

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2008-336**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

*G01N 33/574* (2006.01)

*C12Q 1/68* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.05.2008**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **09.12.2009**  
(Věstník č. 49/2009)

(71) Přihlašovatel:

Masarykova univerzita, Brno, CZ

(72) Původce:

Pospíšilová Šárka, Brno, CZ

Kotašková Jana, Brno, CZ

Tichý Boris, Šlapanice, CZ

Mayer Jiří, Brno, CZ

(74) Zástupce:

Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle  
3, Praha 5, 15000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob stanovení prognózy B-buněčné  
chronické lymfocytární leukémie**

(57) Anotace:

Způsob stanovení prognózy B-buněčné chronické lymfocytární leukémie z biologického vzorku odebraného z těla pacienta, jehož podstata spočívá v tom, že se stanoví exprese genu LAG3 (lymphocyte-activation gene 3).

Stanovení exprese tohoto genu spolu se stanovením exprese dalších genů, LPL a ZAP70, může vést ke stanovení prognózy onemocnění s až 95 % jistotou. Vysoká exprese těchto genů koreluje s přítomností nemutovaného genu pro IgVH a tedy s horším průběhem onemocnění a kratším přežíváním pacientů.

**CZ 2008 - 336 A3**

## Způsob stanovení prognózy B-buněčné chronické lymfocytární leukémie

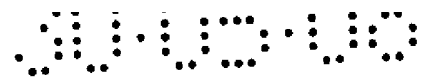
### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu stanovení prognózy u pacientů s diagnostikovanou B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií.

### Dosavadní stav techniky

B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je charakterizována jako monoklonální expanze zralých B-lymfocytů, které se hromadí v periferní krvi a lymfatických orgánech (Chiorazzi N et al., N Engl J Med. 2005;352:804–815). Donedávna se v klinické praxi k určení prognózy používal pouze staging podle Raie (Rai KR et al., Blood 1975;46:219–234) nebo podle Bineta (Binet JL et al., Cancer 1981;48:198–206). Tento empirický systém však není v současné době dostačující. Pacienti jsou diagnostikováni často ve velmi raném stádiu B-CLL a na základě prostého stagingu nelze odlišit pacienty, kteří budou rychle progredovat od pacientů s indolentní formou onemocnění. B-CLL je klinicky značně heterogenní onemocnění a doba přežití se u jednotlivých pacientů velmi liší. Navíc chemoterapie v časných stádiích onemocnění nepřináší nemocnému očekávaný užitek, naopak často dochází ke zkrácení doby přežití nebo rozvoji sekundárních malignit. Z tohoto důvodu se u B-CLL pacientů bez klinických příznaků nemoci často doporučuje pouze sledování. Problematické je zejména včasné rozpoznání agresivní formy choroby, která se častěji projevuje u mladších pacientů. Během posledních deseti let byla onemocnění B-CLL věnována velká pozornost a výsledkem je soubor několika skupin parametrů, které B-CLL podrobně charakterizují a umožňují predikci průběhu nemoci.

Dosud nejvýznamnějším prognostickým markerem u B-buněčné chronické lymfocytární leukémie se jeví mutační status genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgVH). Přítomnost nemutovaného genu pro IgVH (nukleotidová homologie se zárodečnou linií větší než 98 %) je spojena s horším průběhem a kratším přežíváním pacientů (8 let vs. 25 let u pacientů s mutovaným IgVH) (Damle RN et al., Blood 1999;94:1840–1847; Hamblin TJ et al. Blood 1999;94:1848–1854). Stanovení tohoto parametru nezbytného pro stanovení prognózy a léčby onemocnění je však vysoce technicky, časově i finančně náročné, je proto snaha nahradit jeho detekci jiným snadno stanovitelným markerem nebo skupinou markerů. Mutační status genu



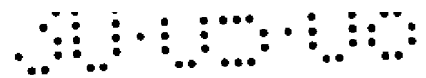
pro IgVH se stanovuje následujícím způsobem: z nádorových buněk je vyizolována RNA, ta je následně přepsána do cDNA. cDNA je amplifikována s primery specifickými pro jednotlivé VH rodiny. Při monoklonálním typu onemocnění je PCR produkt přímo sekvenován. U polyklonálních pacientů je nutné jednotlivé klony odlišit pomocí klonování a následné sekvenace. V obou případech jsou získané sekvence následně porovnány se sekvencí dané zárodečné linie v databázi a určena míra jejich homologie. Toto stanovení se provádí u monoklonálních pacientů jedenkrát a považuje se za faktor, který se během onemocnění nemění. U polyklonálních pacientů se průběžně sleduje pravděpodobný nárůst nejagresivnějšího klonu.

Cílem předkládaného vynálezu je nahradit stávající stanovení mutačního statusu genu pro IgVH souborem genů, jejichž exprese by odlišovala obě prognosticky rozdílné skupiny. V současné době jsou známy některé geny, jejichž míra exprese koreluje s přítomností či nepřítomností mutovaného genu pro IgVH. Jedním z takových markerů objevených u B-CLL pomocí DNA čipových analýz je ZAP70. Tato tyrosin kináza je fyziologicky exprimovaná v T-lymfocytech a její vysoká exprese koreluje s přítomností nemutovaného genu pro IgVH (Rosenwald A et al., *J Exp Med.* 2001;194:1639–1647; Wiesner A et al., *Blood* 2003;101:4944–4951). Dalším genem s rozdílnou expresí odlišující obě skupiny je LPL (lipoproteinová lipáza). I tento gen byl detekován na základě čipových analýz (Oppezso P et al., *Blood* 2005;106:650–657; Bilban M et al., *Leukemia* 2006;20:1080–1088) a jeho vysoká exprese koreluje s přítomností nemutovaného genu pro IgVH.

#### Podstata vynálezu

Tento vynález se týká nového prognostického markeru a souboru markerů, které umožňují s až 95% jistotou stanovit prognózu pacienta s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií (B-CLL).

Předmětem předloženého vynálezu je způsob stanovení prognózy B-buněčné chronické lymfocytární leukémie z biologického vzorku odebraného z těla pacienta, jehož podstata spočívá v tom, že se stanoví exprese genu LAG3 (lymphocyte-activation gene 3) v B-CLL buňkách vzorku. Biologickým vzorkem může být vzorek periferní krve, vzorek kostní dřeně nebo vzorek tkáně, zejména může být vzorkem tkáně vzorek lymfatické uzliny.



Ve výhodném uspořádání vynálezu se stanoví exprese genu LAG3 a alespoň jednoho genu vybraného ze skupiny zahrnující LPL a ZAP70. S výhodou se stanoví exprese souboru genů LAG3, LPL a ZAP70.

Význakem vynálezu je, že ke stanovení exprese genu lze využít detekci hladiny mRNA daného genu.

Na základě DNA čipové analýzy genové exprese B-CLL buněk za účelem definování nových prognostických markerů bylo detekováno zhruba 50 genů s rozdílnou mírou exprese odlišující pacienty s mutovaným a nemutovaným IgVH a rozdílným klinickým průběhem onemocnění. Nově bylo zjištěno, že vysoká exprese genu LAG3 (lymphocyte-activation gene 3) koreluje s nemutovaným IgVH statusem a špatnou prognózou onemocnění spojenou s nutností léčby. Souvislost tohoto genu s mutačním statusem IgVH u B-CLL dosud nebyla známa.

LAG3 (CD223) je membránový protein strukturně podobný CD4 a to jak na genové, tak na proteinové úrovni. LAG3 se exprimuje na T lymfocytech a NK buňkách po jejich aktivaci (Triebel F et al., *Journal of Experimental Medicine* 1996;171:1393-1405). Později bylo zjištěno, že se LAG3 exprimuje také na B lymfocytech, a to po jejich aktivaci prostřednictvím T lymfocytů (Kisielow M et al., *European Journal of Immunology* 2005;35(7):2081-2088). Protein tvoří dvě podjednotky – 70 kDa transmembránový řetězec oligomerizuje s druhým zkráceným 54 kDa extracelulárním fragmentem, zbývající 16 kDa řetězec s transmembránovou doménou se uvolňuje jako solubilní LAG3 (Li N et al., *Journal of Immunology* 2004;173(11):6806-6812). Funkce tohoto proteinu zatím není zcela objasněna. Pravděpodobně se účastní celé řady regulací imunitních pochodů. Signalizace na T lymfocytech přes LAG3 např. inhibuje aktivaci CD4+ a CD8+ T lymfocytů (Macon-Lemaitre L and Triebel F, *Immunology* 2005;115(2):170-178) a reguluje jejich expanzi (Workman CJ and Vignali DA, *European Journal of Immunology* 2003;33(4):970-979). Dále tento protein ovlivňuje např. zrání dendritických buněk (Andreae S et al., *Journal of Immunology* 2002;168(8):3874-3880) a reguluje diferenciaci makrofágů a dendritických buněk z monocytárních prekurzorů (Buisson S and Triebel F, *Immunology* 2005;114(3):369-374) apod.

Podle našich zjištění gen LAG3 významně koreluje se závažností onemocnění a jeho stanovení přináší významnou informaci o prognóze onemocnění a očekávané době přežití pacienta (Obr. 1).

Dále bylo zjištěno, že soubor 3 markerů, ZAP70, LPL a LAG3, umožňuje s 95% jistotou stanovit prognózu pacienta s B-CLL a na základě této prognózy stanovit vhodnou léčbu. Jednoduchá detekce exprese tohoto setu genů by mohla spolehlivě doplnit nebo nahradit náročné stanovení mutačního statusu genu pro IgVH, což by přineslo časovou i finanční úsporu. Kromě primární diagnostiky leukemických pacientů by se tato metodika mohla uplatnit i u pacientů po léčbě, u nichž vlivem terapie může dojít k potlačení dominantního klonu B-lymfocytů (Obr. 2).

Pro stanovení exprese genů se s výhodou využívá detekce hladiny mRNA daného genu, například prostřednictvím jejího přepisu do cDNA a stanovením metodou kvantitativní RT-PCR v reálném čase (RT-qPCR). Stanovení exprese zmíněných genů, např. pomocí RT-qPCR, lze využít pro detekci progresu nového klonu B-lymfocytů s odlišným mutačním statutem IgVH. U pacientů s nízkou expresí je ze stejných důvodů vhodné stanovení periodicky opakovat.

Soubor genů LPL a ZAP70 doplněný o námi nově detekovaný LAG3 je vhodným souborem prognostických markerů pro stanovení prognózy B-CLL a mutačního statusu IgVH.

### Přehled obrázků

Obr. 1 znázorňuje Kaplan-Meierovy křivky, vyjadřující dobu (ve dnech) od diagnózy onemocnění do zahájení terapie ve skupinách pacientů s vysokou a nízkou expresí genu LAG3 v B-CLL buňkách. Na ose x je čas ve dnech, na ose y podíl pacientů.

Obr. 2 znázorňuje fragmentační analýzu genu pro IgVH. Vlevo vzorek pacienta před terapií – dominantní klon s mutovaným IgVH z rodiny VH 3-30, vpravo tentýž pacient půl roku po ukončení terapie – došlo ke změně dominantního klonu. Nový klon nese nemutovaný IgVH z rodiny VH1-69. Záchyt na základě sledování exprese LAG3, LPL a ZAP 70 v průběhu onemocnění.

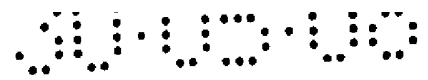
Obr. 3 ukazuje rozdílně exprimované geny mezi skupinami B-CLL buněk s rozdílným mutačním statutem genu pro IgVH detekované pomocí DNA čipů. Sloupce reprezentují

jednotlivé vzorky, řádky reprezentují jednotlivé geny. „M“ - mutovaný gen pro IgVH (n=10), „N“ - nemutovaný gen pro IgVH (n=9). Červeně jsou vyznačeny up-regulované geny, zeleně jsou vyznačeny down-regulované geny.

### Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

V naší studii jsme provedli DNA čipovou (microarray) analýzu genové exprese B-CLL buněk za účelem definování nových prognostických markerů u B-CLL. Pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen) byla izolována totální RNA z B-CLL buněk. Kvalita a koncentrace získané totální RNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop) a elektroforeticky (BioAnalyzer 2100). Pro další analýzy byly použity pouze vzorky s dobrými parametry (RIN > 8, koncentrace > 100 ng/ul). Pro analýzu genové exprese pomocí DNA microarrays byla RNA lineárně amplifikována a fluorescenčně naznačena. Pro lineární amplifikaci byl použit Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent). Protokol výrobce byl pozměněn tak, aby byla umožněna produkce amplifikované RNA s inkorporovaným modifikovaným nukleotidem aminoallyl-UTP. Protokol zahrnuje několik kroků: 1) přepis RNA do dvouvláknové cDNA s inkorporací T7 promotoru, 2) lineární amplifikace RNA pomocí in vitro transkripce enzymem T7 RNA polymerázou s inkorporací aminoallyl-UTP, 3) přečištění amplifikované RNA. Dosažená úroveň amplifikace RNA byla monitorována spektrofotometricky. Pro fluorescenční označení amplifikované RNA byl použit vlastní protokol využívající aminoreaktivní fluorescenční barvy (DY-547-NHS-ester a DY-647-NHS-ester; Dyomics), které se v alkalickém prostředí kovalentně váží na primární aminové skupiny, v tomto případě na aminoskupinu aminoallyl-UTP. Po proběhnutí značící reakce byla amplifikovaná RNA znovu přečištěna. Pro DNA microarray analýzu byla použita technika dvoubarevné hybridizace. Před hybridizací byl vzorek amplifikované fluorescenčně značené RNA pacienta smíchán se stejným množstvím obdobně připravené referenční RNA (Universal Human Reference RNA; Stratagene) značené jinou fluorescenční barvou. Pro hybridizaci byla směs RNA chemicky fragmentována (průměrná délka fragmentů 200bp). Hybridizace probíhala 17 hodin při 65°C. Po hybridizaci byly DNA microarrays promyty pro odstranění nenávané RNA, usušeny centrifugací a skenovány fluorescenčním skenerem ScanArray Express (Perkin Elmer). Obrazová data byla následně převedena do numerické podoby použitelné k dalším analýzám. Převod obrazových dat na numerická (analýza obrazu) byl proveden programem QuantArray (Perkin Elmer). Pro



redukci zdrojů variability, které nemají biologický podklad, byla hrubá data transformována a normalizována pomocí R and R Bioconductor (Gentleman RC et al., *Genome Biol.* 2004;5(10):R80). K vyhledání genů, na základě jejichž exprese je možné rozdělit jednotlivé vzorky do tříd (skupin), byly použity dva typy algoritmů. První náleží do skupiny „unsupervised (machine) learning“ a jsou schopny rozdělit vzorky do skupin (clusters) bez jejich předchozí znalosti (Hierarchical Clustering, K-Means/Medians Clustering, Self Organizing Maps – program TIGR MultiExperimentViewer). Druhým typem jsou postupy využívající „supervised (machine) learning“, vyhledávající geny schopné rozlišit mezi dvěma předem známými skupinami (TIGR MultiExperimentViewer -Support Vector Machines) (Saeed AI et al., *Biotechniques* 2003;34(2):374-8). Normalizovaná data byla statisticky zpracována pomocí SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher VG et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(9):5116-21). Expresní analýzu B-CLL buněk jsme prováděli na čípech Human 1A Arrays (Agilent). Zvolené DNA čipy jsou celogenomové a nesou oligonukleotidové sondy o délce 60 bází. Detekovali jsme ~ 50 genů (Obr. 3) s rozdílnou mírou exprese odlišující pacienty s mutovaným a nemutovaným IgVH a rozdílným klinickým průběhem onemocnění. Kromě již známých prognostických markerů jsme detekovali LAG3 (lymphocyte-activation gene 3), který zatím nebyl v souvislosti s B-CLL a mutačním statutem publikován. Jeho vysoká exprese koreluje s nemutovaným IgVH statutem a špatnou prognózou onemocnění spojenou s nutností léčby. Zjistili jsme tedy, že gen LAG3 významně koreluje se závažností onemocnění a jeho stanovení přináší významnou informaci o prognóze onemocnění a očekávané době přežití pacienta.

#### Příklad 2

Periferní krev pacienta s diagnózou B-CLL byla odebrána do odběrových zkumavek s antikoagulační látkou (heparin). Mononukleární buňky byly separovány pomocí gradientové centrifugace (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare), které předcházela inkubace s koktejlem bispecifických protilátek (na jednom konci anti CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b a na druhém konci anti-glykoforin A) (RosetteSep® B Cell Enrichment Cocktail, StemCell). Nežádoucí buňky tvoří pomocí bispecifických protilátek společně s červenými krvinkami formace zvané rozety. Hustota vytvořených rozet je vyšší než hustota samotné nežádoucí buňky a během gradientové centrifugace dochází k jejich sedimentaci. Totální RNA byla ze separovaných B-CLL buněk izolována pomocí RNeasy Mini Kit podle instrukcí výrobce (Qiagen). Kvalita a koncentrace získané totální RNA byla stanovena spektrofotometricky

(NanoDrop) a elektroforetický (BioAnalyzer 2100). Pro další analýzy byly použity pouze vzorky s dobrými parametry (RIN > 8, koncentrace > 50 ng/ul). K syntéze cDNA byl používán systém SuperScript™ III Reverse Transcriptase s oligo(dT)<sub>12-18</sub> primerem (Invitrogen). Každý vzorek byl analyzován v triplikátu pomocí systému TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) podle instrukcí výrobce. Amplifikace DNA byla následně detekována přístrojem 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) a získaná data byla analyzována pomocí softwaru Sequence Detection System (SDS) software version 1.3.1. Výsledkem bylo číslo cyklu, při kterém fluorescence dosáhne nastaveného prahu (CT - fluorescence threshold cycle). Relativní exprese genu byla normalizována k expresi provozního genu GAPDH, který byl vybrán na základě stability exprese napříč vzorky.

### Příklad 3

Periferní krev B-CLL pacienta byla přenesena do zkumavky a byl změřen objem krve. Dále byl přidán RosetteSep® Human B Cell Enrichment Cocktail (50 µl/ml krve), směs byla promíchána kroužením a inkubována 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byl přidán minimálně stejný objem 2% FBS (fetální bovinní sérum ve fyziologickém roztoku s foťátovým pufrům), promícháno a navrstveno 6 ml ředěné krve na 3 ml Ficoll-Paque Plus® vytemperovaného na laboratorní teplotu. Byla provedena centrifugace 30 minut/400g. Vrstva lymfocytů byla přenesena do čisté zkumavky (15 cm) a doplněna 2% FBS na 10 ml, počet zkumavek byl zvolen tak, aby byly separované lymfocyty naředěny alespoň 2x, obsah zkumavek byl dobře promíchán. Poté byla provedena centrifugace 10-15 minut/200g, byl odsát supernatant a sediment byl rozsuspendován v 1 ml chlazeného lyzačního pufru (lyze eryocytů – 154,9 mM NH<sub>4</sub>Cl, 9,9 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA), objem byl doplněn na 10 ml a převrácením promíchán. Sedimenty z více zkumavek byly v tomto kroku spojeny. Byla provedena centrifugace 10-15 minut/200g, odsát supernatant a sediment rozsuspendován v 2% FBS a přenesen do mikrozkušavky. Po další centrifugaci 10 minut/200g byl odsát supernatant a sediment byl lyzován v 350 µl RLT pufru (lyzační pufr, součást RNeasy Mini Kit firmy Qiagen určenému na izolaci totální RNA).

Totální RNA byla ze separovaných B-CLL buněk izolována pomocí RNeasy Mini Kit podle instrukcí výrobce (Qiagen). Kvalita a koncentrace získané totální RNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop) a elektroforetický (BioAnalyzer 2100). Pro další analýzy byly použity pouze vzorky s dobrými parametry (RIN > 8, koncentrace > 50 ng/µl). K syntéze cDNA byl použit systém SuperScript™ III Reverse Transcriptase s oligo(dT)<sub>12-18</sub> primerem

(Invitrogen) podle instrukcí výrobce. Bylo transkribováno 500 ng totální RNA. Získaných 20  $\mu$ l cDNA bylo naředěno RNase-free vodou na konečný objem 50  $\mu$ l. Každý vzorek byl analyzován v triplikátu pomocí systému TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) podle instrukcí výrobce. Amplifikace DNA byla následně detekována přístrojem 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) a získaná data byla analyzována pomocí softwaru Sequence Detection System (SDS) software version 1.3.1. Výsledkem bylo číslo cyklu, při kterém fluorescence dosáhne nastaveného prahu (Ct - fluorescence threshold cycle). Relativní exprese genu byla normalizována k expresi provozního genu GAPDH ( $\Delta$  Ct). Získaná data byla analyzována pomocí neparametrického Wilcoxonova testu.

Expresí genů LAG3, LPL a ZAP70 byly stanoveny pomocí RT-qPCR u souboru 94 B-CLL pacientů (viz Příklad 2). Na základě výsledků, které dokumentují obr. 1, 2 a Tab. 1, bylo zjištěno, že soubor genů LAG3, LPL a ZAP70, jejichž exprese odlišuje pacienty s nemutovaným IgVH od pacientů s mutovaným IgVH, tedy pacienty s různou prognózou onemocnění, je vhodným souborem pro stanovení prognózy onemocnění u pacienta s vysokou jistotou.

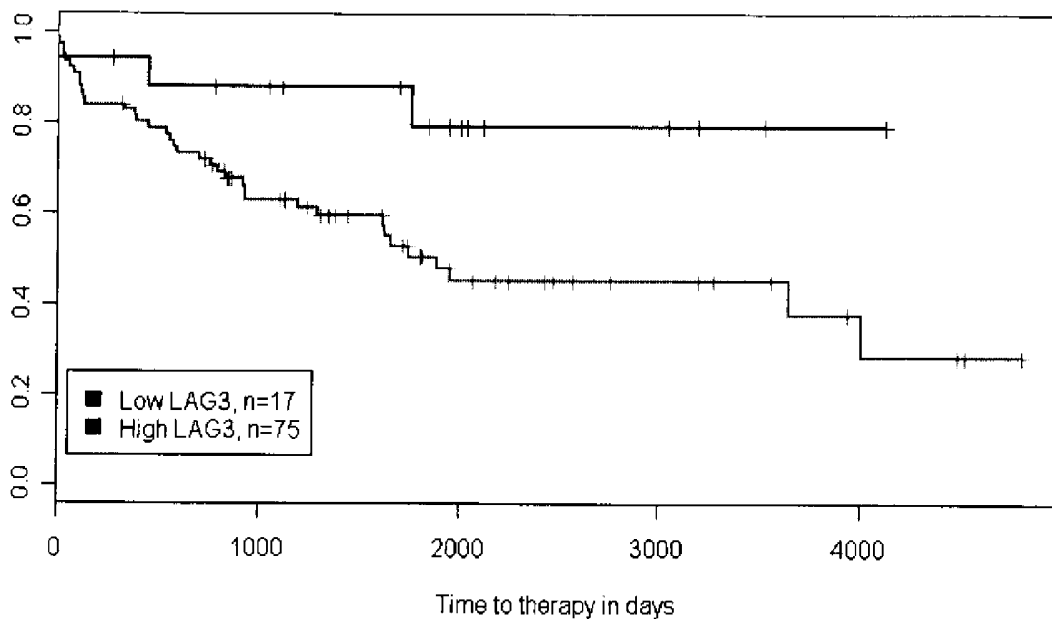
Tabulka 1 ukazuje souhrnné výsledky stanovení exprese genů LAG3, LPL a ZAP70 RT-qPCR u souboru 94 B-CLL pacientů. Vzorky byly podle exprese jednotlivých genů (LPL, LAG3, ZAP70) rozděleny do skupin pozitivní (exprese genu vyšší než stanovená mez) a negativní (exprese genu nižší než stanovená mez). Mez positivity byla stanovena pro LAG3 8,8  $\Delta$  Ct, pro LPL 8,4  $\Delta$  Ct a pro ZAP70 4,8  $\Delta$  Ct. Souhrn pro všechny tři sledované geny byl vytvořen tak, že vzorky klasifikované jako pozitivní pro všechny tři geny byly zařazeny do skupiny pozitivních, ostatní byly vyhodnoceny jako negativní. V tabulce jsou vzorky seskupeny podle mutačního stavu genu IgVH a dále podle positivity/negativity pro stanovované geny. Čísla tučně představují skutečný počet případů, v závorce jsou vyjádřeny jako procento (100% = počet vzorků v dané skupině se shodným stavem IgVH). Poslední řádek tabulky představuje procento správně klasifikovaných vzorků (100% = všechny vyšetřené vzorky).

Tab. 1

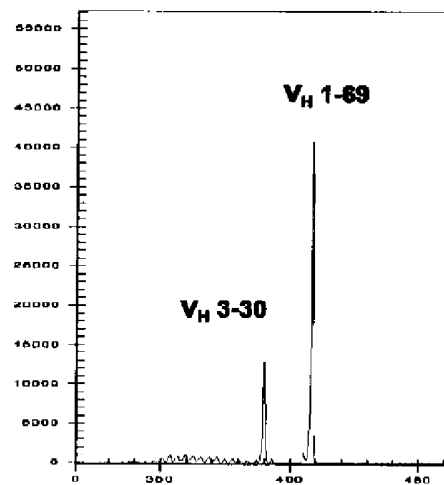
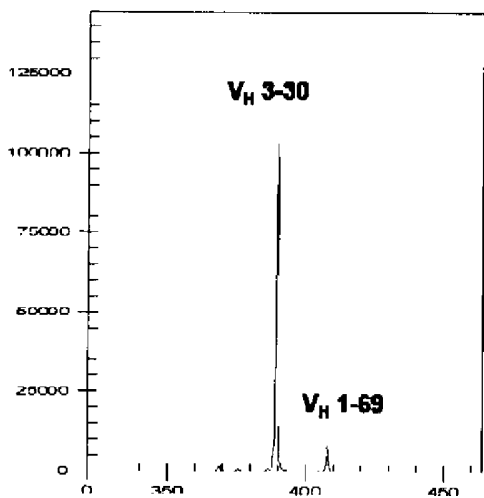
	gen exprese	LPL	ZAP70	LAG3	3 geny
IgVH	POZITIVNÍ	<b>39</b> (97,5%)	<b>39</b> (97,5%)	<b>40</b> (100,0%)	<b>38</b> (95,0%)
UNMUT (n = 40)	NEGATIVNÍ	<b>1</b> (2,5%)	<b>1</b> (2,5%)	<b>0</b> (0%)	<b>2</b> (5,0%)
IgVH MUT	POZITIVNÍ	<b>9</b> (16,7%)	<b>22</b> (40,7%)	<b>36</b> (66,7%)	<b>3</b> (5,6%)
(n = 54)	NEGATIVNÍ	<b>45</b> (83,3%)	<b>32</b> (59,3%)	<b>18</b> (33,3%)	<b>51</b> (94,4%)
Procento správně určeného mutačního statusu		89%	80%	62%	95%

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stanovení prognózy B-buněčné chronické lymfocytární leukémie (B-CLL) z biologického vzorku odebraného z těla pacienta, vyznačený tím, že se stanoví exprese genu LAG3 (lymphocyte-activation gene 3) v B-CLL buňkách vzorku.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že se stanoví exprese genu LAG3 a alespoň jednoho genu vybraného ze skupiny zahrnující LPL a ZAP70.
3. Způsob podle nároku 2, vyznačený tím, že se stanoví exprese genů LAG3, LPL a ZAP70.
4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, vyznačený tím, že ke stanovení exprese genu se použije detekce hladiny mRNA daného genu.
5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, vyznačený tím, že biologickým vzorkem je vzorek periferní krve, kostní dřeně nebo vzorek tkáně, s výhodou je vzorkem tkáně vzorek lymfatické uzliny.



Obr. 1



Obr. 2

