

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241607**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432011**

(51) Int.Cl.  
**C12Q 1/6886 (2018.01)**

(22) Data zgłoszenia: **29.11.2019**

---

(54) **Panel biomarkerów miRNA do diagnozowania różnicowego podtypów histopatologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**31.05.2021 BUP 11/21**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**07.11.2022 WUP 45/22**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny  
W Białymstoku, Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**RADOSŁAW CHARKIEWICZ, Białystok, PL  
ATTILA GYENESEI, Boly, HU  
BENCE GÁLIK, Białystok, PL  
JACEK NIKLIŃSKI, Białystok, PL  
JOANNA RESZEĆ, Białystok, PL  
MIROSŁAW KOZŁOWSKI, Białystok, PL  
ANETTA SULEWSKA, Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Marta Kawczyńska**

---

**PL 241607 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca (AC) względem raka płaskonabłonkowego płuca (SCC), sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca (SCC) względem raka gruczołowego płuca (AC), diagnostyczny panel biomarkerów miRNA, zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca, zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca, zastosowania panelu biomarkerów miRNA, jak również zestaw do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca i zestaw do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca.

### Dziedzina wynalazku

Niniejszy wynalazek dotyczy ogólnie molekularnej diagnostyki klinicznej, dokładniej molekularnej diagnostyki różnicowej podtypów histopatologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. non small cell lung carcinoma, NSCLC), w szczególności raka gruczołowego płuca (ang. Adenocarcinoma, AC) względem raka płaskonabłonkowego płuca (ang. Squamous cell carcinoma, SCC) poprzez monitorowanie i analizę ekspresji mikroRNA (określanych tu także jako miRNA i miRnome) w próbkach biologicznych.

### Stan techniki

Rak płuca jest główną przyczyną śmierci z powodu nowotworów złośliwych na całym świecie. Niedrobnokomórkowy rak płuca jest jednym z najczęstszych rodzajów raka płuca. Dwa główne jego podtypy histopatologiczne stanowi rak gruczołowy płuca i rak płaskonabłonkowy płuca. Częstość występowania raka gruczołowego oraz płaskonabłonkowego sięga 85–90%. Odpowiednie rozpoznanie podtypu histopatologicznego raka płuca pozwala na wdrożenie skutecznego sposobu leczenia i zatem zwiększenie korzyści terapeutycznych.

Znane są sposoby diagnostyczne do stratyfikacji podtypów niedrobnokomórkowego raka płuca oparte na konwencjonalnych badaniach histopatologicznych. Często jednak wyniki tego rodzaju badań są niejednoznaczne lub nie pozwalają na właściwe rozpoznanie histologii nowotworu. Właściwe rozpoznanie jest zaś decydujące dla wdrożenia odpowiedniego leczenia oraz stanowi kluczowy element w procedurze kwalifikacji pacjentów do terapii spersonalizowanych. Obecnie w przypadku, gdy za pomocą wspomnianych badań histopatologicznych nie udaje się potwierdzić rozpoznania, czyli określić rodzaju guza na podstawie badania mikroskopowego pobranych tkanek, często konieczne jest wykonanie zabiegu operacyjnego, aby w sposób ostateczny potwierdzić rozpoznanie raka i zaplanować odpowiednie leczenie. Takie zabiegi operacyjne są obciążające dla pacjenta i wiążą się często z różnego rodzaju powikłaniami.

Znane są także oznaczenia diagnostyczne do diagnozowania różnicowego raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca, które są oparte na metodach molekularnych, to znaczy analizie ekspresji kwasu nukleinowego jednego biomarkera (Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, i wsp. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27:2030–7, Bishop JA, Benjamin H, Cholak H, i wsp. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin Cancer Res* 2010; 16:610–19). Okazało się jednak, że wyniki uzyskane przy zastosowaniu tego rodzaju oznaczeń opartych na analizie ekspresji jednego biomarkera nie są wystarczająco jednoznaczne i nie pozwalają na jednoznaczne rozróżnienie pomiędzy rakiem gruczołowym a rakiem płaskonabłonkowym płuca (Del Vescovo V, Cantaloni C, Cucino A, i wsp. miR-205 Expression levels in nonsmall cell lung cancer do not always distinguish adenocarcinomas from squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011; 35:268–75).

Zatem obecnie nie istnieją sposoby i środki diagnostyczne oparte na molekularnym diagnozowaniu podtypu raka płuca, które pozwalałyby na uniknięcie niedogodności znanych ze stanu techniki. Postęp w diagnostyce molekularnej w tej dziedzinie jest wciąż niezadawalający.

### Krótki opis wynalazku

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca (AC) względem raka płaskonabłonkowego płuca (SCC) u osobnika, polegający na tym, że:

- a) w próbce od osobnika oznacza się ilościowo poziom ekspresji dla diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326,

hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p, i

- b) identyfikuje się sygnaturę miRNA osobnika poprzez porównanie ilościowe poziomu ekspresji oznaczonego dla panelu biomarkerów w próbce od osobnika według a) z ekspresją panelu biomarkerów w próbce referencyjnej stanowiącej opracowaną w sposób ściśle kontrolowany próbkę stanowiącą mieszaninę roztworów RNA (ang. pool) wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach;

przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p wyższy niż we wspomianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p niższy niż we wspomianej próbce referencyjnej wskazują, że osobnik cierpi na raka gruczołowego płuca, a nie na raka płaskonabłonkowego płuca.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca (SCC) względem raka gruczołowego płuca (AC) u osobnika, polegający na tym, że:

- a) w próbce od osobnika oznacza się ilościowo poziom ekspresji dla diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p, i

- b) identyfikuje się sygnaturę miRNA osobnika poprzez porównanie ilościowe poziomu ekspresji oznaczonego dla panelu biomarkerów w próbce od osobnika według a) z ekspresją panelu biomarkerów w próbce referencyjnej stanowiącej mieszaninę RNA wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach;

przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p niższy niż we wspomianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p wyższy niż we wspomianej próbce referencyjnej wskazują, że osobnik cierpi na raka płaskonabłonkowego płuca, a nie na raka gruczołowego płuca.

Korzystnie w sposobach różnicowego diagnozowania *in vitro* według wynalazku jako próbkę od osobnika stosuje się próbkę wybraną z grupy obejmującej świeżą mrożoną tkankę pobraną od pacjenta i tkankę utrwaloną w formalinie i zabezpieczoną parafiną. Korzystniej próbkę stanowi świeża mrożona próbka tkanki guza nowotworowego płuca. Korzystniej próbkę stanowi próbka tkanki guza nowotworowego płuca utrwalona w formalinie i zabezpieczona parafiną.

W sposobach według wynalazku próbka pochodzi od osobnika, którym to osobnikiem jest korzystnie człowiek.

Korzystnie w sposobach różnicowego diagnozowania *in vitro* według wynalazku poziom ekspresji panelu biomarkerów miRNA oznacza się metodą wybraną spośród sekwencjonowania nowej generacji, hybrydyzacji, RT-PCR lub mikromacierzy.

Korzystniej w sposobach różnicowego diagnozowania *in vitro* według wynalazku poziom ekspresji panelu biomarkerów miRNA oznacza się metodą sekwencjonowania nowej generacji.

Korzystnie w sposobach różnicowego diagnozowania *in vitro* według wynalazku identyfikację sygnatury miRNA przeprowadza się metodami statystycznymi lub bioinformatycznymi.

Korzystniej w sposobach według wynalazku identyfikację sygnatury miRNA przeprowadza się metodami bioinformatycznymi, w szczególności poprzez normalizację danych, transformację i kontrolę dystrybucji, analizę różnicową abundancji i regresję typu LASSO/elastycznej sieci oraz korelację abundancji, jeszcze korzystniej poprzez normalizację danych uzyskanych metodą NGS, transformację i kontrolę dystrybucji, analizę różnicową abundancji i regresję typu LASSO/elastycznej sieci oraz korelację abundancji.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto diagnostyczny panel biomarkerów miRNA składający się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca u osobnika,

przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p wyższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p niższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej wskazują łącznie, że osobnik cierpi na raka gruczołowego płuca.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca u osobnika,

przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p niższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p wyższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej wskazują łącznie, że osobnik cierpi na raka płaskonabłonkowego płuca.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA jak zdefiniowano powyżej do różnicowego diagnozowania raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA jak zdefiniowano powyżej do różnicowego diagnozowania raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto zestaw do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca, charakteryzujący się tym, że zawiera środki do ilościowego oznaczania poziomu ekspresji diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p metodą sekwencjonowania następnej generacji oraz instrukcję do przeprowadzenia sposobu różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca jak zdefiniowano powyżej.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto zestaw do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca, charakteryzujący się tym, że zawiera środki do ilościowego oznaczania poziomu ekspresji diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p metodą sekwencjonowania następnej generacji oraz instrukcję do przeprowadzenia sposobu różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca jak zdefiniowano powyżej.

#### **Szczegółowy opis wynalazku**

Wynalazki według załączonych zastrzeżeń patentowych są użyteczne do oznaczania i diagnozowania różnicowego *in vitro* dwóch głównych postaci histopatologicznych niedrobnokomórkowego

raka płuca, mianowicie raka niepłaskonabłonkowego, w szczególności raka gruczołowego, i raka płaskonabłonkowego. Sposoby według wynalazku obejmują izolację RNA z próbki pobranej od pacjenta i analizę ilościową poziomu ekspresji dla diagnostycznego panelu wybranych biomarkerów miRNA w tej próbce. Podwyższona ekspresja wskazanych powyżej biomarkerów i obniżona ekspresja innych wskazanych powyżej biomarkerów w porównaniu do wspomnianej wcześniej próbki referencyjnej stanowiącej mieszaninę roztworów RNA wyizolowanych z guzów AC i SCC w równych ilościach wskazuje na dany podtyp raka płuca. Dokładniej, ocena ilościowa ekspresji wskazanych biomarkerów miRNA pozwala na określenie tkankowo-specyficznego profilu ekspresyjnego wyselekcjonowanych cząsteczek miRNA, czyli tak zwanej sygnatury miRNA lub sygnatury różnicowej ekspresji miRNA, i precyzyjne rozróżnienie pomiędzy podtypem raka gruczołowego płuca (AC) i raka płaskonabłonkowego płuca (SCC). Identyfikacja profilu ekspresyjnego wskazanych biomarkerów, czyli sygnatury miRNA, pozwala na uzyskanie kompletnej klasyfikacji raka płuca i wdrożenie odpowiedniego sposobu leczenia. W sposobach według wynalazku jako próbkę od pacjenta można stosować korzystnie świeżą mrożoną tkankę albo tkankę w postaci utrwalonej w formalinie i zabezpieczonej do kostki parafinowej w formie tzw. cytobloku. Próbkę do zastosowania w sposobach według wynalazku mogą pochodzić z materiału pobranego podczas zabiegu chirurgicznego lub podczas biopsji.

Sposoby według wynalazku zapewniają środki do ilościowego oznaczania i/lub monitorowania ekspresji diagnostycznego panelu biomarkerów na poziomie kwasu nukleinowego. Ilościowe oznaczanie ekspresji diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA według wynalazku można przeprowadzić dowolnym sposobem ilościowej oceny ekspresji znanym w dziedzinie, korzystnie za pomocą sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Technologia NGS wykorzystana do oceny profilu miRnomowego, czyli poziomu ekspresji miRNA guza umożliwia precyzyjną ocenę poziomów ekspresji wielu cząsteczek miRNA w wielu próbkach materiału biologicznego jednocześnie. Przyspiesza to analizę wielu próbek w tym samym czasie, jak również obniża koszty jednostkowej analizy, co ma istotne znaczenie w diagnostyce klinicznej. Do analizy ilościowej poziomu ekspresji miRNA możliwe jest także wykorzystanie metody RT-PCR, hybrydyzacji lub mikromacierzy, itp. Dzięki identyfikacji sygnatury miRNA osobnika poprzez porównanie ilościowe poziomu ekspresji oznaczonego dla panelu biomarkerów w próbce od osobnika z ekspresją panelu biomarkerów we wspomnianej powyżej próbce referencyjnej możliwe jest uzyskanie diagnozowania różnicującego raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca. Identyfikację sygnatury miRNA poprzez porównanie ilościowe poziomu ekspresji dla panelu biomarkerów w próbce od osobnika można przeprowadzić w dowolny sposób znany w dziedzinie, takimi jak metody statystyczne lub bioinformatyczne. Szczególnie korzystnie zgodnie z wynalazkiem przeprowadza się oznaczanie poziomu ekspresji miRNA metodą NGS, a następnie identyfikuje się sygnaturę miRNA metodami bioinformatycznymi jak wspomniano powyżej.

Diagnostyczny panel biomarkerów miRNA według wynalazku stanowi wyselekcjonowany zestaw miRNA. Takie miRNA z diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA według wynalazku ulegają selektywnej ekspresji na poziomie wyższym lub niższym w określonych podtypach histopatologicznych raka płuca w porównaniu do wspomnianej wcześniej próbki referencyjnej, to znaczy w rakach niepłaskonabłonkowych, jak rak gruczołowy (AC), i w rakach płaskonabłonkowych (SCC). Diagnostyczny panel biomarkerów miRNA według wynalazku składa się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p.

Przykładowo, zastosowanie panelu biomarkerów miRNA jak opisano powyżej pozwala na identyfikację sygnatury miRNA, która różnicuje raki gruczołowe i raki płaskonabłonkowe płuca. Dokładniej zgodnie z wynalazkiem zidentyfikowano panel biomarkerów miRNA, które w przypadku raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca ulegają specyficznemu nadekspresji, to znaczy których poziom ekspresji jest wyższy niż w próbce referencyjnej, jak i biomarkerów, które ulegają specyficznemu obniżonej ekspresji, to znaczy których poziom ekspresji jest niższy niż w próbce referencyjnej. Pozwala to na zastosowanie takiego panelu w różnicowej diagnozie *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca, jak również w różnicowej diagnozie *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca.

Zgodnie z wynalazkiem próbkę korzystnie stanowi świeża mrożona próbka tkanki guza nowotworowego płuca lub próbka tkanki guza nowotworowego płuca utrwalona w formalinie i zabezpieczona parafiną. Takie próbki mogą korzystnie pochodzić z materiału pobranego podczas zabiegu chirurgicznego lub podczas biopsji.

Próbką referencyjną, względem której dokonuje się porównania ilościowego ekspresji panelu biomarkerów miRNA według wynalazku, jest korzystnie opracowana w sposób ściśle kontrolowany próbka stanowiąca mieszaninę roztworów RNA wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach.

Zgodnie z wynalazkiem następujące biomarkery miRNA ulegają specyficznej różnicowej nadekspresji w raku gruczołowym płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p.

Następujące biomarkery miRNA ulegają natomiast zgodnie z wynalazkiem specyficznej różnicowej obniżonej ekspresji w raku gruczołowym płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca: hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p.

Innymi słowy oznacza to, że następujące miRNA ulegają specyficznej różnicowej obniżonej ekspresji w raku płaskonabłonkowym płuca względem raka gruczołowego płuca: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, zaś następujące miRNA ulegają specyficznej różnicowej nadekspresji w raku płaskonabłonkowym płuca względem raka gruczołowego płuca: hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p.

Pozwala to zatem na przeprowadzenie różnicowego diagnozowania raka płaskonabłonkowego płuca (SCC) względem raka gruczołowego płuca (AC), gdyż następujące biomarkery miRNA ulegają specyficznej różnicowej obniżonej ekspresji w raku płaskonabłonkowym płuca względem raka gruczołowego płuca: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, zaś następujące biomarkery miRNA ulegają specyficznej różnicowej nadekspresji w raku płaskonabłonkowym płuca względem raka gruczołowego płuca: hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p.

Ilościowe oznaczenie ekspresji panelu biomarkerów opisanych powyżej pozwala na identyfikację sygnatury miRNA, która wiarygodnie, jednoznacznie i powtarzalnie różnicuje raki gruczołowe i raki płaskonabłonkowe płuca.

Twórcy wynalazku przeprowadzili badanie kliniczne, do którego włączono chorych ze zdiagnozowanym rakiem gruczołowym płuca (AC) i płaskonabłonkowym rakiem płuca (SCC). Po poddaniu ocenie ilościowej panelu wyselekcjonowanych biomarkerów miRNA u każdego podmiotu, wykazali oni, że u podmiotów z AC występuje statystycznie istotna różnica w ekspresji wyselekcjonowanego panelu biomarkerów miRNA w porównaniu z podmiotami z SCC przy założeniu, że każda analizowana próbka była porównywana do wspomnianej wcześniej próbki referencyjnej. Próbka referencyjna nazywana również kontrolą referencyjną służy do normalizacji poziomów ekspresji miRNA w całej grupie próbek badanych, umożliwiając miarodajność pomiarów miRNA w każdej próbce niezależnie od histologii nowotworu. W tym układzie porównawczym na początku następowało porównanie pomiarów poszczególnych miRNA dla każdej próbki względem pomiarów tych samych miRNA w próbce referencyjnej. Następnie różnice w ekspresji pomiędzy poszczególnymi próbkami badanymi a próbka referencyjną zostały porównane pomiędzy grupami w ujęciu AC vs SCC. Wyniki badania wykazały, że wśród zidentyfikowanych miRNA, poziom ekspresji dwunastu miRNA był wyższy (regulacja w górę) w przypadku osobników z AC niż w przypadku osobników z SCC, zaś w przypadku pięciu innych miRNA poziom ekspresji był niższy (regulacja w dół) w przypadku AC niż w przypadku SCC (zobacz Tabela 4). Nie jest kluczowe o ile poziom ekspresji jest wyższy lub niższy niż w próbce referencyjnej, gdyż decydujące znaczenie ma w tym przypadku kierunek zmiany ekspresji (regulacja w górę lub regulacja w dół) względem próbki referencyjnej. Na podstawie tych wyników nieoczekiwanie stwierdzono, że przeprowadzenie analizy różnicowej na panelu wielu biomarkerów miRNA umożliwia uzyskanie wiarygodnej sygnatury miRNA pozwalającej na wiarygodne i jednoznaczne różnicowe diagnozowanie *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca, jak również różnicowe diagnozowanie raka płaskonabłonkowego względem raka gruczołowego płuca.

W korzystnych przykładach wykonania wynalazku oznaczenie ilościowe ekspresji dla panelu biomarkerów miRNA przeprowadza się z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji. Poniżej przedstawiono korzystne sposoby realizacji takiego sekwencjonowania. Należy jednak rozumieć, że poniższy korzystny sposób realizacji nie ma w żaden sposób ograniczyć zakresu wynalazku określonego w załączonych zastrzeżeniach patentowych.

## I. Metodologia pomiarów analitycznych

### 1. Materiał dedykowany do przeprowadzenia analiz molekularnych zgodnie z wynalazkiem to albo:

- świeża tkanka pobrana podczas zabiegu operacyjnego z powodu NSCLC zabezpieczona w warunkach niskotemperaturowych (min.  $-80^{\circ}\text{C}$ ) (FF) lub utrwalona w formalinie i zabezpieczona do kostki parafinowej (FFPE); albo
- świeża tkanka pobrana za pomocą technik biopsyjnych zabezpieczona w warunkach niskotemperaturowych (min.  $-80^{\circ}\text{C}$ ) lub utrwalona w formalinie i zabezpieczona do kostki parafinowej (FFPE) w formie tzw. cytobloku (ang. cytoblock).

### 2. Weryfikacja histopatologiczna

Do weryfikacji histopatologicznej stosuje się preparaty histopatologiczne służące do oceny ilości komórek nowotworowych w materiale wykonane za pomocą klasycznych technik histopatologicznych, takich jak przygotowanie skrawków parafinowych lub skrawków mrożeniowych za pomocą kriostatu, barwienie H&E.

Ponadto doświadczony patolog przeprowadza ocenę odsetka komórek rakowych w preparacie.

Wymagana minimalna ilość komórek nowotworowych w próbce biologicznej wynosi 50%.

### 3. Izolacja RNA z materiału tkankowego

Następnie przeprowadza się izolację całkowitego RNA z próbki od osobnika badanego z zastosowaniem komercyjnego, w pełni zoptymalizowanego zestawu do izolacji całkowitego RNA wraz z frakcją małego RNA (ang. smallRNA) dedykowanego do świeżego materiału tkankowego lub materiału typu FFPE.

Wydajność procesu ekstrakcji RNA monitoruje się przy pomocy tzw. kontroli egzogennej, stanowiącej mieszaninę syntetycznych 5' ufosforylowanych cząsteczek miRNA o różnych stężeniach.

### 4. Ocena jakościowa i ilościowa roztworów RNA

W następnej kolejności przeprowadza się następujące oceny jakościowe i ilościowe:

- ocenę czystości roztworów za pomocą metody spektrofotometrycznej UV/VIS;
- ocenę ilościową RNA za pomocą metody spektrofotometrycznej UV/VIS oraz techniki fluorymetrycznej;
- ocenę jakościową RNA w kontekście stopnia integralności cząsteczek RNA za pomocą techniki elektroforezy mikrokapilarnej: przy czym minimalna wymagana wartość współczynnika RIN (ang. RNA Integrity Number) dla roztworu RNA wyekstrahowanego ze świeżego materiału wynosi 6,0, zaś wartość współczynnika RIN dla izolatów RNA pochodzących z materiału typu FFPE nie jest brana pod uwagę, gdyż w tym przypadku wymagania dotyczą stwierdzenia obecności frakcji małego RNA w elektroforegramie.

### 5. Preparatyka bibliotek cDNA do sekwencjonowania następnej generacji (NGS)

Następnie przygotowuje się biblioteki cDNA z zastosowaniem komercyjnego, w pełni zoptymalizowanego zestawu do przygotowania bibliotek cDNA na matrycy cząsteczek smallRNA, bazującego na technice amplifikacji, kompatybilnego z technologią Illumina.

### 6. Ocena jakościowa bibliotek cDNA

Ocenę struktury i rozkładu poszczególnych frakcji biblioteki cDNA odpowiadających poszczególnym frakcjom cząsteczek mieszczących się we frakcji małego RNA przeprowadza się za pomocą techniki elektroforezy mikrokapilarnej.

### 7. Frakcjonowanie bibliotek

Selekcję produktów cDNA o odpowiedniej wielkości (ang. size selection) odpowiadających frakcji miRNA przeprowadza się za pomocą techniki elektroforetycznej w żelu agarozowym.

### 8. Ocena ilościowa bibliotek cDNA po frakcjonowaniu

Po frakcjonowaniu przeprowadza się ocenę stężenia bibliotek cDNA z zastosowaniem techniki amplifikacji.

### 9. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Następnie przeprowadza się sekwencjonowanie następnej generacji na aparacie HiSeq 4000 Illumina.

Uzyskane dane pozwalają na identyfikację sygnatury miRNA różnicującej raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca.

Zgodnie z wynalazkiem taką identyfikację przeprowadza się korzystnie metodami statystycznymi jak wiadomo w dziedzinie, lub bioinformatycznymi. Poniżej przedstawiono przykładowe i korzystne

sposoby realizacji metod bioinformatycznych. Należy jednak rozumieć, że poniższy korzystny sposób realizacji z zastosowaniem metod bioinformatycznych nie ma w żaden sposób ograniczyć zakresu wynalazku określonego w załączonych zastrzeżeniach patentowych.

## II. Metodologia bioinformatyczna

Analiza i identyfikacja sygnatury różnicowej ekspresji miRNA obejmuje kilka etapów. Pierwszym krokiem jest dopasowanie odfiltrowanych sekwencji odczytu do genomu referencyjnego przy użyciu parametrów specyficznych dla miRNA, a następnie zliczenie liczby odczytów dla każdego miRNA. Genomem referencyjnym jest genom gatunku, do którego należy osobnik, którego próbek jest badana. W przypadku gdy takim osobnikiem jest człowiek, genomem referencyjnym jest genom *Homo sapiens*. Jakość mapowania i relacji pomiędzy próbkami jest badana przy użyciu różnych metod i technik wizualizacji. Jeżeli wykryte zostaną próbki o niskiej jakości lub wartości odstające, powinny być one na tym etapie wyłączone z dalszej analizy. Dane są również normalizowane w oparciu o bibliotekę i długości miRNA w celu zmniejszenia zakłóceń systematycznych powodowanych przez źródła niebiologiczne oraz w celu poprawy porównywalności próbek. Na Fig. 14 przedstawiono korzystne etapy identyfikacji sygnatury miRNA metodami bioinformatycznymi zgodnie z niniejszym wynalazkiem dla zestawu danych uzyskanych z analizy ilościowej ekspresji panelu biomarkerów miRNA, korzystnie z sekwencjonowania miRNA.

Wszystkie analizy powinny być wykonane przy użyciu obliczeniowych pakietów statystycznych R language (np. moduł Bioconductor związany z R language).

### 1. Dane surowe

Odczyty należy pozyskać z aparatu do sekwencjonowania następnej generacji (np. HiSeq 4000 (Illumina)), np. w oparciu o metodę zliczania zasad przy użyciu producenckiego oprogramowania dedykowanego do tego celu.

### 2. Mapowanie

Odczyty należy dostosować do genomu referencyjnego, korzystnie w wersji STAR 2.5.1b, stosując tryb wyrównania 2-przebiegowego. Genom referencyjny to genom gatunku, z którego pochodzi próbka od osobnika do badania, jak wyjaśniono powyżej.

### 3. Liczenie i normalizacja

Po dostosowaniu do genomu referencyjnego, odczyty należy powiązać ze znanymi miRNA i policzyć liczbę odczytów dostosowanych w obrębie każdego miRNA. Dane powinny być następnie znormalizowane w celu usunięcia zmienności między próbkami spowodowanej przyczynami niebiologicznymi oraz w celu zapewnienia porównywalności wartości w zestawie próbek. Odczyty należy normalizować, np. przy użyciu metody TMM. Do testów statystycznych dane poddaje się dalszej transformacji logarytmicznej, np. przy użyciu metody voom.

### 4. Kontrola jakości

Kontrolę jakości należy przeprowadzić w celu wykazania korelacji między replikatami. Można ją wykonać za pomocą następujących metod:

- wizualizacja rozkładu wartości ekspresji miRNA w zestawie próbek;
- obliczenie wartości minimalnej, mediany, wartości średniej i maksymalnej ekspresji miRNA znormalizowanych próbek;
- obliczenie wartości korelacji pomiędzy próbkami;
- hierarchiczne grupowanie próbek według ich ogólnego podobieństwa;
- relacje badanych próbek za pomocą analizy głównych składników (PCA).

### 5. Testowanie statystyczne i filtrowanie danych

Po wszystkich etapach wstępnego przetwarzania (preprocessingu) przeprowadza się testy statystyczne między porównywanymi grupami próbek (AC względem SCC) przy założeniu zastosowania próbki referencyjnej stanowiącej opracowaną w sposób ściśle kontrolowany próbkę stanowiącą mieszaninę roztworów RNA wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach, do której należy odnieść wszystkie próbki badane. Wyniki testów statystycznych są następnie poddawane kolejnym etapom, tzw. filtrowania cząsteczek miRNA o zróżnicowanej ekspresji. Filtrowanie opiera się na istotności statystycznej i wielkości różnicy w średnich poziomach ekspresji między grupami próbek. Krotności zmian ekspresji miRNA oraz skorygowane wartości p, które są obliczane za pomocą testów statystycznych, są stosowane jako kryteria filtrowania. Wszystkie pomiary miRNA są filtrowane w celu identyfikacji tych cząsteczek, które wykazują najsilniejsze dowody na zróżnicowaną ekspresję pomiędzy porównywanymi grupami.

Zmiana krotności (FC) opisuje wielkość różnicy w ekspresji miRNA między porównywanymi grupami. Analiza opiera się na procesie modelowania liniowego przeprowadzonego za pomocą pakietu Limma.

Wartość p opisuje wiarygodność zmiany wartości ekspresji miRNA między porównywanymi grupami. W tej analizie wartości p, zastosowane do filtrowania, są tzw. zmodyfikowanymi wartościami p t-testu lub FDR (spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich).

## 6. Identyfikacja sygnatury miRNA

Proces identyfikacji sygnatury ekspresyjnej na podstawie danych z sekwencjonowania miRNA obejmuje następujące etapy:

- Normalizacji Danych, Transformacji oraz Kontroli Dystrybucji;
- Analizy Różnicowej Abundancji oraz Regresji LASSO/Elastic-Net;
- Korelacji Abundancji.

## 7. Ocena przydatności diagnostycznej sygnatury miRNA

Następnie przeprowadza się ocenę przydatności diagnostycznej zidentyfikowanych sygnatur miRNA poprzez wygenerowanie krzywej ROC (ang. receiver operating characteristic curve), wykreślając prawdziwie dodatnie wartości (TPR) względem fałszywie dodatnich wartości (FPR) przy różnych ustawieniach progowych. Krzywe ROC można generować z wykorzystaniem pakietu MetaseqR Biocundoctur.

Uzyskana zgodnie z wynalazkiem sygnatura miRNA osobnika dla wskazanego powyżej panelu biomarkerów miRNA według wynalazku pozwala na różnicową diagnozę raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca, gdy oznaczony poziom ekspresji następujących biomarkerów miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p w próbce od pacjenta badanego jest wyższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej, zaś poziom ekspresji następujących biomarkerów miRNA: hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p w próbce od pacjenta badanego jest niższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej.

Niniejszy wynalazek zostanie teraz zilustrowany w poniższym przykładzie oraz figurach, które jednak nie mają na celu ograniczenia w żaden sposób zakresu wynalazku zdefiniowanego w zastrzeżeniach patentowych.

### Krótki opis figur

Fig. 1 przedstawia rozkład długości odczytów sekwencji dla analizowanych próbek.

Fig. 2 przedstawia krzywą opisującą część rozkładu wartości ekspresji miRNA analizowanych próbek.

Fig. 3 przedstawia wykres ramkowy dla wartości ekspresji miRNA po normalizacji.

Fig. 4 przedstawia wykres korelacji wg Spearmana pokazujący poziom korelacji pomiędzy analizowanymi próbkami.

Fig. 5 przedstawia dendrogram pokazujący wyniki analizy skupień wszystkich analizowanych próbek.

Fig. 6 przedstawia wyniki analizy PCA dla analizowanych próbek.

Fig. 7 przedstawia wykres typu „Volcano” dla porównania AC i SCC.

Fig. 8 przedstawia wykres typu „MDA” dla porównania AC i SCC.

Fig. 9 przedstawia wykres typu „PCA” dla porównania AC i SCC.

Fig. 10 przedstawia wyniki analizy regresji LASSO dla danych testowych.

Fig. 11 przedstawia wyniki analizy regresji LASSO dla walidacji krzyżowej.

Fig. 12 przedstawia typu Heatmapy pokazujący sygnaturę ekspresyjną miRNA do stratyfikacji AC i SCC.

Fig. 13 przedstawia analizę krzywej ROC dla zidentyfikowanej sygnatury miRNA, różnicującej raki gruczołowe i płaskonabłonkowe płuca.

Fig. 14 przedstawia przebieg analizy poziomu ekspresji metodami bioinformatycznymi dla zestawu danych z sekwencjonowania miRNA.

### Przykłady

Wszystkie opisane poniżej procedury i analizy doświadczalne przeprowadzono z zastosowaniem standardowych, powszechnie znanych metod stosowanych w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek, oraz komercyjnie dostępnych zestawów testowych, odczynników i aparatury, postępując zgodnie z zaleceniami producentów stosowanych zestawów, odczynników i aparatury, o ile nie wskazano wyraźnie inaczej.

## Przykład

**Diagnozowanie różnicowe raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca****1. Materiał i Metody****1.1. Pacjenci**

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Deklarację świadomej zgody na przeprowadzenie badań genetycznych uzyskano od każdego pacjenta. Pacjenci zostali zrekrutowani do badania w ramach realizacji projektu MOBIT. Do badania zakwalifikowano 59 pacjentów z rozpoznaniem, operacyjnym niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Kryteria włączenia do badania obejmowały: rozpoznanie raka gruczołowego (Adenocarcinoma, AC) lub płaskonabłonkowego płuca (Squamous cell carcinoma, SCC) w oparciu o rutynową diagnostykę histopatologiczną; kompletną resekcję guza (marginesy resekcyjne wolne od nacieku nowotworowego); stadium zaawansowania klinicznego I–IIIB; dostępność reprezentatywnej, świeżej mrożonej próbki guza (materiał biologiczny zawierający co najmniej 50% komórek nowotworowych w celu ekstrakcji RNA) oraz nie stosowanie przedoperacyjnej chemioterapii. Szczegółowa charakterystyka pacjentów została przedstawiona w Tabeli 1.

Tabela 1  
Charakterystyka pacjentów w grupie badanej.

| Charakterystyka                   |               | Grupa badana, <i>n</i> = 59 |
|-----------------------------------|---------------|-----------------------------|
| Wiek (lata)                       | Średnia ± OS* | 65,64 ± 6,95                |
|                                   | Mediana       | 65                          |
|                                   | Zakres        | 49 - 77                     |
| Płeć                              | Kobieta       | 23 (39%)                    |
|                                   | Mężczyzna     | 36 (61%)                    |
| Stadium zaawansowania klinicznego | IA            | 10 (17%)                    |
|                                   | IB            | 15 (25,4%)                  |
|                                   | IIA           | 10 (17%)                    |
|                                   | IIB           | 9 (15,2%)                   |
|                                   | IIIA          | 13 (22%)                    |
|                                   | IIIB          | 2 (3,4%)                    |
| Podtyp histopatologiczny          | SCC           | 31 (52,5%)                  |
|                                   | AC            | 28 (47,5%)                  |

\* OS, odchylenie standardowe

**1.2. Rozpoznanie histopatologiczne**

Wszystkie próbki guzów płuca zakwalifikowane do badania podlegały ocenie histopatologicznej przy użyciu klasycznych technik histopatologicznych. Preparaty były oceniane niezależnie przez dwóch doświadczonych patologów. Diagnozę histopatologiczną postawiono zgodnie z najnowszą klasyfikacją nowotworów płuca WHO oraz Międzynarodową Multidyscyplinarną Klasyfikacją Gruczolakoraka Płuca IASLC/ATS/ERS. W przypadku jakichkolwiek wątpliwości, preparaty były oceniane z wykorzystaniem barwień immunohistochemicznych w kierunku ekspresji tarczycowego czynnika transkrypcyjnego 1 (ang. thyroid transcription factor-1, TTF-1) (immunohistochemiczny marker raka gruczołowego) oraz w kierunku białka p63 (ang. tumor protein p63, (p63)) (immunofenotyp płaskonabłonkowy). Dodatkowo, wszystkie próbki nowotworów były oceniane pod kątem odsetka komórek rakowych do celów izolacji RNA.

## 2. Izolacja RNA i kontrola jakości

Całkowity RNA wraz z frakcją małego RNA był ekstrahowany ze świeżych mrożonych próbek guzów przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji RNA – mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, USA) zgodnie z protokołem producenta. Ocena jakościowa i ilościowa były wykonane przy użyciu techniki spektrofotometrycznej na aparacie NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). Stężenie roztworów RNA było również oceniane przy użyciu techniki fluorymetrycznej, do której zastosowano aparat Qubit (Thermo Scientific, USA). Współczynnik integralności RNA (RIN) był określany z wykorzystaniem techniki elektroforezy mikrokapilarnej na aparacie Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA).

## 3. Analiza sekwencjonowania następnej generacji (NGS)

### 3.1. Preparatyka bibliotek do NGS

Przygotowanie bibliotek cDNA na matrycy cząsteczek frakcji małego RNA wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu – NEXTflex® Small RNA Sequencing Kit v3 (gel-free & low input options) (BiooScientific, USA) kompatybilnego z technologią Illumina zgodnie z zaleceniami producenta.

### 3.2. Ocena jakościowa bibliotek

Ocenę struktury i rozkładu poszczególnych frakcji bibliotek, odpowiadających poszczególnym frakcjom cząsteczek mieszczących się we frakcji małego RNA, przeprowadzono za pomocą techniki elektroforezy mikrokapilarnej przy użyciu chipów High Sensitivity DNA na aparacie Bioanalyzer 2100 Agilent (Agilent Technologies, USA).

### 3.3. Frakcjonowanie bibliotek

Selekcję produktów cDNA o odpowiedniej wielkości (ang. size selection), odpowiadających frakcji miRNA, wykonano za pomocą techniki elektroforetycznej w żelu agarozowym z wykorzystaniem specjalnych kaset żelowych na aparacie Blue Pippin (Sage Science, USA).

### 3.4. Ocena ilościowa bibliotek cDNA po frakcjonowaniu

Stężenie bibliotek cDNA po frakcjonowaniu oceniono w oparciu o technikę amplifikacji przy użyciu zestawu odczynników – KAPA Library Quantification Kit for Illumina Platforms (Roche, USA) zgodnie z zaleceniami producenta.

### 3.5. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Sekwencjonowanie wypreparowanych bibliotek przeprowadzono na aparacie HiSeq 4000 (Illumina, USA) w standardowy sposób zgodnie z zaleceniami producenta.

## 4. Analizy bioinformatyczne

Wszystkie analizy zostały wykonane przy użyciu obliczeniowych pakietów statystycznych R language (moduł Bioconductor związany z R language).

### 4.1. Dane surowe

Odczyty uzyskano z aparatu HiSeq 4000 (Illumina) w oparciu o metodę zliczania zasad przy użyciu producenckiego oprogramowania dedykowanego do tego celu.

### 4.2. Mapowanie

Odczyty dostosowano do genomu referencyjnego *Homo sapiens* (Ensembl GRCh38 release) w wersji STAR 2.5.1b, stosując tryb wyrównania 2-przebiegowego zgodnie z zaleceniami producenta.

### 4.3. Liczenie i normalizacja

Po dostosowaniu do genomu referencyjnego, odczyty powiązano ze znanymi miRNA i policzono liczbę odczytów dostosowanych w obrębie każdego miRNA. Dane zostały znormalizowane w celu usunięcia zmienności między próbkami spowodowanej przyczynami niebiologicznymi oraz w celu zapewnienia porównywalności wartości w zestawie próbek. Odczyty znormalizowano przy użyciu metody TMM. Do testów statystycznych dane poddano dalszej transformacji logarytmicznej przy użyciu metody voom.

### 4.4. Kontrola jakości

Kontrolę jakości przeprowadzono w celu wykazania korelacji między powtórzeniami oraz identyfikacji wartości odstających. Do kontroli jakości zastosowano następujące metody:

- wizualizację rozkładu wartości ekspresji miRNA w zestawie próbek;
- obliczenie wartości minimalnej, mediany, wartości średniej i maksymalnej ekspresji miRNA znormalizowanych próbek;
- obliczenie wartości korelacji pomiędzy próbkami;
- hierarchiczne grupowanie próbek według ich ogólnego podobieństwa;
- relacje badanych próbek za pomocą analizy głównych składników (PCA).

#### 4.5. Testowanie statystyczne i filtrowanie danych

Po wszystkich etapach wstępnego przetwarzania danych opisanych powyżej przeprowadzono testy statystyczne pomiędzy porównywanymi grupami próbek (AC względem SCC) przy założeniu zastosowania próbki referencyjnej stanowiącej opracowaną w sposób ściśle kontrolowany próbkę stanowiącą mieszaninę roztworów RNA wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach, do której były odnoszone wszystkie próbki badane. Wyniki testów statystycznych poddano następnie kolejnym etapom, tzw. filtrowania cząsteczek miRNA o zróżnicowanej ekspresji. Filtrowanie opierało się na wartościach istotności statystycznej oraz wielkości różnicy w średnich poziomach ekspresji pomiędzy grupami próbek. Krotności zmian ekspresji miRNA oraz skorygowane wartości p, które były obliczone za pomocą testów statystycznych, zostały zastosowane jako kryteria filtrowania. Wszystkie pomiary miRNA zostały przefiltrowane w celu identyfikacji tych cząsteczek, które wykazują najsilniejsze dowody na zróżnicowaną ekspresję pomiędzy porównywanymi grupami. Analizę zmian krotności (ang. Fold Change, *FC*) przeprowadzono za pomocą modelowania liniowego przy użyciu pakietu Limma. Wartości p, które wykorzystano do etapu filtrowania, stanowiły tzw. zmodyfikowane wartości p t-testu lub FDR (spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich).

#### 4.6. Identyfikacja sygnatury miRNA

Proces identyfikacji sygnatury na podstawie danych z sekwencjonowania miRNA składał się z kilku poniższych etapów:

- Normalizacji Danych, Transformacji oraz Kontroli Dystrybucji;
- Analizy Różnicowej Abundancji oraz Regresji LASSO/Elastic-Net.

#### 4.7. Ocena przydatności diagnostycznej zidentyfikowanej sygnatury miRNA

Ocena przydatności diagnostycznej zidentyfikowanej sygnatury miRNA została przeprowadzona poprzez wygenerowanie krzywej ROC (ang. receiver operating characteristic curve). Krzywa została wykreślona na podstawie prawdziwie dodatniej wartości (TPR) względem fałszywie dodatniej wartości (FPR) przy różnych ustawieniach progowych. Do wygenerowania krzywej ROC wykorzystano pakiet MetaseqR Biocundoctur.

### 5. Wyniki

#### 5.1. Wstępne przetwarzanie surowych danych

Surowe odczyty sekwencji wygenerowane podczas przebiegu sekwencjonowania następnej generacji przez aparat HiSeq 4000 (Illumina) zostały zliczone przez specjalne oprogramowanie „base calling software” sprzężone z platformą Illumina. Uzyskane odczyty były następnie poddane ogólnej ocenie jakościowej dla każdej próbki przy użyciu narzędzia modułowego MultiQC v 1.7, uwzględniającego m.in. liczbę odczytów unikatowych oraz zduplikowanych, zawartość par GC, rozkład długości sekwencji, poziom duplikacji sekwencji, zawartość adapterów oraz wskaźniki jakości sekwencji.

Następnie odczyty były poddane trymowaniu w celu usunięcia kontaminacji adapterów oraz czterech przypadkowych zasad na obu końcach odczytów. Odczyty były oceniane ponownie pod kątem jakościowym przy użyciu narzędzia modułowego MultiQC v 1.7. Na Fig. 1 przedstawiono przykładowy parametr jakościowy odczytów dla analizowanych próbek, to znaczy rozkład długości odczytów sekwencji dla analizowanych próbek.

Odczyty po wstępnej obróbce były dostosowane do genomu referencyjnego *Homo sapiens* (Ensembl GRCh38 release). Podsumowanie statystyk dotyczących dostosowania odczytów do genomu referencyjnego dla części analizowanych próbek zaprezentowano w Tabeli 2.

Tabela 2  
Charakterystyka odczytów sekwencji po wstępnej obróbce bioinformatycznej na przykładzie kilkunastu prób biologicznych.

| Próbka   | Wszystkie odczyty | Unikalnie zmapowane | % unikalnie zmapowanych | Wielokrotnie zmapowane | % wielokrotnie zmapowanych |
|----------|-------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|
| 9Gm_S8   | 19615935          | 12958610            | 66,06%                  | 5921815                | 30,19%                     |
| 10Gm_S10 | 17239059          | 10011460            | 58,07%                  | 6664570                | 38,66%                     |
| 17Gm_S14 | 19637813          | 12117736            | 61,71%                  | 6576722                | 33,49%                     |

| Próbka   | Wszystkie odczyty | Unikalnie zmapowane | % unikalnie zmapowanych | Wielokrotnie zmapowane | % wielokrotnie zmapowanych |
|----------|-------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|
| 21Gm_S16 | 19980814          | 13082782            | 65,48%                  | 5889338                | 29,47%                     |
| 23Gm_S18 | 23314335          | 17488529            | 75,01%                  | 5312401                | 22,79%                     |
| 27Gm_S20 | 11438041          | 7883933             | 68,93%                  | 3120458                | 27,28%                     |
| 29Gm_S22 | 11988403          | 8957897             | 74,72%                  | 2762672                | 23,04%                     |
| 30Gm_S24 | 17121229          | 8751692             | 51,12%                  | 4808721                | 28,09%                     |
| 32Gm_S26 | 13396713          | 9605283             | 71,70%                  | 3084424                | 23,02%                     |
| 33Gm_S28 | 21637755          | 16920599            | 78,20%                  | 4450823                | 20,57%                     |
| 34Gm_S30 | 24219401          | 16909924            | 69,82%                  | 6384080                | 26,36%                     |
| 35Gm_S32 | 27126188          | 19926169            | 73,46%                  | 6088352                | 22,44%                     |
| 39Gm_S38 | 18559239          | 12148010            | 65,46%                  | 5823281                | 31,38%                     |
| 40Gm_S40 | 12856824          | 9389249             | 73,03%                  | 3290208                | 25,59%                     |
| 41Gm_S42 | 20686480          | 14343066            | 69,34%                  | 5822814                | 28,15%                     |
| 44Gm_S46 | 16556457          | 9504393             | 57,41%                  | 5660457                | 34,19%                     |
| 57Gn_S50 | 13261254          | 10179657            | 76,76%                  | 2715253                | 20,48%                     |
| 59Gm_S52 | 12262371          | 7961793             | 64,93%                  | 3471736                | 28,31%                     |
| 60Gm_S54 | 14632049          | 9409956             | 64,31%                  | 4491555                | 30,70%                     |
| 61Gm_S56 | 13344337          | 9751130             | 73,07%                  | 3361801                | 25,19%                     |

Do mapowania oraz liczenia odczytów wykorzystano adnotacje bazy miRBase. Odczyty powiązane ze znanymi miRNA i policzono liczbę odczytów dostosowanych do każdego miRNA. Odsetek odczytów zmapowanych różnił się pomiędzy próbkami. Następnie dane zostały znormalizowane w celu usunięcia zmienności między próbkami spowodowanej przyczynami niebiologicznymi oraz w celu zapewnienia porównywalności wartości w zestawie próbek. Odczyty znormalizowano przy użyciu metody TMM. Do testów statystycznych dane poddano dalszej transformacji logarytmicznej przy użyciu metody voom.

## 5.2. Kontrola jakości

Kontrolę jakości przeprowadzono w celu wykazania korelacji między replikatami oraz identyfikacji wartości odstających. Do kontroli jakości analizowanych danych zastosowano opisane poniżej metody. Na Fig. 2 przedstawiono rozkład wartości ekspresji w zestawie próbek z uwzględnieniem wartości minimalnej, średniej i maksymalnej oraz mediany ekspresji znormalizowanych próbek w postaci krzywej opisującej część rozkładu wartości ekspresji miRNA analizowanych próbek. Rozkłady wartości ekspresji w obrębie wszystkich wartości odczytów dla wszystkich analizowanych próbek zostały przedstawione za pomocą wykresu ramkowego. Na Fig. 3 przedstawiono wizualizację wartości ekspresji typu „asinh-transformed” w postaci wykresu ramkowego dla wartości ekspresji miRNA po normalizacji. Różnice w rozkładach wartości ekspresji próbek zostały skompensowane za pomocą normalizacji, po przeprowadzeniu której rozkłady wartości ekspresji miRNA dla próbek są prawie równe. Dzięki powyższym działaniom, możliwa była bezproblemowa analiza porównawcza poziomów ekspresji miRNA dla wszystkich analizowanych próbek. Wartości korelacji pomiędzy próbkami opisują podo-

bieństwo między próbkami na poziomie ogólnym, gdy brane są pod uwagę wszystkie cechy pomiarowe wszystkich próbek. W kolejnej analizie zastosowano wskaźniki Spearmana, które opisują podobieństwo między próbkami w skali 0–1. Wartość 0 oznacza całkowity brak korelacji pomiędzy próbkami, podczas gdy wartość 1 oznacza idealną korelację między nimi. Na Fig. 4 przedstawiono wykres korelacji próbek wg Spearmana pokazujący poziom korelacji pomiędzy analizowanymi próbkami.

Dodatkowo, dane jakościowe QC poddano kolejnej analizie w celu dalszego sprawdzenia struktury danych. W analizie klastrowania hierarchicznego próbki zostały pogrupowane zgodnie z ich ogólnym podobieństwem, biorąc pod uwagę wszystkie pomiary wszystkich próbek. W tej analizie próbki zostały sklastrowane za pomocą wskaźników euklidesowych. Wyniki analizy skupień wszystkich analizowanych próbek zostały zwizualizowane w postaci dendrogramu, który jest rozgałęzionym wykresem (Fig. 5). Na podstawie dendrogramu zaobserwowano najbardziej podobne próbki (innymi słowy najlepiej korelujące), które można znaleźć w najbliższych sobie rozgałęzieniach.

Relacje pomiędzy próbkami zostały również ocenione za pomocą analizy głównych składników (PCA), która jest techniką klasyfikacji komplementarną do klastrowania. Metoda ta pozwoliła na uporządkowanie próbek według ich podobieństwa. Wyniki analizy PCA zostały zwizualizowane w przestrzeni trójwymiarowej na Fig. 6.

### 5.3. Testowanie statystyczne i filtrowanie danych

Po wszystkich etapach wstępnej obróbki bioinformatycznej danych przeprowadzono testy statystyczne pomiędzy porównywanymi grupami próbek (AC względem SCC), przy założeniu zastosowania próbki referencyjnej stanowiącej opracowaną w sposób ściśle kontrolowany próbkę stanowiącą mieszaninę roztworów RNA wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach, do której były odnoszone wszystkie próbki badane. Wyniki testów statystycznych poddano następnie kolejnym etapom, tzw. filtrowania cząsteczek miRNA o zróżnicowanej ekspresji. Filtrowanie zostało przeprowadzone w oparciu o wartości istotności statystycznej oraz wielkości różnicy w średnich poziomach ekspresji pomiędzy grupami próbek. Krotności zmian ekspresji miRNA oraz skorygowane wartości *p*, które były obliczone za pomocą testów statystycznych, zostały zastosowane jako kryteria filtrowania. Wszystkie pomiary miRNA zostały przefiltrowane w celu identyfikacji tych cząsteczek, które wykazują najsilniejsze dowody na zróżnicowaną ekspresję pomiędzy porównywanymi grupami. Analizę zmian krotności (ang. Fold Change, *FC*) przeprowadzono za pomocą modelowania liniowego przy użyciu pakietu Limma. Wartości *p*, które wykorzystano do etapu filtrowania, stanowiły tzw. zmodyfikowane wartości *p* t-testu lub FDR (spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich). Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w Tabeli 3 oraz przedstawione w postaci wykresów na Figurze 7, 8 i 9.

Tabela 3  
Wykaz wstępnie zidentyfikowanych miRNA wykazujących zróżnicowaną ekspresję pomiędzy grupą AC i SCC.

| <b>miRNA, które ulegają zróżnicowanej ekspresji w AC w porównaniu z SCC</b> |   |
|---|---|
| <b>W AC poziom ekspresji niższy niż w SCC</b>                               | <b>W AC poziom ekspresji wyższy niż w SCC</b> |
| hsa-miR-944   | hsa-miR-3617-5p                               |
| hsa-miR-205-5p  | hsa-miR-4709-5p                               |
| hsa-miR-383-5p  | hsa-miR-1294                                  |
| hsa-miR-3927-3p   | hsa-miR-4636                                  |
| hsa-miR-448   |   |
| hsa-miR-1911-5p   |   |

| <b>miRNA, które ulegają zróżnicowanej ekspresji w AC w porównaniu z SCC</b> |   |
|---|---|
| <b>W AC poziom ekspresji niższy niż w SCC</b>                               | <b>W AC poziom ekspresji wyższy niż w SCC</b> |
| hsa-miR-1224-5p   |   |
| hsa-miR-205-3p  |   |
| hsa-miR-6510-3p   |   |
| hsa-miR-3929  |   |
| hsa-miR-4664-3p   |   |
| hsa-miR-7974  |   |
| hsa-miR-6515-3p   |   |
| hsa-miR-6765-3p   |   |
| hsa-miR-3616-5p   |   |
| hsa-miR-6512-5p   |   |
| hsa-miR-5094  |   |
| hsa-miR-6499-5p   |   |
| hsa-miR-1248  |   |
| hsa-miR-3128  |   |
| hsa-miR-149-3p  |   |
| hsa-miR-6814-5p   |   |
| hsa-miR-1305  |   |
| hsa-miR-597-3p  |   |
| hsa-miR-3609  |   |
| hsa-miR-5579-3p   |   |
| hsa-miR-3200-3p   |   |

#### **5.4. Identyfikacja sygnatury miRNA**

Proces identyfikacji sygnatury miRNA na podstawie danych z sekwencjonowania miRNA składa się z poniższych etapów.

W pierwszym etapie przeprowadzono Różnicową Analizę Abundancji i Regresję LASSO/Elastic-Net. Dane przekształcono logarymicznie i wygenerowano wstępny wykres MDS. Punktem odcięcia dla „istotnego wyniku” („significant hit”) był  $FDR \leq 0,05$ . Poniżej przedstawiono Tabelę 4, w której wymieniono zidentyfikowane miRNA wykazujące zróżnicowaną ekspresję w grupie AC w porównaniu do grupy SCC.

Tabela 4. Panel zidentyfikowanych biomarkerów miRNA wykazujących zróżnicowaną ekspresję pozwalającą na różnicowe diagnozowanie AC względem SCC.

| qlogFC | Średnia wartość ekspresji | t    | Wartość P | Skorygowana wartość P | B      | Nazwa miRNA       | Kierunek ekspresji | zmian |
|--------|---------------------------|------|-----------|-----------------------|--------|-------------------|--------------------|-------|
| 1,29   | 4,84                      | 4,57 | 4,55e-05  | 0,0051                | 1,73   | hsa_miR_326       | w górę             |       |
| 1,14   | 7,40                      | 4,49 | 5,89e-05  | 0,0055                | 1,48   | hsa_miR_450a_5p   | w górę             |       |
| 1,33   | 2,04                      | 4,40 | 7,70e-05  | 0,0057                | 1,23   | hsa_miR_1287_5p   | w górę             |       |
| 1,83   | 1,47                      | 4,36 | 8,73e-05  | 0,0057                | 1,11   | hsa_miR_556_5p    | w górę             |       |
| 1,26   | 6,56                      | 4,19 | 0,00015   | 0,0081                | 0,59   | hsa_miR_542_3p    | w górę             |       |
| 1,01   | 10,95                     | 4,17 | 0,000158  | 0,0081                | 0,54   | hsa_miR_30b_5p    | w górę             |       |
| 1,08   | 0,036                     | 4,00 | 0,000265  | 0,0124                | 0,045  | hsa_miR_4728_3p   | w górę             |       |
| 1,24   | 1,07                      | 3,95 | 0,0003    | 0,0131                | -0,082 | hsa_miR_450a_1_3p | w górę             |       |

|       |       |       |          |          |       |                 |        |
|-------|-------|-------|----------|----------|-------|-----------------|--------|
| 2,61  | 9,06  | 3,57  | 0,00093  | 0,0314   | -1,15 | hsa_miR_375     | w górę |
| 1,89  | 2,22  | 3,57  | 0,000947 | 0,0314   | -1,16 | hsa_miR_147b    | w górę |
| 1,14  | 2,00  | 3,47  | 0,0012   | 0,0378   | -1,42 | hsa_miR_7705    | w górę |
| 1,51  | 2,52  | 3,46  | 0,00127  | 0,0378   | -1,44 | hsa_miR_653_3p  | w górę |
| -5,49 | 3,80  | -9,72 | 3,81e-12 | 1,61e-09 | 17,59 | hsa_miR_944     | w dół  |
| -6,19 | 10,90 | -9,59 | 5,72e-12 | 1,61e-09 | 17,20 | hsa_miR_205_5p  | w dół  |
| -5,60 | 0,3   | -8,37 | 2,30e-10 | 4,33e-08 | 13,60 | hsa_miR_205_3p  | w dół  |
| -2,29 | 6,45  | -5,18 | 6,41e-06 | 0,0009   | 3,63  | hsa_miR_149_5p  | w dół  |
| -3,34 | 1,42  | -4,35 | 9,06e-05 | 0,0057   | 1,07  | hsa_miR_6510_3p | w dół  |

Wyniki regresji LASSO dotyczące danych testowych i walidacji krzyżowej przedstawiono na Figurze 10 i 11.

W celu wizualizacji zidentyfikowanej sygnatury miRNA, różnicującej raki gruczołowe i płaskonabłonkowe płuca, wykreślono odpowiednią heatmapę pokazującą sygnaturę ekspresyjną miRNA do stratyfikacji AC i SCC (Fig. 12).

### 5.5. Ocena przydatności diagnostycznej zidentyfikowanej sygnatury miRNA

Ocena przydatności diagnostycznej zidentyfikowanej sygnatury miRNA została przeprowadzona poprzez wygenerowanie krzywej ROC. Krzywa została wykreślona na podstawie prawdziwie dodatniej wartości (TPR) względem fałszywie dodatniej wartości (FPR) przy różnych ustawieniach progowych. Do wygenerowania krzywej ROC wykorzystano pakiet MetaseqR Biocundoctur. Narzędzie pozwoliło na wygenerowanie krzywej ROC przy użyciu matrycy wartości p dla wyników analizy zróżnicowanej ekspresji miRNA z poprzedniej analizy z podaniem wektora opartego na bezpośredniej obserwacji dla zróżnicowanej ekspresji i poziomu istotności. Fig. 13 przedstawia analizę krzywej ROC dla zidentyfikowanej sygnatury miRNA, różnicującej raki gruczołowe i płaskonabłonkowe płuca.

### 6. Wnioski

Na podstawie uzyskanych danych z powyższych analiz można stwierdzić, że zidentyfikowana sygnatura ekspresyjna miRNA jest precyzyjnym narzędziem do różnicowania dwóch głównych podtypów histopatologicznych NSCLC. Sygnatura miRnomowa stanowi doskonały model diagnostyczny do stratyfikacji raków gruczołowych i płaskonabłonkowych w kontekście procedury kwalifikacji pacjentów do terapii spersonalizowanych.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca (AC) względem raka płaskonabłonkowego płuca (SCC) u osobnika, **znamienny tym**, że:
  - a) w próbce od osobnika oznacza się ilościowo poziom ekspresji dla diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p, i
  - b) identyfikuje się sygnaturę miRNA osobnika poprzez porównanie ilościowe poziomu ekspresji oznaczonego dla panelu biomarkerów w próbce od osobnika według a) z ekspresją panelu biomarkerów w próbce referencyjnej stanowiącej mieszaninę RNA wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach;  
przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p wyższy niż we wspomianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p niższy niż we wspomianej próbce referencyjnej wskazują, że osobnik cierpi na raka gruczołowego płuca, a nie na raka płaskonabłonkowego płuca.
2. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca (SCC) względem raka gruczołowego płuca (AC) u osobnika, **znamienny tym**, że:
  - a) w próbce od osobnika oznacza się ilościowo poziom ekspresji dla diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p, i
  - b) identyfikuje się sygnaturę miRNA osobnika poprzez porównanie ilościowe poziomu ekspresji oznaczonego dla panelu biomarkerów w próbce od osobnika według a) z ekspresją panelu biomarkerów w próbce referencyjnej stanowiącej mieszaninę RNA wyizolowanych z guzów AC i guzów SCC w równych ilościach;

- przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p niższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p wyższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej wskazują, że osobnik cierpi na raka płaskonabłonkowego płuca, a nie na raka gruczołowego płuca.
3. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według zastrzeżenia 1 albo 2, **znamienny tym**, że jako próbkę od osobnika stosuje się próbkę wybraną z grupy obejmującej świeżą mrożoną tkankę pobraną od pacjenta i tkankę utrwaloną w formalinie i zabezpieczoną parafiną.
  4. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według zastrzeżenia 3, **znamienny tym**, że próbkę stanowi świeża mrożona próbka tkanki guza nowotworowego płuca.
  5. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według zastrzeżenia 3, **znamienny tym**, że próbkę stanowi próbka tkanki guza nowotworowego płuca utrwalona w formalinie i zabezpieczona parafiną.
  6. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według jednego z zastrzeżeń 1 do 5, **znamienny tym**, że osobnikiem jest człowiek.
  7. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według jednego z zastrzeżeń 1 do 6, **znamienny tym**, że poziom ekspresji panelu biomarkerów miRNA oznacza się metodą wybraną spośród sekwencjonowania nowej generacji, hybrydyzacji, RT-PCR lub mikromacierzy.
  8. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według zastrzeżenia 7, **znamienny tym**, że poziom ekspresji panelu biomarkerów miRNA oznacza się metodą sekwencjonowania nowej generacji.
  9. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według jednego z zastrzeżeń 1 do 8, **znamienny tym**, że identyfikację sygnatury miRNA przeprowadza się metodami statystycznymi lub bioinformatycznymi.
  10. Sposób różnicowego diagnozowania *in vitro* według zastrzeżenia 9, **znamienny tym**, że identyfikację sygnatury miRNA przeprowadza się metodami bioinformatycznymi, w szczególności poprzez normalizację danych, transformację i kontrolę dystrybucji, analizę różnicową abundancji i regresję typu LASSO/elastycznej sieci oraz korelację abundancji.
  11. Diagnostyczny panel biomarkerów miRNA składający się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p.
  12. Zastosowanie panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca u osobnika, przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p wyższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p niższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej wskazują łącznie, że osobnik cierpi na raka gruczołowego płuca.
  13. Zastosowanie panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca u osobnika, przy czym poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p,

hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p niższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej oraz poziom ekspresji biomarkerów obejmujących hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p wyższy niż we wspomnianej próbce referencyjnej wskazują łącznie, że osobnik cierpi na raka płaskonabłonkowego płuca.

14. Zastosowanie panelu biomarkerów miRNA jak zdefiniowano w zastrzeżeniu 11 do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca.
15. Zastosowanie panelu biomarkerów miRNA jak zdefiniowano w zastrzeżeniu 11 do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca.
16. Zestaw do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca względem raka płaskonabłonkowego płuca, **znamienny tym**, że zawiera środki do ilościowego oznaczania poziomu ekspresji diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p metodą sekwencjonowania następnej generacji oraz instrukcję do przeprowadzenia sposobu różnicowego diagnozowania *in vitro* raka gruczołowego płuca jak zdefiniowano w jednym z zastrzeżeń 1 i 3 do 10.
17. Zestaw do różnicowego diagnozowania *in vitro* raka płaskonabłonkowego płuca względem raka gruczołowego płuca, **znamienny tym**, że zawiera środki do ilościowego oznaczania poziomu ekspresji diagnostycznego panelu biomarkerów miRNA składającego się z następujących miRNA: hsa\_miR\_326, hsa\_miR\_450a\_5p, hsa\_miR\_1287\_5p, hsa\_miR\_556\_5p, hsa\_miR\_542\_3p, hsa\_miR\_30b\_5p, hsa\_miR\_4728\_3p, hsa\_miR\_450a\_1\_3p, hsa\_miR\_375, hsa\_miR\_147b, hsa\_miR\_7705, hsa\_miR\_653\_3p, hsa\_miR\_944, hsa\_miR\_205\_5p, hsa\_miR\_205\_3p, hsa\_miR\_149\_5p i hsa\_miR\_6510\_3p metodą sekwencjonowania następnej generacji oraz instrukcję do przeprowadzenia sposobu różnicowego diagnozowania *in vitro* raka jak zdefiniowano w jednym z zastrzeżeń 2 do 10.

# Rysunki

Fig. 1

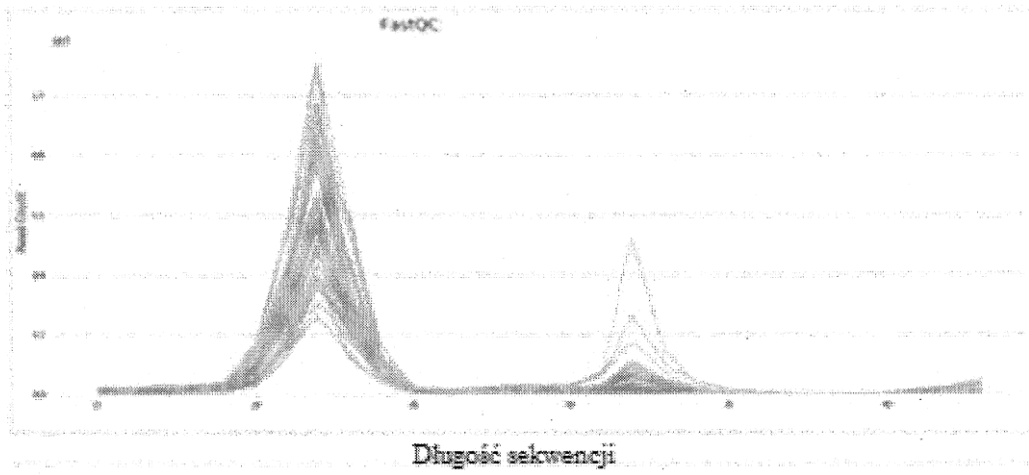


Fig. 2

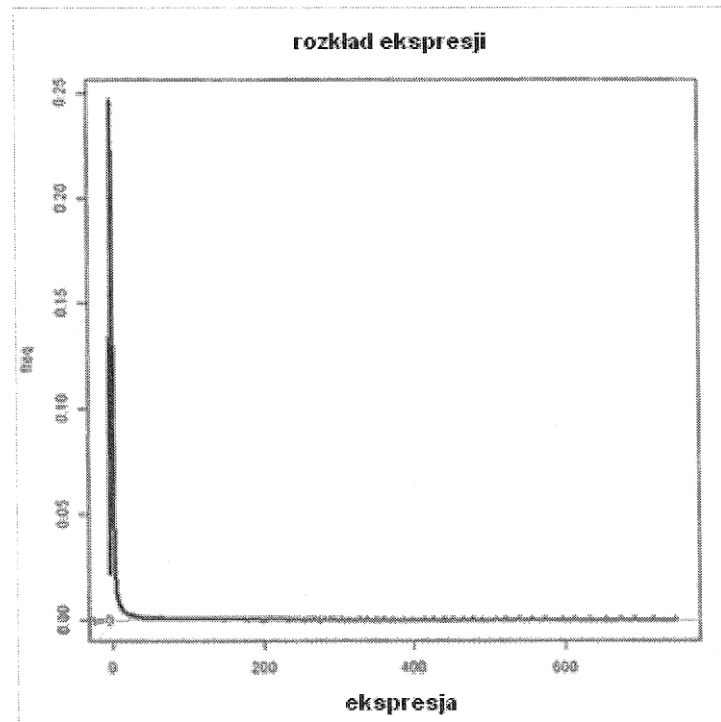


Fig. 3

Wykres danych po normalizacji

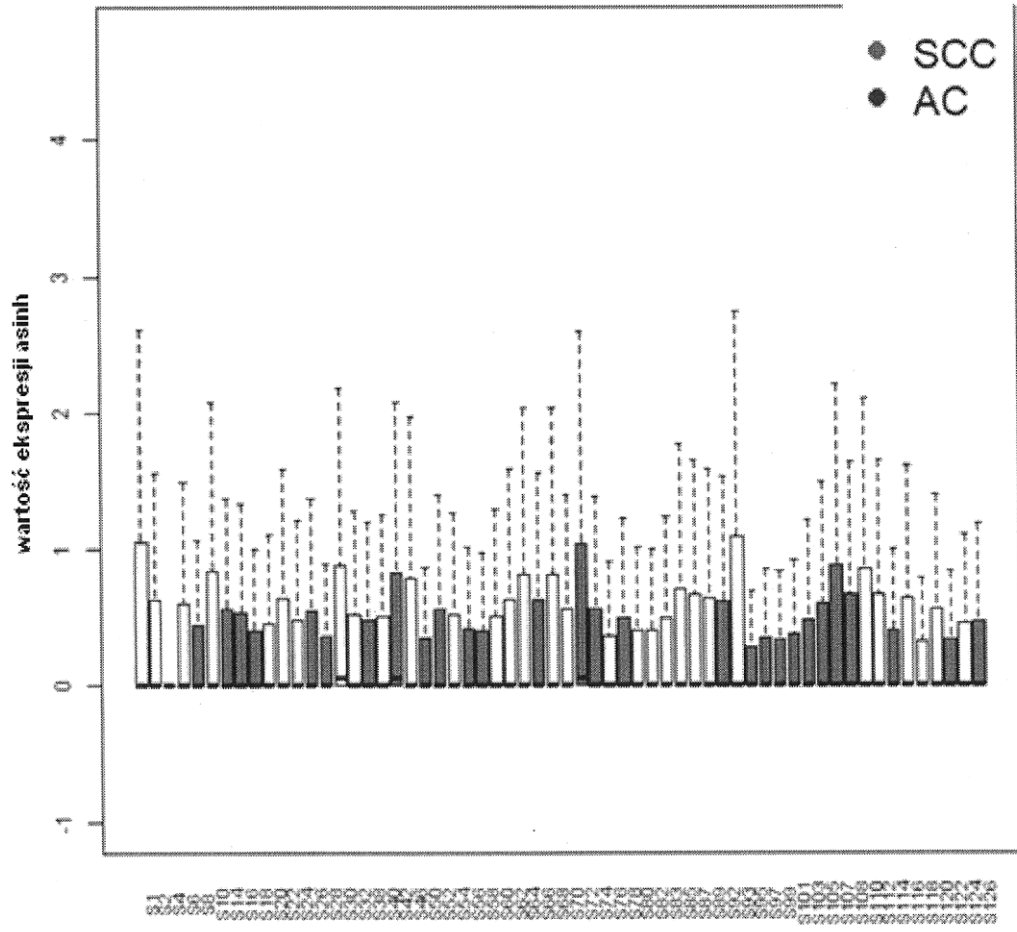


Fig. 4

matryca korelacji, kor:0.659 - 0.844

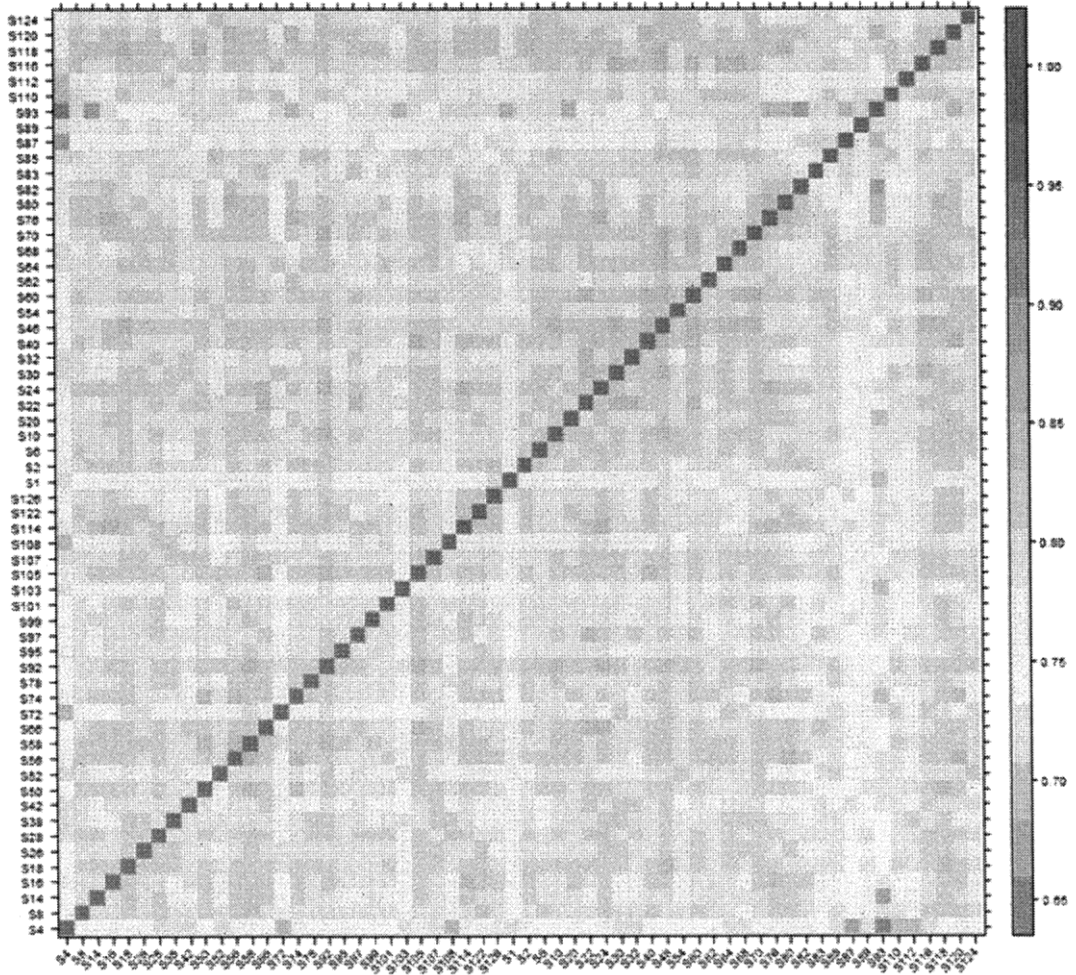


Fig. 5

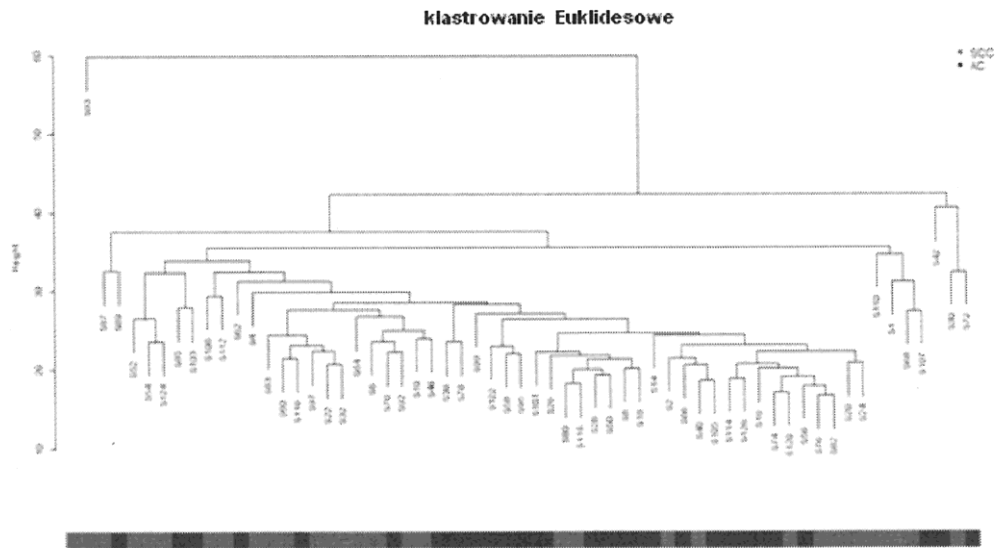


Fig. 6

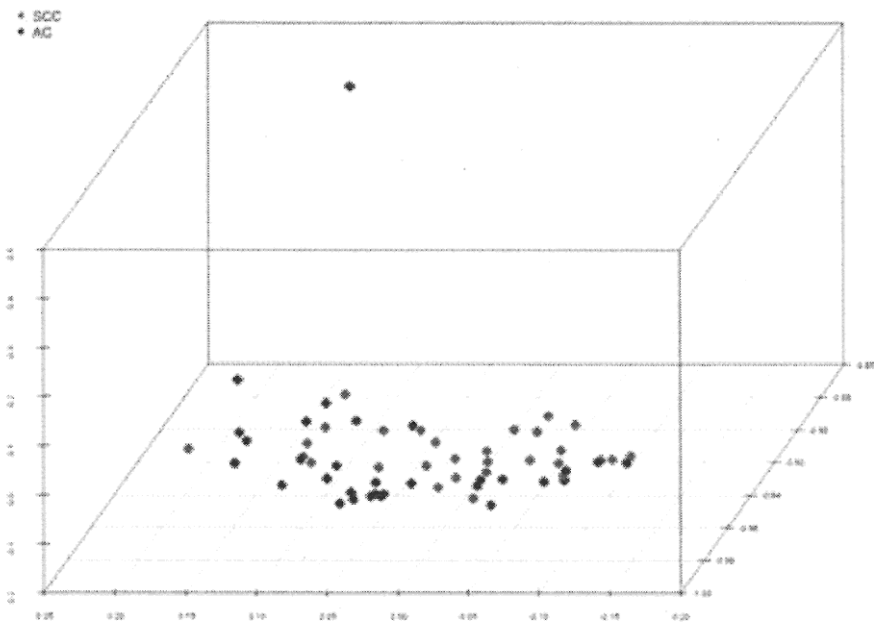


Fig. 7

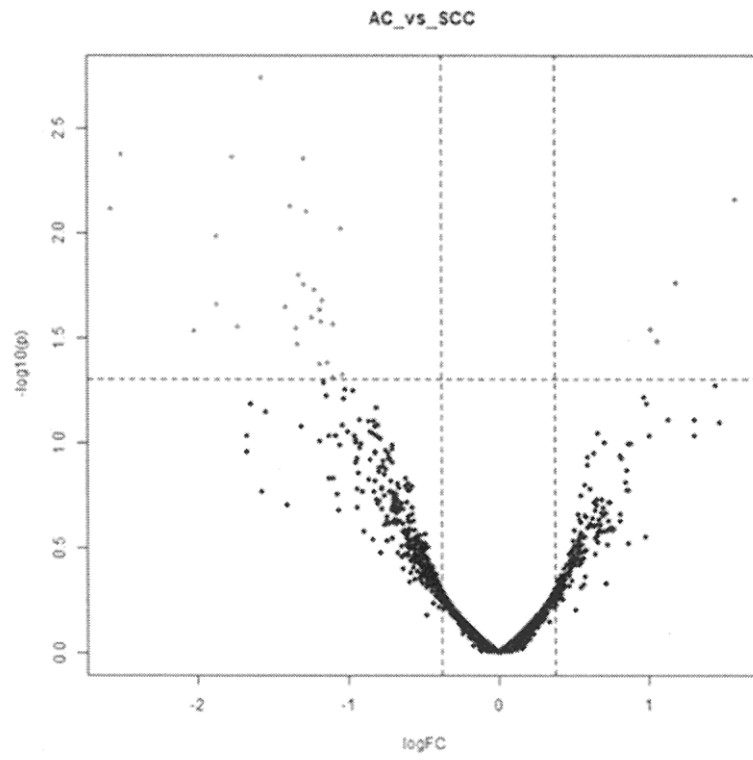


Fig. 8

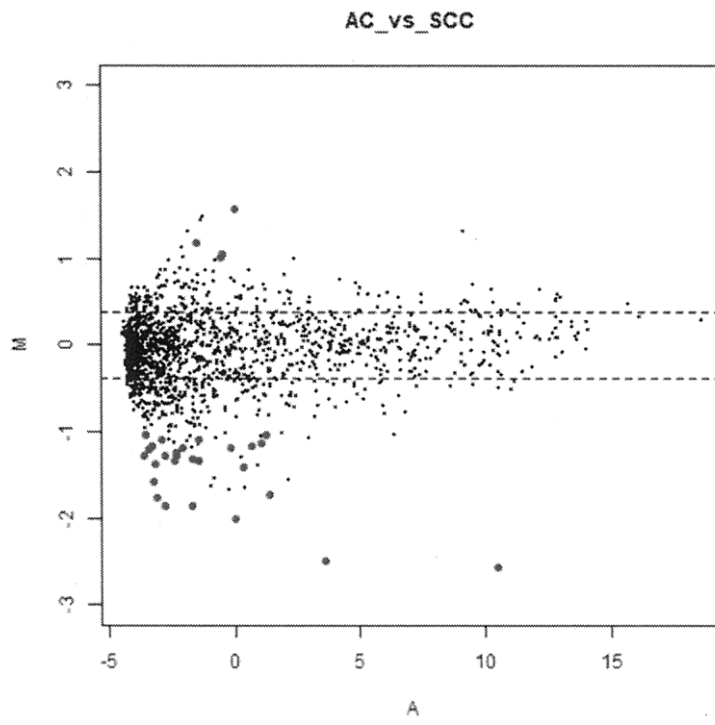


Fig. 9

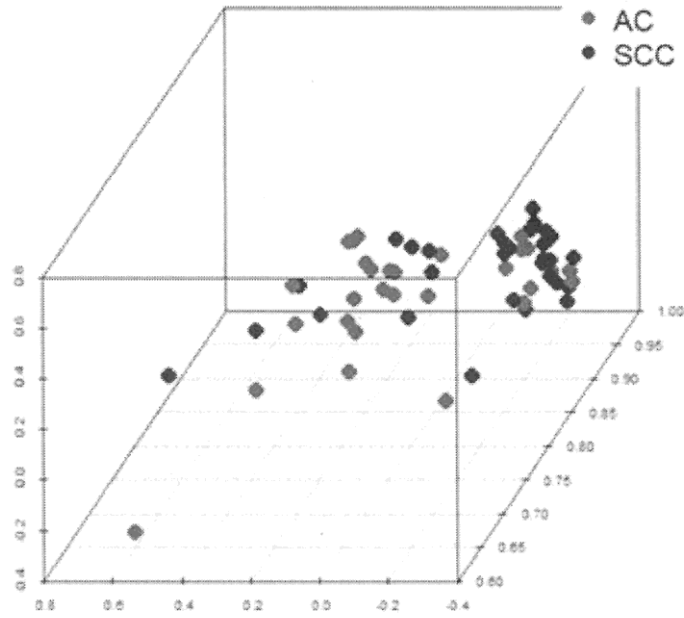


Fig. 10

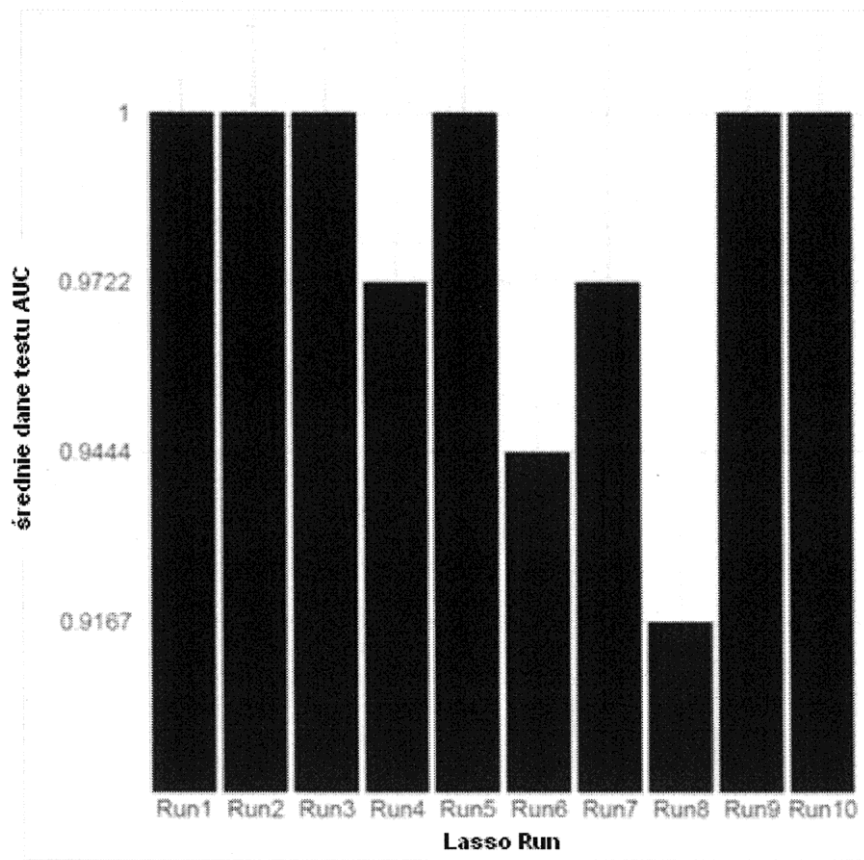


Fig. 11

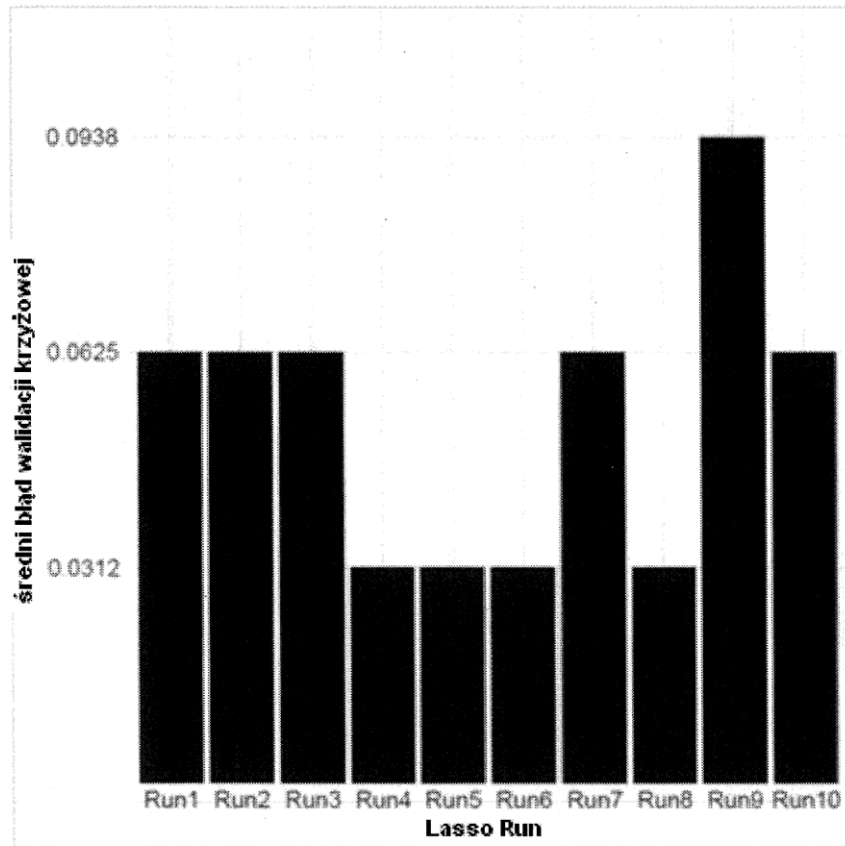


Fig. 12

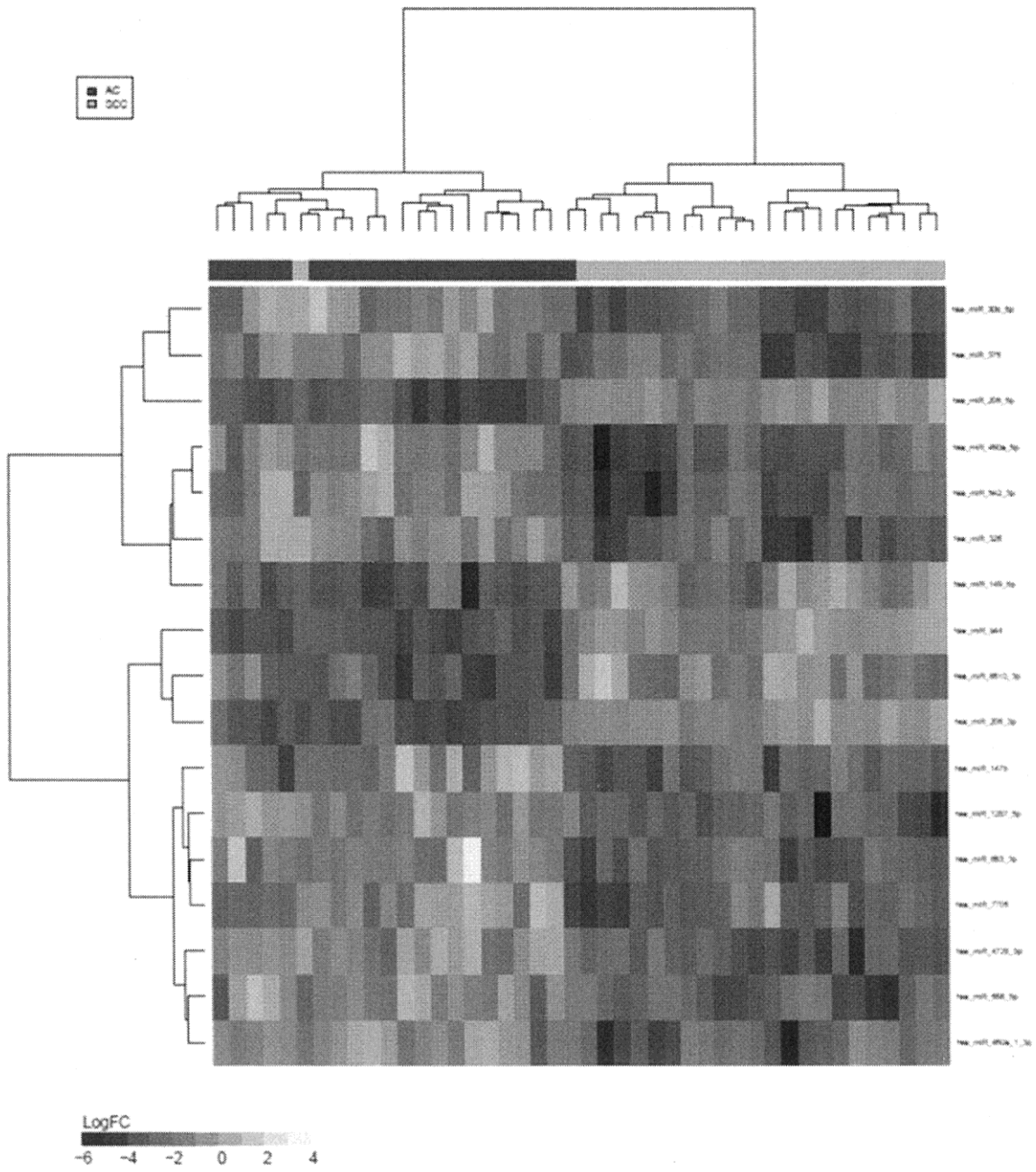


Fig. 13

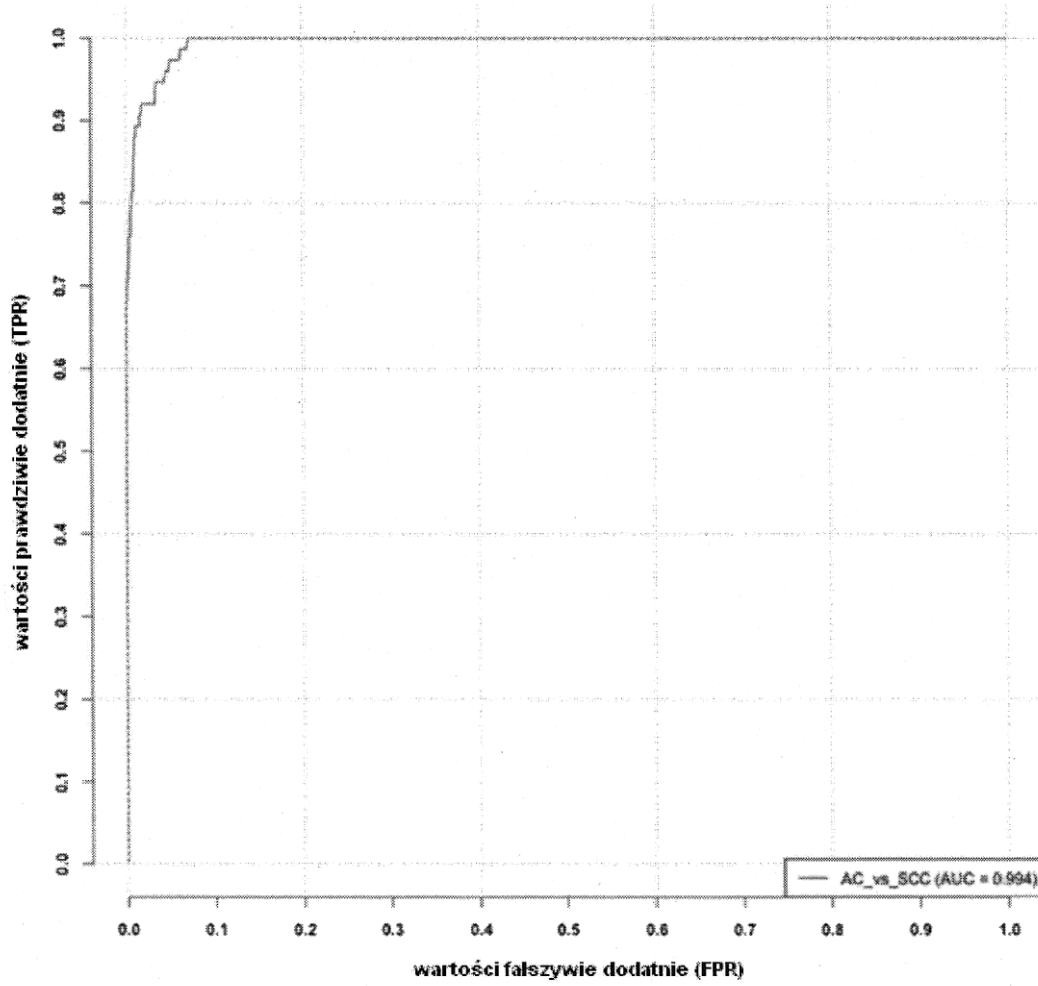


Fig. 14

