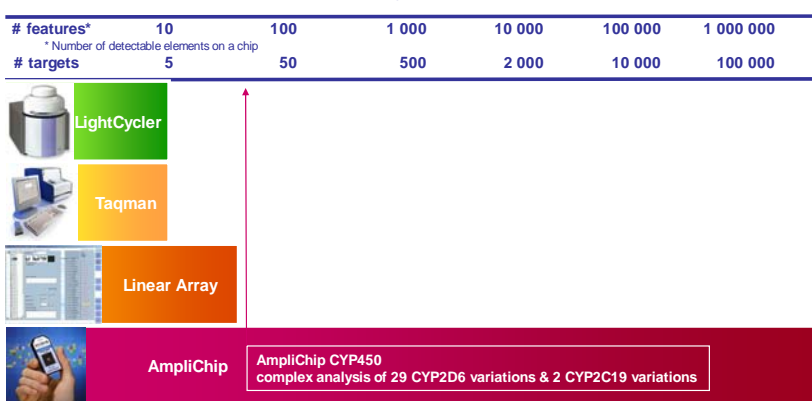


TECHNOLOGIE, JEŽ JE PODSTATOU MIKRODETEKTORŮ AMPLICHIP

Roche Diagnostics prokázala svou schopnost vyvíjet převratné diagnostické testy, které mění zdravotní péči a otvírají nové trhy. V duchu této tradice vytváří společnost Roche novou řadu výrobků AmpliChip navržených tak, že využívají sílu PCR se vzrušujícími technologiemi mikrodetektorů Affymetrix. Tato silná kombinace technologií otvírá cestu pro novou generaci testů, které umožní spolehlivou a celkovou analýzu složitých genomických informací v jediném analytickém postupu. Doposud takové analýzy buď nebyly vhodné pro rutinní klinické využití, nebo byly vykonávány s použitím velmi pracných a časově náročných metod.

Roche Diagnostics - Broadest Range of Gene-Based Platforms

Now extended with AmpliChip microarrays

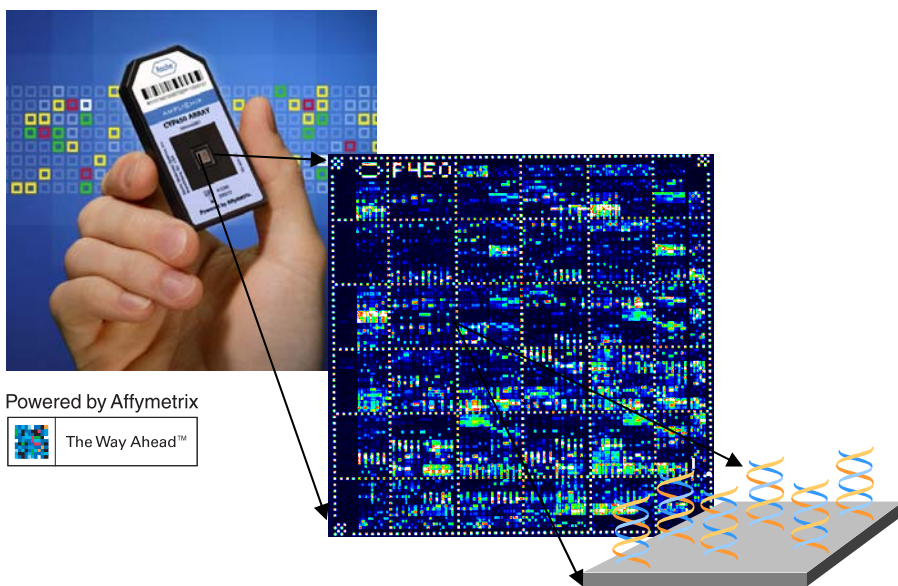


- Výrobky produktové řady AmpliChip rozšiřují už tak silné portfolio genově-orientovaných projektů společnosti Roche Diagnostics. Mikrodetektory umožňují provádět složité, celkové genomické analýzy v jednoduchém diagnostickém postupu.**

“Molekulární mikroskopy”

Před vyvinutím mikrodetektorových metod byl výzkum vlastností molekul a funkcí lidského genetického systému omezen obecně na analýzu jednotlivého genu s tím, že analýza každé varianty genu často vyžadovala samostatnou analýzu. Mikrodetektorové metody revolučním způsobem změnily toto chápání a otevřely nový svět možností jak v klinických, tak výzkumných aplikacích. Mikrodetektory Affymetrix jsou uznávaným standardem pro rozsáhlou paralelní diagnostiku genů v biologickém systému včetně zkoumání struktury genu a funkce genu. Popisovány jako “molekulární mikroskopy,” tyto mocné nové přístroje jsou ve skutečnosti nepatrnými skleněnými čipy, ne většími než otisk prstu. Aby se usnadnila manipulace s nimi, je každý čip uložen v plastovém krytu a je určen k jednorázovému použití a potom k likvidaci.

Jako součást rámcové dohody o spolupráci z ledna 2003 se společnost Affymetrix zavázala vyrábět mikrodetektory AmpliChip pro společnost Roche Diagnostics za podmínek striktní kontroly kvality. Technologie mikrodetektorů a systémů Affymetrix integruje techniky výroby polovodičů, metody suché chemie, molekulární biologii, software a robotiku. Fotolitografie nebo předdefinované vrstvení prováděné molekulou za molekulou s použitím přímé chemické syntézy a masek umožňuje vytvoření tisíců předdefinovaných úseků DNA sekvencí, 25 molekul dlouhých, na specifických částech čipu. Tyto fragmenty DNA



(nazývané oligonukleotidy) naskládané po tisících v nepatrných $20\mu\text{m}^2$ buňkách mikrodetektoru představují biologický systém, který má být analyzován.

Each $20\mu\text{m}^2$ cell on the array can contain 10^7 DNA fragments, or “probes”

Mikrodetektory nazývané také jako “sondové mikrodetektory,” jsou vyráběny v sériích cyklů. Velká skleněná plotna, z níž se pak jednotlivé detektory (nebo “čipy”) vyřezou, je pokrytá adhezivní vrstvou obsahující fotolabilní ochranné skupiny. Dále se použije maska, která umožní expozici pouze vybraných částí mikrodetektoru. Osvícení znehodnotí fotolabilní ochranné skupiny, což umožní selektivní přidání molekul pouze na předtím exponovaná místa. V dalším kroku se použije jiná maska a celý cyklus osvětlení a chemické vazby se provádí znova. Opakováním tohoto cyklu se nasyntetizuje sada oligonukleotidových sond, každá na definovaném místě. Každý výrobek AmpliChip je navržen se systémem vestavěných sond navíc a jinými způsoby kontroly kvality, aby byl zajištěn nejvyšší možný a spolehlivý výkon.

Hotové mikrodetektory nařezané na jejich malý rozměr se vloží do plastového krytu, aby se usnadnila manipulace s nimi. Mikrodetektor testu AmpliChip CYP450 obsahuje více než 15,000 různých oligonukleotidových sond k analýze obou komplementárních řetězců amplifikovaného vzorku cílové DNA.

Využití

Mikrodetektory mohou být navrženy k analýze exprese genů (které geny jsou aktivní a které nejsou aktivní v dané tkáni nebo v daném stádiu nemoci), k detekci určité genové sekvence (které stavební části molekul nebo “páry bází” jsou přítomné ve vzorku, potenciálně důležité pro identifikaci určitých infekčních nemocí), nebo pro genotypizaci (určení toho, které konkrétní genetické odchylky jsou přítomné u jedince nebo u infekčního agens.)

Roche Diagnostics pracuje na vývoji mikrodetektorů AmpliChip a jiných geneticky založených analytických přístrojů pro časnou a více specifickou detekci nemocí a časnou a více specifickou identifikaci faktorů, které mohou ovlivnit riziko nemocí, progresi nemocí nebo odpověď na léčbu.

Test AmpliChip CYP450

Test AmpliChip CYP450 je prvním výrobkem řady AmpliChip společnosti Roche Diagnostics. Je prvním výrobkem využívajícím technologii mikrodetektoru ke kompletní analýze dvou genů, které ovlivňují účinnost léků a nežádoucí účinky léků. Test odhaluje genetické odchylky v genech cytochromu P450 2D6 a 2C19 a výsledek je ve formě předpokládaného příslušného fenotypu (pomalý, střední, extenzivní, nebo ultra-rychlý metabolizér).

Testovací přístroj AmpliChip CYP450 rozeznává 29 známých polymorfismů genu CYP2D6, včetně duplikace genu a delece genu, a dva hlavní polymorfismy genu CYP2C19. Detekce těchto polymorfismů CYP2D6 vyústí v identifikaci 33 unikátních alel, včetně sedmi alel duplikace genu CYP2D6.

Aby byla možná vysoce přesná předpověď pacientova fenotypu, testovací přístroj AmpliChip CYP450 má schopnost nejen detekce *přítomnosti* duplikace genu CYP2D6, ale také schopnost odhalit *kteřá* odchylka genu (alela) byla duplikovaná. Tato specifická je důležitá pro správnou předpověď fenotypu ultra-rychlých metabolizérů a vyvarování se potenciálnímu chybnému zařazení individuálních testů.

Mikrodetektorová technologie v laboratoři

AmpliChip mikrodetektor spojuje sílu dvou v této oblasti špičkových technologií, jež jsou “zlatými standardy”, Roche Diagnostics PCR a mikrodetektorovou technologii Affymetrix. Hlavní kroky v analýze založené na mikrodetektorové technologii zahrnují následující:

1. Test je vyžádán lékařem (jedná-li se o diagnostiku) nebo je definován jako součást farmaceutického klinického pokusu
2. Je odebrán vzorek od pacienta. (Pro test AmpliChip CYP450 je vyžadován běžný vzorek pacientovy krve)
3. Vzorek se odešle do laboratoře provádějící genetickou diagnostiku.

4. Laboratorní technik začne PCR amplifikaci vybraných částí DNA získaných ze vzorku od pacienta.

5. Namnožené a označené segmenty DNA (takzvaný “produkt PCR”) se aplikuje na mikrodetektor AmpliChip CYP450, který se pak umístí do hybridizační komůrky Affymetrix, kde se vytvoří vazby mezi komplementárními páry bází z DNA fragmentů ve vzorku a v samotném mikrodetektoru.



6. Produkt PCR, který se navázal na mikrodetektor se obarví fluorescenčním barvivem.

7. Mikrodetektor se umístí do skeneru Affymetrix, kde se provede laserové naskenování vzorku po hybridizaci. Softwarová analýza tohoto naskenovaného obrazu určí jaká specifická genetická informace je přítomná ve vzorku.

8. U testovacího přístroje AmpliChip CYP450 vytvoří analytický software AmpliChip Data Analysis Software přehlednou zprávu ukazující, které odchylky CYP2D6 a CYP2C19 jsou přítomné. Tato zpráva také uvádí předpokládaný fenotyp (pomalý, střední, extenzivní, nebo ultra-rychlý metabolizér pro gen CYP2D6, nebo pomalý a extenzivní metabolizér pro gen CYP2C19), podle toho, přítomnost jakých genetických odchylek byla analýzou zjištěna.



Zpráva se zašle lékaři, jenž požadoval test, a ten jej pak použije jako pomůcku při rozhodování o výběru léčebného prostředku a dávkování.

Závěr

Po uvedení testovacího přístroje AmpliChip CYP 450 na trh v Evropě v roce 2004 a získání schválení americkou FDA v lednu 2005, se společnost Roche Diagnostics zavázala zavést tuto vzrušující technologii do klinické praxe. V nejbližších letech se očekává využití rozšiřujících se vědomostí o genomu a nových technologií, jako například mikrodetektorů, k hlubšímu pochopení molekulárních rozdílů mezi jedinci a jejich nemocemi s cílem zlepšit péči o pacienty.