

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240134**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423375**

(51) Int.Cl.
G01N 33/84 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **07.11.2017**

(54) **Sposób wykrywania zmniejszonego ryzyka raków u kobiet z mutacją w genie BRCA1**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
20.05.2019 BUP 11/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
21.02.2022 WUP 08/22

(73) Uprawniony z patentu:
READ-GENE SPÓŁKA AKCYJNA, Szczecin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL
RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL
JAN LUBIŃSKI, Szczecin, PL
MAGDALENA MUSZYŃSKA, Szczecin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Rafał Witek

PL 240134 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania zmniejszonego ryzyka raków u kobiet z mutacją w genie *BRCA1* poprzez ocenę wieku, stanu hormonalnego oraz stężenia arsenu we krwi.

U nosicielek mutacji *BRCA1* ryzyko zachorowania w ciągu życia na raka piersi wynosi około 60%, a na raka jajnika około 25% (Lubiński i wsp. 2016).

ARSEN

Bez wątpienia arsen i jego związki są jednymi z najbardziej rozpoznawalnych trucizn. Według klasyfikacji międzynarodowej agencji do badań nad rakiem (IARC, ang. International Agency for Cancer Research) arsen i jego związki zostały określone jako bezwzględne ludzkie karcynogeny – grupa 1 (http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php). Różnorodność objawów klinicznych wywołanych inhalacją związkami arsenu lub jego spożyciem jest bardzo duża.

W zależności od stężenia, czasu ekspozycji i drogi zaabsorbowania skutki oddziaływania arsenu z tkankami są od stosunkowo niegroźnych na przykład hipopigmentacji, po zagrażające życiu nowotwory (WHO). W świetle istniejących danych literaturowych można stwierdzić, że wysokie stężenia arsenu mogą być przyczyną takich raków jak rak płuca (Mostafa i wsp., 2008), nerki (Hopenhayn-Rich i wsp., 1996), skóry (Karagas i wsp., 2001), pęcherza (Mostafa i wsp., 2008), czy trzustki (Liu Mares i wsp., 2013).

Istnieją też prace wskazujące odwrotną korelację – np. Lamm i wsp. stwierdzili nieistotne zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego wraz z rosnącym narażeniem na arsen w wodzie pitnej, w zakresie 3,0–6,0 µg/l (Lamm i wsp., 2004).

Celem wynalazku jest dostarczenie testu diagnostycznego, który pozwalałby na zróżnicowanie grupy nosicielek mutacji w genie *BRCA1*, a zwłaszcza wyodrębnienie grupy pacjentek, u których ryzyko zachorowania na raka jest wyjątkowo wysokie, nawet w porównaniu z innymi nosicielkami mutacji w genie *BRCA1*. Kolejnym celem wynalazku jest dostarczenie testu diagnostycznego, który pozwalałby na wyodrębnienie podgrupy pacjentek, u których ryzyko zachorowania na raka jest względnie niskie, w porównaniu z innymi nosicielkami mutacji genu *BRCA1*.

W związku z brakiem badań wiążących stężenie arsenu we krwi z ryzykiem raków w populacji polskich kobiet z mutacją w genie *BRCA1*, postanowiono ocenić korelację stężenia arsenu we krwi pełnej z ryzykiem raków u w/w kobiet. Nieoczekiwanie ustalono, że istnieje korelacja między stężeniem arsenu we krwi pełnej a ryzykiem raków u kobiet będących nosicielkami mutacji w genie *BRCA1* w zależności od wieku oraz stosowania hormonalnej antykoncepcji. W szczególności stwierdzono, że istnieją zakresy stężeń arsenu we krwi wiążące się z istotnie zmniejszonym oraz z tendencją do znacznie obniżonego ryzyka wystąpienia nowotworów złośliwych u w/w kobiet w zależności od wieku (poniżej oraz powyżej 50 roku życia) oraz stanu hormonalnego.

Przedmiotem wynalazku jest sposób określenia ryzyka raka u kobiety z mutacją w genie *BRCA1* charakteryzujący się tym, że obejmuje ustalenie wieku pacjentki, stanu hormonalnego oraz ilościową ocenę stężenia arsenu we krwi pełnej w próbce pobranej od tej pacjentki, przy czym:

- A. u kobiety z mutacją w genie *BRCA1* niezależnie od wieku, która stosowała antykoncepcję hormonalną dłużej niż 1 rok stwierdza się znacząco obniżone ryzyko rozwoju raków w przypadku występowania wysokiego stężenia arsenu we krwi, zwłaszcza > 1,31 µg/l.
- B. u kobiety z mutacją w genie *BRCA1* przed 50 roku życia, która nigdy nie stosowała antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok stwierdza się znacząco obniżone ryzyko rozwoju raków w przypadku występowania niskiego stężenia arsenu we krwi, zwłaszcza < 0,85 µg/l.

Korzystnie, materiał biologiczny do oceny stężenia arsenu u osoby badanej jest pobierany z tkanki lub wydzieliny, korzystnie z krwi, moczu, włosów lub paznokci.

Korzystnie, że poziom arsenu u osoby badanej jest oznaczany przez bezpośredni pomiar stężenia w badanej próbce lub pośrednio przez ocenę poziomu metabolitu lub innego metabolitu lub produktu genowego takiego jak białko lub RNA, którego stężenie jest skorelowane ze stężeniem arsenu.

Poniżej omówiono wyniki badań, które doprowadziły do uzyskania wynalazku oraz przykład realizacji sposobu według wynalazku.

PROTOKÓŁ BADAŃ

Materiał

Grupa badana została wybrana spośród osób, których materiał znajduje się w biobanku naszego ośrodka. Pacjentki, które zgłosili się w latach 2010–2016 do Onkologicznej Poradni Genetycznej przy Szpitalu Klinicznym Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie zapraszano do oddania

próbki krwi w celu biobankowania i podpisywały zgodę na przechowywanie i wykorzystywanie materiału w celach naukowych. Próbki krwi były pobierane w godzinach 8–14, a pacjentki poinformowane były o konieczności bycia na czczo przez co najmniej 4 godziny przed pobraniem. Dla większości pacjentek próbka była pobrana tylko raz, ale w niektórych przypadkach również więcej razy przy okazji kolejnych wizyt. Próbkę krwi przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonania oznaczeń stężenia arsenu.

Grupa badana liczyła 575 osób, u których oznaczono stężenie arsenu we krwi pełnej a następnie poddano obserwacji przez średnio 38 miesięcy (zakres 12–78). Po upływie tego czasu powstała kohorta prospektywną poddano analizie pod względem częstości zachorowania nowotwory złośliwe. Spośród grupy 575 wyjściowo zdrowych osób, po okresie obserwacji wyłoniono 35 kobiet z rakiem o różnej lokalizacji narządowej (rak piersi i/lub jajnika: 33, otrzewnej: 1, oraz szyjki macicy: 1). Charakterystykę obu grup przedstawiono w Tabeli 1.

T a b e l a 1. Charakterystyka grupy badanych kobiet

Sędnia	Chorzy	Zdrowi
Wiek (zakres)	43,66 lat (24-68)	39,42 lat (18-86)
Stężenie arsenu (zakres)	1,27 $\mu\text{g/l}$ (0,55-3,82)	1,40 $\mu\text{g/l}$ (0,26-9,44)
Wykonany zabieg adneksktomii	6 osób (17,14%)	142 osób (26,30%)
Stosowana hormonalna antykoncepcja	11 osób (31,42%)	231 osób (42,78%)
Stosowana hormonalna terapia zastępcza	5 osób (14,29%)	108 osób (20,00%)

Materiał

Od każdej osoby włączonej do badania pobrano próbkę krwi do pomiaru stężenia arsenu.

Metoda oznaczenia arsenu we krwi pełnej

Aparat

Do określenia zawartości arsenu we krwi wykorzystana została technika spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej. Do wykonania pomiaru wykorzystano spektrometr mas ELAN DRC-e (PerkinElmer). Wykorzystanie ICP-MS pozwala uzyskać limity detekcji $< 0,1 \mu\text{g/l}$. Podczas prowadzenia oznaczeń populacji nieekspozowanej zawodowo na metale i ich związki, czułość aparatury odgrywa kluczową rolę w trakcie prowadzenia analiz.

Przygotowanie do pomiaru

Zebrane próbki krwi zostały rozmrożone z temperatury -80°C do temperatury pokojowej w dniu wykonywania analiz, bezpośrednio przed pomiarem. Każda próbka została dokładnie wymieszana przy użyciu wstrząsarki w celu uzyskania jak największej homogenności materiału. Proces ten został powtórzony bezpośrednio przed pobraniem objętości krwi do rozcieńczeń, z uwagi na rozdzielanie się elementów morfotycznych krwi.

Próbki krwi zostały rozcieńczone w stosunku 1:30 [50 μl krwi: 1450 μl buforu]. Z uwagi na specyfikę pomiaru, do rozcieńczeń zastosowano roztwór wodorotlenku tetrametyloamonowego (TMAH). pH zasadowe zapewnia dobrą rozpuszczalność składników krwi, nie powodując tym samym precypitacji żadnej z frakcji. Dodatkowo, w celu lepszego rozproszenia rozpuszczonych składników krwi, zastosowano dodatek niejonowego surfaktantu – Trytonu X-100. Wykorzystanie tego związku nie tylko ułatwia rozpuszczanie m.in. białek, ale także przyczynia się do szybszego wypłukiwania próbki z układu wprowadzenia spektrometru.

Do korekcji efektu matrycy oraz dryfu aparatu użyte zostały standardy wewnętrzne – rod (^{105}Rh) i iryd (^{197}Ir). Dla uzyskania stabilności jonów metali rozpuszczonych w roztworze zastosowany został dodatek kwasu wersenowego (EDTA). Dodatkowo, z uwagi na organiczny charakter próbki, do wszystkich roztworów dodano butanolu w celu pozbycia się negatywnego efektu związanego ze znaczną ilością węgla w badanej próbce.

Warunki pomiaru

Wszystkie oznaczenia we krwi przeprowadzono z wykorzystaniem kwadrupolowej komory reakcyjnej spektrometru, w tzw. trybie DRC (ang. Dynamie Reaction Cell) aparatu Elan DRC-e (PerkinElmer)

z tlenem jako gazem reakcyjnym. Tlen jest gazem z wyboru dla prowadzenia oznaczeń As. Wykorzystanie tlenu pozwala uzyskać na drodze reakcji chemicznej stabilnego produktu w postaci jonu $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$. Jon ten posiada masę 91, która wolna jest od interferencji spektralnych. Rozwiązanie to zapewnia osiągnięcie maksimum specyfiki pomiaru As.

Walidacja pomiarów

Do walidacji pomiarów zastosowano materiał referencyjny ClinCheck (Recipe, Niemcy), oraz materiały odniesienia: NIST 955c (National Institute of Standards and Technology, Stany Zjednoczone). Są to materiały powszechnie stosowane w spektrometrii, pozwalające na potwierdzenie czułości i specyfiki pomiaru.

Statystyka

Różnice w częstościach pomiędzy analizowanymi grupami oceniano przy pomocy testu zgodności Fishera. Za wyniki istotne statystycznie uznano te, dla których wartości p było mniejsze niż 0,05 ($p < 0,05$).

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała istotną zależność między ryzykiem raków u kobiet z mutacją w genie *BRCA1* a stężeniem arsenu we krwi pełnej.

Kobiety z mutacją w genie *BRCA1*, po stosowaniu antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok ze stężeniem arsenu we krwi $> 1,31 \mu\text{g/l}$ wykazują istotne ponad 21 krotnie zmniejszone ryzyko rozwoju raka niż pozostałe kobiety z w/w mutacją. (OR = 0,04741, $p = 0,0011$, 95% CI: 0,002759–0,8147) [Tabela 2].

T a b e l a 2. Częstość występowania nowotworów w zależności od stężenia arsenu we krwi u kobiet z mutacją w genie *BRCA1*, po stosowaniu antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok.

Grupa	Stężenie As [$\mu\text{g/l}$]	Chorzy	Zdrowi
I	$>1,31$	0	110
II	$<1,31$	11	120

Kobiety z mutacją w genie *BRCA1* przed 50 rokiem życia, po stosowaniu antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok ze stężeniem arsenu we krwi $>1,31 \mu\text{g/l}$ wykazują istotne ponad 18 krotnie zmniejszone ryzyko rozwoju raka niż pozostałe kobiety z w/w mutacją. (OR=0,05526, $p=0,0027$, 95%CI: 0,003193-0,9564) [Tabela 3].

T a b e l a 3. Częstość występowania nowotworów w zależności od stężenia arsenu we krwi u kobiet z mutacją w genie *BRCA1* przed 50 rokiem życia, po stosowaniu antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok.

Grupa	Stężenie As [$\mu\text{g/l}$]	Chorzy	Zdrowi
I	$>1,31$	0	93
II	$<1,31$	10	108

Kobiety z mutacją w genie *BRCA1* przed 50 rokiem życia, które nie stosowały antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok ze stężeniem arsenu we krwi $< 0,85 \mu\text{g/l}$ wykazują istotne ponad 6 krotnie zmniejszone ryzyko rozwoju raka niż pozostałe kobiety z w/w mutacją. (OR=0,15, $p=0,0391$, 95%CI: 0,01914-1,175) [Tabela 4].

T a b e l a 4. Częstość występowania nowotworów w zależności od stężenia arsenu we krwi u kobiet z mutacją w genie *BRCA1* przed 50 rokiem życia, które nie stosowały antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok.

Grupa	Stężenie As [$\mu\text{g/l}$]	Chorzy	Zdrowi
I	$<0,85$	1	80
II	$>0,85$	12	144

Literatura

1. Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L., Fuchs A., Begoglio R., Tello E.E., Nicolli EL, Smith A.H.: Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in argentina. *Epidemiology* (1996); 7(2), s. 117–124.
2. http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php. dostęp: 2017-10-11
3. Karagas M.R., Stukel T.A., Morris J.S., Tosteson T.D., Wei J.E., Spencer S.K., Greenberg E.R.: Skin cancer risk in relation to toenail arsenic concentration in a US population-based case-control study. *Am. J. Epidemiol.* (2001); 153(6), s. 559–565.
4. Lamm S.H., Engel A., Kruse M.B., Feinleib M., Byrd D.M., Lai S., Wilson R.: Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: an analysis based on 133 U.S. counties and 30 years of observation. *J. Occup. Environ. Med.* (2004); 46, s. 298–306.
5. Liu Mares W., Mackinnon J.A., Sherman R., Fleming L.E., Rocha-Lima C., Hu J.J., Lee D.J.: Pancreatic cancer clusters and arsenic-contaminated drinking water wells in Florida. *BMC Cancer* (2013); 13, s. 111.
6. Monografia pod redakcją Jana Lubińskiego *Genetyka Kliniczna Nowotworów* (2015); ISBN 978-83-61350-95-8.
7. Mostafa M.G., McDonald J.C., Cherry N.M.: Lung cancer and exposure to arsenic in rural Bangladesh. *Occup. Environ. Med.* (2008); 65(11), s. 765–768.
8. World Health Organization: Arsenic. *Environmental Health Criteria*, (1981); 18, Geneva

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka raka u kobiety z mutacją w genie *BRCA1*, **znamienny tym**, że obejmuje ustalenie wieku pacjentki, stanu hormonalnego oraz ilościową ocenę stężenia arsenu we krwi pełnej w próbce pobranej od tej pacjentki, przy czym:
 - A. u kobiety z mutacją w genie *BRCA1* niezależnie od wieku, która stosowała antykoncepcję hormonalną dłużej niż 1 rok stwierdza się znacząco obniżone ryzyko rozwoju raków w przypadku występowania wysokiego stężenia arsenu we krwi, zwłaszcza > **1,31 µg/l**.
 - B. u kobiety z mutacją w genie *BRCA1* przed 50 roku życia, która nigdy nie stosowała antykoncepcji hormonalnej dłużej niż 1 rok stwierdza się znacząco obniżone ryzyko rozwoju raków w przypadku występowania niskiego stężenia arsenu we krwi, zwłaszcza < **0,85 µg/l**.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że materiał biologiczny do oceny stężenia arsenu u osoby badanej jest pobierany z krwi.