



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 576 187 B1**(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number:	E003867	(73) Patendiomanik:	ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI Via Venezian, 1, I-20133 Milano, IT
(11) Patendikirjelduse tõlke number:	EE-EP 1 576 187	(72) Leiutise autor:	SOZZI, Gabriella Via Venezian, 1, I-20133 Milano, IT
(30) Prioriteediandmed:	23.12.2002 IT MI20022743	(74) Patendivolnik:	Enn Urgas Patendibüroo Turvaja OÜ Liivalaia 22, 10118 Tallinn, EE
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev:	22.12.2003		
(96) Euroopa patendi- taotluse number:	03785912.1		
(97) Euroopa patendi väljaand- misest teatamise kuupäev:	09.09.2009		
(97) Euroopa patendi number:	EP 1 576 187		
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev:	08.12.2009		
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev:	15.02.2010		

(54) Meetod tsirkuleeriva DNA koguse määramiseks plasmas ja vähi avastamine

MEETOD TSIRKULEERIVA DNA KOGUSE MÄÄRAMISEKS PLASMAS JA VÄHI AVASTAMINE

Käesolev leiutis pakub välja *in vitro* meetodi vähi varajaseks diagnoosiks, prognoosiks ja monitoorimiseks või vähi tekke riski määramiseks. Leiutisekohane meetod põhineb

5 DNA kvantifitseerimisel plasmaproovis PCR amplifikatsiooni teel.

LEIUTISE TAUST

Mitmed teaduslikud artiklid või patendipublikatsioonid kirjeldavad vähi avastamise meetodeid, mis põhinevad spetsiifiliste geneetiliste muutuste tuvastamisel tsirkuleerivas DNA-s või RNA-s.

10 Patendis US 5 496 699 on avalikustatud meetod mutatsioonide avastamiseks nukleiinhappejärjestustes, täpsemalt K-ras geeni järjestuses, bioloogilistes vedelikes nagu veri, seerum või plasma.

Patendis US 5 068 175 on avalikustatud meetod ras onkogeeniga seotud pahaloomulisuste esinemise avastamiseks, mille puhul nimetatud geen kvantifitseeritakse

15 seerumi või plasma proovides.

Patendis WO01/42504 on avalikustatud rakuvälise nukleiinhappe, näiteks K-ras DNA ja APC geenide määramine seerumi või plasma proovides mitmete neoplastiliste haigustega seotud riskifaktorite hindamiseks.

Patendis WO02/18652 on avalikustatud inimese telomeraasi RNA ja telomeraasi

20 pöördtranskriptaasi RNA kvalitatiivne/kvantitatiivne määramise meetod mitmete neoplastiliste haiguste diagnoosiks, monitoorimiseks, raviks või hindamiseks.

Põhimõtteliselt on geeni muutuste molekulaarse iseloomustamise meetodite tundlikkus madal ja aktsepteeritava informatsioonitaseme saamiseks on vajalik suure kogumi geenimarkerite analüüsimine.

25 Hiljuti teatati meetodist vaba tsirkuleeriva DNA kvantifitseerimiseks kopsuvähi patsientide plasmas, mis baseerub kolorimeetrilisel analüüsil ning millega on võimalik patsiente eristada tervetest vaatlusalustest ja jätku-uuringutel avastada varakult haiguse taasilmnemist (Sozzi, G. et al., *Cancer Research* 61, 4675-4678, June 15, 2001).

Tsirkuleeriva DNA kvantitatiivse hindamise kolorimeetrilisi tehnikaid (nt DNA *Dipstick* meetod) piirab siiski kitsas linearsusvahemik, 0,1-10 ng/ml, ja nõrk tundlikkus madalamatel väärtustel. Lisaks sellele põhineb tulemuste lugemine subjektiivsel hinnangul.

- 5 Ühes hilisemas artiklis (*Hsueh-Wei Chang et al., Journal of the National Cancer Institute, Vol. 94, No. 22, November 20, 2002*) on neoplastilise haiguse, täpsemalt munasarjavähi avastamiseks soovitatud analüüsida DNA kontsentratsiooni plasma-proovides ja SNP-de analüüsi. DNA kvantifitseerimiseks analüüsiti kaheaheelalise DNA-ga kokku liidetud PicoGreen® värvi fluorestsentsi intensiivsust. Tulemused
- 10 näitavad, et vastupidiselt SNP analüüsile on meetod, mida kasutatakse plasma DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks, vähe tundlik ja vähe spetsiifiline ning seega ei sobi populatsioonis neoplastilise haiguse skriinimiseks.

LEIUTISE KOKKUVÕTE

- 15 Käesolev leiutis pakub välja meetodi kogu tsirkuleeriva DNA kvantitatiivseks määramiseks vähipatsiendi, perekondlikult vähi suhtes vastuvõtliku või vähi tekke riskiga isiku plasmaproovis, mis hõlmab järgnevat:

- 1) DNA ekstraheeritakse proovist;
- 2) DNA preparaadile lisatakse: a) inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) geeni fragmendi PCR amplifikatsiooniks sobivat oligonukleotiidipraimerite segu, ja
- 20 b) praimeritega piiratud alal olevale järjestusele kleepuvat oligonukleotiidiproovi, mis sisaldab vähemalt ühte summutajat ja ühte reporterfluorofoori 3' ning 5' otsades, PCR reaktsiooni läbiviimiseks sobivatel tingimustel;
- 3) lisatakse 5'-3' eksonukleaasse aktiivsusega ja hTERT geeni fragmendi amplifitseerivat termostabiilset DNA polümeraasi;
- 25 4) mõõdetakse tekkinud fluorestsents.

Olemasoleva DNA suhtelist kogust testitud proovis on lihtne määrata tuvastatud fluorestsentsi väärtustest teadaolevate DNA kogustega koostatud kalibratsioonikõverast interpoleerimisel.

Eelistatud teostusvariandi kohaselt on praimerid ja proovid disainitud selliselt, et need amplifitseeriks hTERT geeni (GenBank registrinumbr AF128893) fragmenti 13059-13156.

5 Kirjeldatud protseduuri, mida tuntakse reaallaja PCR-na, võib teostada automatiseeritult, kasutades seadet GeneAmp 5700 Detection System (Applied Biosystem), mis võimaldab DNA täpset kvantitatiivset amplifitseerimist fluorogeense PCR reaktsiooni pideva optilise monitoorimise kaudu ja mis on võimeline määrama kuni 1 genoomi ekvivalenti, mis vastab 6 pg genoomsele DNA-le.

10 Leiutisekohast tsirkuleeriva DNA kvantifitseerimise meetodit võib rakendada patsientidel erinevat tüüpi vähkide, sealhulgas käärsoole-pärasoole, pea-kaela, maksa ja pankrease vähi varajaseks avastamiseks, prognoosiks või kliiniliseks monitooringuks. Leiutisekohast meetodit võib kasutada ka vähi riski või tekke tõenäosuse hindamiseks tervetel isikutel, kes puutuvad kokku keskkonna või elustiiliga seotud riskifaktoritega, nagu seda on kopsuvähi korral suitsetamine. Plasma DNA tõus sellistel isikutel on märk
15 suurenenud riskist ja seetõttu peaks testi kiiresti kordama teise plasmaprooviga või viima läbi põhjaliku ja spetsiifilise kliinilise uuringu.

LEIUTISE DETAILNE KIRJELDUS

Neoplastilise haiguse olemasolu määramiseks või vähi tekkega seotud riski hindamiseks on plasma DNA kvantifitseerimise näol leitud lihtne ja täpne meetod, milles kasutatakse
20 reaallaja PCR tehnoloogiat. Täpsemalt on käesolevas leiutises välja pakutud meetod tsirkuleeriva DNA kvantifitseerimiseks fluorogeense PCR reaktsiooni pideva optilise monitoorimise kaudu plasma proovis, kasutades praimerite ja proovidena inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) geeniga paarduvaid oligonukleotiide. hTERT amplifikatsiooni määr on indikaatoriks testitud proovis sisalduva DNA üldkoguse jaoks.

25 Seda protseduuri on valideeritud suuremahulises juhtumi-kontrolli uuringus (200 isikut), mis hõlmas varajases staadiumis kopsuvähi patsiente, kellel määrati jätku-uuringutel pärast vähi eemaldamist plasma DNA tasemed, ja terveid, kõvasid suitsetajaid, kes on valitud sobivalt vanuse, soo ja suitsetamisharjumuste järgi. Uuringutulemused näitavad, et 1) leiutisekohane meetod on kõrge spetsiifilisuse ja tundlikkusega, nagu avaldub AUC
30 ja ROC kõveratelt (globaalne väärtus: 0,94, vahemik 0,907-0,973), 2) patsientidel,

sealhulgas väga varajases staadiumis (IA staadium) vähiga patsientidel, on tsirkuleeriva plasma DNA väärtused ligikaudu 8 korda kõrgemad kui tervetel isikutel, 3) pärast vähi eemaldamist alanevad monitooritud patsientidel DNA tasemed kiiresti sarnasele tasemele tervetel isikutel täheldatud väärtusega; korduva vähiga või vähi metastaasidega isikutel on, vastupidiselt, täheldatud kuni 20-kordset tõusu.

Kuigi kõrgeim tundlikkuse (90%), spetsiifilisuse (86%), positiivse prognoosiva väärtuse (PPV-90%) ja negatiivse prognoosiva väärtuse (NPV-90%) summa saadi DNA kontsentratsiooniga 9 ng/ml, kattuvad nende diagnostiliste indikaatorite usaldusvahemikud (CI) nendega külgnevate kontsentratsioonide omadega. Seega tuleb optimaalse väärtuse valimisel seda varieeruvust arvestada. Näidatud on, et 25 ng/ml on ainus lõikepunkt, mille juures tundlikkus ei kattu teiste lõikepunktide tundlikkusega, kuigi see tundlikkus on madal (46%, 95% CI, 36%, 56%).

Vaatamata laiadele usalduspiiridele näitab esitatud riskisuhete (OR - *Odd Ratios*) suurus tugevat seost plasma DNA kontsentratsiooni ja NSCLC riski vahel. Kunagi varem ei ole ühegi bioloogilise markeri kohta sarnaseid OR väärtusi avaldatud ja kliinilises praktikas võib sellest olulist kasu olla. Tsirkuleeriva plasma DNA suurenevaid koguseid jälgiti mis tahes staadiumis ja suures kasvajas võetud proovides. Eriti tähtis on see väikeste haiguskollete süstemaatiliseks avastamiseks, kuna see võib aidata vähendada kopsuvähki haigestumust ja suremust.

Käesolevas leiutises välja pakutud kvantitatiivse analüüsi üheks oluliseks aspektiks on võimalus jälgida pikaajalisi muutusi pärast vähi eemaldamist. Kolmekümne viielt vähipatsiendilt saadud andmed näitasid tsirkuleeriva DNA järsku vähenemist pärast kopsu resektsiooni. Plasma DNA vähenenud või suurenenud tasemed seevastu haiguse taasilmumist isikutel ei tuvastanud (24,7 ng/ml vs 7,1 ng/ml ilma vähita patsientidel, $p=0,002$), viidates sellele, et plasma DNA kvantifitseerimine võib olla uudseks võtteks kirurgiliste patsientide monitoorimiseks või ravi efektiivsuse hindamiseks pärast keemiaravi.

Suitsetamisega kaasneva vaba DNA vabanemise võimaliku modulatsiooni uurimiseks analüüsiti 20 üle 55 aasta vanust mitte kunagi suitsetanud isikut: nende DNA mediaanväärtus oli 0,61 ng/ml. Juhtumi-kontrolli uuringus kõrge riskiga rühmas (üle 50

aasta vanused kõvad suitsetajad, kes suitsetavad aastas >20 pakki) andis sama läbiviidud analüüs keskmiseks väärtuseks 4,6 ng/ml. Nendest tulemustest ilmneb, et vaba tsirkuleeriva DNA kogus on mitte-suitsetavatel inimestel väga madal.

5 Nende kliiniliste uuringute tulemused näitavad leiutisekohase tsirkuleeriva DNA kvantifitseerimise meetodi efektiivsust kopsuvähi varajasel diagnoosimisel kõrge riskirühma inimestel, eelkõige kõvadel suitsetajatel.

JOONISTE KIRJELDUS

10 **Joonis 1.** NSCLC patsientide (A) ja kontrollproovide (B) plasma hTERT kvantitatiivse reaalaaja PCR amplifikatsiooni graafikud. Plasma DNA suhteline kogus on patsientide proovides (vasakul paiknevad kõverad) märksa kõrgem kui kontrollproovides (paremal paiknevad kõverad).

15 Plasma DNA koguste arvutamine põhineb tsüklite arvul, mille juures iga reaktsiooni fluorestsents on ületanud teatud künnise (CT), mis on seatud amplifikatsiooni taustast eristuvale geomeetrilisele faasile. X-telg tähistab kvantitatiivse PCR reaktsiooni tsüklite arvu. Y-telg tähistab taustast eristuva fluorestsentsi intensiivsuse logaritmilist väärtust (ΔR_n).

20 **Joonis 2.** NSCLC juhtumite ja sobivalt valitud kontrollide plasma DNA kontsentratsiooni karpdiagrammid. Diagrammi alumised ja ülemised servad on piiratud 25% ja 75% protsentiilidega, mediaaniks on karbis olev pidevjoon, alumised ja ülemised veapiirid tähistavad 90% väärtustest. Mini = minimaalne detekteeritud väärtus, max = maksimaalne detekteeritud väärtus, sd = standardhälve.

Joonis 3. NSCLC diagnoosi ROC kõverad, mille puhul on kasutatud plasma DNA väärtusi. Kõver ja kõveraalne pindala (AUC - *area under curve*) on määratud logistilisel meetodil SAS programmi (Cary, NC) abil.

25 MATERJALID JA MEETODID

Juhtumi ja kontrolli seeriad

Uuriti sadat järjestikust mitteväikerakk-kopsuvähi (NSCLC - *non small cell lung cancer*) juhtumit, mis ilmnisid 81 mehel ja 19 naisel, kes ei olnud eelnevalt keemiaravi saanud,

ja mis olid kantud Euroopa Onkoloogia Instituudi (IEO - *European Institute of Oncology*) koepanka aastal 2000 kuni 2001. Iga juhtumi jaoks valiti üks kontroll, mis sobitati kokku soo, vanuse ja suitsetamisharjumuste järgi.

5 Keskmine vanus \pm sd oli juhtumitel 65,1 \pm 8,9 aastat ja kontrollidel 64,1 \pm 8,2, keskmine suitsetamise kestus oli juhtumitel 40,5 \pm 10,9 aastat ja kontrollidel 41,7 \pm 9,5. Populatsiooni kuulus 7 mitte kunagi suitsetanud juhtumi-kontrolli paari. Osalejate seast valiti IEO varajase avastamise programmi 93 kõvasti suitsetavat kontrolli, kelle rinnakorvi spiraalkompuutertomograafia (*spiral CT*) oli negatiivne. Mittesuitsetajatest kontrollid värvati instituudi immunoematoloogia osakonnast tervete veredoonorite 10 hulgast. Endiste suitsetajate arv juhtumite ja kontrollide vahel oli vähesel määral erinev (28 juhtumit ja 11 kontrolli).

Üks kerge ja juhusliku suitsetaja juhtum (<5 sigaretti päevas) sobitati mitte kunagi suitsetanute alla. Keskmine paarisine vanuse erinevus 1 aastat oli statistiliselt oluline ($p < 0,02$), viidates vanuse kohandamise vajadusele, kui analüüsitakse plasma DNA-d kui 15 riskifaktorit.

Proovide kogumine ja DNA isoleerimine

7,5 ml perifeerse vere proovi koguti EDTA katsutitesse patsientidelt enne operatsiooni ja kontrollidelt spiraalkompuutertomograafia uuringu ajal ja hoiustati -140° juures. Plasma eraldati ja DNA ekstraheeriti vastavalt varem kirjeldatule (25). Ühest milliliitrist 20 plasmast puhastatud DNA elueeriti 50 μ l lõppruumalas vees. Plasma DNA testimisel oli juhtumi/ kontrolli staatus teadmata.

DNA kvantifitseerimine plasmas

Tsirkuleeriva DNA kvantifitseerimiseks plasmas kasutati kvantitatiivset reaalaja PCR võtet, mis põhineb 5' nukleotiidi meetodil. See meetodika põhineb progressiivse 25 fluorogeense PCR pideval monitoorimisel optilise süsteemiga (28:29). PCR süsteem kasutab kahte amplifikatsiooni praimerit ja täiendavat, amplokoni spetsiifilist ja fluorogeenset hübridisatsiooniproovi, mille märklaudjärjestus asub amplokonis.

Proov on märgistatud kahe fluorestsentsvärviga. Üks täidab 5'-otsas reporteri rolli (VIC^{TM} värv). Selle emissioonispektri summutab teine 3'-otsas asuv fluorestsentsvärv

(TAMRA). Kui toimub amplifikatsioon, siis lõikab AmpliTaq[®] DNA polümeraasi 5'-3' eksonukleasne aktiivsus ekstensiooni faasi ajal reporteri proovi küljest, vabastades selle sel moel summutajast (30). Sellest tulenev reportervärvi fluorestsentsi emissiooni tõus on PCR protsessi jooksul jälgitav.

- 5 Praimerid ja proovid disainiti selliselt, et need amplifitseerisid spetsiifiliselt üldlevinud huvipakkuvat geeni, inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) ühe koopiana esindatud geeni, kaardistatud kui 5p15.33. hTERT geeni amplikoni suurus oli 98 bp (asendid 13059-13156, GenBank registrinumber AF128893). Praimerite ja proovi järjestused olid järgmised: 5'-GGC ACA CGT GGC TTT TCG-3'; äraspidine praimer:
- 10 5'-GGT GAA CCT CGT AAG TTT ATG CAA-3'; proov: VIC5'- TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG-3' TAMRA.

Fluorogeensed PCR reaktsioonid viidi läbi 50 µl reaktsiooniruumalas seadmel GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA). Fluorogeenne proov ja praimer sünteesiti Applied Biosystems poolt. Iga PCR reaktsiooni

15 segu sisaldas 25 µl TaqMan[®] Universal Master Mix Applied Biosystem; 0,67 µl proovi [15 mM]; 0,45 µl päripidist praimerit [10 mM]; 0,45 µl äraspidist praimerit [10 mM]; 18,43 µl steriilset vett. Reaalaja PCR igas reaktsioonis kasutati 5 µl DNA lahust. Termotsükkel käivitati esimese denaturatsiooni etapiga, 2 min temperatuuril 50 °C ja seejärel 10 min 95 °C juures. PCR temperatuuri programm oli 15 s 95 °C juures ja 1 min

20 60 °C juures. Analüüsil kasutati 50 amplifikatsioonitsükli jooksul kogutud andmeid.

Amplifitseerimised viidi läbi 96-kohalistel plaatidel seadmel GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Iga plaat sisaldas patsientide proove triplikaatides ja mitmeid tühju veeproove negatiivse kontrollina. Kalibratsioonikõvera tegemiseks igal plaadil kasutati standardset inimese genoomse DNA kontrolli (TaqMan

25 Control Human Genomic DNA) kontsentratsioonil 10 ng/µl (Applied Biosystem) sobivate seerialahjendustega 50 ng, 5 ng, 2,5 ng, 0,5 ng, 250 pg, 50 pg ja 10 pg. Iga katse korral oli amplifikatsioon lineaarne kuni viimase lahjenduspunktini, mis tähistas 10 pg märklaud-DNA-d (korrelatsioonikoefitsient 0,999-0,995; tõus 3,25-3,35).

Kõikide andmete analüüsil kasutati tarkvara Sequence Detection System (Applied

30 Biosystem), et interpoleerida teadaoleva kogusega DNA standardselt amplifikatsiooni-

kõveralt tundmatu märklaudproovi amplifikatsiooniga CT, saades nii DNA suhtelise sisalduse katseproovis.

Jätku-uuringute tarbeks analüüsiti samas reaalaja PCR katses kohele iga patsiendi kõik järjestikused plasmaproovid, et proovide kogused vaatlusaja jooksul oleksid
5 võrreldavad.

Patoloogilised ja immunohistokeemilised meetodid

Kliinilis-patoloogilised andmed olid kättesaadavad kõikide juhtumite jaoks. Esindatud oli 58 adenokartsinoomi, 34 lamerakk-kartsinoomi, 3 suurerakulist kartsinoomi, 3 pleomorfset kartsinoomi ja 2 adeno-lamerakk-kartsinoomi. Vastavalt WHO kopsu-
10 adenokartsinoomi klassifikatsioonile (31) olid 19 (32,6%) kobarja kasvustriga, 19 papillaarsed, 17 (29,3%) soliidid ja 3 (5,2%) bronhioloalveolaarsed. Vastavalt kopsuvähi etappide parandatud süsteemile (32) oli kasvaja etapis pT1 18%, pT2 55%, pT3 21% ja pT4 6% juhtudest; neljakümne seitsmel protsendil patsientidest oli pN0, 20% pN1 ja 33% pN2 või N3. I etapp moodustas 34%, IIB 25%, IIIA 33% ja IIIB/IVB
15 8%. Kolme juhtumi korral analüüsiti vaid keskseinandi lümfisõlmede metastaase.

Iga juhtumi korral hinnati kasvaja nekroosi või lümfi infiltraadi esinemist poolkvantitatiivselt skaalas puuduv kuni 2+ (kogu kasvaja 1+ kui $\leq 50\%$ ja 2+ kui $> 50\%$). Immunohistokeemiliseks analüüsiks uuriti operatsioonil eraldatud formaliiniga fikseeritud ja parafiiniga kaetud proovides raku apoptoosiga (p53) ja tuumori kasvuga
20 (CD-117, Ki-67 ja mikroveresoonte tihedus) seotud markerite olemasolu, vastavalt varem välja töötatud meetoditele (33). Kõike juhtumeid hinnati pimedalt, teadmata patsiendi identiteeti, patoloogilist diagnoosi, kliinilist väljundit või plasma DNA olukorda. p53-, EGFR-, CD117- ja Ki-67-immunoreaktiivsete kasvajakude protsendi hindamiseks loendati vähemalt 1000 kasvajakude vastavatel immunovärvimise väljadel.
25 Kasvaja neoangiogeneesi tehti kindlaks endoteelirakkude CD34 immunovärvimisega, vastavalt eelnevalt kirjeldatule (34).

Statistilised meetodid

DNA väärtuste jaotuses ilmnes kõrvalekalle normaalsusest, mille vähendamiseks kasutati logaritmilist transformatsiooni. Kontsentratsiooni logaritmi kasutati testimiseks,
30 raporti tulemustes näidati siiski transformeerimata väärtusi.

Plasma DNA kui NSCLC riskifaktori hindamiseks riskisuhete (OR) ja vastavate 95% usaldusvahemike arvutamisel kasutati tinglikku logistilist regressioonanalüüsi (*conditional logistic regression*) SAS programmis (Cary, NC, USA). Plasma DNA kontsentratsioonide diagnostilist jõudlust hinnati vastuvõtja töökõvera (ROC - *receiver-operating characteristic curve*) põhjal. Kõverat ja kõveraalust pindala (AUC) määravate 5 tundlikkuse ja spetsiifilisuse väärtuste arvutamiseks kasutati lõikepunktina iga individuaalset DNA väärtust. Pindalale 95% usaldusvahemiku leidmiseks määrati eraldi standardvead, nagu on kirjeldanud van der Schouw (35).

Juhtumite korral uuriti DNA kontsentratsiooni võimalikku seost pidevate kliiniliste ja 10 patoloogiliste parameetritega, arvutades Pearsoni või Spearmani korrelatsiooni-koefitsiendid, mis sõltuvad parameetrite jaotusest (nt vastavalt vanuse ja EGFR markeri jaotusest). Plasma DNA mediaankontsentratsioonide võrdlemiseks jätku-uuringu tulemustega patsientidel kasutati Kruskal-Wallise testi.

TULEMUSED

15 Tsirkuleeriva plasma DNA kvantitatiivne analüüs vähipatsientidel ja kontrollidel

Joonisel 1 on näha vähipatsientide plasmaproovide ja sobivate kontrollide fluorestsentsi intensiivsuse ja PCR tsükli amplifikatsioonigraafikuid. Iga graafik vastab esialgsele märklaud-DNA kogusele proovis. Amplifikatsioonikõverad nihkusid paremale, mis näitas märklaud-DNA koguse vähenemist ja eristas kontrollid selgelt vähipatsientidest. 20 Plasma DNA kontsentratsioonide jaotus haigusjuhtumite ja sobivate kontrollide korral annab, hoolimata mõningasest kattumisest, kaks erinevat väärtuste kogumit (joonis 2). Juhtumite mediaankontsentratsioon (24,3 ng/ml) oli peaaegu kaheksa korda suurem kui vastav kontrollidel määratud väärtus (3,1 ng/ml). Väga kõrgeid kontsentratsioone täheldati vaid juhtumite korral, samas kui jaotuse teises otsas olid mõned väga madala 25 DNA kontsentratsiooniga (nt 0,5 ng/ml) juhtumid. Juhtumite korral täheldati suuremat tsirkuleeriva DNA varieeruvust kui kontrollidel (vaata joonis 2).

Plasma DNA kontsentratsioon kui NSCLC riskifaktor

Tsirkuleeriva plasma DNA kõrgendatud kontsentratsiooni seostati suurema NSCLC riskiga. Rakendades tinglikku logistilist regressiooni, näitas tertiilide jaotus, et teises ja 30 kolmandas tertiilis olevate plasmakontsentratsioonidega isikute korral kasvas risk

eksponentsiaalselt, võrreldes esimese tertiili omadega (kuni 85 korda, tabel 1). Pidevas analüüsis seostati plasma DNA ühikuline tõus (ng/ml) NSCLS riski 21% tõusuga (OR = 1,21, 95% CI (*confidence interval* - usaldusvahemik) = 1,11, 1,31). Juhtumite korral seostati tsirkuleeriva DNA kontsentratsioon vanusega (vanuse koefitsient plasma kontsentratsiooni logaritmi regressioonil = 0,029, standardviga = 0,013, p = 0,026). Plasma DNA tasemete ja suitsetamise intensiivsuse või kestuse vahel ei leitud mingit seost.

Kvantitatiivse reaalaaja PCR analüüsi diagnostiline jõudlus

Joonisel 3 näidatud ROC kõvera alune pindala oli 0,94 (95% usaldusvahemik 0,907-0,973), mis näitab molekulaarse analüüsi tugevat eristusvõimet. Tabelis 2 on toodud ära mõned DNA kontsentratsioonide lõikepunktid, mida kasutati nende tundlikkuse, spetsiifilisuse, positiivse prognoosiva väärtuse ja negatiivse prognoosiva väärtusega kõvera saamiseks. Tundlikkuse hinnanguid ümbritsevad 95% usaldusvahemikud kattusid tabelis 2 näidatud järjestikuste kontsentratsioonidega, välja arvatud viimase kahe kontsentratsiooniga (20 ja 25 ng/ml).

Plasma DNA tasemete korreleerimine kliinilis-patoloogiliste tunnustega

Analüüsitud morfoloogiliste ja immunohistokeemiliste markerite hulgas täheldati märkimisväärset seost nii EGFR ekspressiooni kui ka mikroveresoonte tihedusega (tabel 3). Proliferatsioonimarker Ki67 suurenes plasma DNA kontsentratsiooni suurenemisel, kuigi korrelatsioon ei olnud statistiliselt oluline (p = 0,15). Vanus oli ainus kliiniline parameeter, millel oli oluline seos DNA vabanemisega plasmas. Seost plasma DNA tasemete ja nekroosi, lümfi infiltratsiooni või kasvumustrite vahel ei täheldatud.

Muutused plasma DNA tasemetes jätku-uuringute käigus

35 vähipatsiendil 100-st, kellel hinnati plasma DNA koguseid enne I-II faasi kasvajate opereerimist, võeti teine plasmaproov ja seda analüüsiti DNA muutuste monitoorimiseks kliinilise jätku-uuringu jooksul, 3 kuni 15 kuud pärast operatsiooni (keskmine möödunud aeg 8 kuud). Üleüldine keskmine DNA kontsentratsioon jätku-uuringu plasmaproovides oli 8,4 ng/ml, mis näitab võrreldes keskmise baastasemega, 24,5 ng/ml, selget vähenemise trendi (p < 0,0001). Võrreldes neid patsiente vastavalt nende

kliinilisele seisundile, oli keskmine DNA kontsentratsioon jätku-uuringutel 30 haigusest vabal isikul märkimisväärselt madalam kui 5 taasilmunud vähiga patsiendil (7,1 ng/ml versus 24,7 ng/ml; $p = 0,002$):

Tabel 1. Plasma DNA kontsentratsioon kui NSCLC riskifaktor

	Kontrollid N=100	Kontrollid N=100	Riskisuhe Tinglik*	95% CI
DNA tertiilide jaotus, ng/ml †				
≤4	4	62	1 ‡	
4,1 - 20	27	36	5,5	(1,9 - 16,3)
>20	69	2	85,5	(16,5 - 445)
* vanuse järgi kohandatud				
† Saadud plasma DNA väärtuste jaotuse ühendamisest juhtumite ja kontrollide korral				
‡ Võrdlusrühm				

5

Tabel 2. Plasma DNA kontsentratsiooni skriinimine

Lõikepunkt (ng/mL) *	Tundlikkus	95%CI†	Spetsiifilisus	95% CI†	PPV	NPV
4	97	91,5-99,4	60	49,7-69,7	71	95
7	92	84,8-96,5	77	67,5-84,8	80	91
10	88	80,0-93,6	86	77,6-92,1	88	88
15	78	68,6-85,7	95	88,7-98,4	94	81
20	69	58,9-77,9	98	93,0-99,8	97	76
25	79	35,9-56,3	99	94,5-100	98	65
PPV = positiivne prognoosiv väärtus, NPV = negatiivne prognoosiv väärtus						
* Lõikepunktist madalamad eristuvad kontsentratsioonid vs määratletud väärtusega võrdsed või kõrgemad kontsentratsioonid						
† Tundlikkuse ja spetsiifilisuse hinnanguid kasutati kui binoomseid parameetreid 95% usaldusvahemike arvutamiseks, kasutades tarkvara Statxact (Cambridge, MA)						

Tabel 3. Plasma DNA tasemete korrelatsioon kliinilis-patoloogiliste parameetritega

Log (DNA kontsentratsioon)					
	Vanus	Suitsetamise aastad	Log MVD	Ki67	Egfr
Koefitsient*	0,22	0,04	0,25	0,15	0,2†
P väärtus	0,026	0,71	0,016	0,15	0,044
n‡	100	93	97	97	97

* Pearsoni korrelatsioonikoefitsiendid
† Spearmani korrelatsioonikoefitsiendid
‡ Proovi suurus on vähendatud 93 suitsetavale kontrollile (praegune või endine) ja 97 primaarse vähiprooviga kontrollile.

JÄRJESTUSTE LOETELU

<110> ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI

<120> VÄHI AVASTAMISE MEETOD

5 <130> 6798MEUR

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcacacgtg gcttttcg

18

<210> 2

15 <211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggtgaacctc gtaagttat gcaa 24

<210> 3

<211> 24

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

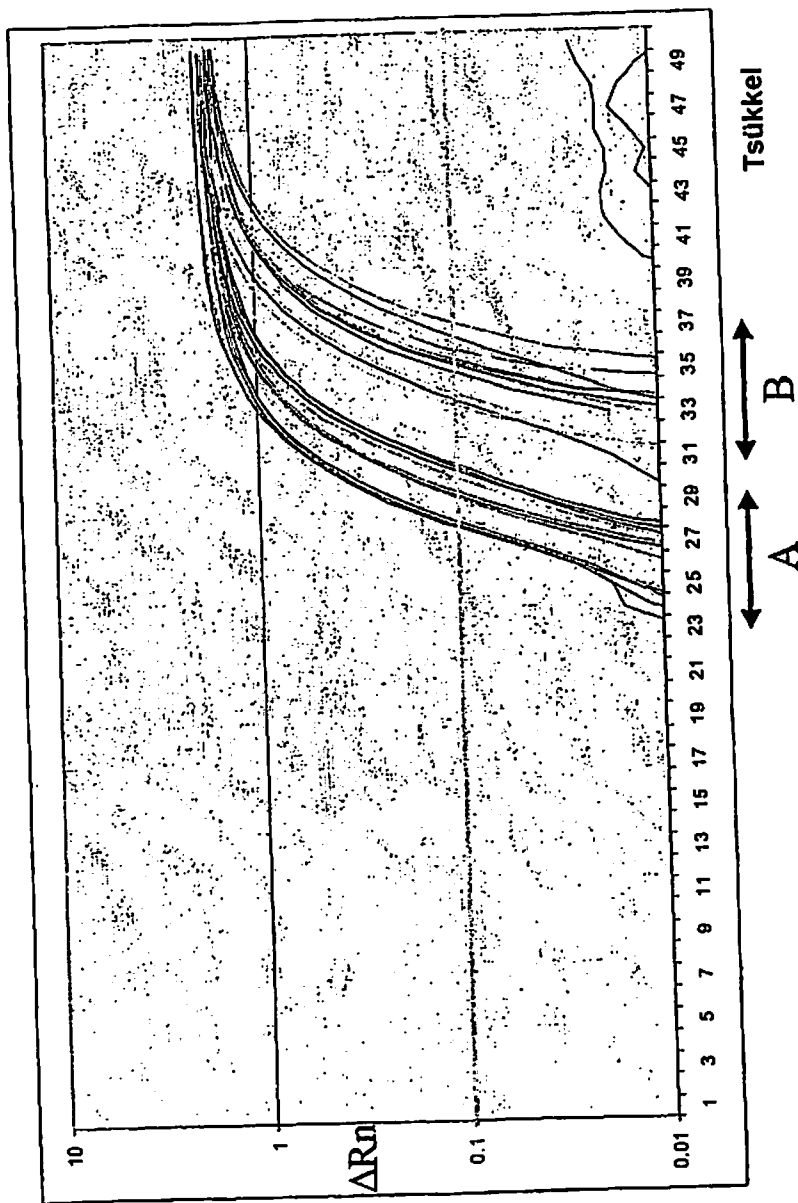
tcaggacgtc gagtggacac ggtg 24

PATENDINÕUDLUS

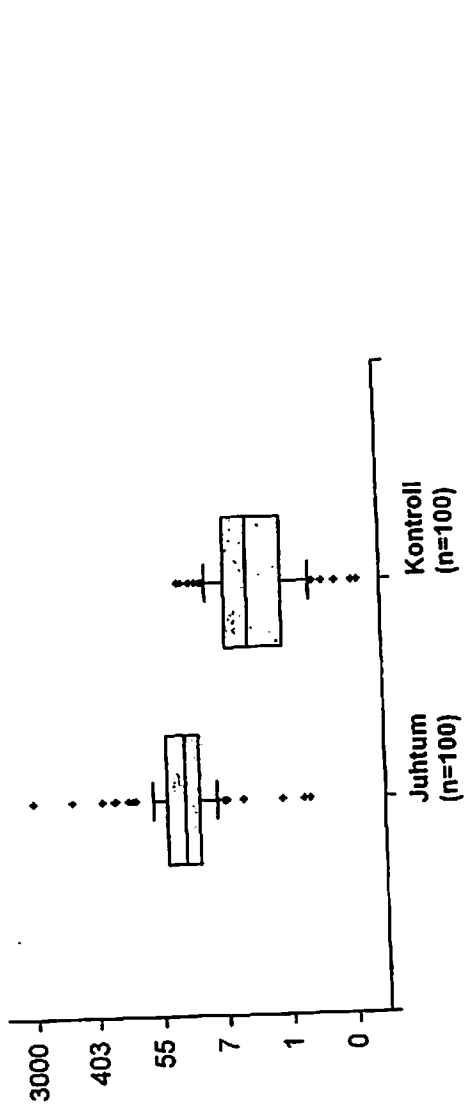
1. Meetod kogu tsirkuleeriva plasma DNA kontsentratsiooni määramiseks vähipatsiendi, vähi tõenäosusega või vähi tekke riskiga isiku plasmaproovis, mis hõlmab järgnevat:
- 1) DNA ekstraheeritakse proovist;
 - 5 2) DNA preparaadile lisatakse: a) inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) geeni fragmendi PCR amplifikatsiooniks sobivat oligonukleotiidipraimerite segu, ja b) praimeritega piiratud alal olevale järjestusele kleepuvat oligonukleotiidiproovi, mis sisaldab vähemalt ühte summutajat ja ühte reporterfluorofoori 3' ning 5' otsades, PCR reaktsiooni läbiviimiseks sobivatel tingimustel;
 - 10 3) lisatakse 5'-3' eksonukleaasse aktiivsusega ja hTERT geeni fragmenti amplifitseerivat termostabiilset DNA polümeraasi;
 - 4) mõõdetakse tekkinud fluorestsents.
2. Nõudluspunktile 1 vastav meetod, kusjuures testproovi DNA kontsentratsioon määratakse teadaolevate DNA koguste põhjal arvutatud kalibratsioonigraafikust
- 15 interpoleerimise teel.
3. Nõudluspunktile 1-2 vastav meetod, mis sisaldab täiendavalt tsirkuleeriva DNA võrdlemist referentskontsentratsiooniga.
4. Nõudluspunktile 3 vastav meetod, kusjuures referentskontsentratsioon on vahemikus 9 kuni 25 ng/ml.
- 20 5. Nõudluspunktile 1 vastav meetod, kusjuures inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) geeni nimetatud fragmendiks on nukleotiidid 13059 kuni 13156 järjestuses, mille GenBank registrinumber on AF128893.
6. Nõudluspunktile 5 vastav järjestus, kusjuures inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) geeni nimetatud fragmendi amplifitseerimiseks on päripidise ja äraspidise
- 25 praimerina kasutatud vastavalt järjestusi SEQ ID 1 ja 2 ning proovina järjestust SEQ ID 3.

7. Nõudluspunktidele 1-3 vastav meetod vähipatsientide varajaseks diagnoosiks, prognoosiks või kliiniliseks monitoorimiseks.
8. Nõudluspunktidele 1-3 vastav meetod vähi tekke riski hindamiseks tervetel isikutel või perekondliku vähi suhtes vastuvõtlikel isikutel.
- 5 9. Nõudluspunktile 8 vastav meetod vähi tekke riski hindamiseks suitsetajatel.
10. Nõudluspunktile 1 vastav meetod, kusjuures nimetatud vähiks on kopsu, käärsoole pärasoole, pea ja kaela, maksa või pankrease vähk.
11. Nõudluspunktile 10 vastav meetod, kusjuures nimetatud vähiks on kopsuvähk.

JOONIS 1



JOONIS 2



Plasma DNA kontsentratsioon (ng/ml) protsentili jaotus haiguse seisundist

	10°	25°	75°	90°	max	media	sd
juhtum	0.5	15.8	24.3	43.7	65.9	75*	310*
kontroll	0.1	1.1	3.1	6.3	11.1	4.6	5

*Väärtuste seast jäeti välja kaks väärtust (823 ja 3010 ng/ml)

juhtum
kontroll

JOONIS 3

