

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-546**
(22) Přihlášeno: **14.10.2018**
(40) Zveřejněno: **22.04.2020**
(Věstník č. 17/2020)
(47) Uděleno: **16.01.2023**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.02.2023**
(Věstník č. 8/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
PV 2015-106 & CZ 306080 B6, Masarykova univerzita a Fakultní nemocnice Brno, 27.7.2016; THOMPSON, Mary Ann, et al. miR-31 and miR-17-5p levels change during transformation of follicular lymphoma. Human pathology, 2016, 50: 118-126, ISSN: 0046-8177; CN108535236, UNIV SOUTH CHINA NORMAL, 14.9.2018, (7); Katerina Musilova et al. miR-150 downregulation contributes to the high-grade transformation of follicular lymphoma by upregulating FOXP1 levels. Blood, 13.8.2018, 2018, Vol. 132, No. 22, p. 2389-2400, ISSN 0006-4971, str. 2389, 2391, 2395, obr. 1A; DOI:10.1182/blood-2018-06-855502.

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

(72) Původce:
doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D., Brno,
Židenice, CZ
Mgr. Ján Deván, 91305 Adamovske Kochanovce,
SK
Mgr. Kateřina Musilová, Brno, Líšeň, CZ

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

(54) Název vynálezu:
Způsob stanovení prognózy u pacientů s folikulárním lymfomem

(57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje způsob stanovení prognózy u pacienta trpícího folikulárním lymfomem, vyznačený tím, že se stanoví množství miR-31 v izolovaném biologickém vzorku pacienta, a na základě tohoto stanovení se pacient přiřadí do prognostické skupiny, přičemž prognostické skupiny a mezní hodnoty pro přiřazení do prognostických skupin se získají analýzou množství miR-31 v biologických vzorcích pacientů se známou prognózou. V biologickém vzorku odebraném z těla pacienta se může stanovit exprese miR-31 spolu s expresí endogenní kontroly, kterou je malá jadéřková RNA či stabilně exprimovaná miRNA, a v případě absolutní kvantifikace se zároveň stanoví i exprese syntetických standardů těchto miRNA, a endogenní kontroly o známých počtech molekul. Stanovení prognózy nezahrnuje stanovení transformace folikulárního lymfomu do difuzního velkobuněčného B-lymfomu. Popsaný způsob umožňuje pomoci stanovení exprese miR-31 přiřazení pacientů do prognostických skupin.

Způsob stanovení prognózy u pacientů s folikulárním lymfomem

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká nového způsobu stanovení prognózy u pacientů trpících folikulárním lymfomem.

10 Dosavadní stav techniky

Folikulární lymfom (FL) je nejčastějším typem indolentního ne-Hodgkinského lymfomu. Navzdory výraznému zlepšení přežití pacientů po zavedení imunoterapie zůstává toto onemocnění, je-li diagnostikováno v pokročilých stádiích, dodnes nevyléčitelným (*Benešová K. et al. Klin Onkol* 2015; 28: 3S73 až 3S79). Jeho průběh je charakteristický opakovanými relapsy vedoucími ke vzniku rezistentního onemocnění nebo k transformaci do agresivnějšího typu lymfomu, která vede k významnému zkrácení doby přežití pacientů (nastane v průběhu choroby u 30 až 40 % pacientů, transformace typicky do difuzního velkobuněčného B-lymfomu [DLBCL]). Osud konkrétního pacienta s nově diagnostikovaným FL lze prozatím jen nedostatečně odhadnout. K tomu slouží několik prognostických skóre (FLIPI, FLIPI2), jež jsou postaveny zejména na základních klinicko-laboratorních parametrech (věk, klinické stadium, laboratorní aktivita choroby vyjádřená obvykle hodnotami LDH, hemoglobinem, beta-2-mikroglobulinem atd.) nebo na klinickém chování v čase (*Casulo C. et al. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015; 33: 2516 až 2522). Nedostatkem těchto skóre je především jejich malá individuální přesnost. V současné době bylo vyšší přesnosti dosaženo díky kombinacím těchto prognostických skóre s mutačním statusem vybraných genů. Výsledkem těchto snah jsou nové klinicko-genetické prognostické skóre, zejména M7-FLIPI, které je založené na hodnocení mutačního statusu sedmi genů (*EZH2, ARID1A, MEF2B, EP300, FOXO1, CREBBP* a *CARD11*) v kombinaci s klinickými faktory (FLIPI, ECOG škála) a modifikované M7-FLIPI vytvořené pro predikci brzké progresse onemocnění nazvané POD24-PI (*Jurinovic V. et al. Blood* 2016; 128: 1112 až 1120; *Pastore A. et al. Lancet Oncol* 2015; 16: 1111 až 1122. 128: 1112 až 1120). Patogeneze FL je komplexní souhrou vzájemných interakcí deregulovaných onkogenů, tumor supresorů, epigenetických regulátorů a faktorů nádorového mikroprostředí. I proto se stanovení prognózy pacientů až dosud odvíjí zejména od stanovení kombinace mnoha faktorů, které by měly pokrýt značnou heterogenitu tohoto onemocnění. Stanovení nových prognostických skóre (M7-FLIPI, POD24-PI) navíc vyžaduje sekvenování několika genů u každého pacienta a je proto časově i finančně náročné. V případě POD24-PI je také nevyhnutelná dlouhá doba sledování pacientů potřebná pro jeho stanovení (24 měsíců). Úkolem vynálezu je proto nalezení nového způsobu, jenž by umožnil rychlé, přesné a finančně méně náročné stanovení prognózy pacientů s FL.

40

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález navrhuje způsob stanovení prognózy u pacienta trpícího folikulárním lymfomem (FL), jehož podstata spočívá v tom, že se stanoví množství miR-31 v izolovaném biologickém vzorku pacienta, a na základě tohoto stanovení se pacient přiřadí do prognostické skupiny, přičemž prognostické skupiny a mezní hodnoty pro přiřazení do prognostických skupin se získají analýzou množství miR-31 v biologických vzorcích pacientů se známou prognózou.

50 Obecně je vyšší hladina miR-31 spojena s pozitivní prognózou, tedy s delší dobou přežití pacienta. V rámci předkládaného vynálezu tak byl identifikován jeden marker, jenž může nahradit stávající prognostické skóre a jehož stanovení je možno provádět s vysokou přesností pomocí metod rutinně užívaných v diagnostických laboratořích. Výhodou je i snadná dostupnost miRNA a díky vysoké stabilitě také možnost izolace z dlouhodobě archivovaných FFPE bločků, zamražené tkáně anebo možnost využití miRNA cirkulujících v tělních tekutinách.

55

Zařazení pacientů do prognostických skupin spočívá v porovnání stanoveného množství miR-31 ve vzorku pacienta vůči hodnotě vybraného kvantilu množství miR-31 ve skupině pacientů se známou prognózou, přičemž pacienti s hladinou miR-31 nižší, než je hodnota tohoto kvantilu, se přiřadí do prognostické skupiny s horší prognózou, a pacienti, jejichž hladina miR-31 je větší než daný kvantil, se přiřadí do prognostické skupiny s lepší prognózou. Prognóza může například odpovídat predikci přežití předem danou dobu, například více než 3 roky nebo více než 10 let, přičemž prognostická skupina s horší prognózou má nízkou šanci přežití (například méně než 70 % nebo 60 % a méně) po tuto dobu, a prognostická skupina s lepší prognózou má vysokou šanci přežití (například alespoň 70 % nebo alespoň 80 % nebo alespoň 90 %) po tuto dobu. V jednom provedení má například skupina s horší prognózou 55 až 60 % přežívajících po 10 letech, zatímco skupina s lepší prognózou má 90 až 92 % přežívajících po 10 letech. V jednom provedení může být kvantilem 2. tercil, ale v jiných provedeních lze kvantil zvolit jinak.

Pro použití hladiny miR-31 jakožto prognostického markeru byla vytvořena reprodukovatelná metoda pro její kvantifikaci. Stanovení množství (exprese) miR-31 ve vzorku, tedy kvantifikaci miR-31, lze provádět relativně, kdy se normalizovaná exprese vyjádří jako rozdíl počtu cyklů potřebných na dosažení prahové detekce u miR-31 a u endogenní kontroly; nebo absolutně, kdy se přepočítává pomocí syntetických standardů přímo množství molekul miRNA vzhledem k množství 1.000.000 molekul endogenní kontroly. Relativní kvantifikace je procesně jednodušší, ale lze ji použít jen pro porovnání množství miR-31 stanovených u pacientů v rámci jedné laboratoře nebo jednoho pracoviště stejnou metodou. Pro umožnění porovnání výsledků a přenos metody mezi pracovišti nebo laboratořemi je vhodnější provádět kvantifikaci miR-31 absolutně, tedy v porovnání se syntetickým standardem.

Kvantifikace miR-31 se provádí vůči endogenní kontrole. Endogenní kontrolou je látka, jejíž množství (exprese) v biologických vzorcích se v podstatě nemění. Ve výhodných provedeních vynálezu může být endogenní kontrolou malá jadéřková RNA (snoRNA), zejména vybraná z RNU38B, RNU6B, RNU44, RNU48, a/nebo může být endogenní kontrolou stabilně exprimovaná miRNA, například miR-16.

Expresí miR-31 se tedy stanoví spolu s expresí endogenní kontroly, a zároveň se v případě absolutní kvantifikace stanoví exprese syntetických standardů miR-31 a endogenní kontroly o známých počtech molekul. Jako endogenní kontrola může vzhledem k charakteru miRNA sloužit malá jadéřková RNA (snoRNA; např. RNU38B, RNU6B, RNU44, RNU48) a/nebo stabilně exprimovaná miRNA (např. miR-16). V rámci předkládaného vynálezu byly navrženy syntetické standardy (obr. 1), a to dle evolučně konzervovaných sekvencí daných miRNA a snoRNA pro miR-31 a endogenní kontrolu. Tyto standardy o známém počtu molekul se analyzují společně se vzorky a následně se přepočítají přesné počty kopií miR-31 na milion molekul endogenní kontroly.

Příklady navržených syntetických standardů:

miR-31: 5' - AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU - 3'

RNU38B: 5' - CCA GUU CUG CUA CUG ACA GUA AGU GAA GAU AAA GUG UGU CUG
AGG AGA - 3'

Pro stanovení exprese se s výhodou použije přepis miRNA do copyDNA (cDNA) a detekce metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR). Pomocí takto stanovené exprese miR-31 je možné rozdělení pacientů do prognostických skupin. U jednotlivých prognostických skupin se stanoví prahové hodnoty exprese miR-31. Při využití relativní kvantifikace se vyjádří normalizovaná exprese pomocí rozdílu počtu cyklů potřebných na dosažení prahové detekce u miR-31 a endogenní kontroly. U kvantifikace absolutní se přepočítává pomocí syntetických standardů přímo množství molekul miRNA vzhledem k jedné molekule endogenní kontroly. Tento postup umožňuje reprodukovat výsledky mezi různými laboratořemi.

Podobně je možné postupovat také při stanovení exprese miR-31 pomocí technik masivního paralelního sekvenování/sekvenování nové generace, tj. definovat počet molekul miR-31 vůči počtu molekul endogenní kontroly.

- 5 Při stanovení prognózy se potom kvantitativně stanoví exprese miR-31 ve vzorku odebraném z těla pacienta a určí jeho příslušnost do odpovídající prognostické skupiny. Expresce miR-31 nižší, než je mezní hodnota (daný počet molekul ve vzorku) indikuje zkrácenou dobu přežití. Mezní hodnota miR-31 (počet molekul ve vzorku) se získá statistickým vyhodnocením její exprese stanovené v biologických vzorcích odebraných z těl pacientů. (počet kopií miR-31/milion kopií endogenní kontroly).

10 Stanovení prognózy podle vynálezu však nezahrnuje stanovení transformace folikulárního lymfomu (FL) do difuzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL) na základě analyzování exprese miR-31.

- 15 Vynález tak poskytuje pomocí relativní nebo absolutní kvantifikace miR-31 ve vzorcích odebraných z těla pacienta způsob stanovení prognózy pacientů FL, a to bez ohledu na jiné známé prognostické markery.

- 20 Biologickým vzorkem může být vzorek tkáně tumoru, například zmražené tkáně, vzorek z FFPE (formalínem fixovaný a v parafínu zalitý vzorek) bločků tkáně tumoru, nebo vzorek periferní krve.

- 25 Kvantifikace miR-31, endogenní kontroly, a popřípadě i syntetického standardu, se s výhodou provede metodou jejího přepisu do copyDNA (cDNA) a detekce metodou qRT-PCR, nebo se kvantifikace s výhodou provede pomocí technik masivního paralelního sekvenování/sekvenování nové generace (miRNAseq).

- 30 Pro aplikaci qRT-PCR v oblasti miRNA je vzhledem ke specifickým vlastnostem miRNA nutná modifikace. Největší překážkou je už samotná délka miRNA, která odpovídá délce běžně používaných primerů, přičemž kratší primery nejsou použitelné. Aby se obešel problém s příliš nízkou teplotou tání primerů v duplexu s miRNA, lze využít například komerčně dostupné tzv. stem-loop neboli vlásenkové primery. Detekční systém TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies) je založen na použití speciálně navržených primerů pro reverzní transkripci, při níž dojde k prodloužení miRNA a následně specifických sond pro qRT-PCR. Reverzní transkripce slouží k syntéze ss cDNA (ss = single strand, jednovláčková) z vyizolované totální RNA prostřednictvím TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kitu (Life Technologies).

- 40 Primery a sondy pro výše uvedené metody pro miR-31 i pro endogenní kontroly jsou komerčně dostupné. V příkladech uvedených zde níže byl například používán systém TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies).

Objasnění výkresů

- 45 Obr. 1a. Rozmezí Ct cyklů (resp. počtu kopií miRNA) pokryté syntetickými standardy (příklad 1).

Obr. 1b. Rozmezí počtu molekul pokrytých syntetickými standardy (příklad 1).

- 50 Obr. 2a. Přežití pacientů v závislosti na míře exprese miR-31 – rozdělení podle druhého tercilu – kohorta 1 (příklad 2).

Obr. 2b. Přežití pacientů v závislosti na míře exprese miR-31 – rozdělení podle druhého tercilu – validační kohorta (příklad 2).

Obr. 2c. Vlevo: srovnání relativní exprese miR-31 u pacientů s přežitím více než 3 roky a u pacientů s přežitím méně než 3 roky. Vpravo: Odhadovaná hustota pravděpodobnosti úmrtí v kohortě FL pacientů od biopsie. Křivka odhadovaného rizika ukazuje, že k maximálnímu riziku úmrtí došlo během prvních 3 let od biopsie.

5

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

10

Byla provedena analýza exprese miR-31 u FL vzorků za účelem definování role miR-31 v prognóze FL. Jako přístup byla zvolena absolutní a relativní kvantifikace miR-31. Relativní kvantifikace je technicky jednodušší, protože nevyžaduje použití syntetických standardů, avšak takto získané výsledky je možné spolehlivě aplikovat jenom v rámci jedné laboratoře, resp. centrálně. Absolutní kvantifikace na rozdíl od relativní kvantifikace umožňuje přesné stanovení počtu kopií miRNA v daném vzorku a možnost toto provést reprodukcibilně v různých laboratořích. Pro přepočtení počtu kopií byla připravena standardní ředící řada o známém počtu molekul, které pokryjí potřebné množství cyklů qRT-PCR. Pro aplikaci qRT-PCR v oblasti miRNA je vzhledem ke specifickým vlastnostem miRNA nutná modifikace. Největší překážkou je už samotná délka miRNA, která odpovídá délce běžně používaných primerů, přičemž kratší primery nejsou použitelné. Aby se obešel problém s příliš nízkou teplotou tání primerů v duplexu s miRNA, byly využity například komerčně dostupné tzv. stem-loop neboli vlásenkové primery. Detekční systém TaqMan[®] MicroRNA Assay (Life Technologies) je založen na použití speciálně navržených primerů pro reverzní transkripci, při níž dojde k prodloužení miRNA a následně specifických sond pro qRT-PCR. Reverzní transkripce slouží k syntéze ss cDNA (ss=single strand) z vyizolované totální RNA prostřednictvím TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kitu (Life Technologies). Vstupní množství RNA je přibližně 4 ng totální RNA v celkovém objemu reakce, který činí 7,5 µl. Jako endogenní kontrola pro normalizaci exprese miRNA byla použita malá jadérková RNA RNU38B a pro stanovení absolutního počtu molekul miR-31 byly použity syntetické standardy miR-31 a RNU38B (dle miRBase v. 19; syntéza na zakázku firmou Sigma Aldrich). Analogicky lze využít RNU6B, RNU44, RNU48 a další snoRNA jako kontrolní RNA.

25

miR-31: 5' - AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU - 3'

35

RNU38B: 5' - CCA GUU CUG CUA CUG ACA GUA AGU GAA GAU AAA GUG UGU CUG AGG AGA - 3'

40

Z těchto synteticky připravených RNA byla připravena cDNA, která byla ředěna v poměru 1:7 vodou bez nukleáz a která při amplifikaci qRT-PCR pokryje téměř 20 cyklů a množství molekul v reakci přibližně od 70 do 18.10⁶ molekul (obr. 1a, b). K syntéze cDNA byl používán systém TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Každý vzorek byl analyzován v triplicátu pomocí systému TaqMan[®] Gene Expression Assay (Life Technologies) podle instrukcí výrobce. Amplifikace cDNA byla následně detekována přístrojem 7900 Real Time PCR System (Life Technologies). Data byla vyhodnocena v programu SDS v2.4 (Life Technologies) a následně exportována ve formátu tabulky Excel (Microsoft Office XP). Pokud je odchylka hodnoty v triplicátu vyšší než 0,3 cyklu, tato odlehlá hodnota je vyřazena z hodnocení. Při využití absolutní kvantifikace se následně provede přepočtení počtu molekul miRNA na milion molekul endogenní kontroly RNU38B. Použití této endogenní kontroly bylo validováno společně s možným použitím dalších malých snoRNA, např. RNU6B, RNU44, RNU48 a stabilně exprimovaných miRNA (miR-16). Analogicky by se postupovalo také při stanovení exprese miR-31 pomocí technik masivního paralelního sekvenování/sekvenování nové generace, tj. definovat počet molekul miR-31 (viz sekvence výše) vůči počtu molekul endogenní kontroly (např. miR-16, viz sekvence výše). Při použití relativní kvantifikace je vyjádřena normalizovaná exprese dané miRNA pouze jako procento exprese endogenní kontroly, a to s využitím počtu cyklů potřebných pro dosažení prahové fluorescence.

55

Příklad 2

5 MiRNA z FFPE tkáňových bloků je izolována podle doporučení a s využitím chemikálií kitu High Pure miRNA Isolation Kit (Roche). Pro izolaci RNA z parafínu je nejprve tkáň odparafinována a následně natrávena působením proteáz. RNA v přítomnosti chaotropní soli guanidin thiokyanátu je navázána na skleněná vlákna ve filtru kolonky. Navázaná RNA je sérií promývacích kroků zbavena nečistot a následně eluována vodným roztokem bez solí (voda bez nukleáz). MiRNA se získá pouhou změnou koncentrace pufru podporujícího vazbu na kolonku. Smícháním malého množství tohoto pufru z kitu High Pure miRNA Isolation Kit (Roche) dojde k zachycení dlouhých molekul RNA, zatímco miRNA kolonkou prochází. Následně se zvyšuje koncentrace tohoto pufru a v nové kolonce se zachycuje miRNA.

15 RNA ze zmrazených vzorků je izolována podle doporučení a s využitím TRIzol reagentu (Life Technologies). Vzorek tkáně je nejprve homogenizován v desetinasobném množství TRIzol reagentu a zmražen na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmražení se přidá 1-brom-3-chlorpropan, který po následné centrifugaci umožní oddělení horní čiré fáze obsahující RNA. Fáze obsahující RNA je odebrána a RNA vysrážena pomocí isopropanolu, následně zbavena nečistot sérií promývacích kroků a rozpuštěna ve vodě bez nukleáz.

20 Kvalita a koncentrace získané totální RNA je stanovena spektrofotometricky (NanoDrop) a elektroforeticky (BioAnalyzer 2100). Pro stanovení absolutní genové exprese se využívá qRT-PCR. Na jedné desce se vždy společně umístí vzorky pro sledované miRNA a endogenní kontrolu daného vzorku spolu s řadou standardů pro stanovení absolutního počtu molekul miR-31 a RNU38B nebo bez standardů v případě relativní kvantifikace. cDNA senanáší v triplikátech. Pro vyloučení kontaminace jsou zařazeny duplikáty, v nichž je cDNA nahrazena vodou bez nukleáz. Pro srovnání desek mezi sebou je využíván interní standard, kterým je vzorek pacientské RNA (tzn. vždy stejná RNA, detekce stejné endogenní kontroly a miRNA). Data jsou hodnocena v programu SDS v2.4 a následně exportována ve formátu tabulky Excel (Microsoft Office XP).
25
30 Pokud byla odchylka hodnoty v triplikátu vyšší než 0,3 cyklu, tato odlehlá hodnota byla vyřazena z hodnocení. V případě kvantifikace absolutní se provede následně přepočítání počtu molekul miRNA na milion molekul endogenní kontroly RNU38B.

35 S využitím zmíněného postupu kvantifikace miR-31 ve vzorcích nádorů FL je možné rozdělit pacienty s FL do prognostických skupin. Na dvou nezávislých kohortách pacientů s FL bylo ukázáno, že pacienti s hladinou miR-31 nižší než 2. tercil její exprese mají významně horší prognózu než pacienti jejichž hladina miR-31 je větší než 2. tercil její exprese v kohortě (první kohorta: 55 % vs. 90 % přežívajících po 10 letech; $p < 0,01$; druhá kohorta: 60 % vs. 92 % přežívajících po 10 letech) (obr. 2a, 2b). Při použití 2. tercilu jako mezní hodnoty vychází hladina miR-31 rovněž jako vysoce signifikantní nezávislý prediktor celkového přežití v multivariantní regresní analýze, která zahrnovala několik známých prognostických markerů (věk, pohlaví, hladinu hemoglobinu, FLIPI skóre, hladinu LDH, přítomnost B-symptomů, postižení více než 4 lymfatických uzlin, stadium onemocnění a hladinu miR-31) ($p = 0,035$; HR = 8,90; tab. 1).
40
45 Exprese miR-31 byla také významně nižší u pacientů, který zemřeli během prvních tří let od biopsie (obr. 2c).

Tabulka 1. Univariantní a multivariantní Coxova regresní analýza pro celkové přežití pacientů s FL (n = 83)

<i>Univariantní Coxova regrese proporcionálních rizik</i>				
	P-hodnota	Poměr rizik	95% IS (dolní)	95% IS (horní)
Pohlaví (muž)	0,910	1,047	0,477	2,294
Postižení > 4 uzlin	0,006	3,341	1,415	7,888
Klinické stadium III-IV	0,058	2,826	0,964	8,281
Přítomnost B symptomů	0,443	1,394	0,596	3,258
Zvýšená LDH	0,041	3,075	1,045	9,045
Hemoglobin < 120 g/l	0,115	2,061	0,838	5,071
Věk > 60 let	0,105	1,931	0,871	4,283
Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,001	6,594	2,219	19,592
<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,009	6,944	1,637	29,463
<i>Multivariantní Coxova regrese proporcionálních rizik</i>				
	P-hodnota	Poměr rizik	95% IS (dolní)	95% IS (horní)
Krok 1 Pohlaví (muž)	0,725	0,843	0,327	2,177
Zvýšená LDH	0,379	0,465	0,085	2,561
Postižení > 4 uzlin	0,515	1,435	0,484	4,253
Klinické stadium III-IV	0,120	0,235	0,038	1,459
Přítomnost B symptomů	0,411	0,656	0,241	1,790
Hemoglobin < 120 g/l	0,702	0,804	0,263	2,455
Věk > 60 let	0,951	0,969	0,355	2,649
Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,035	10,215	1,181	88,350
<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,014	14,331	1,731	118,642
Krok 2 Pohlaví (muž)	0,697	0,836	0,338	2,064
Zvýšená LDH	0,381	0,468	0,085	2,560
Postižení > 4 uzlin	0,489	1,447	0,507	4,128
Klinické stadium III-IV	0,108	0,239	0,042	1,367
Přítomnost B symptomů	0,409	0,655	0,241	1,786
Hemoglobin < 120 g/l	0,704	0,807	0,266	2,443
Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,030	10,044	1,246	80,985
<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,014	14,337	1,731	118,729
Krok 3 Pohlaví (muž)	0,713	0,844	0,342	2,083
Zvýšená LDH	0,422	0,514	0,102	2,602
Postižení > 4 uzlin	0,430	1,511	0,543	4,207
Klinické stadium III-IV	0,114	0,261	0,049	1,382
Přítomnost B symptomů	0,351	0,628	0,236	1,670
Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,026	8,456	1,285	55,630
<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,014	14,031	1,716	114,694
Krok 4 Zvýšená LDH	0,374	0,484	0,098	2,396
Postižení > 4 uzlin	0,443	1,489	0,538	4,121
Klinické stadium III-IV	0,096	0,246	0,047	1,283
Přítomnost B symptomů	0,357	0,633	0,239	1,676
Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,020	9,083	1,418	58,166
<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,014	13,818	1,693	112,821
Krok 5 Zvýšená LDH	0,338	0,457	0,092	2,269
Klinické stadium III-IV	0,125	0,303	0,066	1,395
Přítomnost B symptomů	0,416	0,671	0,257	1,756
Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,013	10,204	1,647	63,244

	<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,017	12,972	1,589	105,924
Krok 6	Zvýšená LDH	0,280	0,449	0,105	1,918
	Klinické stadium III-IV	0,188	0,343	0,070	1,688
	Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,008	10,463	1,836	59,639
	<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,020	11,861	1,469	95,784
Krok 7	Klinické stadium III-IV	0,324	0,455	0,095	2,176
	Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,011	6,088	1,510	24,543
	<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	0,028	10,166	1,292	79,956
Krok 8	Vysoké skóre FLIPI (3-5)	0,010	4,271	1,417	12,872
	<i>miR-31</i> hladina < 2. tercil	<u>0,035</u>	<u>8,904</u>	<u>1,166</u>	<u>67,977</u>

Pro celkové přežití byl použit zleva omezený Coxův regresní model proporcionálních rizik se zpožděnými proměnnými, neboť čas biopsie od diagnózy se mezi pacienty lišil. *miR-31* byla rozdělena do dvou skupin na základě 2. tercilu (rovno hodnotě 53) její relativní exprese (normalizované k RNU38B). IS – interval spolehlivosti.

Průmyslová využitelnost

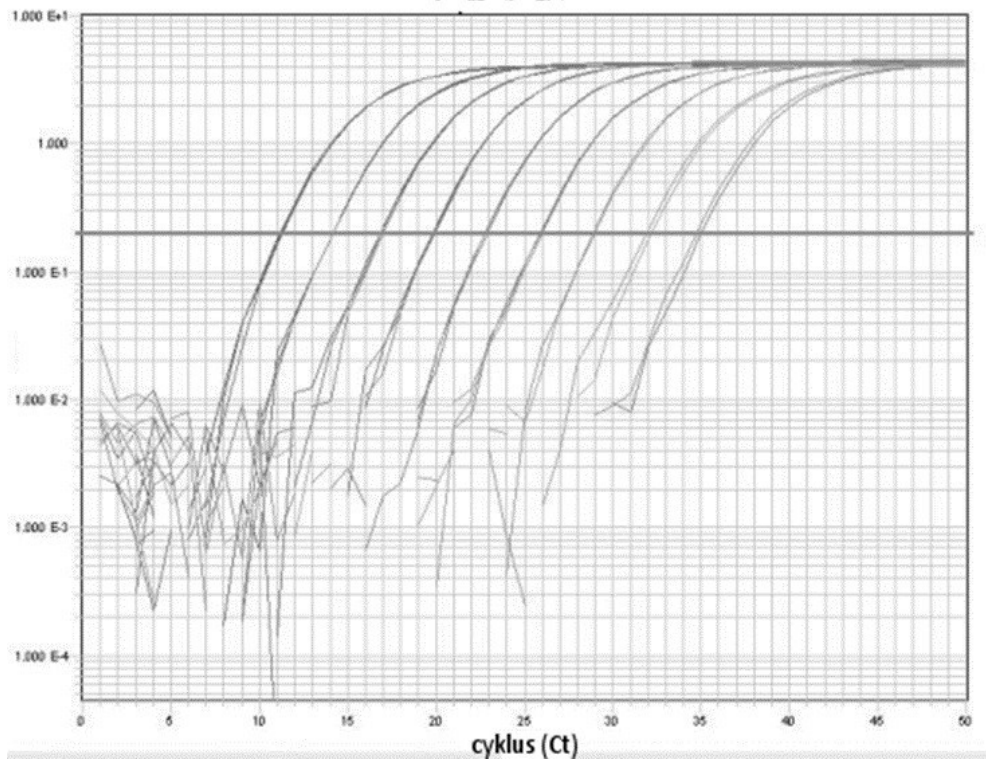
5

Předkládaný vynález je využitelný pro stanovení prognózy u pacientů trpících folikulárním lymfomem.

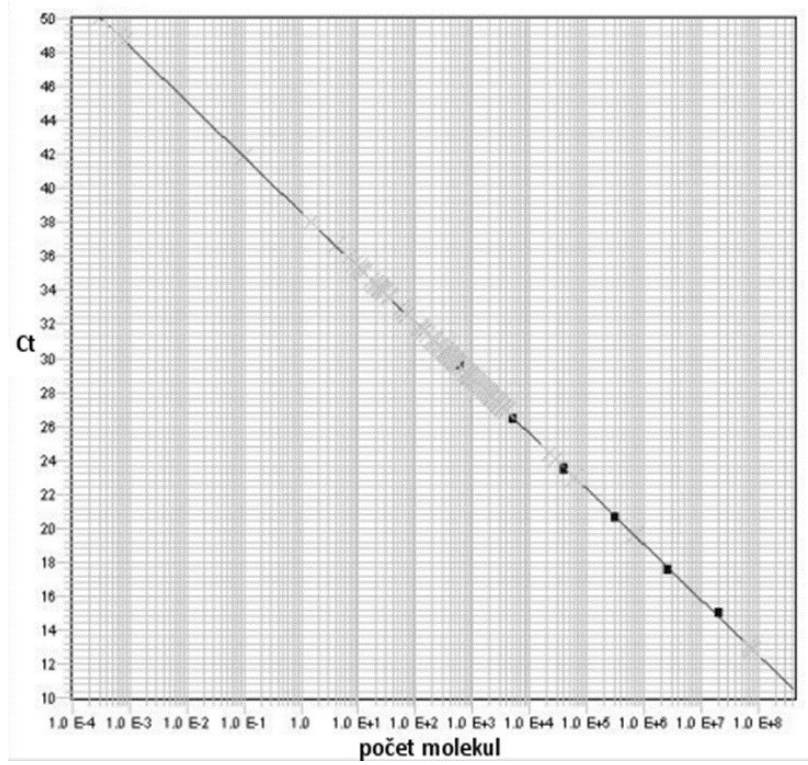
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stanovení prognózy u pacienta trpícího folikulárním lymfomem, **vyznačený tím**, že se *in vitro* stanoví množství miR-31 v izolovaném biologickém vzorku pacienta, a na základě tohoto stanovení se pacient přiřadí do prognostické skupiny, přičemž prognostické skupiny a mezní hodnoty pro přiřazení do prognostických skupin se získají analýzou množství miR-31 v biologických vzorcích pacientů se známou prognózou, přičemž množství miR-31 nad mezní hodnotou indikuje delší dobu přežití pacienta, přičemž stanovení prognózy nezahrnuje stanovení transformace folikulárního lymfomu do difuzního velkobuněčného B-lymfomu.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že mezní hodnotou je kvantil množství miR-31 získaný statistickým vyhodnocením množství miR-31 v biologických vzorcích pacientů se známou prognózou, přičemž pacienti s hladinou miR-31 pod tímto kvantilem množství miR-31 se přiřadí do prognostické skupiny s kratší dobou přežití, a pacienti, jejichž hladina miR-31 je nad tímto kvantilem jejího množství, se přiřadí do prognostické skupiny s delší dobou přežití.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že se množství miR-31 stanoví vůči endogenní kontrole, s výhodou je endogenní kontrola vybrána z RNU38B, RNU6B, RNU44, RNU48, miR-16.
4. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že se množství miR-31 stanoví absolutní kvantifikací s využitím syntetických standardů, s výhodou jsou syntetické standardy:
- miR-31: 5' - AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU - 3'
- RNU38B: 5' - CCA GUU CUG CUA CUG ACA GUA AGU GAA GAU AAA GUG UGU CUG AGG AGA - 3'.
5. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že stanovení množství miR-31 a popřípadě i endogenní kontroly a/nebo syntetických standardů se provede metodou přepisu do copyDNA a detekce metodou qRT-PCR, nebo se stanovení provede technikami masivního paralelního sekvenování/sekvenování nové generace.
6. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že izolovaný biologický vzorek pacienta je vybrán ze skupiny zahrnující vzorek tkáně tumoru, například zmražené tkáně, vzorek z FFPE bločků tkáně tumoru, nebo vzorek periferní krve.

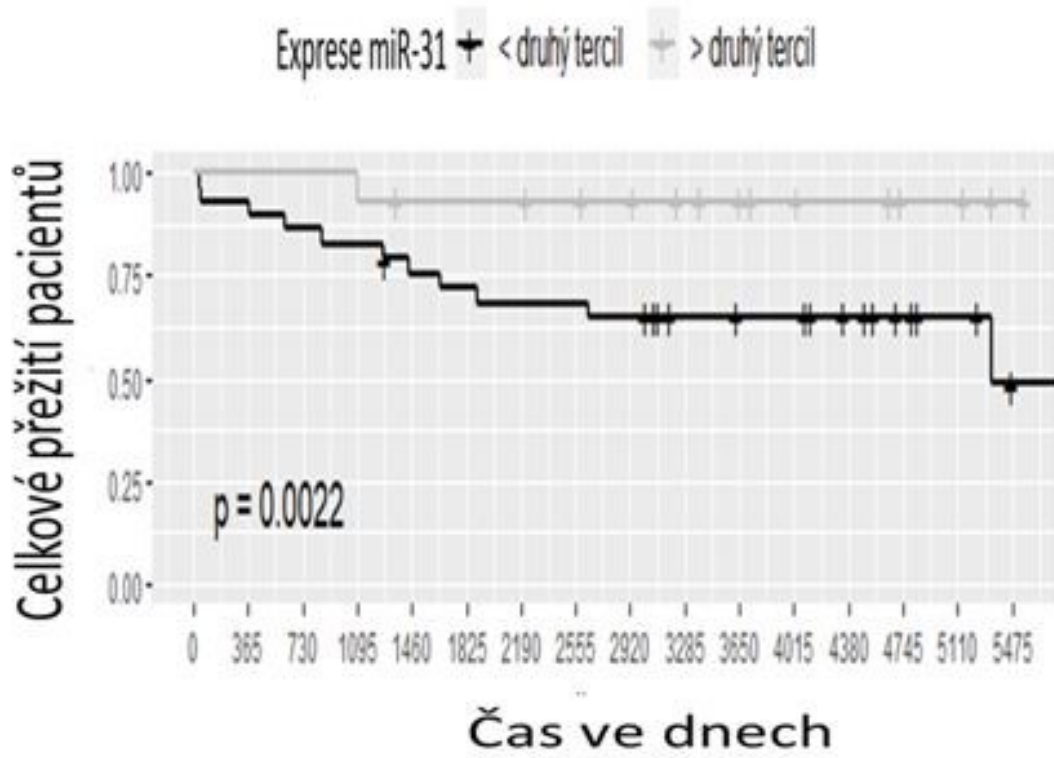
4 výkresy



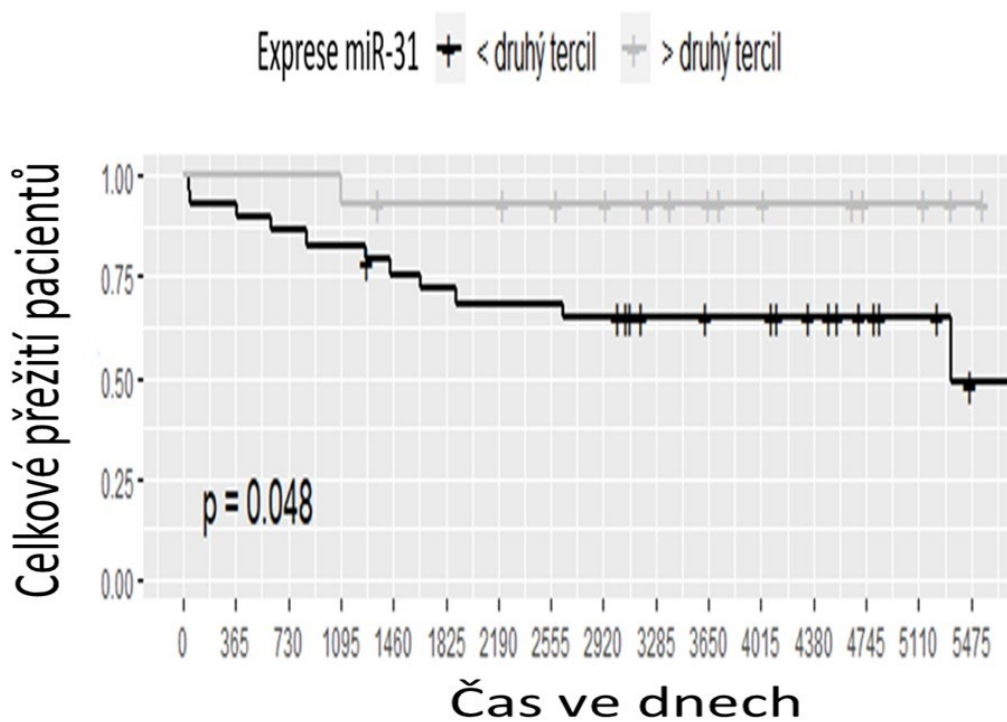
Obr. 1a



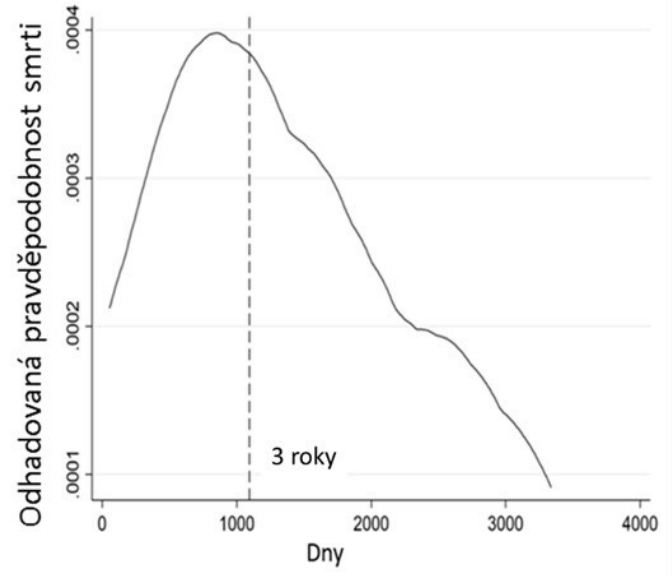
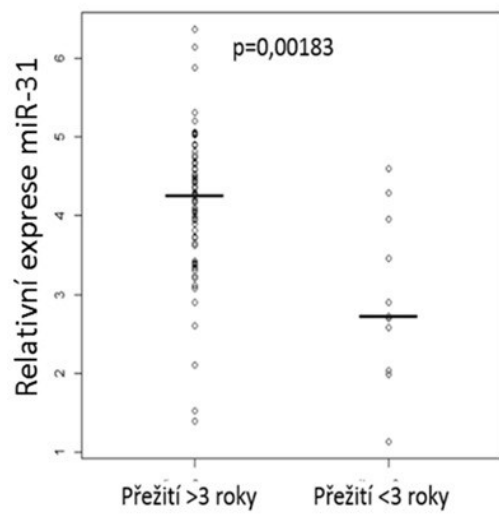
Obr. 1b



Obr. 2a



Obr. 2b



Obr. 2c

SEQUENCE LISTING

<110> Masarykova univerzita a Fakultní nemocnice Brno
 <120> Způsob stanovení prognózy u pacientů s folikulárním lymfomem
 <130> P1655CZ00
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5

 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic standard, miR-31

 <400> 1
 aggcaagaug cuggcauagc u 21

 <210> 2
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic standard RNU38B

 <400> 2
 ccaguucugc uacugacagu aagugaagau aaaguguguc ugaggaga 48