

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041621**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.15

(21) Номер заявки
202192529

(22) Дата подачи заявки
2021.10.04

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
G01N 33/96 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2006.01)

(54) **СПОСОБ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЖЕНЩИН
КАЗАХСТАНА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК
МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ ПЛАЗМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

(31) **2020/0680.1**

(32) **2020.10.06**

(33) **KZ**

(43) **2022.04.29**

(96) **KZ2021/050 (KZ) 2021.10.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"КАЗАХСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ И
РАДИОЛОГИИ" (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Оразгалиева Мадина Гиниятовна,
Кайдарова Диляра Радиковна,
Гончарова Татьяна Георгиевна,
Омарбаева Назгуль Айдарбековна,
Адилбай Даурен Галымұлы,
Кадырбаева Рабига Есенгалиқызы,
Аскандирова Анель Бауыржановна
(KZ)**

(74) Представитель:
Малышева Л.А. (KZ)

(56) CN-A-108300787
WO-A1-2010074924

SHAKSHOUK Hend AbdelGawad et al. Can
mesenchymal stem cells be used as a future weapon
against breast cancer? Alexandria Journal of Medicine,
2017; 53: 1, 1-5, DOI: 10.1016/j.ajme.2016.01.003,
реферат, с. 3, фиг. 1

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано для ранней диагностики рака молочной железы. Предполагается, что иммунологические изменения, происходящие в организме при раке, приводят к эпигенетическим альтерациям ДНК в моноклеарной фракции плазмы периферической крови пациентов. Доступные результаты эпигенетического исследования - поиск метилированных ДНК в плазме периферической крови - позволяют определить свою роль предсказывающего маркера для минимально инвазивного диагноза рака молочной железы. Изобретение осуществляется путем обнаружения в моноклеарной фракции плазмы периферической крови пациенток процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51 и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434.

B1**041621****041621****B1**

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано для улучшения ранней диагностики рака молочной железы. Изобретение осуществляется путем обнаружения процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434 в моноклеарной фракции плазмы периферической крови пациенток, наличие которого позволяет определить развитие рака молочной железы.

Большую роль в развитии злокачественных опухолей играют наследственные генетические мутации, тем не менее, важнейший момент в формировании рака приходится на изменения в экспрессии генов, обусловленные эпигенетическими трансформациями. Эпигенетические изменения не наследуются, не нарушают последовательность нуклеотидов в ДНК, однако могут критически изменять их доступность для транскрипционного аппарата клетки за счет химической модификации определенных хромосомных локусов и связанных с ними генов. Эпигеном более динамичен, что проявляется в метилировании цитозиновых остатков в CpG-динуклеотидах ДНК. Метилирование ДНК является критическим механизмом эпигенетической модификации, которая участвует в программировании экспрессии генов и может способствовать развитию онкологических заболеваний, включая рак молочной железы. Иммунологические сдвиги, совершающиеся в организме при злокачественных заболеваниях, приводят к эпигенетическим альтерациям ДНК не только в клетках, но и в плазме периферической крови. Учитывая, что ацеллюлярная ДНК, содержащая опухолеспецифические мутации и паттерны метилирования ДНК, циркулирует в плазме крови, идентификация этих мутаций в периферической крови пациентов может с высокой долей достоверности выступать прогностическим малоинвазивным биомаркером развития рака.

В настоящее время имеется положительная тенденция в исследованиях к выявляемости злокачественных опухолей на ранних стадиях, в том числе и рака молочной железы, что, в свою очередь, увеличивает шансы пациенток на выздоровление.

Так, например, известен Способ диагностики и определения предрасположенности к раку молочной железы в казахской этнической группе женщин Казахстана на основе использования 105 Ile/Val полиморфизма гена глутатион-S-трансферазы GSTP1 (ПК, номер патента: 26938, опубликовано: 15.05.2013 г.). Решение поставленной задачи достигается тем, что в качестве маркеров предрасположенности и риска развития рака молочной железы предлагается детекция однонуклеотидного полиморфизма 105 Ile/Val гена глутатион-S-трансферазы GSTP1, определяемого с использованием варианта полимеразной цепной реакции - анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Основным преимуществом предлагаемого метода, по мнению авторов, является возможность ранней доклинической и предиктивной диагностики рака молочной железы методом ПЦО, а также определения степени предрасположенности к развитию заболевания среди женщин казахской национальности, проживающих в Казахстане.

Однако недостаток данного способа в том, что данный метод позволяет получить информацию только о генетических наследственных мутациях, что может свидетельствовать о риске заболевания, но не о самом заболевании.

Также известен Способ диагностики предрасположенности к раку молочной железы в казахской этнической группе женщин Казахстана на основе использования полиморфизма rs17542768 гена FGFR2 (ПК, номер патента: 30556, опубликовано: 16.11.2015 г.). Решение поставленной задачи достигается тем, что в качестве маркеров предрасположенности и риска развития рака молочной железы предлагается детекция однонуклеотидного rs17542768 гена FGFR2, определяемого с использованием варианта полимеразной цепной реакции - анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Основным преимуществом предлагаемого метода, по мнению авторов, является возможность проведения ранней доклинической и предиктивной диагностики рака молочной железы на геномном уровне, а также определения степени предрасположенности к развитию заболевания среди женщин казахской национальности, проживающих в Казахстане.

Однако недостаток данного способа в том, что данный метод позволяет получить информацию о предрасположенности к раку молочной железы, но не может дать достоверной картины о наличии рака молочной железы у пациента к моменту диагностики.

Также известен Способ диагностики и определения предрасположенности к раку молочной железы в казахской этнической группе женщин Казахстана на основе использования полиморфизма rs10995190 гена ZNF365 (ПК, номер патента: 31532, опубликовано: 30.09.2016 г.) Задачей предлагаемого изобретения является разработка высокоточного, неинвазивного способа диагностики и определения риска возникновения рака молочной железы (РМЖ) среди женщин казахской этнической группы, проживающих на территории РК, повышающего достоверность диагноза. Решение поставленной задачи достигается путем обнаружения однонуклеотидного (rs10995190) в гене ZNF365, определяемого с использованием варианта полимеразной цепной реакции - анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Способ диагностики основан на том, что наличие аллели G в исследуемом участке можно рассматривать как маркер повышения риска развития РМЖ в казахстанской этнической группе женщин Казахстана. Основным преимуществом предлагаемого метода, по мнению авторов, является возможность проведения на геномном уровне, неинвазивным методом, ранней доклинической и предиктивной диагностики рака молочной железы, а также определения предрасположенности к развитию заболевания среди женщин

казахской национальности, проживающих в Казахстане.

Однако недостаток данного способа в том, что данный метод предлагает маркер повышения риска развития РМЖ в казахстанской этнической группе женщин Казахстана, но не предлагает маркеры для определения рака молочной железы.

Прототипом нашего метода является Способ скрининга злокачественных новообразований у человека (дата публикации: RU-05.09.2018; класс МПК G01N 33/574, номер публикации 0002665965). Изобретение относится к области медицины, в частности к онкологии и эпигенетике, и предназначено для скрининга злокачественных новообразований у человека. Осуществляют забор периферической крови. Получают образцы суспензии, содержащие лимфоциты. В образцах суспензии определяют частоту нестимулированных лимфоцитов с асинхронной репликацией (ЛАР) гена AURKA. При частоте ЛАР гена AURKA, превышающей 28,0%, подтверждают обнаружение у человека злокачественного новообразования. Изобретение обеспечивает упрощение способа скрининга злокачественных новообразований у человека, сокращение времени исследования и его стоимости.

Однако недостаток данного способа в том, что данный метод не специфичен в отношении определения конкретной локализации злокачественных новообразований.

Предполагается, что иммунологические изменения, происходящие в организме при раке, приводят к эпигенетическим альтерациям ДНК в моноклеарной фракции плазмы периферической крови. Доступные результаты исследования метилирования ДНК моноклеарной фракции плазмы периферической крови позволяют определить свою роль предвещающего маркера для минимально инвазивного диагноза рака молочной железы.

Эпигенетический метод относится к малоинвазивным методам, так как для теста достаточно образца плазмы крови обследуемой пациентки.

Поэтому задачей нашего изобретения является повышение чувствительности и специфичности ранней диагностики рака молочной железы.

Техническая задача нашего способа осуществляется путем определения процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434 в моноклеарной фракции плазмы периферической крови пациенток, наличие которого позволяет определить развитие рака молочной железы.

Способ осуществляется следующим образом: Производят забор периферической крови. Плазменную ДНК экстрагируют, используя внутренний бесклеточный протокол экстракции ДНК (HKG Epithera-
reutics). Извлеченную ДНК конвертируют в бисульфит с использованием набора EZ DNA Methylation-Direct (Zymo Research, CA, USA) и хранят при -20°C до дальнейшей обработки. Два цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР), выполняют для мультиплексного секвенирования, направленные на определение процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434. Первый раунд ПЦР-амплификации проводят в реакционных смесях, содержащих 2 мкл бисульфит-конвертированной ДНК и Taq ДНК-полимеразы (Thermo Scientific, CA, США), с использованием набора обратных и прямых праймеров для определения процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434, с использованием стандартной амплификации. Второй цикл ПЦР проводят для маркировки каждого ампликона определенным штрих-кодом с использованием серий прямого и обратного наборов штрих-кода HKG. Библиотеку, содержащую одинаковую дозу полученных ампликонов, объединяют в соответствии с их концентрациями дцДНК, количественно определяют с помощью набора для анализа дцДНК Qubit™ HS (Invitrogen, Калифорния, США). Объединенную библиотеку затем дважды очищают, используя собственные очищающие шарики, и количественно определяют с помощью ПЦР RealTime с использованием набора для количественного анализа библиотеки NEBNext® для Illumina (New England Biolabs, MA, USA). Затем секвенирование проводят на платформе Illumina с использованием MiSeq Reagent V2 Micro (Illumina, CA, USA). В случае определения метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434, прогнозируют развитие рака молочной железы.

Пример исполнения.

Исследование было проведено на базе АО "Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии" г. Алматы. Исследование проведено на 151 испытуемых.

Основная группа включала 101 пациентку с раком молочной железы, которые проходили обследование и лечение на базе АО "Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии" по Протоколу НТП № AP05131940 "Возможности определения маркеров Т-лимфоцитов в ранней диагностике и прогнозировании рака легких и молочной железы" в рамках бюджетной программы 217 "Развитие науки", подпрограмме 102 "Грантовое финансирование научных исследований". У всех исследуемых пациентов раком молочной железы диагноз был гистологически верифицирован.

Контрольная группа - 50 здоровых женщин, добровольцев.

В обеих группах было проведено определение метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434, путем взятия периферической крови. Плазменную ДНК экстрагировали, используя внутренний бесклеточный протокол экстракции ДНК (HKG Epitherapeutics). Извлеченную ДНК конвертировали в бисульфит с использованием набора EZ DNA Methylation-Direct (Zymo Research, CA, USA) и хранили при -20°C до дальнейшей обработки. Два цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР), выполняют для мультиплексного секвенирования, направленные на определение процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434. Первый раунд ПЦР-амплификации проводят в реакционных смесях, содержащих 2 мкл бисульфит-конвертированной ДНК и Taq ДНК-полимеразы (Thermo Scientific, CA, США), с использованием набора обратных и прямых праймеров для определения процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434, с использованием стандартной амплификации. Второй цикл ПЦР проводят для маркировки каждого ампликона определенным штрих-кодом с использованием серий прямого и обратного наборов штрих-кода HKG. Библиотеку, содержащую одинаковую дозу полученных ампликонов, объединяют в соответствии с их концентрациями дцДНК, количественно определяют с помощью набора для анализа дцДНК Qubit™ HS (Invitrogen, Калифорния, США). Объединенную библиотеку затем дважды очищают, используя собственные очищающие шарики, и количественно определяют с помощью ПЦР RealTime с использованием набора для количественного анализа библиотеки NEBNext® для Illumina (New England Biolabs, MA, USA). Затем секвенирование проводят на платформе Illumina с использованием MiSeq Reagent V2 Micro (Illumina, CA, USA).

В ходе проведения данного анализа в основной группе (с раком молочной железы) у всех испытуемых было определено метилирование в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434.

Контрольная группа показала отсутствие метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51, и в островке CpG, связанного с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ ранней диагностики развития рака молочной железы, отличающийся тем, что при обнаружении в моноклеарной фракции плазмы периферической крови пациенток процесса метилирования в островках CpG, связанных с генами JAM3, C17orf64, MSC, C7orf51 и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5, chr5: 77,208,034-77,329,434, прогнозируют развитие рака молочной железы.

