNP. Astfel că identificarea acelor mutații de felul inserțiilor și delețiilor care să existe cu frecvență mare la nivelul speciei umane este semnificativ mai dificilă comparativ cu mutațiile SNP. Invenția prezentată oferă soluție la această problemă.

Precizia detecției și a dozării mutațiilor este dependentă direct de limita minimă, adică de numărul minim de copii ADN cu mutație cuantificabil într-o probă

biologică. Limita minimă depinde atât de natura mutațiilor detectate cât și de limitele tehnologice ale metodei folosite. Progrese notabile s-au realizat în ultimii 10 ani prin apariția instrumentelor capabile de a utiliza o alternativă la PCRul clasic și anume PCR digital. Procedura ddPCR (descrisă mai sus) este o variantă a dPCR și foarte multe studii demonstrează că are o precizie de cel puțin 10 ori mai bună în raport cu qPCRul. În ciuda acestor avantaje, tehnologia ddPCR nu a devenit încă un etalon pentru detecția mutațiilor genetice. Invenția prezentată este optimizată astfel încât se poate aplica atât cu metoda PCR standard, qPCR, cât și cu metoda ddPCR.

e) Expunerea invenției

Invenția se referă la un set de primeri, proiectați astfel încât să detecteze și să cuantifice anumite mutații inserții sau deleții prin tehnicile bazate pe metoda PCR.

Prima problemă tehnică de rezolvat a fost identificarea mutațiilor de tipul inserțiilor și delețiilor care cumulează o serie de caracteristici necesare pentru a fi utile în procedurile de amprentare genetică: frecvența, mărimea, asemănarea cu alte zone ale genomului și complexitatea secvenței. Astfel s-a realizat analiza genomului cu ajutorul unor baze de date publice, pentru a selecta mutațiile de tipul inserțiilor și delețiilor care au o frecvență de apariție de peste 25%, la nivel de alelă. Cazurile selectate au fost stratificate după mărimea mutației și complexitatea structurală a regiunilor genomului unde apar mutațiile respective. În final, a fost evaluat gradul de omologie dintre zona cu mutație și restul genomului. Dintr-un total de 81 mutații care au trecut de filtrul evaluării au fost selectate 25 pentru proiectarea și validarea primerilor. Soluția tehnică este prezentată de grupul de mutații precizate în tabelul 1.

A doua problemă tehnică de rezolvat a fost proiectarea și optimizarea seturilor de primeri. Pentru fiecare mutație selectată, perechile de primeri au fost proiectați cu respectarea regulilor specifice privind complementaritatea cu secvența țintă, eliminarea dimerilor nespecifici, a structurilor intramoleculare dubluatenare, precum și o temperatură de interacție cu ADN-ul țintă în intervalul 60-65 grade Celsius. Soluția tehnică este reprezentată de seturile de primeri cu secvențele precizate în tabelul 1.

A treia problemă tehnică a fost optimizarea metodelor pentru ca primerii să fie eficienți atât cu metoda PCR standard, qPCR, cât și cu metoda ddPCR. Soluția tehnică este reprezentată de seturile de primeri cu secvențele precizate în tabelul 1.

A patra problemă tehnică a fost stabilirea unei metode prin care rezultatele tehnice brute sunt convertite într-o variantă care permite dozarea cantitativă a

numărului de copii ADN purtătoare a mutației țintă în raport cu numărul total de copii ADN ale locusului genomic amplificat. Soluția tehnică este reprezentată de seturile de primeri cu secvențele precizate în tabelul 1, unde seturile de primeri care conțin „D” în denumire amplifică toate copiile ADN ale locusului genomic (indiferent de prezența sau absența mutațiilor), iar seturile de primeri care amplifică doar moleculele ADN purtătoare ale variantelor genetice sunt denumite „R” sau „V”. Astfel cantitatea de ADN mutant se poate exprima ca procent din cantitatea totală de ADN.

Tabelul 1: Seturile de primeri pentru detecția unor mutații de tipul inserțiilor și delețiilor

Nume set primer	Cod mutație	Primer 1	Primer 2
R1	829	CAGTCTGTTTATACATCAAGTTCACAGTTC	TTTGGCCTAAACCTACCTTCACAC
V1	829	CATCAAGTTCACCTACCTACAAGTTCACAG	TTTGGCCTAAACCTACCTTCACAC
D1	829	CGTTACAGTCTGTTTATACATCAAGTTCAC	TTTGGCCTAAACCTACCTTCACAC
V2	581	GGTCATAAACCCAGTCTGCTGTC	CGTAGAGATGTCCCTCATTTCAGAGTAG
D2	581	GGTCATAAACCCAGTCTGCTGTC	GTCTCAGCATCAGTAGAGATGTCC
R3	696	ACTTAGAGGGAGAAAAGTAGAAGAGTGATG	TGACAAAACCTTAGAGGGAGAAAAGTAGAAG
V3	696	CTTAGAGGGAGAAAAGTAGAAGATCACAG	TGACAAAACCTTAGAGGGAGAAAAGTAGAAG
D3	696	TACGGAATACATGAATGAGAATCTACTGC	TGACAAAACCTTAGAGGGAGAAAAGTAGAAG
R4	248	TTCTCCAAGTGTGGTCCAG	TAATGAGTTGCATTATGCACCTTATGC
V4	248	CTCAGAAATCACTAGTGCATAATGCAACTC	CTCTGAACCCGAAGGTCTGTGG
D4	248	TTCTCCAAGTGTGGTCCAG	CTCTGAACCCGAAGGTCTGTGG
R5	759	GAACAATAACAATGTGGCTCTGATATTATTCTC	TAGAAGGAGAGCAGAGATTCTCAGC
V5	759	GTGAACAATAACAATGTGAATTATTGGG	TAGAAGGAGAGCAGAGATTCTCAGC
D5	759	GTATAAATAGTTTATGTGAACAATAACAATGTGG	TAGAAGGAGAGCAGAGATTCTCAGC
R6	156	GTAGCCAGGCATGGTAGCAGG	GTGAGGGCTTAAGTGGGCTAAGTC
V6	156	GTAGCCAGGCATGGTAGCAGG	GCTTAAGTGATTCTCTAAGTCTTAGCCTCC
D6	156	GTAGCCAGGCATGGTAGCAGG	GATTTCTGGGCTTAAGTATTCTCTAAGTC
R7	716	TCAGTTCAGACTTACCAAGTGTGTAG	AGAAGACACTGGATGAATATGTCGTATC
D7	716	GCCACTTAGTTGAGTTCAGTTCAGAC	AGAAGACACTGGATGAATATGTCGTATC
R8	402	CACGCCTGTAATCCCAGCAC	GGGTTTACCATCTTGACCAGG
D8	402	CACGCCTGTAATCCCAGCAC	TCCTGACCTCGTATCCACC
R9	781	GGAAAAATCCCTCTATGCACAAGC	TCACTGGAGTGAGCCTGTC
D9	781	GGAAAAATCCCTCTATGCACAAGC	AAAGACAGGCGAGTGGCTC
V10	359	CTGTTGTATTACTTCTTTGACTTTAGGCAC	TTAAAAGGGCAGGTTCCAGTACTATATG
D10	359	CTGTTGTATTACTTCTTTGACTTTAGGCAC	GCAATACACTAAATTTAAAAGGGCAGGTTTC
R11	881	CAATGGCACTGTCTGGATACTATAACC	GCTGTCTGTGCAGAAATTCACCTGG
D11	881	CAATGGCACTGTCTGGATACTATAACC	GGAGTGGGCTGATACAAAGCTG
V12	804	CAGTGTGCCAGAGTAGCC	ACAGGTTTCAAGTGTAGGTTTCAATCC
D12	804	TGTGTGTGTTACTACTCCACATGG	ACAGGTTTCAAGTGTAGGTTTCAATCC
V13	946	GACATTGAGAGAGGTTAACAAAACGTG	TCAACCAAAATGACTCTAATCTGTGC
D13	946	GACATTGAGAGAGGTTAACAAAACGTG	GCTTGTAATGCTCAACCAAAATGACTC
V14	354	GATTTTCTGAGATATGACCTGGCTTTTC	ACTGTTTCTTTTATTAATTTTCTCCTGAATG
D14	354	GATTTTCTGAGATATGACCTGGCTTTTC	GATGAGATACTGTTTCATTTTACTGTTTCTC
R15	145	CCCTCTTTCCAAAGTTTTCTGTATGAAG	TGGGATTACAGGCGTGAGC
D15	145	CCCTCTTTCCAAAGTTTTCTGTATGAAG	TCCCAAAATGCTGGGATTACAGG
R16	920	AGCCACAGGCTCCTGCAC	TGCTTGTTCACGAAAGTATGAGTGTCTC
D16	920	TCACGGGAGTCACGGAGCAG	TGCTTGTTCACGAAAGTATGAGTGTCTC
V17	122	TGTGAAGCATTGAGCCACTG	GGCAGTTCTCCATCAGTCTCTCC
D17	122	ATGTGAGTGAGCTGACTAGACCAC	GGCAGTTCTCCATCAGTCTCTCC
V18	844	TTGAGGCCAGGAGTTCAAGAC	CCTAGAAATAAACCATCATGTATATGATCCAG
D18	844	TTGAGGCCAGGAGTTCAAGAC	AGTGATATTTTCTCAATTAGAACAGGGTC
V19	389	GCTAAACATTGAGCACACATGGAC	CTTCTCTCCCTCTCTAGTAGTCTG
D19	389	GCTAAACATTGAGCACACATGGAC	CCTGTCACCTAGGTAGTGAGCA
R20	148	GTAATAATTTCTGTCCATGTCTTCTGCC	AGGACTGAAATATAGACTATACAACAGACTG

V20	148	GTCCTCTTCAGTAAAATTTCTGTCTAATTGG	AGGACTGAAATATAGACTATACAACAGACTG
D20	148	TTGATATGTCCTCTTCAGTAAAATTTCTGTGTC	AGGACTGAAATATAGACTATACAACAGACTG
R21	198	TTGCAGTGCAGGCCAGTG	GGTATCAAACACATGATGAGAACCAGTG
D21	198	CTTCAGTGAAGAGACGCC	GGTATCAAACACATGATGAGAACCAGTG
R22	151	CTCAGTGCACCATGATCTCCATCAG	CTCAGGGCAGGAGTGAGCAG
V22	151	ATCCCTCAGTGCCCCACAC	CTCAGGGCAGGAGTGAGCAG
D22	151	ACCCACATTCCCTCAGTGC	CTCAGGGCAGGAGTGAGCAG
R23	437	AGTTAGGACTCTTGATTTGTGAACTG	CACAGACCTTTGCAAAAAGAAGAA
V23	437	AGTTAGGACTCTTGATTTGTGAACTG	CACAGACCTTTGCAAAAAGAACTT
R24	905	ACTCAAGACTCAGAAATAAAGTATTCACAG	ACAGGCCAGTAGTTAGAAGACC
V24	905	ACTCAAGACTCAGAAATAAAGTATTCACAG	GCAGCTTAAGAGCACAGGTTT
R25	423	TGTGACTGAGAAGCAGCCTG	AAGTAGTATGGTTTTACAGTGGATAATGC
V25	423	GTGTGACTGAGAAGCAGTCATTC	AAGTAGTATGGTTTTACAGTGGATAATGC

f) **Avantajele invenției**

Invenția prezintă următoarele avantaje: capacitatea crescută de discriminare dintre moleculele ADN cu mutație și alte molecule ADN, care prezintă un grad mare de omologie cu primele; este sporită specificitatea și sensibilitatea detecției și dozării unor mutații genetice existente în cantități reduse în probele biologice; dozarea mutațiilor din probele biologice nu necesită realizarea unor curbe de calibrare, ceea ce reflectă simplificarea procedurilor și reducerea costurilor.

g) **Descrierea figurilor**

În **figura 1** este prezentat schematic principiul de funcționare al reacției de PCR de detecție și dozare a mutațiilor de tipul inserțiilor și delețiilor. Primerii specifici unei mutații interacționează complet (adică cu toată secvența lor, de la un capăt până la celălalt) doar cu moleculele ADN care includ secvența mutantă și împreună formează o structură ADN dublucatenară. În cazul moleculelor ADN similare cu primele, dar care nu includ secvența mutantă, primerii specifici interacționează doar parțial cu ele, astfel încât capătul 3' al primerului rămâne monocatenar, separat de molecula de ADN. Enzima ADN polimeraza va interacționa și va iniția elongarea primerului doar acolo unde capătul 3' al primerului este perfect complementar cu molecula ADN țintă, astfel că semnalul fluorescent va crește în intensitate doar în acest caz. Prin recunoșterea selectivă a moleculelor ADN de către primeri și prin activitatea selectivă a enzimei se asigură specificitatea și precizia metodei PCR, în scopul detecției cu mare acuratețe doar a moleculelor ADN mutante.

În **figura 2** sunt prezentate rezultatele reacțiilor ddPCR pentru câteva mutații de tipul inserțiilor sau delețiilor. Fiecare coloană reprezintă sumarul unei reacții (sunt precizate codul mutației corespunzător setului de primeri utilizați în reacția respectivă), iar fiecare punct reprezintă o picătură din emulsia PCR. Punctele poziționate în partea superioară reprezintă picături cu semnal fluorescent (colorant EVAgreen), iar punctele poziționate la baza coloanelor nu au semnal fluorescent.

Apariția semnalului fluorescent într-o picătură dovedește că în picătura respectivă există cel puțin o moleculă ADN purtătoare a secvenței complementare cu primerii specifici (mutația țintă). Secvențele țintă pentru o anumită mutație sunt codificate cu literele „V” (secvența variabilă) sau „R” (secvența ancestrală).

În **figura 3** sunt prezentate rezultatele reacțiilor qPCR pentru câteva mutații de tipul inserțiilor sau delețiilor. Fiecare grafic indică evoluția semnalului fluorescent (colorant SYBRgreen) în timp real, adică pe măsură ce numărul de cicluri ale reacției crește. Pe orizontală este marcat numărul de cicluri PCR, iar pe verticală este reprezentată intensitatea semnalului fluorescent. Profilul evoluției semnalului fluorescent este precizat pentru fiecare set de perechi de primeri testați.

h) Realizarea practică a invenției

Prin analiza bazelor de date privind genomul uman și după aplicarea unor criterii de stratificare a polimorfimelor cunoscute (detaliat în secțiunea „expunerea invenției”), au fost selectate 25 de mutații pentru utilizarea în amprentarea genetică a probelor biologice cu ajutorul metodelor bazate pe tehnologia PCR. Frecvența de apariție a mutațiilor selectate a fost evaluată în practică cu ajutorul metodei qPCR și al primerilor precizați în tabelul 1. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2 pentru câteva dintre mutațiile selectate. Rezultatele au fost verificate și prin metoda ddPCR pentru unele dintre mutații. Prezența sau absența mutației este codificată prin termenii „V” (alela variabilă) și „R” (alela de referință). Pentru fiecare probă/genom sunt prezentate câte două rezultate, deoarece fiecare genom diploid normal conține două copii ale locusurilor care pot avea mutațiile respective.

Tabelul 2: Frecvența mutațiilor determinată prin PCR în probe biologice

Cod mutație	Teste		Frecvența			Probe biologice										
	qPCR	ddPCR	R/R	R/V	V/V	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
156	✓	✓	0.63	0.13	0.25			V/V	V/V		R/R	R/R	R/R	R/V	R/R	R/R
248	✓	✓	0.20	0.40	0.40	R/V	R/R	R/V	V/V	V/V						
354	✓	✓	0.00	0.50	0.50			V/V	R/V		R/V	R/V	V/V	V/V	R/V	V/V
696	✓		0.38	0.38	0.25			R/R		R/R	R/R	V/V	R/V	V/V	R/V	R/V
759	✓	✓	0.18	0.45	0.36	R/V	R/R	R/V	R/R	V/V	V/V	R/V	V/V	R/V	V/V	R/V
781	✓		0.00	0.22	0.78	R/V	R/V			V/V	V/V	V/V	V/V	V/V	V/V	V/V
829	✓		0.50	0.00	0.50		R/R		V/V							
844	✓	✓	0.00	0.63	0.38			R/V	V/V		R/V	R/V	R/V	V/V	R/V	V/V

Seturile de primeri proiectați pentru detecția și dozarea mutațiilor selectate au fost optimizați pentru utilizarea lor în metoda ddPCR. Figura 2 prezintă rezultate reprezentative pentru mutațiile 696 și 248. Determinarea numărului de copii ADN

purtătoare ale mutației corespunzătoare setului de primeri este stabilit prin raportarea numărului de semnale pozitive (picături fluorescente) la numărul de semnale negative (picături fără fluorescență) cu ajutorul unui program informatic al echipamentului și al distribuției Poisson.

Seturile de primeri proiectați pentru detecția și dozarea mutațiilor selectate au fost optimizați pentru utilizarea lor în metoda qPCR. Figura 3 prezintă rezultatele qPCR pentru mutațiile 696 și 248. Dozarea mutațiilor se realizează prin determinarea valorilor Ct care reprezintă intersecția dintre prag (linia orizontală) și curba de fluorescență. Valorile Ct se raportează la valorile echivalente stabilite printr-o curba de calibrare.

A fost realizată analiza comparativă dintre metodele qPCR și ddPCR. Seturile de primeri au fost testate comparativ prin cele două metode, iar rezultatele sunt prezentate în figurile 2 și 3. Diferențele dintre probele pozitive și cele negative sunt mai clar determinate în cazul ddPCR, ceea ce confirmă faptul că metoda ddPCR este mai precisă decât metoda qPCR. Nu au fost identificate cazuri în care metoda qPCR să fie mai precisă decât ddPCR.

Deoarece metoda ddPCR este mai precisă, aceasta a fost aleasă pentru a evalua limitele de detecție ale seturilor de primeri. Pentru aceasta s-au realizat diluții seriale în care numărul de molecule ADN cu mutație este cunoscut, iar numărul total de molecule ADN corespunzător locusului genomic este pastrat la aceeași valoare pentru toate probele diluției seriale. Cu aceste date s-a calculat procentul de mutații pentru fiecare probă generată prin diluție serială. Probele au fost testate practic prin ddPCR, iar rezultatele au fost comparate cu valorile teoretice. Tabelul 3 prezintă aceste rezultate pentru două dintre mutațiile evaluate. Se observă corelația bună între valorile teoretice și practice, chiar și pentru probele cu un număr redus de molecule ADN cu mutație.

Tabelul 3: Corelația procentelor moleculelor ADN mutante teoretice și determinate experimental

	Număr total molecule	Procentul teoretic al mutației	Mutația 696, setul de primeri V		Mutația 759, setul de primeri R	
			Număr molecule mutante	Procent obținut	Număr molecule mutante	Procent obținut
Diluția 1	2095	50%	1066	51%	1090	52%

Diluția 2	2180	25%	490	22%	513	24%
Diluția 3	2193	12.50%	276	13%	262	12%
Diluția 4	2325	6.25%	125	5.38%	123	5.28%
Diluția 5	2391	3.13%	83	3.48%	86	3.59%
Diluția 6	2643	1.56%	35	1.32%	45	1.72%
Diluția 7	2463	0.78%	11	0.45%	15	0.59%

4h

i) Aplicabilitatea invenției

Invenția este aplicabilă în toate domeniile în care se utilizează detecția și dozarea mutațiilor genetice, prin oricare dintre metodele bazate pe tehnologia PCR, în scopul identificării originii unei probe biologice de orice fel prin amprentare genetică. Dintre aceste domenii menționăm următoarele: medicină (determinarea chimerismului post-transplant), criminalistică (identificarea originii unor probe biologice) și juridic (testele de paternitate).

REVENDICĂRI

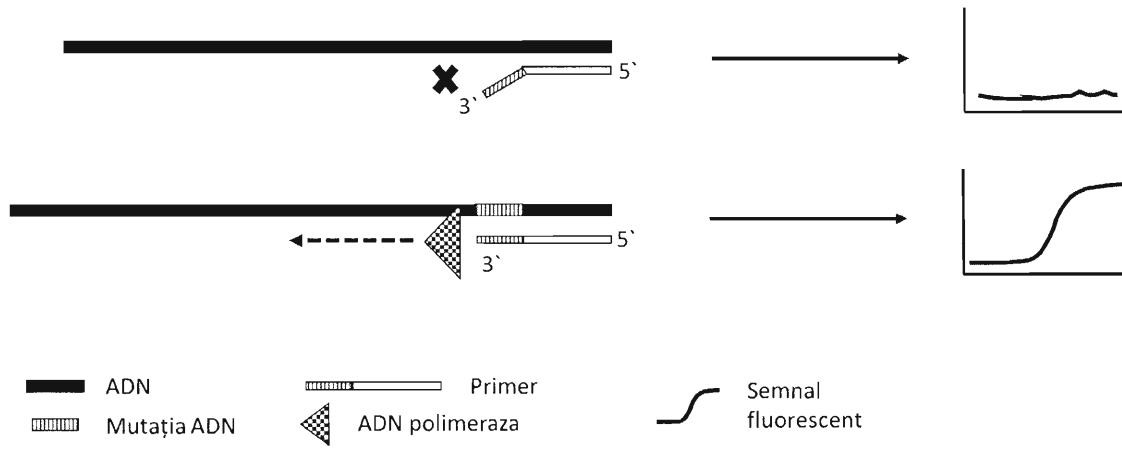
1. Seturile de primeri precizați în tabelul 1 pentru detecția și dozarea mutațiilor de tipul inserțiilor sau delețiilor precizate în tabelul 1;

2. Utilizarea seturilor de primeri precizați în tabelul 1 cu orice metodă bazată pe tehnologia PCR, inclusiv PCR cantitativ (qPCR) sau PCR digital (inclusiv ddPCR) și care amplifică ADN-ul genomic sau ADN-ul complementar prin utilizarea oricărui tip de ADN polimerază termorezistentă, cu excepția celor care au activitate nucleazică asupra catenei ADN din direcția 3' către 5';

3. Utilizarea seturilor de primeri precizați în tabelul 1 cu orice amestec de substanțe destinat PCR sau orice kit comercial destinat PCR, care include fie SYBRgreen (sau un echivalent al acestuia) fie una sau mai multe sonde marcate fluorescent

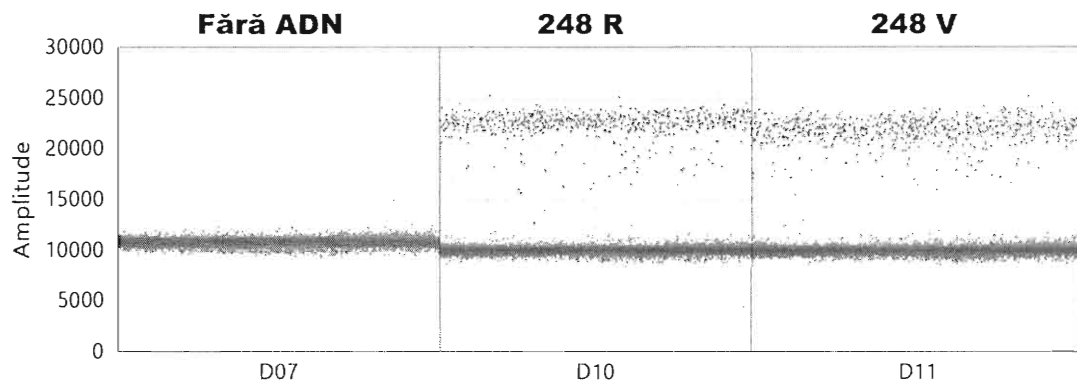
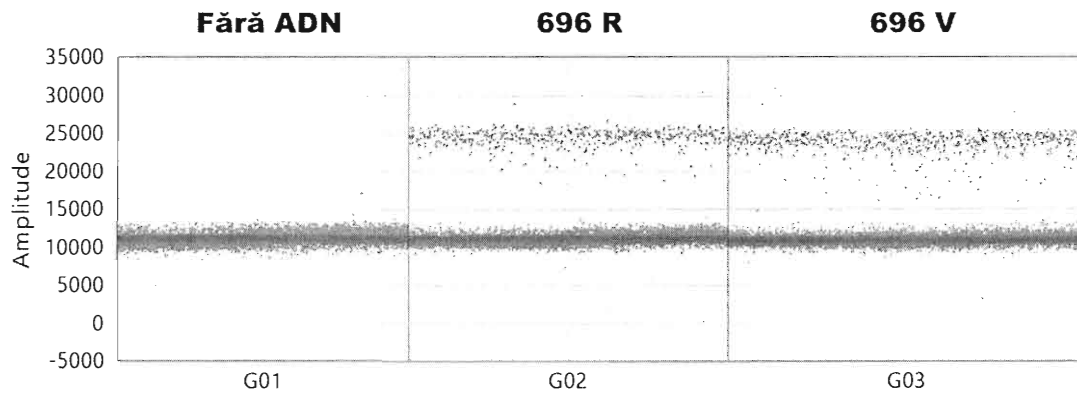
4. Utilizarea seturilor de primeri precizați în tabelul 1 în domeniile în care se utilizează detecția și dozarea mutațiilor genetice, cu scopul identificării originii unei probe biologice de orice fel, cu scopul analizei genetice comparative între două sau mai multe probe biologice sau cu scopul caracterizării calitative și cantitative a unui material biologic de orice fel, care conține un amestec de celule cu origini diferite.

43



42

1

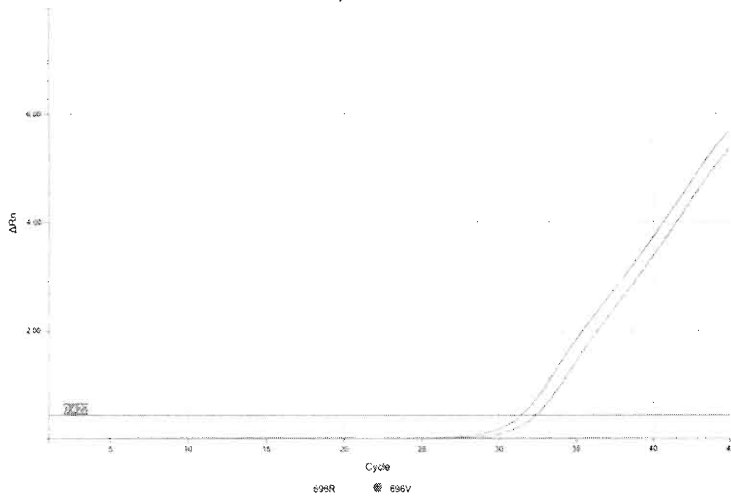


2

60

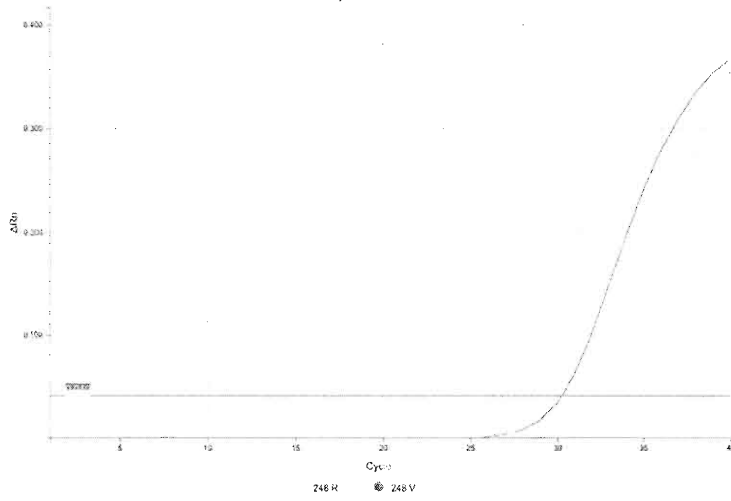
696 R / V

Amplification Plot



248 R / V

Amplification Plot



3