

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 336

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-35822**
(22) Přihlášeno: **12.01.2019**
(47) Zapsáno: **31.10.2019**

(73) Majitel:
Masarykova univerzita, Brno, CZ
Fakultní nemocnice Brno, Brno, Bohunice, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jiří Šána, Ph.D., Polná, CZ
prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D., Brno, Černá Pole,
CZ
Mgr. Alena Kopková, Kyjov, Nětčice, CZ
MUDr. Pavel Fadrus, Ph.D., Brno, Veverčí, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitého vzoru:
**Diagnostická sada pro neinvazivní
diagnostiku mozkových nádorů**

CZ 33336 U1

Diagnostická sada pro neinvazivní diagnostiku mozkových nádorů

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká diagnostické sady pro neinvazivní diagnostiku mozkových nádorů. Sada je určena pro stanovení mikroRNA v mozkomíšním moku umožňující detekci různých typů mozkových nádorů.

10

Dosavadní stav techniky

Primární nádory mozku a mozkové metastázy postihnou ročně v celosvětovém měřítku téměř 40 pacientů na 100 tisíc obyvatel a jejich incidence neustále stoupá. Přibližně 33 % primárních nádorů mozku pak tvoří maligní formy s pětiletým přežíváním v průměru u 34,4 % pacientů, přičemž prognóza úzce souvisí s konkrétním typem nádoru. Nejlepší prognózu mají nízkostupňové gliomy společně s meningeomy, naopak nejkratší přežívání je asociováno s multifonním glioblastomem (GBM). Velmi špatná prognóza bývá rovněž spojována s mozkovými metastázami, které se vyskytují u 20 % až 40 % dospělých pacientů s nádorovým onemocněním. Určení správné diagnózy hraje rozhodující roli i při výběru nejvhodnější terapie. Navzdory významným pokrokům v diagnostice nádorů mozku jako jsou různé modifikace zobrazovacích metod a následné histopatologické vyšetření tkáně, je diagnostika stále omezena lokalizací nádoru a často jeho značnou heterogenitou. Zavedení dostatečně senzitivních a specifických metod pro detekci a stanovení diagnózy u pacientů s mozkovými nádory je proto velice žádoucí. Vhodným diagnostickým nástrojem u mozkových nádorů je analýza mikroRNA, krátkých nekódujících RNA, v mozkomíšním moku (cerebrospinal fluid; CSF), který omývá centrální nervovou soustavu a je tak v přímém kontaktu s případnou patologickou tkání.

Podstata technického řešení

V rámci předkládaného technického řešení byly identifikovány mikroRNA v mozkomíšním moku asociované s přítomností vybraných mozkových nádorů. Předkládané technické řešení tedy poskytuje diagnostickou sadu pro detekci multifonního glioblastomu (GBM), meningeomu a/nebo mozkových metastáz na základě kvantifikace let-7i-5p, miR-151a-3p, miR-423-3p, a alespoň jedné miRNA vybrané z let-7b-5p, miR-140-5p, miR-21-3p, ve vzorku CSF metodou kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR).

Nukleotidové sekvence předmětných mikroRNA jsou následující:

40

let-7b-5p:	5' UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU 3'
miR-140-5p:	5' CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG 3'
miR-21-3p:	5' CAACACCAGUCGAUGGGCUGU 3'
let-7i-5p:	5' UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU 3'
45 miR-151a-3p:	5' CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG 3'
miR-423-3p:	5' AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU 3'

Uvedené sady diagnostického setu mají následující složení:

- 50 - stanovení hladiny exprese let-7b-5p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu pro qPCR sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC AACCAC - 3'

55

univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

forward primer: 5' - GGGTGAGGTAGTAGGTTGT - 3'
 TaqMan sonda: 5' - AGCCAACAACCACACAACC - 3'

- 5 - stanovení hladiny exprese miR-140-5p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu pro qPCR sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC CTACCA - 3'

univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

10 forward primer: 5' - GGGCAGTGGTTTTACCCTA - 3'

TaqMan sonda: 5' - AGCCAACCTACCATAGGGT - 3'

- 15 - stanovení hladiny exprese miR-21-3p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu pro qPCR sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC ACAGCC - 3'

univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

20 forward primer: 5' - GTTGCAACACCAGTCGATG - 3'

TaqMan sonda: 5' - AGCCAACACAGCCCATCGA - 3'

- 25 - stanovení hladiny exprese let-7i-5p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu pro qPCR sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC AACAGC - 3'

univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

forward primer: 5' - GTTTGGTGAGGTAGTAGTTTGT - 3'

30 TaqMan sonda: 5' - AGCCAACAACAGCACAAAC - 3'

- 35 - stanovení hladiny exprese miR-151a-3p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu pro qPCR sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC CCTCAA - 3'

univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

forward primer: 5' - GTTGCTAGACTGAAGCTCC - 3'

TaqMan sonda: 5' - AGCCAACCCTCAAGGAGCT - 3'

- 40 - stanovení hladiny exprese miR-423-3p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu pro qPCR sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC ACTGAG - 3'

45 univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

forward primer: 5' - TTGAGCTCGGTCTGAGGC - 3'

TaqMan sonda: 5' - AGCCAACACTGAGGGGCCT - 3'

- 50 Sada může také s výhodou obsahovat deionizovanou vodu sloužící jako negativní kontrola a qRT-PCR standard odpovídající expresi let-7b-5p ve vzorku pacienta s GBM, expresi miR-140-5p ve vzorku pacienta s meningeomem, expresi miR-21-3p ve vzorku pacienta s mozkovými metastázami a expresi let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p ve vzorcích pacientů s glioblastomem, meningeomem a mozkovými metastázami a jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

55

Diagnostika multifornního glioblastomu

5 Kvantitativní analýza hladiny let-7b-5p normalizované na průměr hladin let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p, jejichž nukleotidové sekvence jsou specifikovány výše, pomocí qRT-PCR umožňuje s dostatečnou specificitou a senzitivitou odlišit pacienty s multifornním glioblastomem (GBM) od jedinců bez jakéhokoliv histopatologicky prokázaného nádorového onemocnění. Hladiny let-7b-5p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p se s pomocí předmětné sady stanovují v RNA izolované ze supernatantu CSF.

10 Bylo zjištěno, že normalizovaná hladina let-7b-5p v supernatantu CSF je významně změněna (zvýšena) u pacientů s GBM ve srovnání s dárci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

Diagnostika meningeomu

15 Kvantitativní analýza hladiny miR-140-5p normalizované na průměr hladin let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p, jejichž nukleotidové sekvence jsou specifikovány výše, pomocí qRT-PCR umožňuje s dostatečnou specificitou a senzitivitou odlišit pacienty s meningeomem od jedinců bez jakéhokoliv histopatologicky prokázaného nádorového onemocnění. Hladiny
20 miR-140-5p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p se s pomocí předmětné sady stanovují v RNA vyzolované ze supernatantu CSF.

25 Bylo zjištěno, že normalizovaná hladina miR-140-5p v supernatantu CSF je významně změněna (zvýšena) u pacientů s meningeomem ve srovnání s dárci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

Diagnostika mozkových metastáz

30 Kvantitativní analýza hladiny miR-21-3p normalizované na průměr hladin let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p, jejichž nukleotidové sekvence jsou specifikovány výše, pomocí qRT-PCR umožňuje s dostatečnou specificitou a senzitivitou odlišit pacienty s mozkovými metastázami od jedinců bez jakéhokoliv histopatologicky prokázaného nádorového onemocnění. Hladiny miR-21-3p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p se s pomocí předmětné sady stanovují
35 v RNA vyzolované ze supernatantu CSF.

Bylo zjištěno, že normalizovaná hladina miR-21-3p v supernatantu CSF je významně změněna (zvýšena) u pacientů s mozkovými metastázami ve srovnání s dárci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

40

Objasnění výkresů

Obrázek 1 zobrazuje rozdíl v normalizovaných hladinách let-7b-5p v mozkomíšním moku mezi
45 pacienty s multifornním glioblastomem (GBM) a jedinci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění pro ($p < 0,0001$). Rozdíl exprese byl analyzován pomocí Mann-Whitneyho testu.

Obrázek 2 zobrazuje ROC křivku, která udává, s jakou senzitivitou a specificitou je mozkomíšní
50 let-7b-5p schopna rozlišit pacienty s GBM a jedince bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění (AUC 0,9091; specificita 81 %; senzitivita 83 %).

Obrázek 3 zobrazuje rozdíl v normalizovaných hladinách miR-140-5p v mozkomíšním moku
55 mezi pacienty s meningeomem a jedinci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění pro ($p < 0,001$). Rozdíl exprese byl analyzován pomocí Mann-Whitneyho testu.

Obrázek 4 zobrazuje ROC křivku, která udává, s jakou senzitivitou a specificitou je mozkomíšní cirkulující miR-140-5p schopna rozlišit pacienty s meningeomem a jedince bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění (AUC 0,8073; specificita 83 %; senzitivita 75 %).

- 5 Obrázek 5 zobrazuje rozdíl v normalizovaných hladinách miR-21-3p v mozkomíšním moku mezi pacienty s mozkovými metastázami a jedinci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění pro ($p < 0,01$). Rozdíl exprese byl analyzován pomocí Mann-Whitneyho testu.

- 10 Obrázek 6 zobrazuje ROC křivku, která udává, s jakou senzitivitou a specificitou je mozkomíšní cirkulující miR-21-3p schopna rozlišit pacienty s mozkovými metastázami a jedince bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění (AUC 0,7969; specificita 75 %; senzitivita 100 %).

15 Příklad uskutečnění technického řešení

Pro testování diagnostické schopnosti miRNA podle předkládaného technického řešení byly připraveny qRT-PCR sety o následujícím složení:

Komponenta	Množství	Účel
Mix RT – reverzní transkripce ¹	1 x 4,67 μ l (1 rxn)	Přepis miRNA do cDNA
Mix PCR ²	1 x 17, 4 μ l (1 rxn)	Amplifikace miRNA
Detekční sada pro miR-140-5p (RT primer; qPCR primery; TaqMan sonda)	2 μ l; 1 μ l (1 rxn)	Reverzní transkripce a amplifikace miR-140-5p
Detekční sada pro miR-21-3p (RT primer; qPCR primery; TaqMan sonda)	2 μ l; 1 μ l (1 rxn)	Reverzní transkripce a amplifikace miR-21-3p
Detekční sada pro let-7i-5p (RT primer; qPCR primery; TaqMan sonda)	2 μ l; 1 μ l (1 rxn)	Reverzní transkripce a amplifikace let-7i-5p
Detekční sada pro miR-151a-3p (RT primer; qPCR primery; TaqMan sonda)	2 μ l; 1 μ l (1 rxn)	Reverzní transkripce a amplifikace miR-151a-3p
Detekční sada pro miR-423-3p (RT primer; qPCR primery; TaqMan sonda)	2 μ l; 1 μ l (1 rxn)	Reverzní transkripce a amplifikace miR-423-3p
Deionizovaná voda RT, qPCR	3,33 μ l; 1,6 μ l (1 rxn)	Negativní kontrola
Pozitivní kontrola RT, qPCR	3,33 μ l; 1,6 μ l (1 rxn)	Pozitivní kontrola pro let-7b-5p, miR-140-5p, miR-21-3p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p

20

Pozn. ¹Mix RT obsahuje 10X RT pufr, dNTP mix w/dTTP (100M total), inhibitor RNáz (20U/ μ L), and MultiScribe™ RT enzym (50U/ μ L). ²Mix PCR obsahuje AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs s dUTP/dTTP směsí, ROX Passive Reference a optimalizovaný pufr. Uvedené objemy komponent platí pro jednu miRNA v rámci RT reakce v objemu 10 μ l a qPCR reakce v objemu 20 μ l. Pozitivní kontrola obsahuje qRT-PCR standard odpovídající hladinám let-7b-5p ve vzorku pacienta s multifonním glioblastomem, hladinám miR-140-5p ve vzorku pacienta s meningeomem, hladinám miR-21-3p ve vzorku pacienta s mozkovými metastázami a hladinám let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p ve vzorcích pacientů s glioblastomem,

25

meningeomem a mozkovými metastázami a jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

5 Set podle předkládaného technického řešení může obsahovat všech šest sad pro stanovení hladin všech šest miRNA, může však také obsahovat detekční sady pro let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p, a dále jednu nebo dvě sady vybrané z detekčních sad pro let-7b-5p, miR-140-5p, miR-21-3p.

10 Stem-loop primer (RT primer), qPCR primery (forward, reverse), a TaqMan sonda měly sekvence uvedené v nároku 1.

15 K izolaci RNA byl použit CSF pacientů odebraný pomocí lumbální punkce v objemu 3 až 5 ml do sterilní zkumavky. Poté byl CSF centrifugován 10 minut při RCF 500 g a 4 °C s následným oddělením a uschováním supernatantu. Celková RNA obohacená o frakci krátkých RNA byla izolována z 1 ml CSF supernatantu za použití kitu Urine microRNA Purification Kit od Norgen Biotek.

20 K detekci hladin let-7b-5p, miR-140-5p, miR-21-3p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p byly použity výše uvedené sady obsahující jak specifické stem-loop primery pro reverzní transkripci (RT), pomocí níž je RNA přepsána do cDNA, tak primery a fluorescenčně značené sondy pro qPCR. Finální amplifikace a kvantifikace konkrétních miRNA byla provedena za použití přístroje QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Kvantita stanovovaných miRNA je vyjádřena tzv. C_q (quantitation cycle), tedy číslem cyklu, při kterém fluorescenční signál dosáhl nastavené prahové hodnoty. Detekované hladiny let-7b-5p, miR-140-5p a miR-21-3p byly normalizovány na průměr hladin referenčních let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p.

30 Relativní exprese let-7b-5p, miR-140-5p a miR-21-3p byly stanoveny metodou 2^{-dC_q}, kde hodnota dC_q představuje rozdíl mezi C_q jednotlivých stanovovaných miRNA a průměrem hladin tří referenčních miRNA.

35 Všichni pacienti, jejichž RNA byla použita k analýze, byli předem diagnostikováni pomocí histologického vyšetření odebrané tkáně. Do studie byli zařazeni pouze pacienti, u nichž byl histopatologicky potvrzen GBM, meningiom nebo mozkové metastázy. Kontrolní skupinu tvořili jedinci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

40 U pacientů s GBM byla v CSF detekována významně zvýšená hladina let-7b-5p ve srovnání s jedinci bez jakéhokoliv histopatologicky prokázaného nádorového onemocnění ($p < 0,0001$) (Obrázek 1). Rozdíl hladin mezi sledovanými skupinami byl testován pomocí Mann-Whitneyho testu.

45 Pomocí ROC (receiver operating characteristic) analýzy byla získána hodnotící, prahová hodnota normalizované exprese let-7b-5p v CSF (cut-off = 0,6418), podle které lze rozlišit pacienty s GBM od jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění se specificitou 81 % a senzitivitou 83 % (AUC [area under curve] = 0,9091) (Obrázek 2).

50 Vzorky s vyšší normalizovanou hladinou let-7b-5p, než je prahová hodnota, jsou považovány za vzorky pacientů s GBM, naopak vzorky s nižší normalizovanou hladinou let-7b-5p, než je prahová hodnota, jsou považovány za vzorky jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

55 U pacientů s meningeomem byla v CSF detekována významně zvýšená hladina miR-140-5p ve srovnání s jedinci bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění ($p < 0,001$) (Obrázek 3). Rozdíl hladin mezi sledovanými skupinami byl testován pomocí Mann-Whitneyho testu.

Pomocí ROC (receiver operating characteristic) analýzy byla získána hodnotící, prahová hodnota normalizované exprese miR-140-5p v CSF (cut-off = 0,2248), podle které lze rozlišit pacienty s meningeomem od jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění se specificitou 83 % a senzitivitou 75 % (AUC [area under curve] = 0,8073) (Obrázek 4).

Vzorky s vyšší normalizovanou hladinou miR-140-5p, než je prahová hodnota, jsou považovány za vzorky pacientů s meningeomem, naopak vzorky s nižší normalizovanou hladinou miR-140-5p, než je prahová hodnota, jsou považovány za vzorky jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

U pacientů s mozgovými metastázami byla v CSF detekována významně zvýšená hladina miR-21-3p ve srovnání s jedinci bez jakéhokoliv histopatologicky prokázaného nádorového onemocnění ($p < 0,01$). Rozdíl hladin mezi sledovanými skupinami byl testován pomocí Mann-Whitneyho testu.

Pomocí ROC (receiver operating characteristic) analýzy byla získána hodnotící, prahová hodnota normalizované exprese miR-21-3p v CSF (cut-off = 0,0661), podle které lze rozlišit pacienty s mozgovými metastázami od jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění se specificitou 75 % a senzitivitou 100 % (AUC [area under curve] = 0,7969) (Obrázek 6).

Vzorky s vyšší normalizovanou hladinou miR-21-3p, než je prahová hodnota, jsou považovány za vzorky pacientů s mozgovými metastázami, naopak vzorky s nižší normalizovanou hladinou miR-21-3p, než je prahová hodnota, jsou považovány za vzorky jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Diagnostický set pro detekci multiformního glioblastomu, meningeomu a/nebo mozkových metastáz ze vzorku mozkomíšního moku metodou kvantitativní PCR v reálném čase, **vyznačený tím**, že obsahuje sady pro stanovení hladin následujících mikroRNA: let-7i-5p, miR-151a-3p, miR-423-3p a alespoň jedné mikroRNA vybrané z let-7b-5p, miR-140-5p a miR-21-3p, přičemž uvedené sady jsou:

- sada pro stanovení hladiny let-7b-5p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu typu TaqMan sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC AACCAC - 3'

univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

forward primer: 5' - GGGTGAGGTAGTAGGTTGT - 3'

TaqMan sonda: 5' - AGCCAACAACCACACAACC - 3'

- sada pro stanovení hladiny miR-140-5p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu typu TaqMan sestávající ze sekvencí:

stem-loop primer:

5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTACCA - 3'

univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'

forward primer: 5' - GGGCAGTGGTTTTACCCTA - 3'

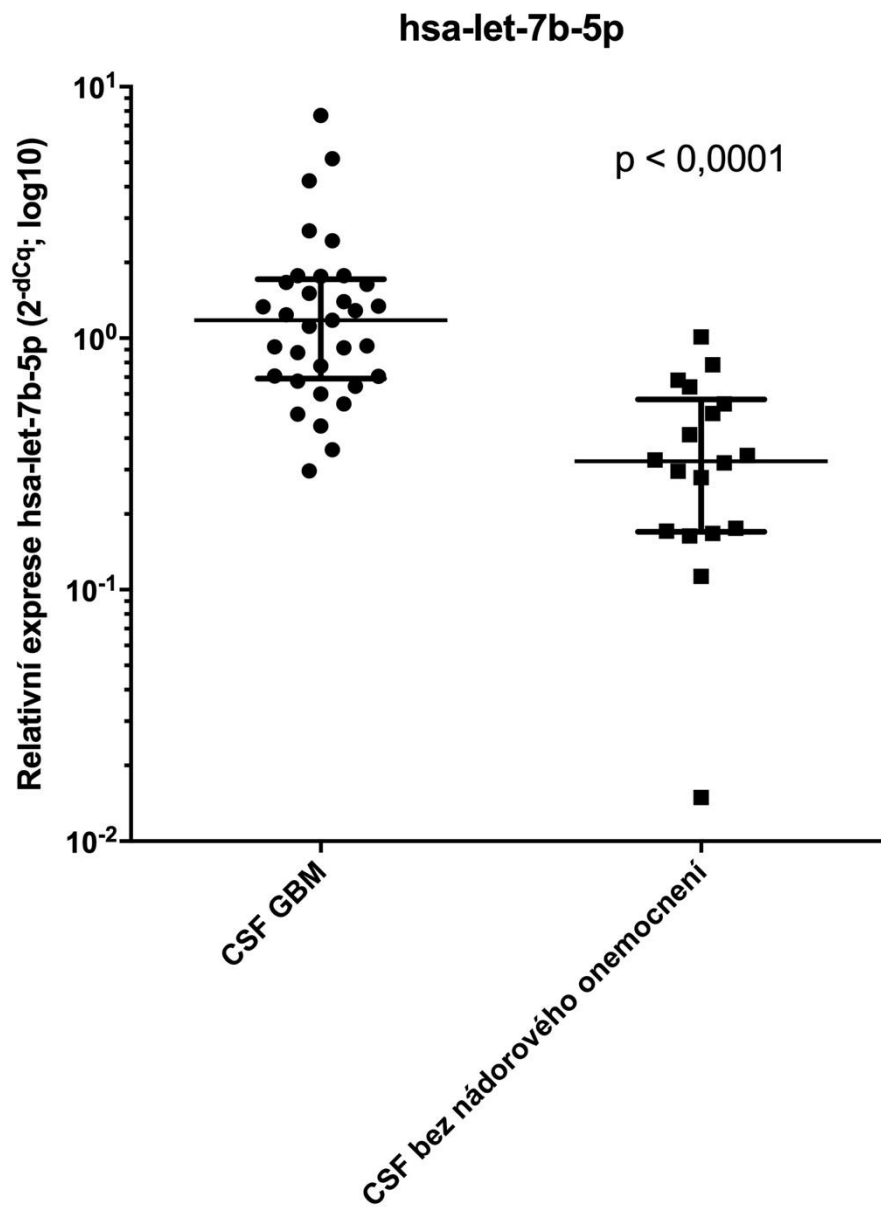
TaqMan sonda: 5' - AGCCAACCTACCATAGGGT - 3'

- sada pro stanovení hladiny miR-21-3p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu typu TaqMan sestávající ze sekvencí:
- stem-loop primer:
 5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACAGCC - 3'
 univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'
 forward primer: 5' - GTTGCAACACCAGTCGATG - 3'
 TaqMan sonda: 5' - AGCCAACACAGCCCATCGA - 3'
- sada pro stanovení hladiny let-7i-5p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu typu TaqMan sestávající ze sekvencí:
- stem-loop primer:
 5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC AACAGC - 3'
 univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'
 forward primer: 5' - GTTTGGTGAGGTAGTAGTTTGT - 3'
 TaqMan sonda: 5' - AGCCAACAACAGCACAAAC - 3'
- sada pro stanovení hladiny miR-151a-3p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu typu TaqMan sestávající ze sekvencí:
- stem-loop primer:
 5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCCTCAA - 3'
 univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'
 forward primer: 5' - GTTGCTAGACTGAAGCTCC - 3'
 TaqMan sonda: 5' - AGCCAACCCTCAAGGAGCT - 3'
- sada pro stanovení hladiny miR-423-3p, obsahující stem-loop primer pro reverzní transkripci a primery a fluorescenčně značenou sondu typu TaqMan sestávající ze sekvencí:
- stem-loop primer:
 5'– GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC ACTGAG - 3'
 univerzální reverse primer: 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'
 forward primer: 5' - TTGAGCTCGGTCTGAGGC - 3'
 TaqMan sonda: 5' - AGCCAACACTGAGGGGCCT - 3'
2. Diagnostický set pro detekci multiformního glioblastomu podle nároku 1, **vyznačený tým**, že obsahuje sady stem-loop primerů pro reverzní transkripci, primerů a fluorescenčně značených sond pro stanovení hladin mikroRNA let-7b-5p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p.
3. Diagnostický set pro detekci meningeomu podle nároku 1, **vyznačený tým**, že obsahuje sady stem-loop primerů pro reverzní transkripci, primerů a fluorescenčně značených sond pro stanovení hladin mikroRNA miR-140-5p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p.
4. Diagnostický set pro detekci mozkových metastáz podle nároku 1, **vyznačený tým**, že obsahuje sady stem-loop primerů pro reverzní transkripci, primerů a fluorescenčně značených sond pro stanovení hladin mikroRNA miR-21-3p, let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p.
5. Diagnostický set podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tým**, že dále obsahuje deionizovanou vodu jako negativní kontrolu.
6. Diagnostický set podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tým**, že dále obsahuje směsný qRT-PCR standard odpovídající hladinám let-7b-5p ve vzorku pacienta s multiformním glioblastomem, hladinám miR-140-5p ve vzorku pacienta s meningeomem, a/nebo hladinám miR-21-3p ve vzorku pacienta s mozkovými metastázami; a směsný qRT-PCR

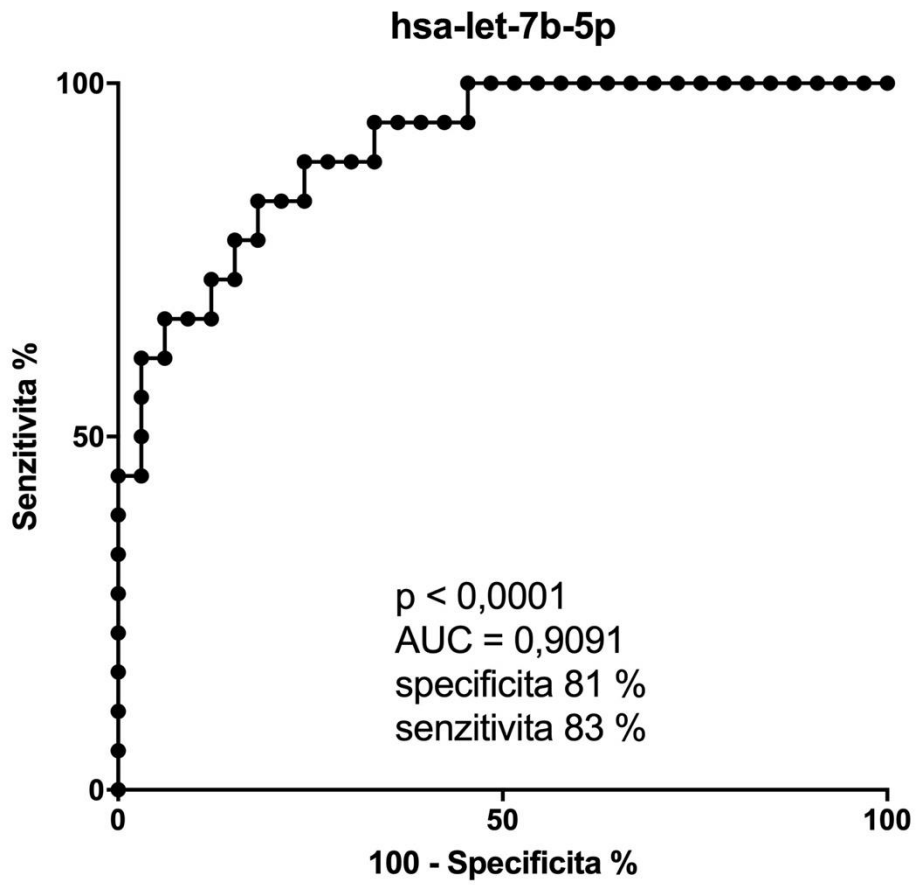
standard odpovídající hladinám let-7i-5p, miR-151a-3p a miR-423-3p ve vzorcích pacientů s glioblastomem, meningeomem a/nebo mozkovými metastázami; a směsný qRT-PCR standard odpovídající hladinám uvedených miRNA u jedinců bez jakéhokoliv prokázaného nádorového onemocnění.

5

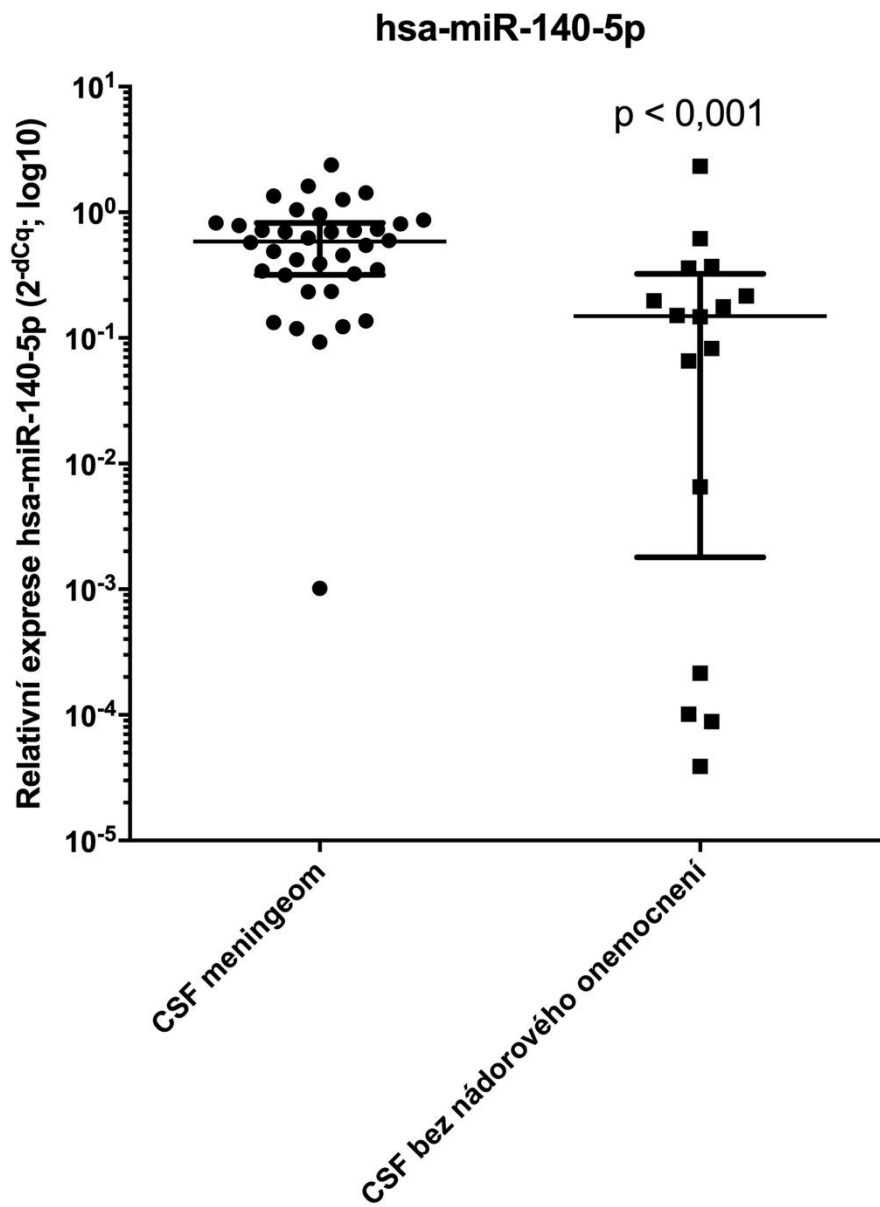
6 výkresů



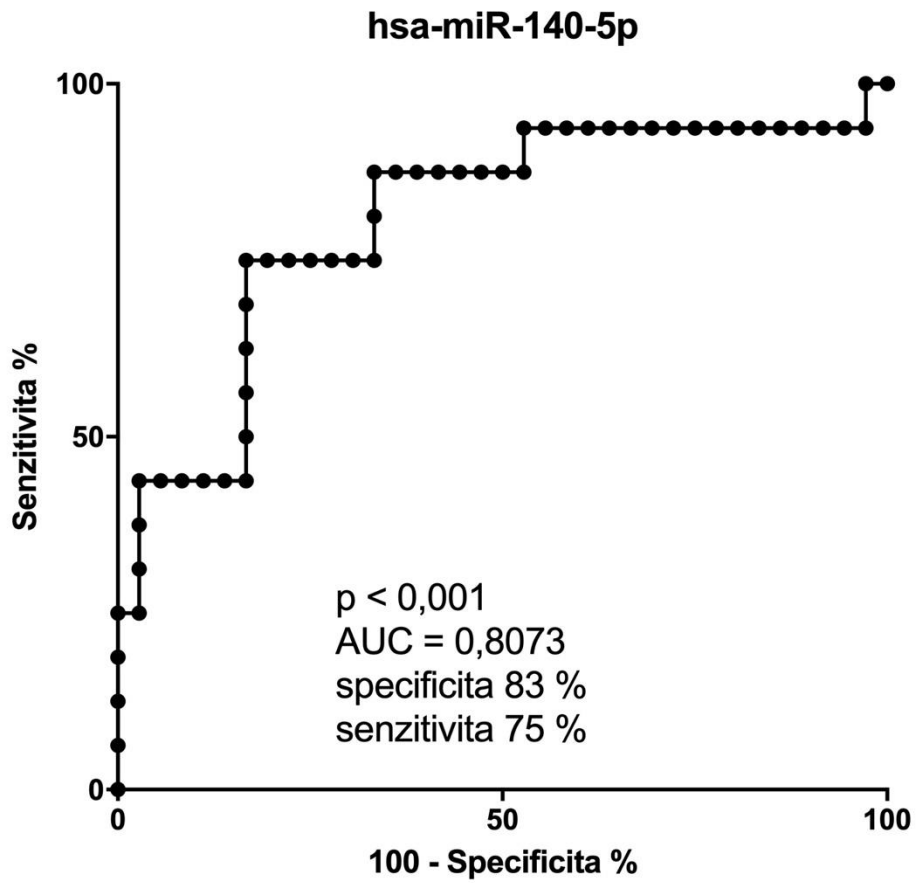
Obr. 1



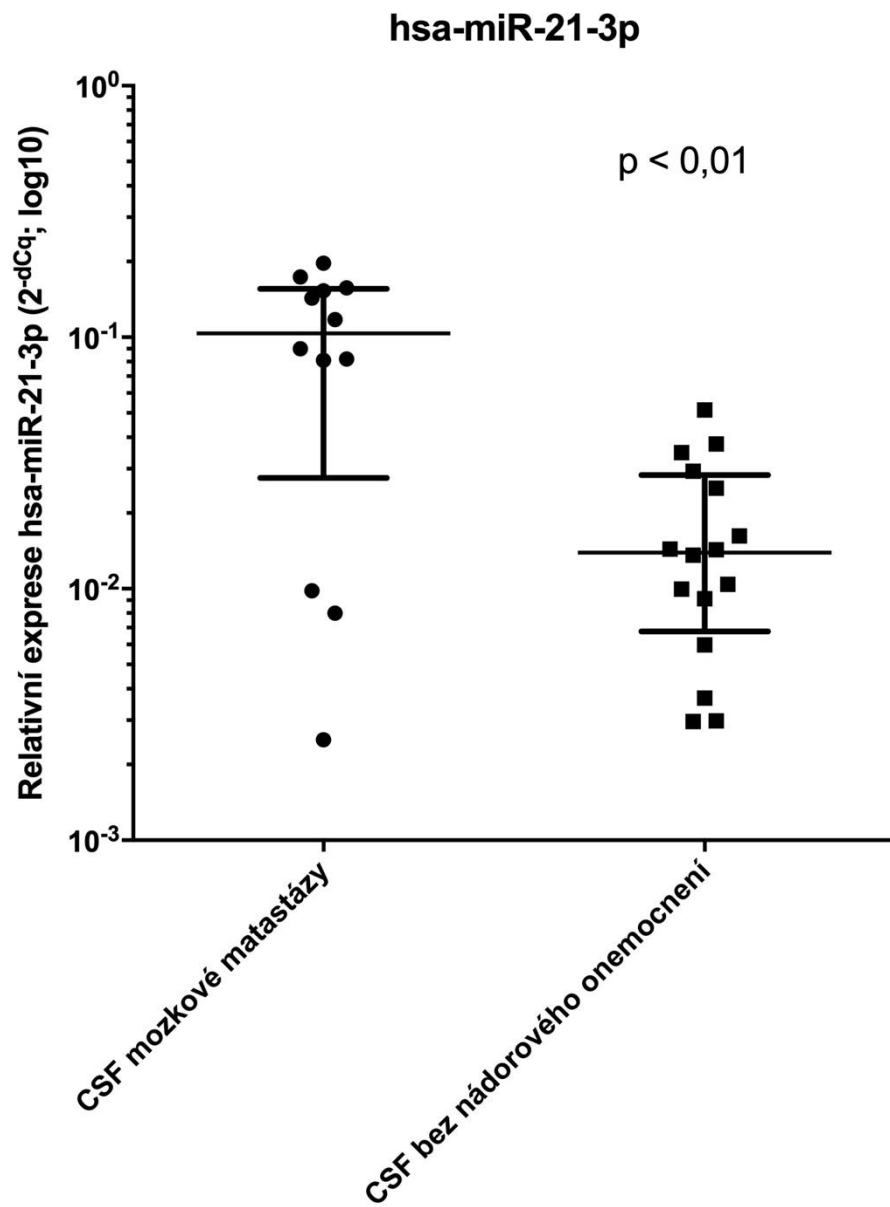
Obr. 2



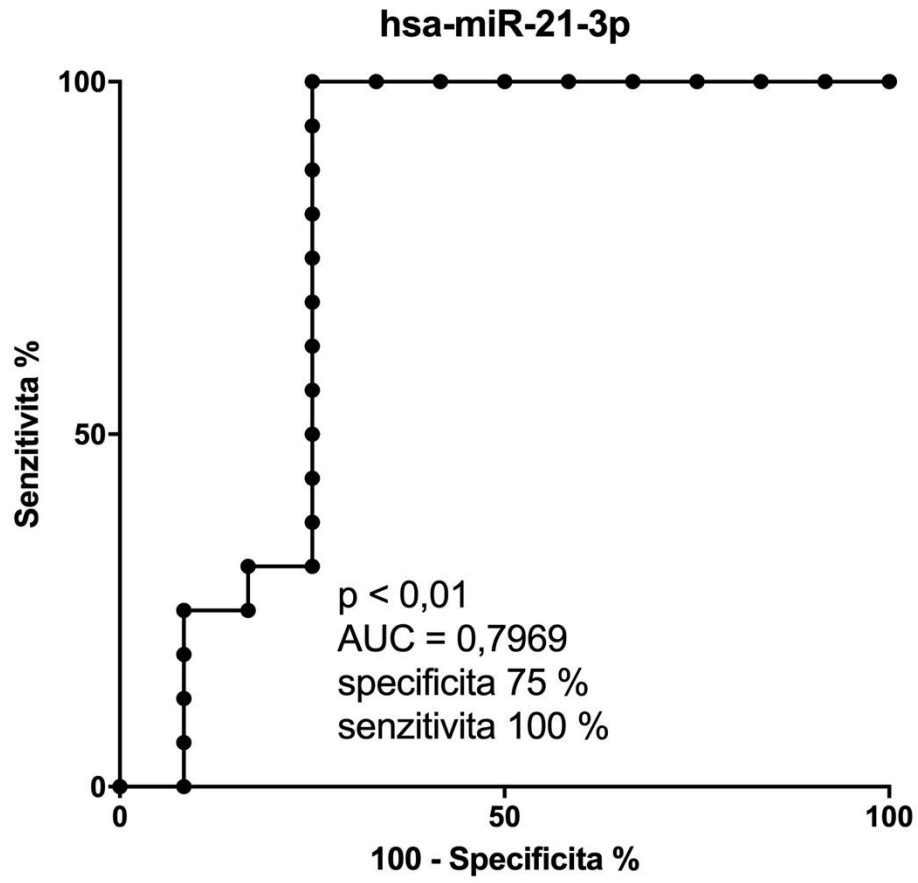
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6