

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2021 577**
(22) Paraiškos padavimo data: **2021-12-30**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2023-07-10**

(71) Pareiškėjas:
**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A.
Mickevičiaus g. 9, 44307 Kaunas, LT**
(72) Išradėjas:
**Greta Varkalaitė, LT
Jurgita SKIECEVIČIENĖ, LT
Juozas KUPČINSKAS, LT**
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
**Reda ŽABOLIENĖ, 7, METIDA, Verslo centras
„VERTAS“, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Būdas nustatyti su skrandžio vėžiu siejamas mutacijas kraujyje naudojant genų panelę

(57) Referatas:

Atlikus 29 skrandžio vėžio pacientų viso egzomo sekoskaitą buvo sukurta 38-ių genų panelė. Naudojant šią panelę ir atliekant naujos kartos sekoskaitą somatinės mutacijos gali būti įvertinamos ir gauti rezultatai gali būti naudojami prognozuoti įvairiais navikais sergančių pacientų ligos eigą, įvertinti atkrytį bei prognozuoti ligą.

BŪDAS NUSTATYTI SU SKRANDŽIO VĖŽIU SIEJAMAS MUTACIJAS KRAUJYJE NAUDOJANT GENŲ PANELĘ

TECHNIKOS SRITIS

Šis aprašymas priklauso mutacijų nustatymo nukleorūgštyse sričiai, o tiksliau – su vėžiu susijusių mutacijų nustatymui nukleorūgštyse išgaunamose iš kūno skysčių.

TECHNIKOS LYGIS

Skrandžio vėžys vis dar yra vienas dažniausių ir letaliausių vėžinių susirgimų Lietuvoje ir pasaulyje. Mirtingumas nuo šios ligos artėja prie mirtingumo nuo širdies ir kraujagyslių ligų lygio. Gydymas, parinktas atsižvelgiant į individualų biožymenų rinkinį, vis daugiau pradedamas analizuoti klinikiniuose tyrimuose. Todėl pastarųjų metų skrandžio vėžio moksliniai tyrimai telkiasi į naujų diagnostinių įrankių ir technologijų sukūrimą, kurie leistų diagnozuoti šią ligą ankščiau, stebėti ligos eigą ir taikyti personalizuotos medicinos principus gydant. Šiuo metu yra žinoma, kad analizuojant žmogaus kraujyje aptinkamą laisvai cirkuliuojančią DNR galima diagnozuoti onkologinę ligą ir stebėti jos eigą.

JAV patento dokumentas US2020181711A1 aprašo panašų metodą analizuoti vėžį, kur pacientų skysčių mėginiuose esančių EN2 ir SATB2 genų ekspresija yra naudojama diagnozuoti ir įvertinti vėžį. Šis dokumentas įvertina tik šių dviejų genų ekspresiją ir nepateikia skrandžio vėžio aptikimui optimizuoto genų rinkinio, kuris leistų tiksliau analizuoti skrandžio vėžį.

JAV Patento dokumentas US2021002727A1 aprašo metodą identifikuoti su liga susijusius genų variantus nuskaitant paciento ir sveiko žmogaus egzomų sekas ir jas palyginant tarpusavyje. Nors lyginant sveiko žmogaus ir paciento DNR sekas galima surasti daugiau ligą lemiančios DNR, šis būdas yra netikslus, nes sugeneruoja daugiau klaidingai teigiamų rezultatų, kurie atsiranda dėl skirtumų tarp individų.

Artimiausias patento dokumentas US2019256924A1 aprašo daugybės onkologinių ligų tyrimo metodą apimančią pacientų kraujo mėginiuose laisvai plaukiojančios genetinės medžiagos biomarkerių analizę KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, PIK3CA, HRAS, CDKN2A, AKT1, CTNNB1, APC, EGFR, GNAS, PPP2R1A, BRAF, FBXM7, PTEN, FGFR2 genuose. Nors keletas genų, kurie naudojami vėžio biomarkerių analizei sutampa, šio išradimų genų panelė nėra optimizuoti aptikti skrandžio vėžį.

IŠRADIMO ESMĖ

Sukurta 38-ių genų panelė apima apie 390 kilo bazių regioną genome. Taikant šia panelę ir atliekant naujos kartos sekoskaitos analizę (naudojamas GATK Best Practices somatic short variants workflow (PMID: 25431634), kurį sudaro tokie bionformatiniai įrankiai kaip Burrows-

Wheeler Aligner (BWA), Samtools, Mutect2 ir kt.), galima įvertinti pacientų kraujyje esančios DNR mutacijas susijusias su onkogeneze. Viso egzomo sekoskaita atlikta naudojant hibridizaciją specifiniais pradmenimis koduojančios genomo dalies sekų praturtinimui (komercinis xGen Exome Research Panel v1, IDT rinkinys). Duomenys gauti naudojant tokia DNR analizę gali būti pritaikomi įvairias vėžines ligas turinčių pacientų ligos stebėjimui, ligos prognozavimui ir atkryčio vertinimui.

Atlikus viso egzomo sekoskaitą LSMU Kauno Klinikų Gastroenterologijos klinikos skrandžio vėžio pacientų grupei (n=29) buvo sukurta 38-ių genų panelė, kurią galima naudoti onkogenezės stebėjimui. Šią panelę ir atliekant naujos kartos sekoskaitos analizę galima įvertinti somatinės navikinės kilmės mutacijas neinvaziniu būdu – pacientų kraujyje. Nustatytos mutacijos apima vieno nukleotido pakaitas bei nedideles insercijas ir delecijas. Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad tokia laisvai cirkuliuojančios DNR analizė gali būti taikoma įvairiais navikais sergančių pacientų ligos eigos stebėsenai, atkryčio vertinimui ir prognozei.

Šis su vėžiu susijusių mutacijų nustatymo būdas naudojamas įvertinti mutacijas esančias DNR fragmentuose išgrynintuose iš paciento biologinio mėginio naudojant genų panelę susidedančią iš: ACVR2A, CDH1, ERBB4, GLI3, MSH6, PREX2, SYNE1, TRRAP, APC, CTNNB1, FAT1, KMT2C, MUC16, PTEN, SMAD4, ZIC4, ARID1A, EGFR, FAT4, KRAS, PBRM1, RHOA, SPEN, TTN, ATM, EPHB1, FBXW7, MACF1, PIK3CA, RIMS2, STK11, CCND1, ERBB2, FHIT, MLH1, PKHD1, RNF43 ir TP53 genų ir specifinių pradmenų. Įvertinimas atliekamas palyginant gautą informaciją su referentine žmogaus genomo seka.

Minėtas biologinis mėginys dažniausiai yra kūno skysčių mėginys, dažniausiai kraujo mėginys. Mutacijų analizei naudojama iš kūno skysčių, konkrečiai, kraujo plazmos išgryninta laisvai cirkuliuojanti DNR. Iš laisvai cirkuliuojančios DNR išgauti genų panelės fragmentai yra naudojami kiekybinei ir kokybinei analizei. Nustatius žalingas vieno nukleotido pakaitas, insercijas ir delecijas, jos yra toliau vertinamos kokybiškai ir kiekybiškai tam, kad būtų prognozuojamas vėžys. Ši genų panelė yra labiausiai pritaikyta būtent su skrandžio vėžiu susijusių mutacijų nustatymui.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Paciento periferinis kraujas paimamas standartinės flebotomijos procedūros metu, naudojant komerciškai prieinamus K2EDTA mėgintuvėlius (10 ml mėgintuvėlis vienam pacientui; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Plazma nuo eritrocitų atskiriama per 2 valandas nuo kraujo paėmimo naudojant optimizuotą dvigubo centrifugavimo protokolą (Streleckiene G, ..., Skieceviciene J. Effects of Quantification Methods, Isolation Kits, Plasma Biobanking, and Hemolysis on Cell-Free DNA Analysis in Plasma. Biopreserv Biobank. 2019;17(6):553-561. PMID: 31343271). Laisvai cirkuliuojančios DNR gryninimas iš kraujo plazmos atliekamas naudojant komercinius skyrimo rinkinius: *QIAamp Circulating Nucleic Acid isolation kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Naudojant mūsų genų panelę, sudaryta iš 38 genų ir specifinių

pradmenų šių genų praturtinimui, atliekama naujos kartos sekoskaita. Sugeneruotos sekos prilyginamos referentinei žmogaus genomo sekai (GRCh37/hg19), atliekamas sekų apdorojimas: sekoskaitos adapterių šalinimas, kokybės kontrolė, sekų apjungimas į „šeimas“ pagal unikalius molekulinis žymenis (angl. *unique molecular identifiers (UMI)*). Nustatyti genetiniai variantai vėliau anotuojami, pagal duomenų bazes (dbSNP/ClinVar, COSMIC ir kt.) įvertinant jų reikšmę baltymo gamybai. Tik žalingą poveikį turintys somatiniai variantai (vieno nukleotido pakaitos ir insercijos/delecijos) vertinami toliau. Mūsų tyrimas rodo, kad prognostinę reikšmę pacientų išgyvenamumui bei kaip žymuo naviko išplitimui turi ir kokybinė (t. y. aptinkama ar ne somatinė mutacija kraujo plazmoje) ir kiekybinė (t. y. aptinkamų mutacijų skaičius, mutavusio alelio dažnis) plazmos laisvai cirkuliuojančios DNR analizė.

1 lentelė. Genai, sudarantys genų panelę.

ACVR2A	CDH1	ERBB4	GLI3	MSH6	PREX2	SYNE1	TRRAP
APC	CTNNB1	FAT1	KMT2C	MUC16	PTEN	SMAD4	ZIC4
ARID1A	EGFR	FAT4	KRAS	PBRM1	RHOA	SPEN	TTN
ATM	EPHB1	FBXW7	MACF1	PIK3CA	RIMS2	STK11	
CCND1	ERBB2	FHIT	MLH1	PKHD1	RNF43	TP53	

Naudojant šią panelę ir atliekant gilią taikininę naujos kartos sekoskaitą iš viso somatinės mutacijos plazmoje laisvai cirkuliuojančios DNR buvo nustatytos 91,3 proc. pacientų, o mutacijos, kilusios iš navikinio audinio - 47,8 proc. pacientų. Lyginant mokslinę literatūrą, skelbiami audinio ir laisvai cirkuliuojančios DNR mutacijų profilio persidengimo rezultatai yra nuo 33,9 proc. iki 58,0 proc. (Fang W-L, et al, 2016; Kim YW, et al, 2019; Lan J, et al, 2020). Be to, naudojant sukurta panelę mutacijos plazmos laisvai cirkuliuojančioje DNR buvo nustatytos ir pacientams su santykinai mažais navikais (T1-T2 pagal TNM klasifikaciją, 10 proc. tirtųjų), tai rodo, kad identifikavus mutacijas galima nustatyti ligą anksti ir taip pagerinti pacientų išgyvenamumą.

Naudojant genų panelę taip pat buvo atliktas kiekybinis mutacijų vertinimas ir nustatyta sąsaja su išgyvenamumu. Stipri asociacija tarp mutacijų kiekio ir išgyvenamumo parodo, kad mutacijų tyrimas plazmos laisvai cirkuliuojančiojoje DNR galėtų būti taikomas pacientų prognozės vertinimui bei personalizuoto gydymo pritaikymui, kai mutacijos nustatomos su atsaku į terapiją susijusiuose genuose. Šiame tyrime pacientų, kurių laisvai cirkuliuojančios DNR buvo nustatyta: i) 1-2 somatinės mutacijos genuose, esančiuose panelės sudėtyje išgyvenamumo mediana siekė 469 dienas; ii) 3-6 somatinės mutacijos genuose, esančiuose panelės sudėtyje, išgyvenamumo mediana siekė 315 dienų; iii) daugiau nei 6 mutacijos genuose, esančiuose panelės sudėtyje, išgyvenamumo mediana siekė 44 dienas. Pacientų, kuriems nenustatyta mutacijų kraujyje laisvai cirkuliuojančioje DNR, išgyvenamumo mediana

buvo ilgiausia - 803 dienos. Nustatyti skirtumai tarp šių grupių buvo statistiškai patikimi $P = 0,008$ (kai alfa reikšmingumo lygmuo $P < 0,05$). Be to, papildomai buvo naudotas Cox proporcingos rizikos modelis, įtraukiantis pacientų demografinius rodiklius bei naviko charakteristikas. Rezultatai taip pat parodė statistiškai reikšmingą daugiau nei 6 somatinių mutacijų poveikį pacientų išgyvenamumui (koreguota $P = 0,0186$).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Su vėžių susijusių mutacijų mėginyje nustatymo būdas, besiskiriantis tuo, kad būdas apima:
su vėžiu susijusių mutacijų įvertinimą naudojant genų panelę, susidedančią iš: ACVR2A, CDH1, ERBB4, GLI3, MSH6, PREX2, SYNE1, TRRAP, APC, CTNNB1, FAT1, KMT2C, MUC16, PTEN, SMAD4, ZIC4, ARID1A, EGFR, FAT4, KRAS, PBRM1, RHOA, SPEN, TTN, ATM, EPHB1, FBXW7, MACF1, PIK3CA, RIMS2, STK11, CCND1, ERBB2, FHIT, MLH1, PKHD1, RNF43 ir TP53 genų ir specifinių pradmenų, kur įvertinimas apima šių genų sekų nustatymą ir šių sekų palyginimą su referentine genomo seka
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad mėginys yra kūno skysčių mėginys.
3. Būdas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad kūno skysčių mėginys yra kraujo mėginys.
4. Būdas pagal bet kurį iš 1 - 3 punktų, besiskiriantis tuo, kad minėti genų panelės DNR fragmentai, naudojami mutacijų analizei, yra išgauti iš laisvai cirkuliuojančios DNR.
5. Būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, besiskiriantis tuo, kad laisvai cirkuliuojanti DNR yra išgryninama iš kraujo plazmos.
6. Būdas pagal bet kurį iš 1-6 punktų, besiskiriantis tuo, kad žalingos somatinės mutacijos apima vieno nukleotido pakaitas bei insercijas ir delecijas.
7. Būdas pagal bet kurį iš 1-7 punktų, besiskiriantis tuo, kad nustatytos mutacijos yra su vėžiu susijusios mutacijos.
8. Būdas pagal 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad nustatomos su vėžių susijusios mutacijos yra su skrandžio vėžiu susijusios mutacijos.