

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040405**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.27

(51) Int. Cl. *C12Q 1/6858* (2018.01)

(21) Номер заявки
201892100

(22) Дата подачи заявки
2018.10.16

(54) **ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ EGFR И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(43) **2020.04.30**

(56) KR-A-2011098440
WO-A1-2018102162
RU-C2-2454462

(96) **2018000124 (RU) 2018.10.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ
ОБЩЕСТВО "БИОКАД" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Гусьнин Григорий Сергеевич,
Соловьев Кирилл Владимирович,
Пестова Наталья Евгеньевна, Иванов
Роман Алексеевич, Морозов Дмитрий
Валентинович (RU)**

(74) Представитель:
Москвич А.С. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, молекулярной биологии и медицины, а именно к диагностической тест-системе для определения мутаций и делеций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента и ее применению в способе для оценки статуса мутаций T790M, L858R и делеций в 19 экзоне (del19) гена EGFR из опухолевой клетки образца от пациента методом ПЦР в режиме реального времени для диагностики *in vitro*, а также в способе прогнозирования ответа на терапию тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), при этом наличие любой из вышеуказанных мутаций или делеций является прогностическим фактором для назначения пациентам с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) терапии тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor (EGFR)).

B1

040405

**040405
B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, молекулярной биологии и медицины, а именно к диагностической тест-системе для определения мутаций и делеций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента и ее применению в способе для оценки статуса мутации T790M в экзоне 20, мутации L858R в экзоне 21 и делеций в 19 экзоне (del19) гена EGFR из опухолевой клетки образца, а также в способе прогнозирования ответа на терапию тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Уровень техники

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) представляет собой морфологически неоднородную группу, включающую в основном плоскоклеточный рак (70-75%), аденокарциному (20-25%) различной степени дифференцировки и другие, редкие формы рака легкого. Частота встречаемости основных мутаций гена EGFR в России составляет 20,2% при аденокарциномах и 4,2% при плоскоклеточном раке легкого (Imyanitov E.N. et al., Distribution of EGFR Mutations in 10,607 Russian Patients with Lung Cancer, *Mol. Diagn. Ther.*, 2016 Aug, 20(4):401-6, DOI: 10.1007/s40291-016-0213-4).

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) - трансмембранный рецептор, в норме активирующийся при связывании с эпидермальным фактором роста - EGF. При активации EGFR запускается внутриклеточный сигнальный каскад RAS-RAF-MAPK (Benvenuti S. et al., Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies, *Cancer Res.*, 2007, 67(6):2643-8), приводящий к повышению пролиферации малигнизированных клеток, росту опухоли, стимуляции процессов инвазии, патологического ангиогенеза и метастазирования (Salomon D.S. et al., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Critical Reviews in Oncology/Haematology*, 1995, 19:183-232; Johnson B.E., Jaenne P.A. (2005), Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Res.*, 65, 7525).

Известен ряд мутаций в тирозин-киназном домене EGFR, приводящих к конститутивной активации рецептора, например мутация T790M в экзоне 20, мутация L858R в экзоне 21 и различные делеции в 19 экзоне (del19) (Pao W., Miller V.A. (2005), Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions, *J. Clin. Oncol.*, 23, 2556; Johnson B.E., Jaenne P.A. (2005), Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Res.*, 65, 7525). Наличие таких мутаций в опухоли коррелирует с ответом на терапию тирозин-киназными ингибиторами (TKI), например такими как эрлотиниб, gefитиниб и афатиниб (Yang Z., Hackshaw A., Feng Q., Fu X., Zhang Y., Mao C., Tang J., Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis, *Int. J. Cancer.*, 2017, 140(12):2805-2819) или таким как осимертиниб (Stratmann J.A. et al., Efficacy and safety analysis of the German expanded access program of osimertinib in patients with advanced, T790M-positive non-small cell lung cancer, *J. Cancer Res. Clin Oncol.*, 2018 Sep 22, DOI: 10.1007/s00432-018-2754-x).

Известен патентный документ WO 2013074977, где описан метод селективной амплификации мутантного аллеля, в частности L858R в EGFR, с применением двух прямых праймеров.

Известен патентный документ WO 2007/039705, где описан метод обнаружения мутаций, в частности L858R, в рецепторе EGFR в биологических жидкостях с использованием двух пар аллель-специфичных праймеров.

Известен патентный документ WO 2012095639, где описан метод детекции наличия или отсутствия вариантного нуклеотида в диагностической области последовательности нуклеиновой кислоты-мишени в образце с применением двух праймеров и олигонуклеотидного зонда, причем второй праймер может быть соединен с зондом с образованием петлеобразной структуры.

Известен патентный документ RU 2454464 C2, где описан молекулярно-генетический способ определения чувствительности опухоли у пациентов с раком легкого на терапию gefитинибом, включающий исследование гена EGFR в образце опухолевой ткани на наличие делеции в 19 экзоне и/или замены L858R в 21 экзоне путем аллель-специфической ПЦР. При выявлении у пациентов любой из двух типов мутаций в гене EGFR назначают им терапию gefитинибом.

Тем не менее существует постоянная потребность в разработке высокоэффективных диагностических тест-систем для определения мутаций и делеций в гене EGFR и методов ее использования.

Диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента по изобретению ("AmpliCAD-EGFR-тест") позволяет с высокой эффективностью, чувствительностью и достоверностью выявлять наиболее распространенные и клинически-значимые мутации и делеции в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, а именно мутацию T790M в экзоне 20, мутацию L858R в экзоне 21 и различные делеции в 19 экзоне, методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени при диагностике *in vitro*, при этом наличие любой из вышеуказанных мутаций или делеций является прогностическим фактором для назначения терапии тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor (EGFR)), например, таких как эрлотиниб, gefитиниб, афатиниб или осимертиниб, для пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Таким образом, высокоэффективное, чувствительное и достоверное выявление наиболее распро-

страненных и клинически-значимых мутаций и делеций в гене EGFR позволяет повысить достоверность и точность данного прогностического фактора для назначения терапии тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor (EGFR)), например таких как эрлотиниб, gefитиниб, афатиниб или осимертиниб, для пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Высокоэффективное, чувствительное и достоверное определение статуса мутаций и делеций гена EGFR и персонализированный подход к выбору терапии, основанный на результатах молекулярно-генетического тестирования, позволяет сделать лечение пациентов более эффективным.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к диагностической тест-системе для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, которая включает следующие компоненты:

а) праймеры и зонд для проведения контрольной реакции (BK) включают в себя следующие специфические последовательности:

BK_F: CTGGAGGCATCCTATTGCACTCCAG (SEQ ID NO: 1);

BK_R: AAGTTCTTCGGTAAGTCACAACATCAAGAACTT (SEQ ID NO: 2);

BK_Z: (FAM) CACCAAAGCTTAGGTGTTTGCTGA (BHQ1) (SEQ ID NO: 3),

б) праймеры и зонд для выявления мутации T790M включают в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_T790M3_3F:

TGAAGCTCAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTTCA (SEQ ID NO: 4);

EGFR_T790M_R:

ATCACGTAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCAGGAAGCCTACGTGAT (SEQ ID NO: 5);

EGFR_T790M_Z: FAM - ACGGTGGAGGTGAGGCAGAT - BHQ1 (SEQ ID NO: 6),

в) праймеры и зонд для выявления мутации L858R включают в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_L858R_F: CGTCCAAATATATGTCAAGATCACAGATTTTGGACG (SEQ ID NO: 7);

EGFR_L858R_R: GTAAGGACCTAAAGCCACCTCCTTAC (SEQ ID NO: 8);

EGFR_L858R-Z: (FAM)-TGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAAT-(BHQ-1) (SEQ ID NO: 9), и

г) праймеры и зонд для выявления делеции в 19 экзоне (del19) включают в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_d19_F: AATCCCGTCGCTATCAA (SEQ ID NO: 10);

EGFR_d19_R: GGGCCTGAGGTTTCAAG (SEQ ID NO: 11);

EGFR_del19_3B: CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGC-Pi (SEQ ID NO: 12);

EGFR_del19_Z: 5'-(FAM)-CTTTGCTGTGTGGGGTCCATG-(BHQ-1)-3' (SEQ ID NO: 13),

е) при необходимости может включать ПЦР-буфер, ДНК-полимеразу, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ионы Mg^{2+} и другие компоненты, необходимые для проведения ПЦР-реакции;

ф) при необходимости положительный контроль ("ПКО"),

г) при необходимости отрицательный контроль ("ОКО"),

где FAM - это флуоресцентный краситель,

BHQ - это гаситель флуоресценции.

В одном из вариантов диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца включает ПЦР-буфер, ДНК-полимеразу, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ионы Mg^{2+} и другие компоненты, необходимые для проведения ПЦР-реакции.

В одном из вариантов диагностической тест-системы для определения мутаций в гене EGFR используется образец из опухолевой клетки пациента-человека.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, который включает проведение параллельно четырех *in vitro* реакций аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени с использованием вышеуказанной диагностической тест-системы, где четыре *in vitro* реакции представляют собой

а) выявление фрагмента 28 экзона гена EGFR (BK),

б) выявление мутации T790M,

в) выявление мутации L858R,

г) выявление мутации del19,

а также может включать при необходимости

е) постановку положительного контроля ("ПКО"), и

ф) постановку отрицательного контроля ("ОКО").

В одном из вариантов способа для определения мутаций в гене EGFR используется образец из опухолевой клетки пациента-человека.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу прогнозирования ответа на терапию тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) путем определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, который включает проведение параллельно четырех *in vitro* реакций аллель-

специфической ПЦР в режиме реального времени с использованием вышеуказанной диагностической тест-системы, где четыре *in vitro* реакции представляют собой

- a) выявление фрагмента 28 экзона гена (ВК),
- b) выявление мутации Т790М,
- c) выявление мутации L858R,
- d) выявление мутации del19,
- a также может включать при необходимости
- e) постановку положительного контроля ("ПКО"), и
- f) постановку отрицательного контроля ("ОКО"),

при этом наличие любой из вышеуказанных мутаций или делеций является прогностическим фактором для назначения пациентам с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) терапии тирозинкиназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor (EGFR));

если значение Ct в реакции ВК выходит за рамки допустимых значений, если слишком много ДНК или слишком мало ДНК, то результаты, полученные в остальных трех реакциях для выявления мутаций, отбраковываются.

В одном из вариантов способа прогнозирования ответа терапии тирозин-киназными ингибиторами (TKI) выбирают из группы: эрлотиниб, gefитиниб, афатиниб или осимертиниб.

В одном из вариантов способа прогнозирования ответа на терапию тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) используют образец из опухолевой клетки пациента-человека.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано определение аналитической чувствительности праймера EGFR_T790M3_3F при выявлении копий плазмидной ДНК с целевой мутацией на фоне плазмидной ДНК дикого типа.

На фиг. 2 показана амплификация плазмидной ДНК с делецией 19 в количестве 300 копий на фоне плазмидной ДНК дикого типа с общим количеством 3000 копий при использовании праймеров и блокеров универсального дизайна. Концентрация блокеров - 0,5 мкМ. Линии: без блокера, блокер 1, блокер 2, блокер 3 - показаны стрелками.

На фиг. 3 показан анализ аналитической чувствительности при помощи 16 независимо приготовленных рабочих образцов с мутацией Т790М.

На фиг. 4 показан анализ аналитической чувствительности при помощи 16 независимо приготовленных рабочих образцов с мутацией L858R.

На фиг. 5 показан анализ аналитической чувствительности при помощи 16 независимо приготовленных рабочих образцов с мутацией del19.

Описание изобретения

Определения и общие методы.

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области или как описано в настоящем документе.

Под "пациентом" понимается любое животное, классифицируемое как млекопитающее, в том числе приматы, люди, грызуны, собачьи, кошачьи, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, лошади, свиньи и т.д.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) представляет собой трансмембранный гликопротеин - тирозинкиназу, являющуюся членом семейства erbB рецептора. EGFR состоит из гликозилированного наружного лиганд-связывающего домена (621 остаток) и цитоплазматического домена (542 остатка), связанных коротким трансмембранным линкером из 23 аминокислот. Внеклеточная часть EGFR содержит 25 дисульфидных мостиков, 12 N-связанных сайтов гликозилирования и обычно считается состоящей из четырех субдоменов. Рентгеновские кристаллические структуры EGFR позволяют полагать, что рецептор может принимать как аутоингибируемую связанную конформацию, которая неспособна связывать эпидермальный фактор роста (EGF) (Ferguson et al., Mol. Cell, 2003, vol. 11:507-517), так и активную конформацию, которая может опосредовать связывание лиганда EGF и димеризацию рецептора (Garrett et al., Cell, 2002, vol. 110:763-773; Ogiso et al., Cell, 2002, vol. 110:775-787).

Термин "праймер" означает олигонуклеотид, способный выступать в роли точки инициации синтеза

продукта удлинения праймера, представляющего собой комплементарную нить нуклеиновой кислоты (всех типов ДНК или РНК), в подходящих условиях амплификации (например, буфер, соль, температура и pH) в присутствии нуклеотидов и агента, полимеризующего нуклеиновые кислоты (например, ДНК-зависимую или РНК-зависимую полимеразу). Праймер может быть однонитевым или двуниевым. В случае двуниевых праймеров перед использованием для получения продуктов удлинения праймер может быть особым образом обработан (например, денатурирован) для расхождения нитей. Обычно такая стадия денатурации проводится с помощью высокой температуры, но альтернативно может проводиться с помощью щелочи с последующей нейтрализацией. Праймеры по настоящему изобретению имеют приблизительную длину от 15 до 50 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 20 до 40 нуклеотидов, наиболее предпочтительно приблизительно от 22 до 30 нуклеотидов. Праймеры по настоящему изобретению могут содержать дополнительные нуклеотиды, помимо детально описанных в настоящем документе. Например, праймеры, используемые в SDA, могут включать сайт распознавания рестрикционной эндонуклеазы на 5'-конце последовательности, связывающейся с мишенью (см. патенты США № 5270184 и 5455166). Праймеры для NASBA и TMA могут включать промотер РНК-полимеразы, сцепленный с последовательностью праймера, связывающейся с мишенью. Способы сцепления таких особых последовательностей с последовательностью, связывающейся с мишенью, для использования в выбранной реакции амплификации хорошо известны специалистам в области техники. Кроме того, в определенных случаях праймер может быть мечен детектируемой меткой.

Фраза "прямой (forward или F) праймер" означает праймер, гибридизующийся (или отжигающийся) с последовательностью-мишенью (например, матричная нить). Фраза "обратный (reverse или R) праймер" означает праймер, гибридизующийся (или отжигающийся) с комплементарной нитью последовательности-мишени. Прямой праймер гибридизуется ближе к 5'-концу последовательности мишени, чем обратный праймер.

Фразы "последовательность-мишень" или "нуклеиновая кислота-мишень" в настоящем документе используются взаимозаменяемо и означают объект, чье присутствие или отсутствие необходимо обнаружить. В контексте настоящего изобретения последовательность-мишень предпочтительно включает нуклеотидную последовательность, с которой один или более праймеров могут образовывать комплекс. Последовательность-мишень также может включать область, гибридизующуюся с зондом, с которой зонд может образовывать стабильный гибрид в соответствующих условиях амплификации. Специалисту в области техники очевидно, что последовательность-мишень может быть однонитевой или двуниевой. В контексте настоящего изобретения искомые последовательности-мишени локализованы в области гена EGFR. Материалом для исследования диагностической тест-системой для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест") являются препараты нуклеиновых кислот, выделенные из срезов биопсийного/операционного материала ткани немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека, фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE).

Как используется в настоящем документе фраза "набор праймеров и зондов для выявления" или "праймеры и зонд для выявления" означает комбинацию, включающую два или более праймеров, которые в совокупности служат заправкой для амплификации последовательности-мишени или нуклеиновой кислоты-мишени, и по меньшей мере один зонд, способный обнаружить последовательность-мишень или нуклеиновую кислоту-мишень. В общем случае зонд гибридизуется с нитью продукта амплификации (или ампликона), что приводит к образованию гибрида продукта амплификации с зондом, который можно обнаружить с помощью стандартных способов, известных из уровня техники.

Диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест") позволяет выявлять наиболее распространенные и клинически-значимые мутации в гене EGFR методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени с использованием прибора Rotor-Gene Q и его программного обеспечения для анализа результатов.

Выявление мутаций проходит в трех независимых реакциях:

- 1) выявление мутации L858R в 21 экзоне (2573T>G 6224);
- 2) выявление мутации T790M в 20 экзоне (2369C>T 6240);
- 3) выявление любой из 19 делеций (указанных в табл. 1) 19 экзона, но без различия между ними.

Таблица 1

Список мутаций, выявляемых набором "AmpliCAD-EGFR-тест"

№	Название	Изменение в кодонах	Номер в базе данных COSMIC
1.	T790M	2369C>T 6240	6240
2.	L858R	2573T>G	6224
3.	Делеции в 19-ом экзоне («AmpliCAD-EGFR-тест») способен выявлять и другие, более редкие делеции в 19-ом экзоне гена EGFR. В списке приведены наиболее часто встречающиеся делеции в 19-ом экзоне, в отношении которых были определены параметры эффективности набора)	2235 2249del15	6223
4.		2235 2252>AAT	13551
5.		2236 2253del18	12728
6.		2237 2251del15	12678
7.		2237 2254del18	12367
8.		2237 2255>T	12384
9.		2236 2250del15	6225
10.		2238 2255del18	6220
11.		2238 2248>GC	12422
12.		2238 2252>GCA	12419
13.		2239 2247del9	6218
14.		2239 2253del15	6254
15.		2239 2256del18	6255
16.		2239 2248TTAAGAGAAG>C	12382
17.		2239 2258>CA	12387
18.		2240 2251del12	6210
19.		2240 2257del18	12370
20.		2240 2254del15	12369
21.		2239_2251>C	12383

Состав диагностической тест-системы для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест") указан в табл. 2.

Таблица 2

Название реагента	Описание реагента	Объем реагента, мл
Реакционная смесь «ПЦР-микс»	Буферный раствор, содержащий в том числе дезоксинуклеозидтрифосфаты, соли Mg ²⁺ и ДНК-полимеразу. Консервант - азид натрия.	0,5
Смесь праймеров и зондов «T790M»	Вода, не содержащая нуклеаз; олигонуклеотид немеченый, специфичный к мутантной форме участка экзона 20, которая содержит мутацию, соответствующую замене T790M («прямой» праймер); олигонуклеотид немеченый, специфичный к участку экзона 20 («обратный» праймер); олигонуклеотид, флуоресцентно-меченый, специфичный к участку экзона 20 («зонд»). Последовательности праймеров и зонда указаны ниже.	0,7
Смесь праймеров и зондов «L858R»	Вода, не содержащая нуклеаз; олигонуклеотид немеченый, специфичный к мутантной форме участка экзона 21, которая содержит мутацию, соответствующую замене L858R («прямой» праймер); олигонуклеотид немеченый, специфичный к участку экзона 21 («обратный» праймер); олигонуклеотид, флуоресцентно-меченый, специфичный к участку экзона 21 («зонд»). Последовательности праймеров и зонда указаны ниже.	0,7
Смесь праймеров и зондов «del19»	Вода, не содержащая нуклеаз; олигонуклеотид немеченый, специфичный к участку экзона 19 («прямой праймер»); олигонуклеотид, специфичный к экзону 19 дикого типа («блокер»); олигонуклеотид немеченый, специфичный к участку экзона 19 («обратный» праймер); олигонуклеотид, флуоресцентно-меченый, специфичный к участку экзона 19 («зонд»). Последовательности праймеров и зонда указаны ниже.	0,7

Положительный контрольный образец «ПКО» (при необходимости)	Смесь рекомбинантных плазмидных ДНК, содержащих все искомые мутации. «ПКО» необходим для проверки того, чтобы ненадлежащее состояние реактивов в составе набора, техническое состояние прибора, выбранный режим амплификации или пробоподготовка не привели к отсутствию или подавлению амплификации даже при наличии целевых молекул ДНК в образце.	0,5
Смесь праймеров и зондов для проведения контрольной реакции («ВК»)	Вода, не содержащая нуклеаз; олигонуклеотид немеченый, специфичный к участку экзона 28 («прямой» праймер); олигонуклеотид немеченый, специфичный к участку экзона 28 («обратный» праймер); олигонуклеотид, флуоресцентно-меченный, специфичный к участку экзона 28 («зонд»). Последовательности праймеров и зонда указаны ниже.	0,7
Отрицательный контрольный образец «ОКО» (при необходимости)	Вода деионизованная, не содержащая нуклеаз. «ОКО», необходима для проверки того, что амплификация не является следствием случайного нежелательного попадания ДНК из окружающего воздуха или поверхностей в пробирку или из одной пробирки в другую (контаминации).	1,5

Смесь праймеров и зондов для проведения контрольной реакции ("ВК").

ВК_F: CTGGAGGCATCCTATTGCACTCCAG (SEQ ID NO: 1);

ВК_R: AAGTTCTTCGGTAAGTCACAACATCAAGAACTT (SEQ ID NO: 2);

ВК_Z: FAM CACCAAAGCTTAGGTGTTTGCTGA BHQ1 (SEQ ID NO: 3).

Смесь праймеров и зондов "T790M", включающих в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_T790M3_3F:

TGAAGCTCAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTTCA (SEQ ID NO: 4);

EGFR_T790M_R:

ATCACGTAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCAGGAAGCCTACGTGAT (SEQ ID NO:5);

EGFR_T790M_Z: (FAM) - ACGGTGGAGGTGAGGCAGAT - (BHQ1) (SEQ ID NO: 6).

Смесь праймеров и зондов "L858R", включающих в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_L858R_F: CGTCCAAATATATGTCAAGATCACAGATTTTGGACG (SEQ ID NO: 7);

EGFR-L858R_R: GTAAGGACCTAAAGCCACCTCCTTAC (SEQ ID NO: 8);

EGFR_L858_Z: (FAM)-TGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAAT-(BHQ-1) (SEQ ID NO: 9).

Смесь праймеров и зондов "del19", включающих в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_d19_F: AATCCCGTCGCTATCAA (SEQ ID NO: 10);

EGFR_d19_R: GGCCTGAGGTTTAC (SEQ ID NO: 11);

EGFR_del19_3B: CCGTTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGC-Pi (SEQ ID NO: 12);

EGFR_del19_Z: (6-FAM)-CTTTGCTGTGTGGGGTCCATG-(BHQ-1) (SEQ ID NO: 13).

Принцип метода, положенного в основу работы диагностической тест-системы для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест") основан на полимеразной цепной реакции с аллель-специфическими праймерами в режиме реального времени.

Метод заключается в добавлении в реакционную смесь ДНК, полученной из исследуемого образца, специфических олигонуклеотидов "праймеров", соответствующих последовательности участка-мишени ДНК, специфического олигонуклеотида "зонда", содержащего флуоресцентную метку FAM (6-карбоксихлорофлуоресцеин) с 5'-конца и гаситель флуоресценции BHQ-1 с 3'-конца, а также фермента - ДНК-полимеразы (обладающей 5'-3' экзонуклеазной активностью) с последующей инкубацией в условиях, необходимых для работы фермента. При этом увеличивается количество копий участка-мишени (амплификация). В ходе синтеза каждой новой копии участка-мишени ДНК разрушается флуоресцентно меченный олигонуклеотид (зонд) за счет действия ДНК-полимеразы, так что флуоресцентная метка FAM перестает находиться с гасителем BHQ-1 в составе одной молекулы и способна флуоресцировать. Поэтому в каждый момент времени интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству копий участка-мишени в растворе.

Для определения мутационного статуса гена EGFR по каждой из искомым мутаций, анализируются результаты ПЦР с ДНК исследуемого образца в двух различных реакционных смесях, первая из которых содержит праймеры и зонд для обнаружения искомой мутации (в случае ее наличия), а вторая содержит праймеры и зонд для амплификации фрагмента гена "внешнего эндогенного контроля амплификации" (ВК). В представляемой тест-системе фрагментом гена внешнего эндогенного контроля (ВК) является участок 28 экзона гена EGFR. Выбор этого участка обусловлен его относительно низкой полиморфностью, а также его близостью к исследуемым участкам гена EGFR.

Наличие амплификации во второй реакции (с праймерами и зондом для ВК) будет свидетельство-

вать о надлежащем состоянии ПЦР-реактивов в составе набора реагентов, о достаточном для амплификации количестве ДНК в реакции (контроль внесения образца), а также о приемлемом для амплификации качестве исследуемой ДНК (контроль выделения и очистки ДНК).

В составе набора реагентов также предусмотрены положительный контрольный образец "ПКО" и отрицательный контрольный образец "ОКО". ПКО представляет собой смесь плазмидных ДНК, содержащих все искомые мутации и фрагмент ВК, и он необходим для проверки того, чтобы ненадлежащее состояние реактивов в составе набора реагентов, техническое состояние прибора, выбранный режим амплификации или пробоподготовка не привели к отсутствию или подавлению амплификации даже при наличии целевых молекул ДНК в образце. ОКО не содержит ДНК, и он необходим для проверки того, что амплификация не является следствием случайного нежелательного попадания ДНК из окружающей среды в реакционную смесь (контаминации) или из соседней пробирки (кросс-контаминация).

Все реакции при проведении анализа рекомендуется проводить в 2-х повторях.

ДНК с мутациями в препаратах геномной ДНК, выделенной из FFPE-срезов опухолевых тканей или биопсийного/операционного материала, сильно разбавлены соответствующими последовательностями ДНК дикого типа и их трудно обнаружить. ПЦР с аллель-специфическими праймерами является методом обнаружения мутаций в геномной ДНК, позволяющим находить небольшое количество мутантных ДНК на фоне большого числа молекул ДНК, не содержащих мутацию (дикого типа). Аллель-специфические праймеры, полностью комплементарные мутантным последовательностям анализируемой ДНК, амплифицируют преимущественно только мутантные последовательности.

Аналитическая чувствительность.

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения):

для мутации L858R - 75 копий/реакция (что соответствует 2,5%);

для мутации T790M - 30 копий/реакция (что соответствует 1%);

для делеции в экзоне 19 - 150 копий/реакция (что соответствует 5%).

Аналитическая специфичность.

Аналитической специфичности диагностической тест-системы - это способность не выявлять детектируемые с помощью диагностической тест-системы мутации в ДНК в последовательностях других участков ДНК генома человека и в последовательностях ДНК гена EGFR человека, не содержащей указанные мутации.

Аналитическая специфичность была подтверждена экспериментально. Результаты исследования показали, что присутствие в реакции ДНК трех гомологов гена EGFR (HER2, HER3 и HER4) и бактерий *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* не влияет на оценку мутационного статуса образцов с помощью исследуемого набора реагентов. Таким образом, была подтверждена аналитическая специфичность диагностической тест-системы для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест"), а именно отсутствие кросс-реагирования с ДНК гомологов гена EGFR, соответствующей участкам гена EGFR, с детектируемыми мутациями и с компонентами клеточных распространённых микроорганизмов.

Наличие амплификации в положительном контрольном образце.

При постановке можно убедиться в надлежащем состоянии реактивов в составе набора реагентов, техническом состоянии прибора, выбранном режиме амплификации и пробоподготовке для исключения ложноотрицательных результатов. Такая проверка осуществляется путем постановки ПЦР с каждой из четырех смесей праймеров и зондов и положительным контрольным образцом ("ПКО"), который может входить в диагностическую тест-систему для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест"). "ПКО" содержит смесь рекомбинантных плазмид, содержащих участки гена EGFR с детектируемыми мутациями. ПЦР с "ПКО" можно проводить при каждом проведении анализа с помощью диагностической тест-системы для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест").

Контроль контаминации.

При постановке можно убедиться, что амплификация не является следствием случайного нежелательного попадания ДНК из окружающего воздуха или поверхностей в пробирку или из одной пробирки в другую (контаминации) для исключения ложноположительных результатов. Такая проверка может осуществляться путем постановки ПЦР с каждой из четырех смесей праймеров и зондов и отрицательным контрольным образцом ("ОКО"), который может входить в состав диагностической тест-системы для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест"). "ОКО" представляет собой воду деионизованную, не содержащую нуклеаз и нуклеиновых кислот. ПЦР с "ОКО" можно проводить при каждом проведении анализа с помощью диагностической тест-системы для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента ("AmpliCAD-EGFR-тест").

Таким образом, диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента по изобретению ("AmpliCAD-EGFR-тест") позволяет с высокой эффективностью, чувствительностью и достоверностью выявлять наиболее распространённые и клинически значимые мутации и делеции в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, а именно мутацию

T790M в экзоне 20, мутацию L858R в экзоне 21 и различные делеции в 19 экзоне, методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени при диагностике *in vitro*, при этом наличие любой из вышеуказанных мутаций или делеций является прогностическим фактором для назначения терапии тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor (EGFR)), например таких как эрлотиниб, gefитиниб, афатиниб или осимертиниб, для пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Высокоэффективное, чувствительное и достоверное выявление наиболее распространенных и клинически-значимых мутаций и делеций в гене EGFR позволяет повысить достоверность и точность данного прогностического фактора для назначения терапии тирозин-киназными ингибиторами (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor (EGFR)), например таких как эрлотиниб, gefитиниб, афатиниб или осимертиниб, для пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Высокоэффективное, чувствительное и достоверное определение статуса мутаций и делеций гена EGFR и персонализированный подход к выбору терапии, основанный на результатах молекулярно-генетического тестирования, позволяет сделать лечение пациентов более эффективным.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации, включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема предлагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы.

Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов.

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 4000 т.п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сэнгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях.

Применяли пакет программ фирмы Infomax's Vector NTI Advance suite, версия 8.0, для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Пример 1. Дизайн олигонуклеотидов (праймеров и зонда) для выявления мутации T790M в 20 экзоне гена EGFR.

Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зондов были подобраны с использованием общедоступных программ, таких как, например, Primer3Plus (<http://primer3plus.com>) или IDT OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Принцип действия аллель-специфических праймеров основан на чувствительности ДНК-полимеразы к несовпадениям (мисматчам) нуклеотидов на 3'-конце дуплексов праймер-ДНК. Аллель-специфические праймеры подбирали таким образом, чтобы последний нуклеотид на 3'-конце совпадал с целевой мутацией, благодаря чему должна существенно снижаться амплификация ДНК-последовательностей, не содержащих мутацию (последовательность дикого типа). Помимо этого, для увеличения способности праймера к дискриминации целевой последовательности и последовательности дикого типа вводили дополнительный мисматч во втором или третьем положении со стороны 3'-конца. Для экспериментальной проверки были сконструированы шесть различных "прямых" (forward) праймеров (EGFR_T790M2_1F, EGFR_T790M2_2F, EGFR_T790M2_3F, EGFR_T790M3_1F, EGFR_T790M3_2F, EGFR_T790M3_3F), отличающихся дополнительными мисматчами во втором или третьем положении относительно 3'-конца. Также был сконструирован общий "обратный" (reverse) праймер (EGFR_T790M_R) и общий "зонд" (EGFR_T790M_Z), которые использовались в каждой реакции вместе с одним из прямых аллель-специфических праймеров.

Праймеры включали в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_T790M2_1F: 5'-TTCAGCTCGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTGAA-3';
 EGFR_T790M2_2F: 5'-TACAGCTCGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTGTA-3';
 EGFR_T790M2_3F: 5'-TCCAGCTCGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTGGA-3';
 EGFR_T790M3_1F: 5'-TGGAGCTCCG TAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTCCA-3';

EGFR_T790M3_2F: 5'-TGTAGCTCAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTACA-3';
 EGFR_T790M3_3F: 5'-TGAAGCTCAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTTCA-3';
 EGFR_T790M_R: 5'-ATCACGTAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCAGGAAGCCTACGTGAT-3'.

Зонд включал в себя следующую специфическую последовательность: EGFR_T790M_Z (FAM) - ACGGTGGAGGTGAGGCAGAT - (BHQ1),

где FAM - это флуоресцентный краситель,
 BHQ - это гаситель флуоресценции.

Работоспособность праймеров оценивали по эффективности амплификации соответствующего фрагмента 20 экзона гена EGFR в реакции ПЦР в режиме реального времени. Реакцию проводили в объеме 20 мкл.

Состав реакционной смеси.

H₂O (деионизованная вода без нуклеаз),

1 X ПЦР-буфер (10 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 100 mM KCl),

MgCl₂ - конечная концентрация 3 mM,

dNTP - конечная концентрация каждого нуклеотидтрифосфата 0,2 mM,

Taq-полимераза (с "горячим стартом" (hot-start) и 5'-3' экзонуклеазной активностью) - 1 U (ед.),

прямой праймер - конечная концентрация 500 nM,

обратный праймер - конечная концентрация 500 nM,

зонд (меченый FAM) - конечная концентрация 250 nM,

плазмидная ДНК 2ul.

ПЦР в режиме реального времени проводили при помощи прибора Rotor-Gene Q (Qiagen). Программа амплификации состояла из стадии активации hot-start Taq-полимеразы при 95°C в течение 5 мин, далее следовало 45 циклов, состоящих из стадий денатурации (при 95°C в течение 15 с) и отжига, совмещенного с элонгацией (55°C в течение 60 с). После стадии отжига/элонгации происходило считывание флуоресцентного сигнала от флуорофора FAM.

Была проведена проверка работы каждой пары праймеров при различных температурах отжига на стадии отжига/элонгации (52, 55, 60°C). В качестве матрицы использовались образцы плазмидной ДНК, содержащие 6000 копий целевой ДНК дикого типа или 600 копий ДНК с мутацией T790M (10% от дикого типа). Для дальнейших исследований был выбран праймер EGFR_T790M3_3F, так как он неожиданно продемонстрировал наилучшую эффективность амплификации ДНК с целевой мутацией. Температура отжига была выбрана 55°C.

Для определения аналитических характеристик праймера EGFR_T790M3_3F была проведена реакция ПЦР в режиме реального времени, где в качестве исследуемого образца использовались следующие модельные образцы, содержащие плазмидную ДНК:

- 1) 6000 копий ДНК дикого типа (образец, не содержащий мутацию);
- 2) 6000 копий ДНК дикого типа+600 копий ДНК с мутацией T790M (10% ДНК с мутацией);
- 3) 6000 копий ДНК дикого типа+300 копий ДНК с мутацией T790M (5% ДНК с мутацией);
- 4) 6000 копий ДНК дикого типа+60 копий ДНК с мутацией T790M (1% ДНК с мутацией) (фиг. 1).

Анализ полученных кривых амплификации основан на определении значения Ct (Cycle Threshold) - это цикл амплификации, соответствующий точке пересечения кривой амплификации и пороговой линии. В качестве показателя эффективности был использован параметр Δ Ct, определяемый как разница между Ct в реакции с матрицей дикого типа и Ct в реакции с матрицей, содержащей мутацию. Чем больше Δ Ct, тем больше специфичность. Обнаружение 60 копий мутантной ДНК на фоне 6000 копий ДНК дикого типа происходило эффективно (фиг. 1): все результаты, которые были получены, можно считать приемлемыми для выявления целевой мутации в образцах с содержанием мутантной ДНК менее 1%.

Пример 2. Дизайн олигонуклеотидов (праймеров, блокера и зонда) для выявления делеций (del19) в 19 экзоне гена EGFR.

Для конструирования системы праймеров, которая могла бы выявлять любую делецию в 19 экзоне гена EGFR, но не делать различия между ними, есть два подхода. Первый "индивидуальный", когда для выявления каждой делеции создается своя отдельная пара праймеров, а второй подход "универсальный", когда одна пара праймеров способна выявлять любую из делеций. Под "универсальной" парой праймеров здесь и далее подразумевается пара праймеров, специфичных к участкам, одинаковым как для мутантных вариантов гена, так и для дикого типа. Разделение аллельных форм при этом может осуществляться разными способами. В рамках разработки описываемой тест-системы было предложено использование олигонуклеотида-"блокера", специфичного к участку гена EGFR без делеций. Сайты посадки блокера и соответствующего праймера должны перекрываться. В противном случае полимеразы начнет удлинять спаренный 3'-конец праймера и, дойдя до места посадки блокера, будет его вытеснять за счет 5'-3'-эксонуклеазной активности – так же, как она вытесняет зонд. Таким образом, блокер должен специфично подавлять амплификацию ДНК дикого типа. "Универсальный" дизайн обладает рядом преимуществ перед дизайном с парами праймеров для каждой мутации в отдельности.

Использование универсальной пары праймеров позволяет легче достичь следующих целей:

- 1) минимизации образования гетеродимеров олигонуклотидов;
- 2) обеспечение одинаковой эффективности амплификации ДНК с различными мутациями;
- 3) минимизация затрат ресурсов при синтезе праймеров.

Был предложен и проверен вариант универсальных праймеров и блокера с перекрывающимися сайтами связывания на матрице.

Праймеры, блокеры и зонд включали в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_d19_F: 5'-AATCCCGTCGCTATCAA-3';

EGFR_d19_R: 5'-GGGCCTGAGGTTTCAG-3';

Блокер 1: EGFR_del19_1B: 5'-GCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCG-Pi-3';

Блокер 2: EGFR_del19_2B: 5'-TCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTC-Pi-3';

Блокер 3: EGFR_del19_3B: 5'-CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGC-Pi-3';

EGFR_del19_Z: 5'-(FAM)-CTTTGCTGTGTGGGGTCCATG-(BHQ1)-3'.

Работоспособность праймеров оценивали по эффективности амплификации соответствующего фрагмента 19 экзона гена EGFR в реакции ПЦР в режиме реального времени. Реакцию проводили в объеме 20 мкл.

Состав реакционной смеси.

H₂O (деионизованная вода без нуклеаз),

1 X ПЦР-буфер (10 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 100 mM KCl),

MgCl₂ - конечная концентрация 3 mM,

dNTP - конечная концентрация каждого нуклеотидтрифосфата 0,2 mM,

Taq-полимераза (с "горячим стартом" (hot-start) и 5'-3' экзонуклеазной активностью) - 1 U (ед.),

прямой праймер - конечная концентрация 500 nM,

обратный праймер - конечная концентрация 500 nM,

блокер - конечная концентрация (0,5-2,5 mM),

зонд (меченый FAM) - конечная концентрация 250 nM,

плазмидная ДНК 2ul.

Программа амплификации состояла из стадии активации hot-start Taq-полимеразы при 95°C в течение 5 мин, далее следовало 45 циклов, состоящих из стадий денатурации (при 95°C в течение 15 с) и отжига, совмещенного с элонгацией (55°C в течение 60 с). После стадии отжига/элонгации происходило считывание флуоресцентного сигнала от флуорофора FAM.

В качестве праймеров использовались EGFR_d19_F и EGFR_d19_R. Для проверки эффективности дизайна с универсальными праймерами прежде всего был сделан выбор между тремя вариантами блокера. Блокеры проверялись в двух концентрациях: 0,5 и 2,5 мкМ. Для проверки была выбрана делеция 19, так как эта делеция максимально сдвинута "вправо", оставляя наибольшую протяженность перекрытия с блокерами. Таким образом, она представляла наихудший случай применения блокеров: если они эффективны с этой делецией и не блокируют ее амплификацию значительно, то с остальными делециями эффективность ожидалась еще большая.

На основании результатов эксперимента был сделан выбор в пользу блокера 3 (EGFR_del19_3B), так как он неожиданно наиболее эффективно блокировал амплификацию ДНК дикого типа как в концентрации 2,5 мкМ, так и в концентрации 0,5 мкМ, а ингибирование мутантной ДНК при этом было незначительно (фиг. 2). Результаты проверки панели делеций с олигонуклеотидами универсального дизайна были проанализированы для количественной оценки эффективности использованного сочетания олигонуклеотидов. Так как амплификация ДНК дикого типа наблюдалась во всех образцах, в качестве показателя эффективности был использован параметр ΔC_t , определяемый как разница между C_t в реакции с матрицей дикого типа и C_t в реакции с матрицей, содержащей делецию. Чем больше ΔC_t , тем больше специфичность. Результат можно считать приемлемым, если ΔC_t определялся как минимум в двух из трех повторов и был больше, чем стандартная ошибка. Обнаружение 300 копий мутантной ДНК на фоне ДНК дикого типа происходило эффективно.

Пример 3. Дизайн олигонуклеотидов (праймеров и зонда) для выявления мутации L858R в 21 экзоне гена EGFR.

С использованием общедоступных программ были подобраны олигонуклеотидные последовательности праймеров и зонда, включающих в себя следующие специфические последовательности:

праймеры и зонд для выявления мутации L858R включают в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_L858R_F: CGTCCAAATATATGTCAAGATCACAGATTTTGGACG (SEQ ID NO: 7);

EGFR_L858R_R: GTAAGGACSTAAAGCCACCTCCTTAC (SEQ ID NO: 8);

EGFR_L858R_Z: (FAM)-TGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAAT-(BHQ-1) (SEQ ID NO: 9),

где FAM - это флуоресцентный краситель,

BHQ1 - это гаситель флуоресценции.

Работоспособность праймеров оценивали по эффективности амплификации соответствующего фрагмента 21 экзона гена EGFR в реакции ПЦР в режиме реального времени. Реакцию проводили в объ-

еме 20 мкл.

Состав реакционной смеси.

H₂O (деионизованная вода без нуклеаз),

1 X ПЦР-буфер (10 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 100 mM KCl),

MgCl₂ - конечная концентрация 3 mM,

dNTP - конечная концентрация каждого нуклеотидтрифосфата 0,2 mM,

Taq-полимераза (с "горячим стартом" (hot-start) и 5'-3' экзонуклеазной активностью) - 1 U (ед.),

прямой праймер - конечная концентрация 500 nM,

обратный праймер - конечная концентрация 500 nM,

зонд (меченый FAM) - конечная концентрация 250 nM,

плазмидная ДНК 2ul.

ПЦР в режиме реального времени проводили при помощи прибора Rotor-Gene Q (Qiagen). Программа амплификации состояла из стадии активации hot-start Taq-полимеразы при 95°C в течение 5 мин, далее следовало 45 циклов, состоящих из стадий денатурации (при 95°C в течение 15 с) и отжига совмещенного с элонгацией (55°C в течение 60 с). После стадии отжига/элонгации происходило считывание флуоресцентного сигнала от флуорофора FAM.

Для определения аналитических характеристик праймера EGFR-L858R F была проведена реакция ПЦР в режиме реального времени, где в качестве исследуемого образца использовались следующие модельные образцы, содержащие плазмидную ДНК:

- 1) 6000 копий ДНК дикого типа (образец, не содержащий мутацию);
- 2) 6000 копий ДНК дикого типа+600 копий ДНК с мутацией T790M (10% ДНК с мутацией);
- 3) 6000 копий ДНК дикого типа+300 копий ДНК с мутацией T790M (5% ДНК с мутацией);
- 4) 6000 копий ДНК дикого типа+150 копий ДНК с мутацией T790M (2,5% ДНК с мутацией);
- 5) 6000 копий ДНК дикого типа+60 копий ДНК с мутацией T790M (1% ДНК с мутацией).

Анализ полученных кривых амплификации основан на определении значения Ct (Cycle Treshold) - это цикл амплификации, соответствующий точке пересечения кривой амплификации и пороговой линии. В качестве показателя эффективности был использован параметр ΔCt, определяемый как разница между Ct в реакции с матрицей дикого типа и Ct в реакции с матрицей, содержащей мутацию. Чем больше ΔCt, тем больше специфичность. Обнаружение 150 копий мутантной ДНК на фоне 6000 копий ДНК дикого типа происходило эффективно, тогда как обнаружение 60 копий мутантной ДНК на фоне 6000 копий ДНК дикого типа происходило с гораздо меньшей эффективностью. Результаты, которые были получены, можно считать приемлемыми для выявления целевой мутации в образцах с содержанием мутантной ДНК не менее 2,5%.

Пример 4. Дизайн олигонуклеотидов (праймеров и зонда) для контрольной реакции (BK).

Для определения мутационного статуса гена EGFR по каждой из искомым мутаций анализируются результаты ПЦР с ДНК исследуемого образца в двух различных реакционных смесях, первая из которых содержит праймеры и зонд для обнаружения искомой мутации (в случае ее наличия) (см. пример 1), а вторая содержит праймеры и зонд для амплификации фрагмента гена "внешнего эндогенного контроля амплификации". В представляемой тест-системе фрагментом гена внешнего контроля (BK) является участок 28 экзона гена EGFR. Выбор этого участка обусловлен его относительно низкой полиморфностью, а также его близостью к исследуемым участкам гена EGFR.

С использованием общедоступных программ были подобраны олигонуклеотидные последовательности праймеров и зонда, включающих в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_BK_F: 5'-CTGGAGGCATCCTATTGCACTCCAG-3';

EGFR_BK_R: 5'-AAGTTCTTCGGTAAGTCACAACATCAAGAACTT-3';

EGFR_BK_Z: 5'-(FAM)-CACCAAAGCTTAGGTGTTTGCTGA-(BHQ1)-3'.

Наличие амплификации в реакции (с праймерами и зондом для BK) будет свидетельствовать о надлежащем состоянии ПЦР-реактивов в составе набора реагентов, о достаточном для амплификации количестве ДНК в реакции (контроль внесения образца), а также о приемлемом для амплификации качестве исследуемой ДНК (контроль выделения и очистки ДНК). Значение C_t в реакции с праймерами и зондами смеси "BK" для каждого из образцов должно быть в диапазоне от 23 до 34.

Если в реакции со смесью праймеров и зондов "BK" не определяется пороговый цикл или значение C_t превышает норму (из указанного диапазона), причиной этого может быть низкая концентрация ДНК в образце, недостаточное ее качество или наличие примесей, ингибирующих ПЦР. Дальнейший анализ результатов ПЦР с этим образцом не проводится, ДНК для этого образца необходимо выделить заново и повторить постановку анализа.

Если значение C_t в реакции образцов с праймерами и зондами смеси "BK" ниже нормы (из указанного диапазона), причиной этого может быть избыточное количество ДНК в образце; постановку необходимо провести заново, и перед повторным тестированием образец необходимо развести деионизованной водой в 10 раз.

Пример 5. Алгоритм детекции мутаций.

Каждый сет амплификации (набор проб для одного запуска прибора) помимо исследуемых образцов должен содержать ПКО и ОКО. При использовании прибора Rotor-Gene Q для проведения ПЦР в режиме реального времени после завершения программы амплификации необходимо удалить из анализа данные, полученные на первых 10 циклах амплификации, и после этого установить пороговую линию (Threshold) на уровне 0,03. Далее следует проанализировать результаты ПЦР в пробирках с деионизованной водой в качестве образца (ОКО) и только в том случае, если во всех реакциях с ОКО не определяется пороговый цикл и не стоит комментарий "Multi-Ct", можно переходить к следующему этапу анализа. Далее следует проанализировать результаты ПЦР в пробирках с ПКО и только в том случае, если во всех четырех реакциях с ПКО определяется пороговый цикл, можно переходить к следующему этапу анализа. Далее следует проанализировать результаты ПЦР в пробирках с исследуемыми образцами (отдельно каждый образец). Если в реакции со смесью праймеров и зондов "T790M", "L858R" или "del19" не определяется пороговый цикл и не стоит комментарий "Multi-Ct", результатом этой реакции считается пороговый цикл 45, и именно это значение используется для дальнейших расчетов. Далее следует проанализировать результаты ПЦР в пробирках с ВК. Значение C_t в реакции с праймерами и зондами смеси "ВК" для каждого из образцов должно быть в диапазоне от 23 до 34. Из значений C_t в реакции с праймерами и зондами "T790M", "L858R" и "del19" для каждого из образцов, прошедших предыдущие этапы обработки, необходимо вычесть соответствующее значение C_t в реакции образца с праймерами и зондами смеси "ВК". Получившиеся числа (ΔC_t) необходимо сравнить с максимальными допустимыми значениями:

статус "Есть мутация T790M" присваивается образцу, если $\Delta C_{t_{T790M}} \leq 10,8$,

статус "Есть мутация L858R" присваивается образцу, если $\Delta C_{t_{L858R}} \leq 10,3$,

статус "Есть мутация del-19" присваивается образцу если $\Delta C_{t_{del19}} \leq 13,8$.

Пример 6. Аналитическая чувствительность тест-системы, предел обнаружения.

В ходе предварительных экспериментов на модельных образцах было сделано предположение о том, что порог обнаружения тест-системы составляет

для мутации L858R - 75 копий/реакция (что соответствует 2,5% от общего числа копий ДНК (геном-эквивалентов) в реакции);

для мутации T790M - 30 копий/реакция (что соответствует 1% от общего числа копий ДНК в реакции);

для делеций в экзоне 19 - 150 копий/реакция (что соответствует 5% от общего числа копий ДНК в реакции).

Это было необходимо подтвердить на серии рабочих образцов, по составу максимально приближенных к реальным клиническим образцам ДНК, выделенным из FFPE-срезов.

Для оценки аналитической чувствительности тест-системы рабочие образцы были приготовлены следующим образом: сначала ДНК выделяли из нескольких FFPE-срезов с подтвержденным отсутствием исследуемых мутаций и объединяли полученные препараты ДНК в один образец "пул", который служил в последствие "фоном", имитирующим ДНК без мутаций в рабочих образцах, далее для приготовления рабочих образцов к аликвотам фоновой ДНК добавляли плазмидную ДНК, содержащую одну из мутаций, исследуемых набором реагентов. Концентрация ДНК в каждом рабочем образце составляла 10 нг/мкл. В каждом рабочем образце содержалась плазмидная ДНК, имеющая либо замену L858R, либо замену T790M, либо одну из делеций в 19 экзоне. Концентрация плазмидной ДНК в рабочих образцах для исследования аналитической чувствительности составляла

для L858R - 75 копий/реакция (что соответствует 2,5% от общего числа копий ДНК (геном-эквивалентов) в реакции);

для мутации T790M - 30 копий/реакция (что соответствует 1% от общего числа копий ДНК в реакции);

для делеций в экзоне 19 - 150 копий/реакция (что соответствует 5% от общего числа копий ДНК в реакции).

Для анализа чувствительности использовалась панель из независимо приготовленных рабочих образцов в количестве 16 шт., содержащих плазмидную ДНК одной из трех искомым мутаций:

16 образцов с мутацией T790M,

16 образцов с мутацией L858R, и

16 образцов с делециями (использовались делеции с 1 по 16).

Все исследованные образцы содержали ДНК с мутациями в концентрации, заявленной как предел обнаружения, а именно

1% от общего числа копий ДНК (геном-эквивалентов) в реакции в случае образцов с мутацией T790M (30 копий/реакция), либо

2,5% (75 копий/реакция) в случае образцов с мутацией L858R, либо

5% (150 копий/реакция) в случае образцов с делециями.

Кроме того, общая концентрация ДНК в каждом образце составляла 10 нг/мкл. Так как в ходе исследования аналитической чувствительности во всех образцах была обнаружена соответствующая мута-

ция (фиг. 3, 4, 5), результаты исследования подтверждают способность тест-системы выявлять концентрации мутантных ДНК, указанных как предел обнаружения.

Пример 7. Аналитическая специфичность тест-системы.

Для теоретического подтверждения специфичности наборов было необходимо подтвердить отсутствие неспецифического связывания при поиске последовательностей, комплементарных используемым олигонуклеотидам (праймам и зондам), в базах данных последовательностей ДНК человека с помощью онлайн программ primerBLAST (для пар праймеров) и nucleotideBLAST (для зондов). В результате поиска последовательностей, комплементарных используемым олигонуклеотидам (праймам и зондам), в базах данных последовательностей ДНК человека с помощью онлайн программ primerBLAST (для пар праймеров) и nucleotideBLAST (для зондов) не было обнаружено значимого связывания с неспецифическими последовательностями, что подтверждает заявленную аналитическую специфичность набора.

Для экспериментального подтверждения аналитической специфичности наборов использовалась панель из независимо приготовленных рабочих образцов в количестве 16 шт. с подтвержденным статусом отсутствия искомой мутации. Референсным методом было секвенирование по Сэнгеру и тестирование при помощи набора для *in vitro* диагностики Therascreen EGFR RGQ PCR Kit (Qiagen) (16 образцов с подтвержденным отсутствием мутации T790M, 16 образцов с подтвержденным отсутствием мутации L858R и 16 образцов с подтвержденным отсутствием какой-либо из 19 делеций). Все исследованные образцы имели подтвержденный референсным методом статус отсутствия искомой мутации. Общая концентрация ДНК в каждом образце составляла 10 нг/мкл. В ходе исследования аналитической специфичности во всех образцах был подтвержден статус отсутствия мутации.

Перечень последовательностей.

<110> ЗАО БИОКАД

<120> Диагностическая тест-система для определения мутаций в гене

EGFR и ее применение

<160> 13

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<400> 1

CTGGAGGCATCCTATTGCACTCCAG

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<400> 2

AAGTTCTTCGGTAAGTCACAACATCAAGAACTT

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<400> 3

CACCAAAGCTTAGGTGTTTGCTGA

<210> 4

<211> 47

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<400> 4

TGAAGCTCAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTTC

A

<210> 5
<211> 45
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность
<400> 5
ATCACGTAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCAGGAAGCCTACGTGAT

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность
<400> 6
ACGGTGGAGGTGAGGCAGAT

<210> 7
<211> 36
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность
<400> 7
CGTCCAAATATATGTCAAGATCACAGATTTTGGACG

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность
<400> 8
GTAAGGACCTAAAGCCACCTCCTTAC

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность
<400> 9
TGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAAT

<210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность
 <400> 10
 AATTCCCGTCGCTATCAA

<210> 11
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность
 <400> 11
 GGCCTGAGGTTTCAG

<210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность
 <400> 12
 CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGC

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность
 <400> 13
 CTTTGCTGTGTGGGGTCCATG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, включающая следующие компоненты:

а) праймеры и зонд для контрольной реакции (БК) включают в себя следующие специфические последовательности:

БК_F: CTGGAGGCATCCTATTGCACTCCAG (SEQ ID NO: 1);
 БК_R: AAGTTCCTTCGGTAAGTCACAACATCAAGAACTT (SEQ ID NO: 2);
 БК_Z: FAM CACCAAAGCTTAGGTGTTTGCTGA BHQ1 (SEQ ID NO: 3),

б) праймеры и зонд для выявления мутации T790M включают в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_T790M3_3F:
 TGAAGCTCAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCGAAGGGCATGAGCTTCA (SEQ ID NO: 4);
 EGFR_T790M_R:
 ATCACGTAGTAGAATGAAAGCGCCGTTCCAGGAAGCCTACGTGAT (SEQ ID NO: 5);
 EGFR_T790M_Z: FAM - ACGGTGGAGGTGAGGCAGAT - BHQ1 (SEQ ID NO: 6),

в) праймеры и зонд для выявления мутации L858R включают в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_L858R_F: CGTCCAAATATATGTCAAGATCACAGATTTTGGACG (SEQ ID NO: 7);
 EGFR_L858R_R: GTAAGGACCTAAAGCCACCTCCTTAC (SEQ ID NO: 8);
 EGFR_L858R_Z: (FAM)-TGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAAT-(BHQ-1) (SEQ ID NO: 9), и

г) праймеры и зонд для выявления делеции в 19 экзоне (del19) включают в себя следующие специфические последовательности:

EGFR_d19_F: AATTCCCGTCGCTATCAA (SEQ ID NO: 10);
 EGFR_d19_R: GGCCTGAGGTTTCAG (SEQ ID NO: 11);
 EGFR_del19_3B: CCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGC-Pi (SEQ ID NO: 12);

EGFR_del19_Z: (FAM)-CTTTGCTGTGTGGGGGTCCATG-(BHQ-1) (SEQ ID NO: 13),

где FAM - это флуоресцентный краситель,

BHQ - это гаситель флуоресценции.

2. Диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца по п.1, которая включает ПЦР-буфер, ДНК-полимеразу, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ионы Mg^{2+} и другие компоненты, необходимые для проведения ПЦР-реакции.

3. Диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца по п.1, которая включает ПЦР-буфер, ДНК-полимеразу, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ионы Mg^{2+} , положительный контроль и отрицательный контроль.

4. Диагностическая тест-система для определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца по п.1, где образец взят у пациента-человека.

5. Способ определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, включающий проведение параллельно четырех *in vitro* реакций аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени с использованием диагностической тест-системы по пп.1-3, где четыре *in vitro* реакции представляют собой

- a) выявление фрагмента 28 экзона гена EGFR (ВК),
- b) выявление мутации T790M,
- c) выявление мутации L858R,
- d) выявление мутации del19.

6. Способ определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца по п.5, где образец взят у пациента-человека.

7. Способ прогнозирования ответа на терапию тирозин-киназными ингибиторами рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легкого путем определения мутаций в гене EGFR из опухолевой клетки образца от пациента, включающий проведение параллельно четырех *in vitro* реакций аллельспецифической ПЦР в режиме реального времени с использованием диагностической тест-системы по пп.1-3, где четыре *in vitro* реакции представляют собой

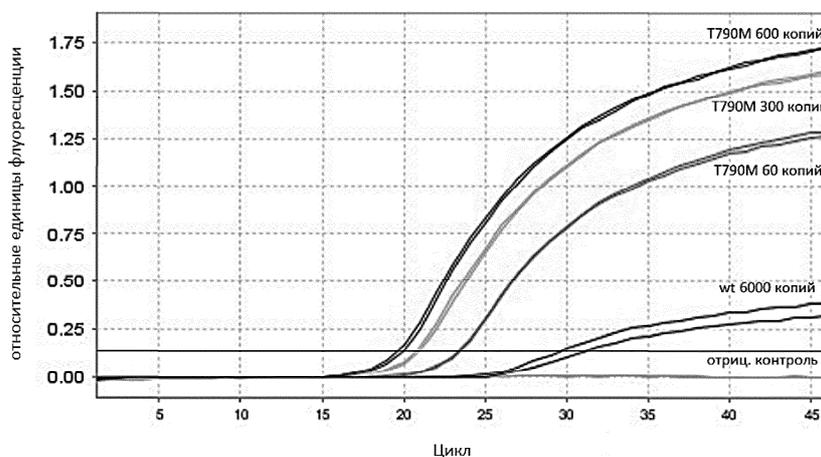
- a) выявление фрагмента 28 экзона гена EGFR (ВК),
- b) выявление мутации T790M,
- c) выявление мутации L858R,
- d) выявление мутации del19,

при этом наличие любой из вышеуказанных мутаций или делеций является прогностическим фактором для назначения пациентам с немелкоклеточным раком легкого терапии тирозин-киназными ингибиторами рецепторов эпидермального фактора роста;

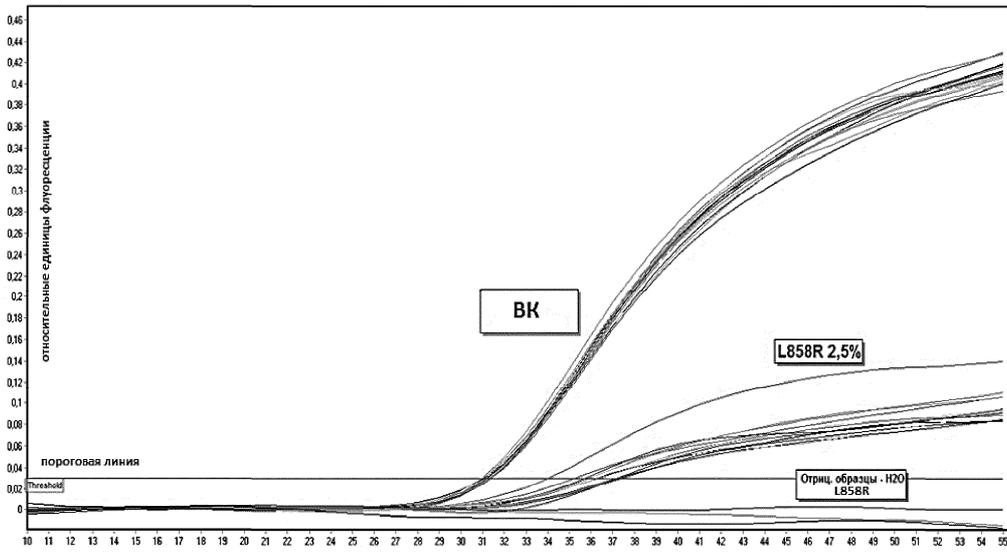
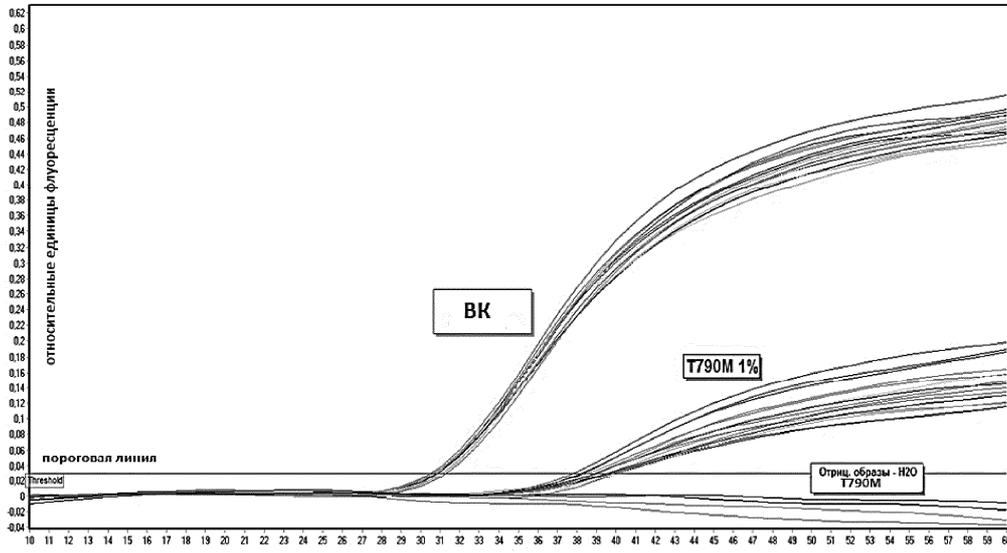
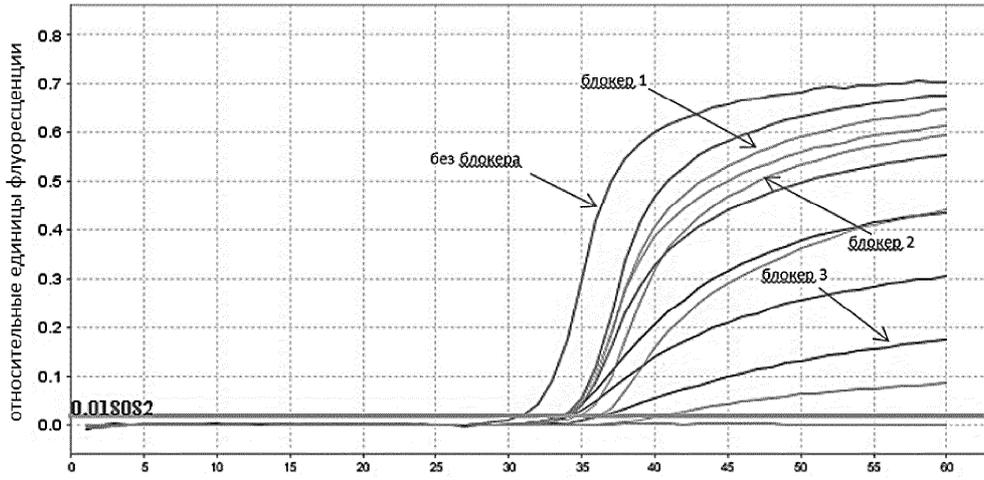
если значение С в реакции ВК выходит за рамки допустимых значений, если слишком много ДНК или слишком мало ДНК, то результаты, полученные в остальных трех реакциях для выявления мутаций, отбраковываются.

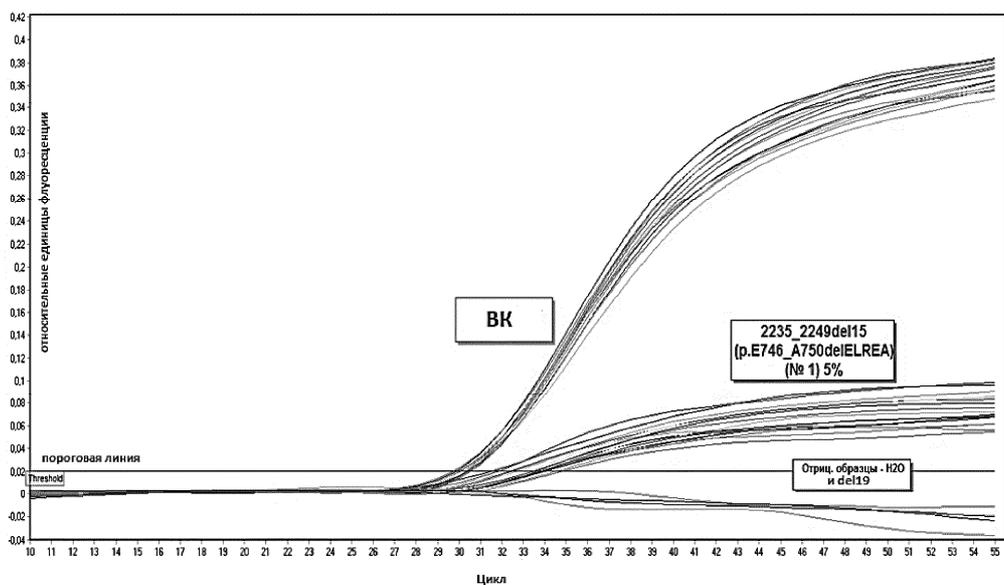
8. Способ прогнозирования ответа на терапию тирозин-киназными ингибиторами рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легкого по п.7, где тирозинкиназный ингибитор выбирают из группы: эрлотиниб, gefitinib, афатиниб или осимертиниб.

9. Способ прогнозирования ответа на терапию тирозин-киназными ингибиторами рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легкого по п.7, где образец взят у пациента-человека.



Фиг. 1





Фиг. 5

