

Realizační produkty výzkumného záměru Masarykova onkologického ústavu s názvem Funkční diagnostika zhoubných nádorů v letech 2005-2007, které lze využít v biomedicínské praxi za předpokladu příslušné kvalifikace a technologické vybavenosti pracovišť.

I. Vývoj nových diagnostických metod

1. Diagnostika intragenových přeskupení

Produktem VZ MOÚ je zavedení a ověření metody detekce intragenových přeskupení MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), zahrnujících celé exony genu, kterou lze využít zejména v komplexní diagnostice nádorové predispozice. Tuto metodu lze provádět na ALF express II automatickém DNA sekvenátoru (Pharmacia). Byly jí nalezeny následující přestavby BRCA1 genu : delece exonů 1A+1B+2 , delece části exonu 11+exonu 12, delece exonů 21+22 , delece exonů 18+19 , delece exonu 20 , delece exonů 5-14. Velké delece byly zachyceny u 6% původně BRCA1 a BRCA2 negativních případů, což svědčí o významu testování intragenových přeskupení v BRCA1 genu i v budoucnu. Vývoj směřuje k zavedení jednoduchého screeningového PCR test pro testování intragenových delecí příbuzných postižených pacientů.

2. Presekvenační diagnostika mutací vysokorozlišovací analýzou křivek tání.

Produktem VZ MOÚ je zavedení a ověření laboratorní metody pro presekvenační detekci mutací založené na principu heteroduplexní analýzy s automatickým vyhodnocováním přístrojem LightScanner firmy Idaho Technologies. Vlastní metoda využívá vlastností fluorescenční barvy LCGreen plus, která se během PCR reakce inkorporuje do dsDNA. Během postupného zahřívání dochází k meltingu DNA a barva se z jednořetězců uvolňuje, což se projevuje poklesem fluorescence. Přítomnost heteroduplexu v analyzovaném fragmentu DNA výrazně mění profil křivky meltingu. Metoda vyžaduje maximální optimalizaci PCR (pouze „čistá“ intenzivní PCR bez nespecifických fragmentů), přesnost v pipetování a standardní výchozí podmínky pro všechny vzorky – tj. u všech vzorků analyzovaných v jedné sérii použití přibližně stejného množství DNA. Nejlépe je mít vzorky naředěné na stejnou pracovní koncentraci a připravené stejnou izolační metodou a analyzovat spolu pouze vzorky připravené z jednoho Master mixu. Jakákoli minimální odchylka v PCR mixu mezi jednotlivými vzorky se projeví změnou v profilu meltingu.

Z našich zkušeností jsme zachytili veškeré změny v DNA - substituce, drobné delece, inserce - které byly již dříve zjištěny jinými metodami. Záchyt substitucí je u popsané metody bezesporu vyšší než u klasické heteroduplexní analýzy využívající elektroforetickou detekci v akrylamidovém (MDE) gelu. Metoda HRM umožňuje ve většině případů přesné rozlišení různých polymorfismů a mutací lokalizovaných ve stejném fragmentu a mnohdy zachytí také homozygotní varianty polymorfních oblastí. Rozlišení obou forem homozygotů v polymorfních oblastech je však možný pouze u některých oblastí – v závislosti na sekvenci analyzovaného úseku. Záchyt heterozygotního stavu je u metody HRM téměř 100%.

Metodu používáme jako presekvenační, tedy pozitivní nálezy mutací jsou zatím vždy ověřeny sekvenováním, i když se profil mutace jeví jako naprosto jednoznačný. Převedení klasické heteroduplexní analýzy na uvedenou analýzu a následně využití 4-kapilárního sekvenátoru ABI3130 vede ke zvýšení senzitivity, vyšší automatizaci a urychlení průchodu vzorků laboratoří. Celková doba potřebná ke kompletnímu vyšetření například kódující sekvence genů BRCA1 a BRCA2 se zkrátí na polovinu. Pomocí metody byla zachycena nová mutace v genu BRCA1, v oblasti sestřihu, která nebyla zjišťována pomocí HA a byla zpětně vyšetřena u 600 probandek původně negativně testovaných na BRCA1/2 mutace se záchytem v 1,8%.

3. Diagnostika genu CHEK2

Produktem VZ MOÚ je diagnostika genu nádorové predispozice CHEK2. Produkt genu CHEK2 (alternativně CHK2, homolog Cds1 a RAD53) je významnou protein kinázou, která se podílí na regulaci buněčného cyklu. Při poškození DNA je CHEK2 protein kináza významná pro aktivaci celé řady proteinů (mimo jiné také p53, BRCA1), které se podílejí na řízení DNA reparace a apoptózy. Některé mutace v CHEK2 genu jsou nízko penetrantní alely způsobující genetickou predispozici ke vzniku nádoru prsu. Jde také o gen zvýšené predispoicepredispozici ke vzniku nádoru prostaty, plic, ovaria, mozkových nádorů a osteosarkomů. Gen byl testován u 392 nepříbuzných pacientů diagnostikovaných s nádorem prsu nebo ovaria z rizikových rodin s pozitivní rodinnou anamnézou nebo diagnostikovaných v mladém věku (pod 40 let) nebo s duplexním nádorem bez pozitivní rodinné anamnézy. Validace proběhla také ve spolupráci s Dept Genomic Science and Medicine na University of Washington v USA a OKEO I.LF UK v Praze.

4. Diagnostika genu DSS1

Produktem VZ MOÚ je diagnostika genu nádorové predispozice DSS1. Gen DSS1 se nachází v komplexu s BRCA2-RAD51 proteinem a hraje významnou roli v průběhu homologní rekombinace a v reparačních procesech spřažených s rekombinací. Ztrátové mutace v DSS1 genu mohou vést k nádorové predispozici obdobně jako mutace v BRCA2 genu. Byly optimalizovány PCR a sekvenační reakce, které pokrývají kódující sekvence DSS1 genu. Validace detekce byla provedena u 109 pacientek s karcinomem prsu.

5. Diagnostika předterapeutické exkrece přirozených pyrimidinů

Produktem VZ MOÚ je vývoj a validace laboratorní metody na bázi GC/MS, vyžadující instrumentaci LC/MS/MS, pro diagnostiku individuálního typu metabolismu a tedy i tolerance pyrimidinových cytostatik. Při stanovení přirozených pyrimidinů po analýze několika set normálních profilů v moči jsme nepozorovali významnější interference se stanovením thyminu. K tomuto profilu lze přidat analýzu dihydrothyminu, který je markerem deficiencie enzymu DHP (dihydropyrimidinasy) a také se považuje za možnou genetickou příčinu intolerance fluoropyrimidinů

6. Farmakogenetická diagnostika eliminačního fenotypu po podání 5-fluorouracilu

Produktem VZ MOU je diagnostická laboratorní metoda na bázi HPLC pro měření plasmatických hladin 5-FU, který patří k nejčastěji podávaným protinádorovým lékům, a jeho dceřinného metabolitu 5-DHFU. Metoda byla ověřena na analýzách plasmatických profilů u 68 pacientů léčených protokolem FUFA/Mayo nebo při podávání kontinuálního fluorouracilu.

7. Diagnostika transkriptů genů vybraných enzymů ve vztahu k léčbě fluoropyrimidiny

Produktem VZ MOÚ je diagnostika transkriptů vybraných nádorových enzymů pro predikci citlivosti k léčbě fluoropyrimidiny. Výsledky vícerozměrné statistické analýzy PCA (analýza hlavních komponent) potvrdily předpoklad, že všechny tři markery jsou pro predikci přibližně stejně významné. Analýza pomocí ROC křivek ukazuje v souladu s PCA, že operační body všech tří uvedených markerů mají přibližně stejné hodnoty - dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD): senzitivita 66% při specifitě 77% , thymidilátsyntáza (TS) : senzitivita 66% při specifitě 77% , thymidinfosfatáza (TP) : senzitivita 66% při specifitě 63%.S využitím analýzy pomocí klasifikačních stromů bylo dosaženo nejvyšší shody predikce odpovědi s realitou (pro otestování byla použita krosvalidace): celková přesnost 67,30%, přesnost u

responderů 68,50%, spolehlivost u nonresponderů 66,70%. Vztah hladin transkriptů TS,TP, DPD k patologické regresi adenokarcinomu rekta během preoperativní konkomitantní chemoradioterapie s kapecitabinem byl ověřen u 81 pacientů.

8. Diagnostika transkriptů genů vybraných enzymů ve vztahu k léčbě inhibitory topoizomerázy irinotekanem.

Produktem VZ MOÚ je detekce polymorfismu specifického genu enzymu zodpovědného za citlivost nádorů k inhibitoru topoizomerázy irinotekanu. Irinotekan se v organismu přeměňuje na aktivní formu SN-38, která je v procesu detoxikace přeměňována na beta-glukuronid pomocí UDP-glukuronosyltransferasy. Polymorfismy (UGT) 1A1, zejména promoterová varianta UGT1A1*28 je odpovědná za ADR vůči irinotekanu. Při diagnostice jde o stanovení RFLP polymorfismů UGT1A1*7,*6,*27,*29 s asociací k přecitlivělosti a rezistenci na irinotekan.

9. Diagnostika cirkulujícího VEGF jako potenciální marker anti-angiogenní terapie

Produktem VZ MOÚ je validovaná detekce sérového VEGF, důležitého iniciátoru angiogeneze, u nemocných léčených Avastinem, kterou lze provádět mikrodestičkovou ELISA soupravou. Metoda byla validována na retrospektivním materiálu uloženém v sérové bance. Ověřili jsme, že přídavek Avastinu v koncentraci odpovídající hodnotám v cirkulaci během terapie interferuje při stanovení VEGF – v jeho přítomnosti je cirkulující VEGF blokován. Lze tedy analyzovat pouze odběry před nasazením léčby. Koncentrace VEGF v séru před terapií se pohybovala v rozmezí 101 – 1008 ng/l, zvýšená hladina (cut-off 500 ng/l) byla prokázána u 4/11 nemocných (36%). Přestože je známo, že sérové hladiny jsou oproti plasmě výrazně zvýšeny o VEGF uvolněné z trombocytů v procesu koagulace, nebyl vztah mezi sérovým VEGF a počtem trombocytů nalezen. Nižší hodnota sérového VEGF (a poměru k počtu trombocytů) v tomto dosud omezeném souboru naznačuje možnost predikce lepší odpovědi. Definitivní závěry může přinést podložené statistické hodnocení na větším souboru, s ohledem na vysoké náklady léčby jednotlivých případů nejlépe v multicentrické studii pracovišť zúčastněných v Avastinovém registru.

10. Metodika odběru a přípravy vzorků pro proteomické analýzy SELDI-TOF

Produktem VZ MOÚ je metodika odběru a přípravy vzorků pro proteomické analýzy metodou SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption and ionisation /time of flight), jejíž nerespektování může vést k falešným výsledkům. Prokázali jsme, že již typ odběrové zkumavky může mít vliv na výsledky a být zdrojem artefaktů. Tato skutečnost nebyla dosud

nikde podrobněji rozpracována ani na ni nebylo upozorněno firmou dodávající aparaturu. V aplikovaném projektu detekce proteinových spekter SELDI u pacientek s karcinomem prsu a pozitivitou Her2/neu byly totiž zjištěny významné rozdíly ve spektrech u odebraného materiálu mezi zkumavkou Sarstedt Neutrál bez gelu a aktivátoru a zkumavkou Sarstedt Sérum-gel-aktivátor, obsahující gel a aktivátor. Měření prokázalo rozdíly ve spektrech sér odebraných do různých zkumavek. Spektrum séra ze zkumavky Sérum-gel-aktivátor je prokazatelně o dva vrcholy bohatší než spektrum vzorku ze zkumavky Neutrál. Jedná se o vrcholy 3956,5 a 4282,8 m/z. Na základě tohoto zjištění jsou stanoveny požadavky na odběrový systém, který ovlivní kvalitu výsledků analýz tohoto typu. Metodika se týká také vlivu různých podmínek na získaná proteinová spektra a optimálních postupů pro získání reprodukovatelných výsledků. Vyhodnoceny byly následující podmínky a jejich vliv na výsledky získané metodou SELDI-TOF: vliv prefrakcionace séra pomocí izoelektrické fokusace, vliv koncentrace urey na stupeň denaturace proteinu, vliv koncentrace dithiothreitolu na imunologický test, vliv teploty a času na tvorbu krystalů matrice, srovnání sorpčních povrchů proteinových čipů na kvalitu získaných proteinových spekter. Všechny tyto parametry významně ovlivňují profily i kvalitu proteinových spekter. Podmínkám při přípravě vzorků je nutné věnovat zvýšenou pozornost, protože velkou měrou mohou ovlivnit konečný výsledek analýzy SELDI-TOF. Metodika je použitelná pro pracoviště využívající SELDI-TOF analýzy.

11. Diagnostika cirkulujících endoteliálních buněk

Produktem VZ MOÚ je laboratorní metoda detekce cirkulujících endoteliálních buněk (CEC) a endoteliálních progenitorů (CEP) v periferní krvi jako pomocných biomarkerů nádorové angiogeneze. Validace byla provedena zhodnocením nálezů CEC a CEP v souboru neonkologických dárců a dětských onkologických pacientů s nádory před primární chirurgickou léčbou. Hodnocení vychází z analýzy asi 200 vyšetřených pacientů a svědčí pro statisticky významně vyšší počty cirkulujících endotelií u onkologicky nemocných.

12. Diagnostika regulačních proteinů signální dráhy STAT/SOCS u pacientů s maligním melanomem

Produktem VZ MOÚ je zavedení a standardizace metodiky pro detekci exprese proteinu STAT 5, včetně jeho izoforem, a pro detekci jeho fosforylovaných-aktivovaných variant na úrovni proteinu a mRNA. Byla vypracována metodika detekce exprese SOCS 1 proteinu, jako dalšího ze série inhibitorů STAT-dependentních cytokinových signálních dráh. V projektech maligního melanomu byly statisticky zpracovány výsledky korelací STAT1

alterací s průběhem onemocnění u nemocných maligním melanomem a výsledky analýzy indukce exprese SOCS3 inhibitoru interferony α/γ v buňkách maligního melanomu a melanocytech. Významným výsledkem je průkaz, že absence STAT1 fosforylace (aktivace) na Tyr 701 po IFN- γ pozitivně koreluje s průběhem onemocnění, celkovým přežitím a léčebnou odpovědí a že tento parametr reprezentuje nezávislý prognostický marker pro maligní melanom. Výsledky ukázaly významnou inverzní korelaci mezi aktivací STAT 3 faktoru indukovanou interferonem-alfa a intervaly relapsu a přežití.

II. Vývoj nových léků

a) přímá spolupráce s komerční sférou

Testování nového platinového protinádorového preparátu LA-12 (Pliva Lachema)

in vitro a navazující klinické studie

Produktem spolupráce MOÚ s firmou Pliva Lachema je uvádění nového protinádorového léku LA-12 do klinické praxe. Za tímto účelem byly provedeny krátkodobé kultivace primokultur s komparací testů chemorezistence na cisplatinu, oxaliplatinu a nově studovaný platinový preparát LA-12 - na stabilní linii HT-29. Prostudovány jsou i změny v regulačních mechanismech dráhy supresorového proteinu p53 ve vztahu k léčbě LA-12. V MOÚ je provedeno také klinické hodnocení účinnosti léku LA-12 v rámci standardního protokolu vedeného na Oddělení klinických hodnocení. Výsledky zde neuvádíme, protože jejich uveřejňování podléhá stanovením smlouvy se zadávající firmou

b) přímá spolupráce s nonprofitní akademickou sférou***Vývoj a registrační řízení protinádorových vakcín na bázi nádor infiltruujících lymfocytů (TIL) u maligního melanomu***

Produktem spolupráce VZ MOÚ s týmem FNB/FDN a ILBIT A3 LF MU je registrace a klinické použití terapeutické protinádorové vakcíny u nemocných s maligním melanomem. V MOÚ jde o podíl na zdrojových a realizačních fázích projektu vedeného prof. Michálkem z FNB/FDN a ILBIT A3 LF MU, jehož cílem je vývoj, registrace a příprava terapeutických nádorových vakcín pro nemocné s maligním melanomem a s aplikacemi v rámci klinických hodnocení v MOÚ. Příprava vakcín živých buněk vyžaduje poměrně komplexní součinnost za účasti onkochirurgů, patologů, imunologů, čistých laboratoří ILBIT, onkologů a manažerů klinických studií, zejména pak výrobní laboratoře nejvyšší třídy čistoty. Realizace bude tedy patrně i nadále soustředěna do rukou brněnské kooperativní skupiny centra ILBIT A3/MOÚ, neboť zatím nelze předpokládat potřebné vybavení, standardy a schválení SÚKL na jiných pracovištích.

V Brně 12.3.2008

prof.MUDr. Jan Žaloudík, CSc.
náměstek ředitele pro rozvoj, vědu a výuku