



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010147074/15, 19.11.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.11.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.11.2010

(43) Дата публикации заявки: 27.05.2012 Бюл. № 15

(45) Опубликовано: 20.10.2012 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SAMARA WARDANA P. et al. p16(INK4a) is superior to high-risk human papillomavirus testing in cervical cytology for the prediction of underlying high-grade dysplasia // Cancer Cytopathol., 2010, Jun 25, vol. 118(3), pp.146-56, abstract. RU 2315312 C2, 20.01.2008. RU 2245551 C1, 27.01.2005. US 6287775 B1, 11.09.2001. БОЖЕНКО В.К. и др.
Исследование (см. прод.)

Адрес для переписки:

117997, Москва, ГСП-7, ул. Профсоюзная,
86, ФГУ "РНЦПР" Минздравсоцразвития
России, В.К. Боженко

(72) Автор(ы):

Боженко Владимир Константинович (RU),
Кудинова Елена Александровна (RU),
Близнюков Олег Петрович (RU),
Мельникова Надежда Васильевна (RU),
Бурменская Ольга Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
"Российский научный центр
рентгенрадиологии" Министерства
здравоохранения и социального развития
России (RU)

(54) МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к онкологии, предназначено для обнаружения экспрессии мРНК гена p16(INK4a) в образцах ткани шейки матки. Способ диагностики цервикальных интраэпителиальных неоплазий на основе определения мРНК гена p16 в материале соскоба шейки матки с использованием количественной ПЦР включает забор исследуемого материала из шейки матки путем соскоба, анализ экспрессии мРНК p16 как маркера потенциальной прогрессии диспластических процессов шейки матки, а

также анализ концентрации мРНК гена гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT-1). При этом оценивают уровень относительной экспрессии мРНК гена p16 к уровню экспрессии мРНК HPRT-1. Отношение уровня экспрессии мРНК гена p16 к мРНК HPRT-1 свыше 93 отн. ед. соответствует CIN3 (рак in situ), а его значение более 201 отн. ед. соответствует плоскоклеточному раку. Данный способ позволяет повысить эффективность диагностики предраковых процессов шейки матки. 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

экспрессии мРНК маммаглобина А при различной патологии молочных желез. - Вестник РНЦПР,

вып.9, статья опубликована 21.12.2009 [найдено 25.07.2011 на сайте http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v9/papers/bozhenko_v9.htm]. МАЛЬЦЕВА Л.И. и др. Возможности ранней диагностики рака шейки матки. - Практическая медицина, 2009, №2 [найдено 25.07.2011 на сайте <http://mfvt.ru/vozmozhnosti-rannej-diagnostiki-raka-shejki-matki/>]. CUSCHIERI K., et al. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008 Oct; 17(10):2536-45.

R U 2 4 6 4 5 7 0 C 2

R U 2 4 6 4 5 7 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010147074/15, 19.11.2010**(24) Effective date for property rights:
19.11.2010

Priority:

(22) Date of filing: **19.11.2010**(43) Application published: **27.05.2012 Bull. 15**(45) Date of publication: **20.10.2012 Bull. 29**

Mail address:

**117997, Moskva, GSP-7, ul. Profsojuznaja, 86,
FGU "RNTsRR" Minzdravsotsrazvitija Rossii,
V.K. Bozhenko**

(72) Inventor(s):

**Bozhenko Vladimir Konstantinovich (RU),
Kudinova Elena Aleksandrovna (RU),
Bliznjukov Oleg Petrovich (RU),
Mel'nikova Nadezhda Vasil'evna (RU),
Burmenskaja Ol'ga Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie
"Rossijskij nauchnyj tsentr rentgenradiologii"
Ministerstva zdravookhraneniya i sotsial'nogo
razvitija Rossii (RU)**

(54) **DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASMS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention aims at detecting mRNA expression of the p16(INK4a) gene in cervical tissue samples. A diagnostic technique for cervical intraepithelial neoplasms on the basis of detecting p16 gene mRNA in the cervical scraping material with the use of quantitative PCR involves sampling the examined cervical material, analysing p16 mRNA expression as a potential progression marker of cervical dysplastic processes, as well as

analysing the mRNA concentration of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT-1) gene. It is combined with evaluating the level of relative mRNA expression of the p16 gene to the level of mRNA expression of HPRT-1. The relation of the level of mRNA expression of the p16 gene to mRNA expression of HPRT-1 more than 93 relative units corresponds with squamous cell carcinoma.

EFFECT: technique enables higher effectiveness of diagnosing premalignant cervical processes.

1 tbl, 2 ex

RU 2 464 570 C2

RU 2 464 570 C2

Изобретение относится к области медицины, в частности к онкологии, и предназначено для обнаружения экспрессии мРНК гена p16 (INK4a) в образцах ткани шейки матки, полученных путем соскоба, с различной патологией: рак шейки матки, CIN различной степени.

5 Рак шейки матки занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости женщин 15-39 лет в Российской Федерации (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2008). Установлено, что этиологическим агентом его развития являются вирусы папилломы человека группы «высокого риска заболевания» (ВПЧ 16, 18 и
10 родственные им) (Zur Hausen H., 1989, 2002). Только у части инфицированных женщин как результат персистенции вируса наблюдается развитие цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN). Пристального внимания заслуживает изучение факторов, способствующих развитию рака шейки матки у данной группы больных. Общеизвестно, что изолированное использование цитологического исследования не
15 позволяет достоверно оценить прогностическую значимость диспластических процессов шейки матки.

Алгоритм обследования и лечения пациенток цервикальными интраэпителиальными неоплазиями тесно связан с выявлением прогностических
20 молекулярно-биологических маркеров предраковых поражений и рака шейки матки.

Использование биомаркеров, которые позволяют идентифицировать потенциально опасные группы инфекции ВПЧ, может улучшить точность скрининга рака шейки матки. К ним относят обнаружение мРНК ВПЧ E6/E7 (АРТИМА),
25 иммуноцитохимическое выявление экспрессии p16 (INK4a), определение ДНК ВПЧ (НС2) для выявления женщин с высоким риском неоплазий шейки матки.

Сверхэкспрессия ингибитора циклинзависимой киназы p16INK4a (p16) в диспластических клетках эпителия шейки матки указывает на активное присутствие вирусных онкогенов E7. Несмотря на сильную корреляцию между присутствием
30 вирусных онкогенов E7 и выраженной экспрессией p16 (INK4a), должны учитываться некоторые морфологические особенности при оценке цитологических препаратов. Так, при наличии цервикальной интраэпителиальной неоплазии в случае прогрессирования дисплазии при иммуноокрашивании с антителами к p16 отмечается постепенное увеличение доли позитивных клеток, начиная с базального и
35 парабазальных слоев. Известно, что при иммуноцитохимическом окрашивании с антителами к p16 позитивное окрашивание выявляется не только в клетках с морфологическими признаками дисплазии, но и в клетках метаплазированного эпителия, что может привести к ложноположительным результатам. В препаратах
40 может наблюдаться спорадическое физиологическое окрашивание неизмененного железистого эпителия шейки матки (P.Samarawardana, D.L. Dehn, M.Singh et al., 2010). Таким образом, из уровня техники известно, что, несмотря на стандартизованное получение монослойного препарата, оценка результатов иммуноцитохимического исследования с антителами к p16 осуществлялась полуколичественным способом.

45 Из описания к патенту US006709832B1 изобретение "Method of early diagnosis of carcinomas" (опубликовано 23.03.2004) известно, что одним из направлений диагностики предраковых процессов и рака шейки матки является определение мРНК белка p16 в материале парафиновых блоков при ретроспективном исследовании
50 диагностического материала. Однако данная методика является инвазивной - на начальном этапе необходимо выполнение биопсии шейки матки с последующим гистологическим исследованием. Учитывая актуальность скрининга рака шейки матки и хорошие показатели известного из уровня техники подхода, заключающегося в

количественном анализе экспрессии гена p16, задачей изобретения является расширение арсенала технических средств данного назначения. При этом технический результат заключается в реализации указанного назначения.

5 Следовательно, тестирование мРНК гена p16 (INK4a) по материалу соскоба шейки матки с использованием количественной ПЦР может быть использовано в качестве дополнительного маркера для повышения эффективности скрининга рака шейки матки и позволит прогнозировать распространенные поражения шейки матки.

10 Технический результат достигается благодаря тому, что способ определения мРНК гена p16 (INK4a) в материале соскоба шейки матки с использованием количественной ПНР включает забор исследуемого материала из шейки матки путем соскоба у пациенток с цитологически установленной цервикальной интраэпителиальной неоплазией, что не требует выполнения биопсии и достигается неинвазивным

15 способом получения диагностического материала, анализ экспрессии мРНК гена p16 (INK4a) путем ПЦР как маркера присутствия вирусных онкогенов ВПЧ человека. Причем анализ исследуемого материала включает также анализ концентрации мРНК гена гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT-1). При этом сравнивают уровень экспрессии мРНК p16 (INK4a) с уровнем экспрессии мРНК HPRT-1.

20 Экспрессия последнего осуществляется на достаточно постоянном уровне, что позволяет отнести этот ген к так называемой группе «генов домашнего хозяйства» и определять относительный уровень экспрессии функционально активных генов (в данном случае p16 (INK4a), опираясь на значения экспрессии HPRT-1. Подобный подход является общепринятым и позволяет обеспечить высокую воспроизводимость результатов (Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Чазова Н.Л. и соавт.2009).

25 Осуществление изобретения поясняется следующим примером.

Анализ экспрессии гена p16 (INK4a)

Выделение РНК

30 Образцы соскобов шейки матки вынимали из раствора для хранения материала, гомогенизировали на приборе (фирма Qiagen, Германия). Выделение РНК проводили согласно инструкции с помощью наборов "RNeasy mini kit" (фирма Qiagen, Германия). Метод основан на лизисе образцов в растворе гуанидинтиоционата сорбции РНК на колонках, отмывках РНК в спиртовых растворах и элюции РНК. Объем образцов

35 после выделения составил 100 мкл.

Проведение обратной транскрипции

40 Реакцию обратной транскрипции ставили, используя реактивы фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология» в объеме 40 мкл (в реакцию брали 33 мкл образца). В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды. Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 30 минут с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 10 раз в ТЕ-буфере.

Проведение ПЦР

45 Для постановки ПЦР использовали реактивы фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология». Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом структур генов таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК исследуемых и нормировочных генов. Это позволило не использовать дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНК-азой на этапе выделения РНК. Контроль

50 отсутствия реакции на геномной ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации, эквивалентной конечной концентрации кДНК. ДНК-зонды, использовавшиеся для

детекции продуктов амплификации исследуемых и нормировочных генов, были помечены FAM. Реакции амплификации генов ставили в разных пробирках в двух повторах. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен "горячий старт", который обеспечивался использованием парафина. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур», для всех тест-систем температура была унифицирована и составила 64°C.

Амплификацию осуществляли в режиме "реального времени" в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл - 80°C 30 сек, 94°C 1 мин; 50 циклов - 94°C 10 сек, 64°C 20 сек, использовали приборы "ДТ-322" и "ДТ-964" производства фирмы ЗАО "НПФ ДНК-Технология". Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C. Дополнительный контроль прохождения реакции осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Для проведения одной реакции ПЦР использовали 10 мкл 2,5X реакционной смеси; 1 мкл MgCl₂ (25 mM) («Syntol», Россия), 7,5 мкл деионизованной воды, 1 мкл прямого праймера (10 pmol), 1 мкл обратного праймера (10 pmol) («Syntol», Россия), 0,5 мкл праймера «проба», содержащего флуорофор «Tag man», 5 мкл образца кДНК. В работе использовали следующие праймеры:

Для p16 (INK4a) использовались праймеры:

Ко второму экзону:

Прямой: 5_-CCCTGGCTCTGACCATTTCTG-3_.

Обратный: 5_-ACCACCAGCGTGTCCAGGAA-3

Для контрольного гена HPRT:

Прямой: 5'-GCGTТААСТCGGCGTTTCAT и

Обратный: 5'-GCGCTCAGGTCAAATTCAGAC.

Критический цикл и исходное количество копий кДНК определяли с помощью компьютерной программы «ДТ-96», поставляемой вместе с прибором.

Статистический анализ проводился в программе Статистика 6.0. Для оценки относительного содержания мРНК p16 в образцах использовали анализ содержания мРНК референтного гена HPRT-1 в том же образце, характеризующемся низким и стабильным уровнем экспрессии мРНК в клетке. При отношении экспрессии мРНК p16 (INK4a) к мРНК HPRT-1 меньше 1 предполагалось, что экспрессия мРНК p16 (INK4a) в образце практически отсутствует, а при отношении больше 1 - о наличии экспрессии p16 (INK4a) в образце.

Расчет относительной экспрессии проводили на основании сравнительной оценки величин C_t x (где x-конкретный ген), получаемых для каждого гена на приборе ПЦР «реального времени» после проведения ПЦР реакции. Определение уровня экспрессии мРНК p16 (INK4a) относительно мРНК HPRT-1 считали методом дельта-дельта Си-ти ($\Delta\Delta C_t$) (Ребриков Д.Н. и соавт.2009).

$[p16] (INK4a)/[HPRT1]=E-(C_{t1}-C_{t2})$,

где

$[p16] (INK4a)/[HPRT1]$ - нормированное по HPRT1 значение экспрессии p16 (INK4a), измеряется в относительных единицах, показывает, сколько копий мРНК p16 (INK4a) приходится на 1 копию HPRT1;

E - эффективность амплификации, показывает прирост матрицы на каждом цикле амплификации. Теоретически на каждом цикле происходит удвоение матрицы, поэтому $E=2$;

C_{t1} - значение порогового цикла в образце для p16 (INK4a);

St2 - значение порогового цикла в образце для HPRT1.

Проанализировано 19 образцов соскобов шейки матки больных, из которых с гистологически подтвержденным плоскоклеточным раком шейки матки (3 случая), cin3 (рак in situ) (6 случаев), cin2 (3 случая), cin 1 (5 случаев) и реактивные изменения (2 случая). Материал получен путем соскоба с шейки матки при комплексном гинекологическом обследовании.

В образцах был проведен анализ экспрессии мРНК гена p16 (INK4a). Было проведено также цитологическое исследование. Критерием достоверности цитологического и молекулярно-генетического методов явились результаты сопоставления с гистологическим исследованием биопсийного и/или операционного материала.

В таблице 1 представлены полученные данные по количественному анализу мРНК для 19 образцов соскобов шейки матки, а также данные цитологического и гистологического анализов.

Сопоставление результатов цитологического исследования и уровня экспрессии p16 (INK4a) показало, что при реактивных изменениях эпителия шейки матки уровень экспрессии был незначительным и составил 20 и 32 отн. ед.. Повышенная экспрессия мРНК гена p16 (INK4a) наблюдалась при наличии CIN1 - $59 \pm 8,81$ отн. ед. ($M \pm SD$, где M-среднее, SD -стандартное отклонение), CIN2 $67 \pm 21,3$ отн. ед. или CIN3 $147,7 \pm 48$ отн. ед. Максимальные значения относительного уровня экспрессии p16 (INK4a) были характерны для плоскоклеточного рака - $251,0 \pm 37,7$ отн. ед.

Пример 1

Пациентке Д. 28 лет (образец 11) выполнено цитологическое исследование соскоба шейки матки. Цитологически в соскобе шейки матки диагностирован "CIN2". В материале соскоба соотношение между уровнем экспрессии мРНК p16 (INK4a) и уровнем экспрессии мРНК HPRT-1 составило 93 отн.ед. - установлен диагноз CIN3 (рак in situ), который был подтвержден при гистологическом исследовании.

Пример 2

Пациентке Л. 43 лет (образец 17) при цитологическом исследовании диагностирован "CIN3(рак in situ)". В материале соскоба соотношение между уровнем экспрессии мРНК p16 (INK4a) и уровнем экспрессии мРНК HPRT-1 составило 201 отн.ед. - установлен диагноз плоскоклеточный рак, подтвержденный при гистологическом исследовании.

Таблица 1. Количества мРНК гена p16 (INK4a) в образцах соскобов шейки матки

Образец	Цитологический анализ	Отношение мРНК гена p16 (INK4a) к мРНК HPRT-1 (отн.ед.)	Гистологический анализ
1	Выраженное воспаление	60	Cin1
2	Cin1	20	Реактивные изменения эпителия
3	Cin1	32	Реактивные изменения эпителия
4	Cin1	48	Cin1
5	Cin1	50	Cin1
6	Cin1	67	Cin1
7	Cin2	70	Cin1
8	Cin2	40	Cin2
9	Cin2	92	Cin2
10	Cin2	69	Cin2
11	Cin2	93	cin3(рак in situ)
12	Cin2-3	102	cin3(рак in situ)
13	cin3(рак in situ)	120	cin3(рак in situ)
14	cin3(рак in situ)	150	cin3(рак in situ)
15	cin3(рак in situ)	202	cin3(рак in situ)
16	Плоскоклеточный рак	219	cin3(рак in situ)
17	cin3(рак in situ)	201	Плоскоклеточный рак
18	cin3(рак in situ)	260	Плоскоклеточный рак
19	Плоскоклеточный рак	292	Плоскоклеточный рак

Формула изобретения

Способ диагностики цервикальных интраэпителиальных неоплазий на основе определения относительного содержания мРНК гена p16 (INK4a) с использованием

количественной ПЦР, который включает забор исследуемого материала путем соскоба из шейки матки, его цитологический анализ, отличающийся тем, что при наличии интраэпителиальной неоплазии по цитологическому исследованию проводится также анализ гена гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT-1), при этом сравнивают уровень экспрессии мРНК p16 (INK4a) с уровнем экспрессии мРНК HPRT-1 и, если отношение уровня экспрессии мРНК гена p16 (INK4a) к мРНК HPRT-1 свыше 93 отн. ед., то ставится диагноз CIN3 (рак in situ), а если значение превышает 201 отн. ед. - ставится диагноз плоскоклеточного рака.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50