



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75254** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
G01N 33/53
G01N 33/48
C12R 1/93

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ЦИТОМЕГАЛОВІРУСІВ ДО ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

1

(21) 20040705446

(22) 07.07.2004

(24) 15.03.2006

(46) 15.03.2006, Бюл. № 3, 2006 р.

(72) Чумак Анатолій Андрійович, Абраменко Ірина Вікторівна, Бойченко Павло Константинович

(73) Науковий центр радіаційної медицини АМН України

(56) EP A1 1046400 20.10.2000

A.M. Fillet et all. Natural polymorphism of cytomegalovirus DNA polymerase lies in two nonconserved regions located between domains delta-C and II and between domains III and I.

JP F1 11322746 21.11.1999

WO A1 9727480 31.07.1997

2

Lurian N.S. et all. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2001, 45, pp.2775-2780

(57) Спосіб визначення чутливості цитомегаловірусу до противірусних препаратів, який включає взяття у пацієнта з вени крові, виділення сироватки або моноклеарів та проведення полімеразної ланцюгової реакції з праймерами, які дозволяють ампліфікувати область гена, де локалізовані відомі мутації 460-607, що визначають резистентність цитомегаловірусу до противірусних препаратів, який **відрізняється** тим, що полімеразну ланцюгову реакцію проводять у присутності пептидних гомологів ДНК з послідовністю GTTCTCCAACGCGCG.

Винахід відноситься до медицини і може бути використаний для визначення резистентності цитомегаловірусів до дії противірусних препаратів. Цитомегаловірус (ЦМВ), носійство якого досягає поширення у 60-80% дорослих імуннокомпетентних людей, стає причиною небезпечної для життя інфекції в осіб з порушеною імунною системою: хворих на СПІД, реципієнтів трансплантатів кісткового мозку, нирок, серця, печінки та інших органів. Тривале лікування противірусними препаратами - ганцикловіром, фоскарнетом чи цидофовіром приводить до появи резистентних ізолятів вірусу. Визначення резистентності ЦМВ до противірусних препаратів необхідне для підвищення ефективності лікування шляхом заміни препарату, до якого розвинулась резистентність, на інший, до якого резистентності немає.

Відомо процес діагностики резистентності ЦМВ шляхом культурального дослідження, заснованого на тесті зменшення числа бляшок. Для проведення дослідження до культури фібробластів крайньої плоти людини, що ростуть у виді моношару в 24-лунковому планшеті, додають суспензію, що містить 50-100 бляшкоутворюючих одиниць ЦМВ, та інкубують протягом 1 години.

Потім рідину заміщають середовищем, що містить агарозу і противірусний препарат у відповідних розведеннях:

ганцикловір (1, 5, 10, 20, 50мкМ) або фоскарнет (62,5, 125, 250, 500, 1000мкМ). Гель обмежує поширення вірусних часток, таким чином, що ними можуть бути уражені тільки клітини, що оточують первинно інфіковані. Клітини культивують 7-10 днів, фіксують метанолом і забарвлюють по Романовському-Гімзе. Підраховують число бляшок (одна бляшка - скупчення загиглих клітин, інфікованих вірусною часткою) і обчислюють 50% інгібуючу дозу (ID_{50}) для противірусного препарату - концентрацію препарату, що приводить до 50% зменшення числа бляшок. Ізоляти вірусу, що мають $ID_{50} \geq 400$ мкМ для фоскарнета та $ID_{50} \geq 6$ мкМ для ганцикловіра вважаються резистентними до цих препаратів [1].

Недоліком відомого способу є відсутність стандартизації клітин та умов їх культивування і тривалий час від початку дослідження до отримання результатів.

Відомо процес діагностики резистентності ЦМВ до противірусних препаратів шляхом додавання до культури фібробластів легень людини,

(13) **C2**
(11) **75254**
(19) **UA**

що ростуть у 96-лунковій планшеті, 8 послідовних розведень вірусмісного середовища і протівірусних препаратів в розведеннях: ганцикловір (0,25, 1, 4, 16, 32мкМ) або фоскарнет (50, 100, 200, 400, 800мкМ). Після 7-денної інкубації імуоферментним методом визначається вміст у лунках антигену р65 вірусного походження. Ізоляти з $ID_{50} \geq 600$ мкМ для фоскарнета і $ID_{50} \geq 32$ мкМ для ганцикловіра вважаються резистентними до препаратів. Ізоляти з $ID_{50} \geq 300$ але < 600 мкМ для фоскарнета і $ID_{50} \geq 20$ але < 32 мкМ для ганцикловіра вважаються частково резистентними [2].

Недоліком відомого процесу є тривалий час від початку культивування до отримання результату, за цей час хворий без ефективного лікування може померти.

Найбільш близьким за технічною сутністю є процес визначення резистентності ізолятів ЦМВ - ампліфікація певних послідовностей ДНК вірусу з наступним секвенуванням продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який вибрано нами як аналог. Відомо, що резистентність ЦМВ до ганцикловіру найчастіше пов'язана з мутаціями в локусі, що кодує UL97 кіназу, необхідну для фосфорилування ганцикловіра і його перетворення в активну форму [3].

Недоліком відомого процесу є необхідність застосування спеціального устаткування (вартість секвенатора варіює від 45 до 500 тис. у. о.), відносно висока вартість і тривалість аналізу, тому він не може бути широко впроваджений у клінічну практику.

Технічним завданням винаходу є створення швидкого, надійного та процесу діагностики мутацій ЦМВ, який не потребує спеціального обладнання.

Поставлене технічне завдання вирішується за рахунок того, що в людини, яка має ознаки цитомегаловірусної інфекції, беруть з вени кров, виділяють сироватку (або моноклеари) та проводять ПЛР із праймерами, що дозволяють ампліфікувати область гена, у якій локалізовані відомі мутації (460-607), у присутності так званих пептидних гомологів ДНК з послідовністю

(GTTCTCCAACGCGCG), що комплементарна послідовності, специфічній для ганцикловір-чутливого ізоляту. Ці спеціально сконструйовані проби, що мають комплементарність до області передбачуваної мутації, але не можуть виступати праймерами, пригнічують ампліфікацію даної області в тому випадку, якщо вона не містить нуклеотидів, які зазнали мутації.

Процес відрізняється від аналога тим, що модифіковано процес проведення ПЛР, завдяки чому визначення мутацій ЦМВ до ганцикловіру перетворюється на якісну реакцію, проведення якої здійснюється у короткий термін (2,5 год.) і не потребує складного обладнання та додаткових реагентів.

Процес дозволяє своєчасно діагностувати наявність мутацій ЦМВ до ганцикловіру та призначити адекватне лікування, що складає суть даного винаходу.

Процес реалізації винаходу ілюструється на прикладах. 1. Хворий В-ко, діагноз хронічний лімфолейкоз. Методом полімеразної ланцюгової реакції в сироватці крові виявлено ДНК ЦМВ, що свідчить про реактивацію цитомегаловірусної інфекції. При проведенні полімеразної ланцюгової реакції у присутності пептидних гомологів ДНК з послідовністю (GTTCTCCAACGCGCG) ампліфікації ДНК ЦМВ не виявлено, що свідчить про відсутність мутацій до ганцикловіру (рис.1, додаток).

2. Хворий І-но, ВІЛ-інфікований, ЦМВ-асоційований ретинит. Методом ПЛР в сироватці крові виявлено ДНК ЦМВ, що свідчить про реактивацію цитомегаловірусної інфекції. Проведення ПЛР у присутності пептидних гомологів ДНК з послідовністю (GTTCTCCAACGCGCG) не інгібувало ампліфікацію ДНК ЦМВ, що свідчить про наявність мутацій до ганцикловіру (рис. 2, додаток).

Процес, що заявляється може бути впроваджений в лабораторіях, акредитованих для проведення ПЛР і використаний в лікувальних закладах при підборі протівірусних препаратів в лікуванні хворих з реактивацією ЦМВ та первинною інфекцією.

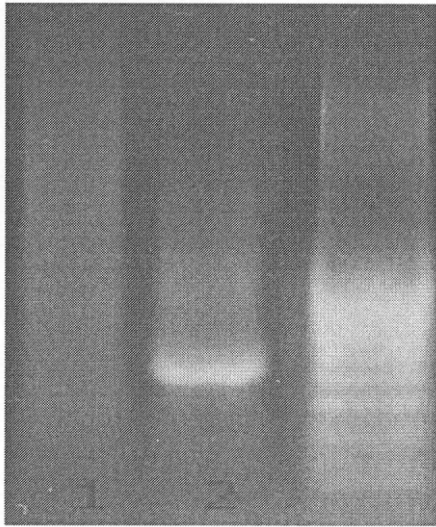


Рис.1. Результати ПЛР визначення геному ЦМВ у хворого В-ко (хронічний лімфолейкоз). 1 - реакція у присутності пептидних гомологів ДНК; 2 - реакція у відсутності пептидних гомологів ДНК; маркери молекулярних ваг.

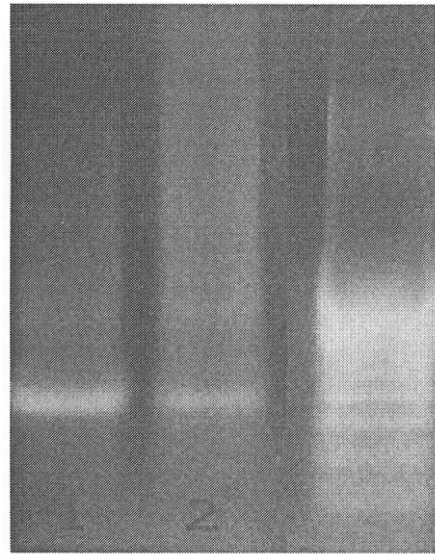


Рис.2. Результати ПЛР визначення геному ЦМВ у хворого І-но (ВІЛ-інфікований). 1 -реакція у присутності пептидних гомологів ДНК; 2 - реакція у відсутності пептидних гомологів ДНК; маркери молекулярних ваг.