



HU000230680B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **230 680**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

- (21) A bejelentés ügyszáma: **P 12 00607** (51) Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)
(22) A bejelentés napja: **2012. 10. 19.** **G01N 33/53** (2006.01)
G06F 7/20 (2006.01)
(40) A közzététel napja: **2014. 04. 28.** **G06F 17/30** (2006.01)
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2017. 08. 28.**

(72) Feltaláló(k): dr. Nagy László 20%, Debrecen (HU) Mesko Bertalan 20%, Kisvárdai (HU) Steiner László 20%, Debrecen (HU) dr. Zahuczky Gábor 20%, Bocskai kert (HU) dr. Holló Zsolt 20%, Kerepes (HU)	(73) Jogosult(ak): Egis Gyógyszergyár Nyilvánosan Működő Részvénytársaság, Budapest (HU)
--	--

(54) **Diagnosztikai eljárás**

(57) Kivonat

Diagnosztikai eljárásokat ismertetünk, amely in vitro eljárások arra szolgálnak, hogy előre jelezzék, hogy egy páciens reagál-e TNF α inhibitorral történő kezelésre. Az ismertetett gének expressziós szintjének meghatározása révén eldönthető, hogy várhatóan hatásos lesz-e egy TNF α inhibitorral végzett kezelés

DIAGNOSZTIKAI ELJÁRÁS

A találmány területe

A találmány a diagnosztikai eljárások területére esik. Új, *in vitro* eljárásokat ismertettünk TNF α inhibitorral történő kezelés hatékonyságának előrejelzésére.

5 A technika állása

A tumor nekrozis faktor hozzájárul a gyulladásos válaszreakció kialakulásához, ami számos autoimmun betegség, úgymint reumatoid artritisz (RA), spondylitis ankylopoetica, Crohn-betegség, pikkelysömör, hydradenitis suppurativa és súlyos asztma tüneteinek okozója. Ezeket a betegségeket olykor TNF inhibitorral kezelik.

10 A reumatoid artritisz (RA) a krónikus gyulladással járó, szisztémás autoimmun betegségek közé sorolható, ami számos szervet és szövetet érinthet, de jellemzően az ízületeket támadja. RA egy fájdalmas, gyakran mozgás-korlátozottsággal járó betegség, ami idővel a mozgásképeség teljes elvesztésével járhat. A Crohn-betegség a gyulladásos bélbetegségek (Inflammatory Bowel Disease, IBD) közé tartozik, ami a szájtól a végbélnyílásig, az
15 emésztőszervrendszer bármely részét érintheti és tünetek egész sorát okozhatja. A tünetei elsősorban az alhasi fájdalom, hasmenés, hányás vagy fogyás, de okozhat emésztőszervrendszeren kívüli tüneteket is.

A fenti betegségek kezelésére jelenleg rendelkezésre álló módszerek minden beteg esetében azonosak. Ennek eredményeként az ismert kezelések alkalmazásával néhány beteg több
20 alkalommal eredménytelen kezelésben részesül, mielőtt a számára hatékony gyógymódot megtalálnák. A TNF alfával összefüggésbe hozható betegségek (pl. RA, IBD) hatékonyabb kezelése és az eredményes gyógymód azonosítása érdekében szükség van tehát a beteg személyére szabott terápiára.

Az EP 1 857 559 számú bejelentés *in vitro* eljárást ismertet annak előrejelzésére, hogy a
25 beteg fogékony lesz-e a TNF α inhibitorral történő kezelésre. Az eljárás tárgya 8 gén expressziós szintjének biológiai mintából történő meghatározása, ahol a gének a következők: EPS15, HLA-DPB1, AKAP9, RASGRP3, MTCBP-1, PTNP12, MRPL22 és RPS28.

A WO 2011/097301 számú bejelentés eljárást ismertet annak előrejelzésére, hogy egy reumatoid artritiszben szenvedő beteg fogékony lesz-e a TNF α inhibitorral történő kezelésre. Az
30 eljárás tárgya a HLA-DRB 1 „shared epitope” (HLA-DRB1 SE) allél jelenlétének meghatározása a beteg mintájából, ahol legalább egy kópia HLA-DRB 1 SE allél jelenléte valószínűsíti, hogy a beteg fogékony lesz a TNF α inhibitorral történő kezelésre

Annak ellenére, hogy a WO 2011/097301 és EP 1857 559 számú bejelentésekben már ismertettek a TNF α inhibitorral történő kezelés hatékonyságának előrejelzésére alkalmas eljárásokat, szükség van további hatékony és pontos módszerekre ahhoz, hogy előre eldönthessük, hogy a TNF α -val összefüggésbe hozható betegségekben szenvedők mely kezelésre lesznek fogékonyak.

A találmány rövid leírása

2010 végéig világszerte több mint 2 000 000, többek között reumatoid artritiszben (RA) vagy Crohn-betegségben (CD) szenvedő beteg kapott TNF α ellenes biológiai szert (influximabot, adalimumabot és etanerceptet) hatékonyságukban különböző eredménnyel (M.P. Karampetsou et al., QJM (2010) 103 (12): 917-928.).

A krónikus gyulladásos megbetegedések monoklonális antitestekkel történő kezelésével kapcsolatos fő problémák két, a közelmúltban megjelent publikáció következtetéseiből összefoglalhatók: 1) Az RA-s betegek szignifikáns aránya, 30%-uk nem fogékony a biológiai terápiára (Van Baarsen et al., Genes and Immunity 11, 622-629). 2) Számos, az autoimmun betegségek biológiai szerekkel történő kezelését vizsgáló tanulmány eredménye azt jelzi, hogy a terápiás hatékonyság a második TNF inhibitor kezelést követően csökkenhet (Rubbert-Roth et al., Arthritis Research & Therapy 2009).

Ezért a klinikai gyakorlatban igény van további, a beteg terápiára való fogékonyágának előrejelzésére alkalmas módszerre, az első vagy második kezelést megelőzően. Egy ilyen módszer nagy hatással bírna az ilyen típusú szerek alkalmazására a terápiák költség-hatékonyabbá tételével, és a személyre szabott kezelés lehetőségének megteremtésével.

A találmány szerinti eljárás bioinformatikán alapuló algoritmus használatán alapul, amely alkalmas géncsoportok azonosítására, amely géncsoportok expressziós mintázatának elemzésével alkalmas a TNF α inhibitor kezelésre fogékony és nem fogékony betegek elkülönítésére.

Közelebbről a jelen találmány feltalálói a fenti probléma megoldására olyan *in vitro* eljárást fejlesztettek ki, amely alkalmas beteg TNF α inhibitor terápiára való fogékonyágának előrejelzésére, amely eljárás tartalmazza a következő gének közül választott legalább hat gén expressziós szintjének meghatározását a beteg biológiai mintájából: ABCC4, AIDA, ARHGEF12, BMP6, BTN3A2, CA2, CADM2, CD300E, CYP1B1, ENDOD1, FCGR1A, FMN1, GCLC, GPR34, HORMAD1, IGF2BP2, IL18R1, IL1RL1, KAT2B, MAP1LC3B, MMD, MS4A4A, MS4A7, ODC1, PBX1, PCYT1B, PIP4K2A, PIP5K1B, PRDM1, PSME4, RAD23A, RIOK3, RNASE2, RNF11, SLC7A5, THEM5, TMEM176A, TMEM176B, UBE2H,

WARS vagy a következő gének közül választott legalább hat gén expressziós szintjének meghatározását a beteg biológiai mintájából: APOBEC3A, AQP9, CCL4, CNTNAP3, CYP4F3, DHRS9, EIF2AK2, ELOVL7, EPSTI1, FCGR3A, GPAM, GPR15, GZMB, IFI35, IFI44, IFI44L, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IL2RB, IRF2, IRF7, MGAM, MICA, MME, MX1, OR2A9P, PF4, PTGS2, RAVER2, RFC1, RGS1, RSAD2, S100P, SERPINB10, SERPING1, SIGLEC1, TNF, TNFAIP6.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja során a választott gének expressziós szintjének változását egy normalizáló (housekeeping) gén expressziójának változásával összehasonlításban relatív módon végzik, ahol a normalizálói gén előnyösen a cyclophilin, előnyösebben a cyclophilin A (PPIA). A biológiai minta előnyösen perifériás vér, előnyösebben perifériás vér mononukleáris sejt (PMBC).

A találmány egyik előnyös kiviteli módja szerint az ELOVL7, IFI44L, IFIT1, IFIT3, MICA, OR2A9P és RAVER2 gének, vagy az APOBEC3A, IFI44, IFI44L, IFIT1, IFITM1, MICA és RGS1 gének, vagy az APOBEC3A, DHRS9, IFI35, IFI44, IFI44L, MICA és RFC1 gének expressziós szintjét határozzák meg előnyösen reumatoid artritiszben (RA) szenvedő beteg biológiai mintájából.

A találmány egy másik előnyös kiviteli módja szerint a BMP6, CD300E, CYP1B1, ODC1, RNF11 és UBE2H gének, vagy az ARHGEF12, CADM2, CD300E, GCLC, RIOK3 és UBE2H gének, vagy a CADM2, CD300E, CYP1B1, MMD, ODC1, RNF11 and UBE2H gének expressziós szintjét határozzák meg előnyösen gyulladáscsökkentő betegségekben, például Crohn-betegségben a szenvedő beteg biológiai mintájából

Előnyösen a találmány szerint az eljárást a TNF α inhibitorral való kezelés hatékonyságának követésére alkalmazzuk.

A jelen találmány szerinti eljárás megvalósítás során a TNF α inhibitor előnyösen TNF α ellenes antitest, TNF-el fuzionált fehérje vagy rekombináns TNF-kötő fehérje, előnyösebben adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliximab, pegsunercept vagy ezek bármely biohasonló változata, még előnyösebben infliximab vagy biohasonló változata.

A találmány szerinti eljárás egyik megvalósítási módja tartalmazza továbbá a fenti gének expressziós szintjének összehasonlító vizsgálatát a terápiára fogékony és nem fogékony betegcsoportokból származó referens értékekkel.

A találmány szerinti eljárás során az génexpresszió mértéke előnyösen a fenti génekről átíródó mRNS mennyiségi mérésével történik, az adott biológiai mintából. A gének expressziós

szintjének meghatározására különösen előnyös eljárás a DNS-chip technika és a reverz transzkripciót követő valós-idejű (kvantitatív real-time) polimeráz láncreakció (RT-qPCR).

5 A találmány szerinti eljárás egyik megvalósítási módja tartalmazza továbbá egy biomarker fehérje szintjének meghatározását, ahol a biomarker fehérje előnyösen gyulladáskeltő citokin, kemokin vagy egy hatóanyag elleni antitest.

10 A találmány tárgya továbbá TNF α inhibitor alkalmazása TNF α -val összefüggésbe hozható betegségek kezelésében, ahol a kezelésben részesülő beteg a találmány szerinti eljárás segítségével a TNF α inhibitorral való kezelésre fogékony betegek csoportjába lett sorolva és a TNF α inhibitor adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliximab vagy pegsunercept.

Az ábrák rövid ismertetése

1. ábra: A találmány szerinti vizsgálat elrendezés és időterve.
2. ábra: Az automatikus génpanel-generálás sematikus útvonala.
- 15 3. ábra: Az reumatoid artritiszben (RA) szenvedő betegek esetében szignifikáns expressziós változást produkáló gének normalizált mRNS szintjei a kezelés előtt és után (p-értékek: AQP9: 0,02; TNFAIP6: 0,028; IGJ: 0,012). Az értékek meghatározása microarray mérés alapján történt.
- 20 4. ábra: A reumatoid artritiszben (RA) szenvedő betegek esetében statisztikailag szignifikáns expressziós változást produkáló 4 gén normalizált mRNS szintjének összehasonlítása a terápiára fogékony (R, Responder) és nem fogékony betegek (NR, Non-responder) csoportja között
- 25 5. ábra: A Crohn-betegségben (CD) szenvedő betegek esetében szignifikáns expressziós változást produkáló gének normalizált mRNS szintjei a kezelés előtt és után (p-értékek: MMP8: 0,018, AQP9: 0,011, IGKC: 0,001, TNFAIP6: 0,005, MGAM: 0,011). Az értékek meghatározása microarray mérés alapján történt.
- 30 6. ábra: Az Crohn-betegségben (CD) szenvedő betegek esetében statisztikailag szignifikáns expressziós változást produkáló 4 gén normalizált mRNS szintjének összehasonlítása a NR és R betegek csoportja között
7. Lineáris diszkriminancia-analízissel (LDA) értékelt három génlista reumatoid artritisz esetén (RA). Az oszlopokban a baloldali sávok a nem fogékony betegeket, a jobb

oldali sávok pedig a fogékony betegeket reprezentálják. Minél nagyobb a távolság a csoportok között és minél kisebb az átfedés a minták között annál jobb elkülönítő képességgel rendelkezik az adott génlista. A lista tetején a százalékok a szegregáció arányát és a keresztvalidálás eredményét mutatják a nem fogékony betegek maximális számának azonosítására fókuszálva. A microarray vizsgálatból (tesztcsoport) származó eredmények a bal oszlopokban, az RT-qPCR vizsgálatból (validálási csoport) származó eredmények a jobb oszlopokban láthatók, mindegyik génpanel esetén. A microarray adatok alapján legnagyobb p-értéket mutató gének listája a jobb oldalon szereplő oszlopban látható, ezek szolgáltak negatív kontrollként.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
8. Lineáris diszkriminancia-analizissel (LDA) értékelt három génlista Crohn-betegség esetén (CD). Az oszlopokban a baloldali sávok a nem fogékony betegeket, a jobb oldali sávok pedig a fogékony betegeket reprezentálják. Minél nagyobb a távolság a csoportok között és minél kisebb az átfedés a minták között annál jobb elkülönítő képességgel rendelkezik az adott génlista. A lista tetején a százalékok a szegregáció arányát és a keresztvalidálás eredményét mutatják a nem fogékony betegek maximális számának azonosítására fókuszálva. A microarray vizsgálatból (tesztcsoport) származó eredmények a bal oszlopokban, az RT-qPCR vizsgálatból (validálási csoport) származó eredmények a jobb oszlopokban láthatók, mindegyik génpanel esetén. A microarray adatok alapján legnagyobb p-értéket mutató gének listája a jobb oldalon szereplő oszlopban látható, ezek szolgáltak negatív kontrollként.
 9. Az egyes génpanelekben szereplő gének száma és az adott génpanel F-értéke közötti korreláció minden génpanel esetén a tesztcsoportban és validálási csoportban, RA-ban.
 10. Az egyes génpanelekben szereplő gének száma és az adott génpanel F-értéke közötti korreláció minden génpanel esetén a tesztcsoportban és validálási csoportban, CD-ben.
 11. ábra: Crohn betegben ELISA-val mért IFN γ szint (tesztcsoport)
 12. ábra: Crohn betegben ELISA-val mért IL-6 szint (tesztcsoport)
 13. ábra: RA-s betegekben szignifikáns különbséget mutató szérum citokinek pontdiagrammja (tesztcsoport)
 14. ábra: RA-s betegek kiindulási mintáiban ELISA-val mért TNF α szintje (tesztcsoport)
 15. ábra: RA-s betegek kéthetes mintáiban ELISA-val mért TNF α szintje (tesztcsoport)
 16. ábra: RA-s betegek kiindulási és kéthetes mintáiban ELISA-val mért TNF α szintje (tesztcsoport)

17. ábra: RA-s betegek kéthetes és 14 hetes mintáiban ELISA-val mért infliximab szintje (tesztcsoport)
18. Crohn betegek kéthetes mintáiban ELISA-val mért infliximab szintje (tesztcsoport)
19. RA-s betegek kéthetes mintáiban ELISA-val mért infliximab szintje (tesztcsoport)

5

A találmány részletes leírása

A teljes génexpressziós profil perifériás vérből történő meghatározása szokásos eljárás az autoimmun betegségek patogenetikai jellemzőinek leírására és a betegségek csoportosítására. A perifériás vér egy könnyen hozzáférhető, sejteket tartalmazó biológiai anyagminta és szűrési eljárások során történő használatának vannak előnyei. Továbbá a keringő perifériás vér mononukleáris sejtek (PMBC) a gyulladásban részt vevő sejtek kulcsfigurái, számos kutatócsoport vizsgálta már őket microarray technológiával. A keringő monociták, T és B sejtek génexpressziós mintázata nem feltétlenül tükrözi az adott betegség típusát, tehát a terápiás hatékonyság és a betegség lefolyásának előrejelzéséhez a farmakogenomikai markereken túl szükség van multigénes diagnosztikai panelvizsgálatokra. A PBMC génexpressziós profiljának meghatározása jóval olcsóbb és kevésbé invazív megoldás, mint a biopszia vagy egyéb invazív eljárások. Ennek ellenére eddig, a különféle autoimmun betegségek génexpressziós profiljának, a speciális kezelés fényében történő összehasonlító vizsgálatát nem végezték el.

A terápiás hatás előrejelzésére alkalmazható biomarkereket vagy ezek csoportját általánosan használják a kezelés hatékonyságának javítására. A perifériás vérből történő mintavételnek az előnyös tulajdonságai ismertek. De a minták vétele és kiértékelése során mind a klinikai dolgozók, mind a kutatók részéről szigorú előírásokat kell betartani a minták heterogenitásának elkerülése érdekében.

A jelen találmány feltalálói jó elkülönítő képességgel bíró génpaneleket azonosítottak egy tesztcsoportban perifériás vér teljes génexpressziós profiljának meghatározásával és az eredményeket egy független validációs csoporton validálták.

A találmány szerinti eljárást a következőkben összegezzük. Az RA-ban vagy CD-ben szenvedő betegektől perifériás vért veszünk és kívánt esetben a PBMC-eket kinyerjük. A perifériás vérből, vagy az izolált PBMC-ből RNS-t izolálunk és reverz transzkripcióval cDNS-t állítunk elő. A találmány szerinti gének relatív expressziós szintjének meghatározására egyidejűleg RT-qPCR reakciót is végzünk

30

A jelen találmány megalkotása során teljes génexpressziós vizsgálatot végeztünk egy tesztcsoporton Affymetrix microarray technológia segítségével azért, hogy géneket azonosítsunk, amely géneket aztán egy független csoporton validálni lehet a jóval pontosabb kvantitatív real-time polimeráz láncreakció segítségével. Az RT-qPCR a legjobb módszer a génexpresszió mérésére (az érzékenység, dinamikus tartomány, a standardizálás, a teljesítmény és ár tekintetében) és egyben ideális diagnosztikai eszköz is.

Úgy gondoltuk, hogy a validáláshoz nem csupán a kiindulási, hanem a kéthetes adatok is használhatók. Ezért a validálandó gének csoportjához azokat a géneket is hozzáadtuk, amelyek expressziója a 2 hetes mintákban is statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott, továbbá néhány a szakirodalomból ismert gént is bevontunk a vizsgálatba.

A microarray technológiával vizsgált kiindulási és kéthetes CD minták összehasonlítása során 5 olyan gént találtunk, amelyek esetében a terápia hatására bekövetkező expressziós változás mindkét mintacsoportban észlelhető volt. Ezek közül az AQP9-t és a TNFAIP6-ot már korábban azonosították, mint IBD markert, az MGAM egy teljes genomra kiterjedő hozzárendelési vizsgálat során azonosított TNF α -gátló kezelés hatékonyságának előrejelzésére alkalmas marker gyermek IBD esetén, az MMP8 gén kifejeződése kimutatható a gyulladásban lévő fekélyes bélmintából IBD esetében és kifejeződése a stromában az IBD-re jellemző genetikai marker. Az RA betegek mintáinak vizsgálata során minden gén, amely szignifikáns expressziós változást mutatott az első két hétben összefüggést mutat a betegség patogenezisével: az AQP9 és a TNFAIP6 gének segítségével elkülöníthetők az RA betegek az egészséges kontrol emberektől PBMC génexpressziós mintázat elemzéssel; az IGJ (immunglobulin J) gén expressziója pedig szignifikáns eltérést mutatott ikrekben, az RA beteg és egészséges ikertestvér között.

Az eredmények egy független validációs csoporton RT-qPCR-rel való validálása szintén egy sor olyan gént eredményezett, amelyek expressziója szignifikáns eltérést mutatott a terápiára fogékony és nem fogékony betegek között. CD esetén ezek a gének a következők: TMEM176B és TMEM176A, amelyek a dendrikus sejtek működését befolyásolják azáltal, hogy multimereket képeznek és gátolják a dendrikus sejt érését. UBE2H, amellyel kapcsolatban elmondható, hogy a TNF-a egy ismert regulátora az UBE2H-függő ubikvitin konjugáló aktivitásának; és a WARS, ami egy trp-tRNS szintetáz. RA esetén pedig a következők: CYP4F3, ami az osteoarthritis patomechanizmusával hozható összefüggésbe; DHRS9, MGAM; és PF4, amiket egy proteomikai vizsgálat során azonosítottak, mint az RA-ben használt infliximab terápia hatástalanságának előrejelzésében fontos szereplők.

Habár egyes gének expressziója a terápiára fogékony és nem fogékony betegek között szignifikáns eltérést mutathat, a terápia hatékonyságának nagy pontosságú előrejelzése csupán génpanelek analizálásával érhető el.

5 A legjobb elkülönítő képességgel bíró génpanelek azonosításához Canonical variates analízist (CVA), vagy lineáris diszkriminancia-analízist végeztünk, mivel ezekben több gén egyidejű, génpanelként történő vizsgálata lehetséges, amely során kimutathatók olyan alapvető különbségeket, amelyek tökéletes elkülönülést eredményeznek a többváltozós térben. Szemben az egyváltozós analízisekkel, amik figyelmen kívül hagyják a gének között létrejövő interakciókat.

10 A hasonló génexpressziós vizsgálatok során azonosított végpont-függő génpanelek csak néhány közös gént tartalmaznak, aminek oka a minta feldolgozás, mRNS extrakció, vagy az adatelemzés eltérő módszere vagy akár a klinikai szempontból homogénnek tekinthető beteg csoportokon vizsgált markerek egyedi variációi, heterogenitása lehet. Az a tény, hogy egy gén a fogékony és nem fogékony betegek között statisztikailag szignifikáns különbséget mutató gének
15 közé sorolható, nem feltétlenül jelenti azt, hogy az adott gén a betegség vagy kezelés patogenetikájában fontos szerepet játszik. Ennek megfelelően a megfelelő terápia kiválasztásához a fogékonysággal kapcsolatba hozható gének egy csoportját kell vizsgálni.

Mindkét betegség esetén a fogékony és nem fogékony csoportok közötti jó elkülönítő képességgel bíró génpanelek, egy általunk készített bioinformatikai algoritmus segítségével
20 történő automatikus kiválasztása körülbelül 4700 génpanelt eredményezett, 100% szegregációt eredményezve a fogékony és nem fogékony betegek között. Ezek közül 3-3 olyan génpanelt azonosítottunk, amelyek a panelek F-értéke, kereszt validálási adatok és határértékek alapján a csoportok között a legjobb elkülönítő képességgel bírtak.

Meglepődve tapasztaltuk, hogy

- 25
- 1) A krónikus gyulladásos betegségekben, úgymint CD és RA a perifériás vér génexpressziós mintázata alkalmas prediktív génpanelek azonosítására, amelyek alkalmasak az infliximab terápia hatásosságának előrejelzésére a panelekben részt vevő gének expressziós szintjének infliximab terápia előtt történő mérésével;
 - 2) Meglepő módon teljesen különböző génpanelek alkalmasak a hatékonyság
30 előrejelzésére a CD és RA betegek esetében, annak ellenére, hogy a két betegség hasonló patogenetikai hátterű; és

- 3) számos olyan génpanelit sikerült azonosítani, amely tökéletes elkülönülést eredményez a teszt, és validációs csoportok között, továbbá erős elkülönülést mutatott a kereszt validálási analízis során is.

A találmány szerinti eljárás kulcsponjtja a mintavétel módja. Az alkalmazott módszerek kritériuma az RNS bomlásának megakadályozása a minták tárolása és szállítása során. Erre alkalmas eszközök kereskedelmi forgalomban kaphatók (pl. Paxgene, Leucoloc) de ezek többé-kevésbé eltérő sejtpopulációt eredményeznek, mint amelyet a jelen tanulmány során használtunk. A mintavételi módszer továbbá alkalmas kell, legyen a megfelelő statisztikai elemzéshez szükséges, legalább 120-140 minta vételére. A minták feldolgozása, a QC és RT-qPCR technológia mind-mind jól ismert eljárások.

Az általunk azonosított és validált találmány szerinti géncsoport egy régóta fennálló igényt elégít ki azzal, hogy mind a Crohn betegség, mind a reumatoid arthritisz esetében a TNF α inhibitor terápiára fogékony és nem fogékony betegek egyértelmű elkülönítését teszi lehetővé genomikai eljárás keretében. A találmány szerinti diagnosztikai eljárás ezen a területen elsőként teszi lehetővé a személyre szabott orvoslást, amely minden betegnek előnyére válhat. Továbbá nem csupán a betegek számára jelent előnyt, azzal hogy megkíméli őket a hatékony terápia megtalálása előtti nem hatékony kezeléstől, hanem az orvosok, és egészségügyi hatóságok számára is előnyösen javítja a hatásosságot és biztonságosságot.

PÉLDÁK

Vizsgálati elrendezés

5 A vizsgálatban a tesztcsoportot, amín a microarray vizsgálatot elvégeztük, 20 Crohn-betegségben és 19 reumatoid artritisz-ben szenvedő beteg alkotta (kezelést megelőző és kéthetes mintavétellel).

10 Az validálás során 15, a validálási csoportba tartozó RA beteg kiindulási mintáját, 5, a tesztcsoportba tartozó beteg mintáját és 20 a validálási csoportba tartozó CD beteg kiindulási mintáját vizsgálták RT-qPCR-rel. Az 1. ábrán szereplő sematikus diagram mutatja a vizsgálat elrendezését és időbeosztását.

Vizsgált személyek toborzása

A) Reumatoid artritisz

Beválasztási kritériumok:

- 15 • Klinikailag diagnosztizált reumatoid artritisz (az American Rheumatism Association 1987-óta érvényes kritériumai alapján)
- 20 és 60 év közötti életkor
- Legalább kettő, a betegséget befolyásoló anti-reumás készítmény hatástalansága, ahol az egyik készítmény a metotrexát volt.
- Aktív betegség (a 28 ízületen számolt betegségaktivitási index (DAS28) >3.2).
- 20 • Anti-TNF terápiaiban nem részesült beteg
- Napi 10 mg-os prednizon terápia engedélyezett, azzal a kikötéssel, hogy a dózis a belépést megelőzően legalább 2 hónapja stabil volt.
- Orális kortikoszteroidok (prednizon: maximum dózis 10 mg/nap) és nem-szteroid gyulladásgátlók engedélyezettek, azzal a kikötéssel, hogy a dózis kiindulást megelőzően
- 25 • legalább 1 hónapja stabil volt.
- A betegek a kiindulást megelőző legalább 4 hét óta a metotrexát maximum tolerálható dózisát kapták (5-30 mg/hét).
- Nő:Férfi arány 3:1

Kizárási kritériumok:

30 Dohányzás vagy korábbi dohányzás; terhesség vagy szoptatás; malignoma vagy korábbi malignoma; klinikailag szignifikáns mértékű komorbiditás; fennálló fertőzőes megbetegedés;

Olyan betegek, akiknek egyéb eredetű akut ízületi gyulladással járó betegsége van/volt.

Gyűjtött adatok:

Kor, RA diagnosztizálásának éve; DAS28; CRP; WE; komorbiditás; készítmények (pl. DMARDS)

A kezelést követő 14 héttel a klinikai hatékonyság értékelése EULAR kritériumok alapján történik és a DAS28 érték legalább 1,2-vel történő csökkenése esetén hatékornak tekinthető a kezelés.

B) Crohn-betegség

Beválasztási kritériumok:

- Klinikailag diagnosztizált Crohn-betegség
- 20 és 60 év közötti életkor
- CDAI >250
- Korábbi anti-TNF α terápia kizárt
- metotrexát (MTX) kezelés engedélyezett, de <20 mg/hét
- prednizol kezelés engedélyezett, de <10 mg/nap
- Nő:Férfi arány 1:1

Kizárási kritériumok:

Dohányzás vagy korábbi dohányzás; terhesség vagy szoptatás; malignoma vagy korábbi malignoma; klinikailag szignifikáns mértékű komorbiditás; fennálló fertőzőes megbetegedés; Olyan betegek, akiknek egyéb eredetű akut gyulladásoos bélbetegsége van/volt.

Gyűjtött adatok:

Kor, CD diagnosztizálásának éve; CDAI (ha a CDAI érték 150 alá csökkent, akkor a terápiát hatékornak tekintik, egyéb esetben nem hatékony); CRP; WE; komorbiditás; készítmények; vastagbél biopszia eredménye (ha volt); hatékonyság értékelése a kezelést követő 14 hét után.

Mintavétel, tárolás és feldolgozás:

A hatékonyságot a kezelést követő 14 hét után orvosok értékelték a fent leirt kritériumok alapján. A perifériás vérmintákat (10 ml) EDTA-t tartalmazó BD Vacutainer K2E vérvételi csövekbe gyűjtötték és abból szeparálták a PBMC-eket további 10 ml perifériás vért vettek steril csöbe a szérum mintákhoz. Minden minta a gyűjtést követő egy órán belül feldolgozásra került.

A PBMC-eket Ficoll gradiens centrifugálással különítették el. A perifériás vért 10 ml fiziológiás sóoldattal hígították és 10 ml Ficoll-ra rétegezték. A Centrifugálás 2500 rpm sebességgel 20 percig folyt, majd a PBMC üledéket összegyűjtötték. A sejteket sóoldatban kétszer mosták (1700 rpm, 7 perc), TRIzol reagenssel lizálták. Az RNS izolálásig a tárolás -70°C fokon történt.

A végpontok statisztikai elemzése

A betegcsoportok végpontjainak összehasonlítása GraphPad Prism szoftverrel és Mann-Whitney U-próbával történt (szignifikancia-szint: $p < 0,05$).

RNS izolálás

- 5 Az RNS izolálása a PBMC-ből TRIzol reagens (Invitrogen) felhasználásával történt a gyártó protokollja szerint. Az RNS mennyisége NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo Scientific) készüléken, míg a minőségi elemzés Agilent bioanalizátor (Agilent Technologies) készülékeken történt.

Microarray

- 10 A teljes génexpressziós mintázat elemzése a 28869 gént tartalmazó Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST array alkalmazásával történt. Ambion WT Expression Kitet (Applied Biosystems) és GeneChip WT Terminal Labeling és Control Kitet (Affymetrix) használtunk a 250 ng RNS minta amplifikálására és jelölésére. A mintákat 45 °C fokon, 16 órán át hibridizáltattuk, a mosást GeneChip Fluidics Station 450 automatán végeztük, a gyártó
15 protokollja szerint, majd az array szkenneléséhez GeneChip Scanner 7G (Affymetrix) rendszert használtunk.

Microarray-adatok kiértékelése

- Microarray-adatok kiértékelése Genespring GX10 (Agilent Biotechnologies) szoftverrel történt. Az Affymetrix adat file-okat RMA algoritmussal importáltuk és a normalizált adatokból
20 mediánt számoltunk. A kiindulási és 2 hetes értékek összehasonlítása során, első lépésben a próbakészlet azon 20 %-át, ami a legalacsonyabb expressziós szintet mutatta, kizártuk, majd a megmaradt próbakészletet a „fold change” (génexpressziós változási érték) alapján szűrtük (1,2 értékig kiejtettük). A statisztikai elemzéshez Mann-Whitey U-próbát használtunk Benjamini-Hochberg többszörös hipotézis korrekcióval.

- 25 A terápiára fogékony és nem fogékony betegek értékeinek összehasonlítása során első lépésben a próbakészlet azon 20 %-át, ami a legalacsonyabb expressziós szintet mutatta, kizártuk, majd a megmaradt próbakészletet a „fold change” (génexpressziós változási érték) alapján szűrtük (1,2 értékig kiejtettük). A statisztikai elemzés során két mintás t-próbát használtunk Benjamini-Hochberg többszörös hipotézis korrekcióval. A gének funkcionális
30 csoportosítása Panther Classification System segítségével történt (<http://www.pantherdb.org/>).

RT-qPCR

A génexpressziós adatokat TaqMan Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems) 384-wll Card segítségével nyertük, ami alkalmas akár 384 real-time PCR egyidejű futtatására és számos vizsgálatban alkalmazták már génexpressziós profil meghatározásánál. Ezeken a kis és

közepes teljesítményű, a 96 általunk vizsgált génre specifikus TaqMan® Gene Expression Assay-el előre feltöltött mikrofluidikai kártyákon egyidejűleg 2 minta futhat. A cDNS-eket High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével állítottuk elő, a gyártó utasításainak megfelelően. Az RT-PCR futásokhoz minden mintából 1 µg RNS-t használtunk. Mintánként 400 ng (4 µl) cDNS-t alkalmaztunk. Az RT-qPCR méréshez 196 µl nukleáz-mentes vizet, 200 µl 2× TaqMan Universal PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) adtunk. Ezt a keverék aztán egyenlően elosztottuk a TLDA négy minta-bevezető nyílásába. Az array-eket 1 percig, 1300 rpm-mel szobahőmérsékleten egyszer centrifugáltuk a minták egyenletes elosztása miatt. Ezután a kártyát lezártuk, hogy elkerüljük a minták keveredését az egyes lyukak között. Az qPCR reakciót Applied Biosystems Prism 7900HT szekvencia detektáló rendszer segítségével végeztük a következők szerint: thermal cycler conditions: 2 perc 50°C fokon, 10 perc 94,5°C fokon, majd 30 mp 97°C fokon 40 cikluson keresztül és 1 perc 59,7°C fokon. A kísérletet a korábbi microarray vizsgálat során kiválasztott 91 génnel és a normalizáláshoz használt 5 normalizáló (housekeeping) génnel végeztük.

15 RT-qPCR adatelemzés

RT-qPCR adat fájlokat Data Assist szoftverrel (Applied BioSystems) importáltuk és az alapanalízis során kapott nyers Ct értékeket a megfelelő normalizáló (housekeeping) génekkel normalizáltuk. A normalizáló génként a Cyclophilin A-t (PPIA) használtuk, mert ezen gén expressziós szintje mutatta a legkisebb eltérést a minták között. Azokat a géneket amelyek expressziós szintje eltérést mutatott a terápiára fogékony és nem fogékony betegek csoportja között nem paraméteres statisztikai tesztet (Mann-Whitney U próba) és lineáris diszkriminancia (LDA) analízis segítségével találtuk meg.

Kanonikus variancia analízis (CVA), lineáris diszkriminancia (LDA)

Az előre meghatározott csoportba tartozás meghatározására a canonical variate analysis (CVA) a legmegfelelőbb módszer. A CVS a lineáris diszkriminancia-analízis generalizált változata, a továbbiakban a két fogalmat azonos értelemben használjuk. A CVA-t arra használtuk, hogy megállapítsuk, hogy a terápiára fogékony és nem fogékony betegek csoportja szétválik-e a többdimenziós térben a genetikai változatosságuk alapján, és ha igen, akkor mely génpanelek rendelkeznek a legjobb elkülönítő képességgel. A CVA eredményei az ún. kanonikus értékek (viszonyító pontok a kanonikus térben, amelyeket a kanonikus függvények sajátértékei határoznak meg).

Automatikus génpanel-generálás

A lineáris diszkriminancia-analízist (LDA) (Hamadeh HK et al. Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. Toxicol Sci. 2002 Jun;67(2):232-40.)

olyan gén-panelek automatikus létrehozására használtuk, amelyek a következő algoritmussal számolva 100 %-os szegregációt eredményeznek a terápiára fogékony és nem fogékony betegek csoportja között mindkét betegség esetén, továbbá mind a teszt-, mind a validálási csoport között (CD esetén 40, RA esetén 41 gént használtunk, amelyeket a tesztesoporton szűrtünk és a validálási csoporton validáltunk):

- 1) A „genes in model” szett létrehozása. Eleinte a szett az összes gént tartalmazza. Az ún. „protected genes” szett létrehozása. Eleinte ez a szett üres.
- 2) Az F-érték kiszámítása minden génre, ami a csoportok közötti és csoporton belüli variancia aránya.
- 3) Az osztályozó algoritmust (LDA) futtatjuk mindkét csoportban (validációs és tesztesoport) a „genes in model” szettre. Mindkét esetben egy pontossági százalékkértéket kapunk, amit a „legjobb pontossági érték”-ként használunk.
- 4) A „selectable genes” szettet a következőként határozzuk meg:

$$\text{„selectable genes”} = \text{„genes in model”} \text{ mínusz „protected genes”}$$

Ha a „selectable genes” szett nem üres, akkor az algoritmus az 5. lépés szerint folytatódik, ha üres, akkor a 7. lépésre ugrunk.

- 5) A „selectable genes” szettből géneket veszünk ki a következő modellek alapján
 - a) random módon egyenlő valószínűséggel (**uniform model**);
 - b) random módon a gének F-értékével fordítottan arányos értékű valószínűséggel (**F_prop model**);
 - c) a legalacsonyabb F-értékű géneket vesszük ki.

Mindegyik esetben a kiválasztott gént átmenetileg kivesszük a „genes in model” szettből. A sztochasztikus modellek a min_F modellhez képest jobb szegregálódást eredményeznek a csoportok között. A uniform és F-prop modellek sztochasztikus algoritmusok, míg a min_f model determinisztikus.

- 6) A csoportosító algoritmust az (átmenetileg csökkentett) „genes in model” szetten futtatjuk.
 - a) ha az így számolt pontossági érték alacsonyabb lesz a „legjobb pontossági érték”-nél, akkor a kiválasztott gént visszatesszük a „genes in model” szettbe és a gént belerakjuk a „protected genes” szettbe.
 - b) ha az így számolt pontossági érték legalább akkora lesz, mint a „legjobb pontossági érték”, akkor a kiválasztott gént véglegesen kivesszük a „genes in model” szettből és

a „protected genes” szettet kiürítjük. A „legjobb pontossági érték”-et pedig átírjuk az pontossági értékre.

Az algoritmus a 4. lépésnél folytatódik.

5 7) Az algoritmus véget ér. A végeredmény a „genes in model” szett és egy „legjobb pontossági érték”.

10 A lineáris diszkriminancia-analizist az R szoftver segítségével végeztük (R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.) a szemléltetéshez package MASS-t (Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York) és package wordcloud-ot használva (Ian Fellows (2012). wordcloud: Word Clouds. R package version 2.0. <http://CRAN.R-project.org/package=wordcloud>).

Enzimhez kapcsolt immunoszorbens assays (ELISA)

15 Az IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ , TNF α , infliximab és anti-infliximab antitest szérumszintjeinek meghatározása érdekében enzimhez kötött ellenanyag vizsgálatot (ELISA) alkalmaztunk. Quantikin ELISA kitéket (R&D Systems) használtunk IL-6, IL-8, IL-12 és IFN γ mérésekhez a gyártó protokollja szerint. TNF α , infliximab és anti-infliximab antitest méréséhez LISA –TRACKER Premium Infliximab kité (BioMedical Diagnostics) használtunk. Az eredményeket pg/ml-ben adtuk meg. Az adatok elemzése GraphPad Prism szoftverrel és Mann-Whitney U-próbával történt (szignifikancia-szint: $p < 0,05$).

PÉLDÁK

1. példa

A reumatoid artritiszben szenvedő betegek tesztcsoportjának mintáin végzett teljes génextpressziós analízis

25 *Reumatoid artritiszben szenvedő betegek tesztcsoportja*

30 19 beteg kiindulási és kéthetes mintája szerepelt a microarray vizsgálatban. 6 fogékony és 13 nem, vagy mérsékelten fogékony beteget azonosítottak az orvosok. Mindegyik beteg ugyanabban a kezelésben részesült és nem-dohányzó volt. A fogékony (R) és nem-fogékony (NR) csoport között nem volt szignifikáns a különbség a kor, DAS28, HAQ, CRP, reumatoid faktor, anti-CCP vagy DMARD-k tekintetében (I. táblázat).

kiindulásnál		Fogékony (ARC70-50)	Nem vagy mérsékelten fogékony (ARC20-0)
		6	13
Nem	Férfi/Nő	1/5	2/11
Kor	NS	44,33	47,08
DAS28	NS	5,63	5,26
HAQ	NS	1,27	2,06
CRP (mg/ml)	NS	16,83	28,31
DMARDs	NS	2,83	2,69
RF (IU/ml)	NS	105,83	148,62
CCP (IU/ml)	NS	675,78	756,31

1. táblázat: Az RA betegek tesztcsoportjának összesített klinikai paramétereit.
NS jelentése: nem szignifikáns, a DAS28, HAQ és DMARDs „score” értékek.

5 Microarray analízis

A globális génextpressziós analízis olyan géneket tárt fel, amelyek expressziója statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a fogékony és nem-fogékony betegek kiindulási mintáiban. A kéthetes minták analízise során szintén találtunk géneket, amelyek expressziója statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a fogékony és nem-fogékony betegek mintái között.

10 Néhány gén expressziója már a kiindulási mintákban is szignifikáns eltérést mutatott (EPST11, IFI44, IFIT1, IFIT2, IFIT3, RFC1 és RSAD2); de számos olyan gént is találtunk, melyek expressziójának változása csak a 2 hetes mintákból volt kimutatható (FCGR3A, GPAM, MICA, ELOVL7, PF4, RGS1 és SNORD41). A fenti gének közül a szakirodalom többet már összefüggésbe hozott a RA-vel (FCGR3A, MICA, PF4, IFIT1, stb.).

15 A kiindulási és kéthetes minták összehasonlítása eredményeként 3 olyan gént találtunk (AQP9, IGJ and TNFAIP6), amely statisztikailag szignifikáns eltérés mutatott a Benjamini-Hochberg korrekciót követően is. Ezen a gének expressziójának időbeli változása jelzi terápia hatását. (3. ábra)

2. példa

20 A reumatoid artritiszes génpanel validálása RT-qPCR-rel

Reumatoid artritiszben szenvedő betegek validációs csoportja

15 beteg kiindulási mintája szerepelt az RT-qPCR vizsgálatban. 4 fogékony és 11 nem, vagy mérsékelten fogékony beteget azonosítottak az orvosok. Mindegyik beteg ugyanabban a kezelésben részesült és nem-dohányzó volt. A fogékony (R) és nem-fogékony (NR) csoport

között nem volt szignifikáns a különbség a kor, DAS28, HAQ, CRP vagy DMARD-k tekintetében (2. táblázat).

Kiindulásnál (tesztcsoport)		Fogékony	Nem vagy mérsékelten fogékony
		4 (6)	11 (13)
Nem	Férfi/Nő	0/4 (1/5)	3/8 (2/11)
Kor	nem szignifikáns	54 (44,33)	56,2 (47,08)
DAS28	nem szignifikáns	5,23 (5,63)	5,44 (5,26)
HAQ	nem szignifikáns	1,59 (1,27)	1,93 (2,06)
CRP (mg/ml)	nem szignifikáns	18,9 (16,83)	9,58 (28,31)
DMARDs	nem szignifikáns	3 (2,83)	2,7 (2,69)

2. táblázat: Az RA betegek validációs csoportjának összesített klinikai paramétereit. Zárójelben a tesztcsoport adatai láthatók, a DAS28, HAQ és DMARDs „score” értékek.

RT-qPCR analízis

Az RT-qPCR vizsgálatnál 15 beteg mintáját, valamint a tesztcsoportból 5 beteg (2 fogékony és 3 nem-fogékony) mintáját használtuk fel. A validáláshoz használt qPCR assay elrendezése a következő volt: A microarray vizsgálatok eredménye szerint a kiindulási mintákban 29 probe set mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a R és NR minták között. Ezek közül 27 gént (a nem annotált géneket és a snoRNS-eket kizártuk) vizsgáltunk a TLDA kártyákon, továbbá 6 gént a kéthetes NR és R minták összehasonlításából és 10, a szakirodalomból ismert gént. Az alább leírt végső analízist ezek közül 41 génen végeztük el (a különbséget nem mutató géneket kizártuk). Az RT-qPCR eredménye alapján 4 gén expressziója mutatott statisztikailag szignifikáns (egyoldali Mann-Whitney U teszt) eltérést a R és NR csoportok között (4. ábra). Technikai validálást is végeztünk, ami szintén sikeresnek bizonyult.

3. példa

20 A Crohn betegek tesztcsoportjának mintáin végzett teljes génexpressziós analízis

A Crohn betegek tesztcsoportja

20 beteg kiindulási és kéthetes mintája szerepelt a microarray vizsgálatban. 14 fogékony és 6 nem fogékony beteget azonosítottak az orvosok. Mindegyik beteg ugyanabban a kezelésben részesült és nem-dohányzó volt. A fogékony (R) és nem-fogékony (NR) csoport között nem volt

szignifikáns a különbség a kor, CDAI, CRP, hemoglobín, leukocita vagy neutrofil granulocita (3. táblázat).

kiindulásnál		Fogékony	Nem fogékony
		14	6
Nem	Férfi/Nő	8/6	3/3
Kor	nem szignifikáns	36,2	36
CDAI	nem szignifikáns	319,6	351,5
CRP (mg/ml)	nem szignifikáns	22,78	13,59
Hemoglobín (g/l)	nem szignifikáns	125,1	120,6
Leucocita (G/l)	nem szignifikáns	9,02	8,01
Neutrofilek (%)	nem szignifikáns	70,0	74,5

3. táblázat: A CD betegek tesztescsoportjának összesített klinikai paramétereit.

5 A CDAI jelentése Crohn's Disease Activity Index érték.

Microarray analízis

A globális génexpressziós analízis olyan géneket tárt fel, amelyek expressziója statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a fogékony és nem-fogékony betegek kiindulási mintáiban. A kéthetes minták analízise során szintén találtunk géneket, amelyek expressziója statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a fogékony és nem-fogékony betegek mintái között. Néhány gén expressziója már a kiindulási mintákban is szignifikáns eltérést mutatott (DDX11L2, BMP6, THEM5 és ABCC4); de számos olyan gént is találtunk, melyek expressziójának változása csak a kéthetes mintákból volt kimutatható (GPR34, PRDM1, IL1RL1, CA2, MMD, SCL7A5, CADM2 és RAD23A). A fenti gének közül a szakirodalom többet már összefüggésbe hozott a CD-vel, (BMP6, ABCC4, CA2, IL1RL1 és PRDM1). A kiindulási és kéthetes minták összehasonlítása eredményeként 5 olyan gént találtunk (AQP9, IGKC, MGAM, MMP8 and TNFAIP6), amely statisztikailag szignifikáns eltérés mutatott a Benjamini-Hochberg korrekciót követően is. Ezen gének expressziójának időbeli változása jelzi terápia hatását. (5. ábra)

20

4. példa

A Crohn betegséges génpanel validálása RT-qPCR-rel

A Crohn betegek validációs csoportja

20 beteg kiindulási mintája szerepelt az RT-qPCR vizsgálatban. 13 fogékony és 7 nem, fogékony beteget azonosítottak az orvosok. Mindegyik beteg ugyanabban a kezelésben részesült és nem-dohányzó volt. A fogékony (R) és nem-fogékony (NR) csoport között nem volt szignifikáns a különbség a kor, CDAI, CRP, hemoglobin, leukocita vagy neutrofil granulocita tekintetében (4. táblázat).

kiindulásnál (tesztcsoport)		Fogékony	Nem fogékony
		13 (14)	7 (6)
Nem	Férfi/Nő	8/5 (8/6)	4/4 (3/3)
Kor	nem szignifikáns	26,8 (36,2)	30,2 (36)
CDAI	nem szignifikáns	338,3 (319,6)	370,7 (351,5)
CRP (mg/ml)	nem szignifikáns	27,2 (22,78)	16,5 (13,59)
Hemoglobin (g/l)	nem szignifikáns	130 (125,1)	127 (120,6)
Leucocita (G/l)	nem szignifikáns	7,58 (9,02)	9,24 (8,01)
Neutrofilek (%)	nem szignifikáns	74,0 (70,0)	72,83 (74,5)

4. táblázat: A CD betegek validációs csoportjának összesített klinikai paraméterei. Zárójelben a tesztcsoport adatai láthatók, CDAI (Crohn's Disease Activity Index) értékek.

RT-qPCR analízis

A validáláshoz használt qPCR assay elrendezése a következő volt: A tesztcsoporton végzett microarray vizsgálat eredménye szerint a kiindulási mintákban 49 probe set mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a R és NR minták között. Ezek közül 36 gént (a nem annotált géneket és a snoRNS-eket kizártuk) vizsgáltunk a TLDA kártyákon, továbbá 8 gént a kéthetes NR és R minták összehasonlításából és 7, a szakirodalomból ismert gént. Az alább leírt végső analízist ezek közül 40 génen végeztük el (a különbséget nem mutató géneket kizártuk). Az RT-qPCR eredménye alapján 4 gén expressziója mutatott statisztikailag szignifikáns (egyoldali Mann-Whitney U teszt) eltérést a R és NR csoportok között (6. ábra).

5. példa

Az expressziós adatok biostatistikai elemzése

A statisztikai analízist a 40/41 (RA/CD) előszűrt gén expressziós adatain végeztük mindkét csoportban a fentiekben részletesen leírt automata génpanel-generálás segítségével,

amely algoritmust arra terveztük, hogy a legjobb, a terápiára fogékony és nem fogékony betegek közötti elkülönítő képességgel rendelkező génpaneleket azonosítsuk.

Az algoritmust a determinisztikus min_F modellel és 5000szer a sztohasztikus modellekkel is lefuttattuk. RA esetén az F_prop modell a 4747 olyan génpanel kombinációt eredményezett, amely 100%-os szegregációt mutatott a fogékony és nem fogékony betegek között, mind a teszcsoportban, mind a validációs csoportban (a microarray és az RT-qPCR adatokat is használva), a uniform modell még ennél is több, 4909 génpanelt eredményezett. CD esetén az eredmény 4657 az F_prop és 4878 a uniform modellt használva. A min_F modellt használva is kaptunk 100%-os szegregációt eredményező génpaneleket, de meg kell jegyeznünk, hogy a sztohasztikus modellek mélyebb elválásokat eredményeztek a pontossági indikátorok tekintetében mindkét betegség tekintetében. Az 5000 futtatás eredményeként létrejött, 100%-os szegregációt eredményező génpanelek magas száma azt sugallja, hogy a vannak további 100%-os szegregációt eredményező génpanelek, ezek száma megközelítőleg 50 000-re tehető.

A keresztvalidálás megmutatja, hogy a modell hogyan illeszkedik a hipotetikus validációs szetthez, amennyiben valós validációs szett nem áll rendelkezésre. Mí a leave-one-out keresztvalidációt („egyét kihagy”, LOOCV) használtuk, ahol a validáló adatként egy, az eredeti vizsgálati körből kivett megfigyelést használtunk, míg a „training” adatokat a maradék megfigyelések adták. Ezt addig ismételtük, míg a vizsgálati kör minden megfigyelése szerepelt validáló adatként. A szemléltetéshez 3-3, az F-érték, keresztvalidáció és a szegregálódó csoportok határai tekintetében legjobb elkülönítő képességgel rendelkező génpanelt választottuk. A microarray adatok alapján legnagyobb p-értéket mutató gének szolgáltak negatív kontrollként, amelyek nem mutattak szegregációt (5. ábra).

Az RA esetében a legjobb elkülönítő képességgel bíró génpanel a következő géneket tartalmazza: CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVER2, SERPINB10 és TNFAIP6 (RA1); a második génpanel a következő géneket tartalmazza: CNTNAP3, CYP4F3, EPST11, MME, RGS1, SERPINB10 és TNFAIP6 (RA2); a harmadik génpanel pedig a következőket: FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVER2, RFC1 és RSAD2 (RA3) (7. ábra)

A CD esetében a legjobb elkülönítő képességgel bíró génpanel a következő géneket tartalmazza: ARHGEF12, ENDOD1, FCGR1A, GCLC, GPR34, KAT2B, MAP1LC3B és ODC1 (CD1); a második génpanel a következő géneket tartalmazza: ABCC4, AIDA, ARHGEF12, CADM2, FMN1, KAT2B, ODC1, PCYT1B és RNASE2 (CD2); a harmadik génpanel pedig a következőket: AIDA, CADM2, GCLC, KAT2B, MMD, PCYT1B, PIP5K1B, RIOK3 és RNF11 (CD3) (8. ábra).

Génpanel #	RA1		RA2		RA3		Negatív kontroll
reumatoid artritisz csoport	Teszt-csoport	Validációs csoport	Teszt-csoport	Validációs csoport	Teszt-csoport	Validációs csoport	Teszt-csoport
Csoportok szegregációja	100%	100%	100%	100%	100%	100%	53%
Keresztvalidálás eredménye	100%	87%	95%	93%	95%	87%	-
Adatok forrása	Micro-array	RT-qPCR	Micro-array	RT-qPCR	Micro-array	RT-qPCR	Micro-array
Génpanel #	CD1		CD2		CD3		Negatív kontroll
Crohn-betegség csoport	Teszt-csoport	Validációs csoport	Teszt-csoport	Validációs csoport	Teszt-csoport	Validációs csoport	Teszt-csoport
Csoportok szegregációja	100%	100%	100%	100%	100%	100%	55%
Keresztvalidálás eredménye	95%	80%	90%	85%	90%	80%	-
Adatok forrása	Micro-array	RT-qPCR	Micro-array	RT-qPCR	Micro-array	RT-qPCR	Micro-array

5. táblázat: A szemléltetéshez választott génpanelek pontossági indikátorai. A választott génpanelek szegregációs és keresztvalidálás adatai, valamint a negatív kontroll láthatók.

5. A 9. és 10. ábrán láthatók a fogékony és nem fogékony betegek között 100%-os szegregációt mutató panelek F-értéke és a bennük szereplő gének száma panelenként, minden betegcsoportból (minél nagyobb az F érték, annál jobb a szegregáció, tehát a legalacsonyabb F-értékkel rendelkező panel a modell leggyengébb pontját képviseli), F-érték alapján sorba rendezve, a legjobb elkülönítő képességgel bíró génpanelek várható számának becslése érdekében. A

minimum F-érték görbe inflexiós pontja alapján megállapítható, hogy RA esetén hozzávetőlegesen 350, míg CD esetén körülbelül 200 génpanel eredményez jó elkülönítést, megjegyezzük, hogy az ábrán szereplő összes génpanel 100%-os elkülönülést eredményez a fogékony és nem fogékony csoportok között.

5 6. példa

ELISA analízis

Az ELISA mérések célja öt gyulladásokeltető citokin (TNF α , IL6, IL8, IFN γ és IL12), az infliximab és az infliximab elleni antitest szérumszintjének meghatározása volt. A 6. táblázat mutatja, hogy az RA-s betegek esetében az IL-12 szintjében statisztikailag szignifikáns eltérés volt tapasztalható a fogékony és nem fogékony betegek kiindulási mintái között (statisztikai analízist végezve), míg a Crohn betegek esetében a TNF γ szintje mutatott szignifikáns különbséget. Az RA-s csoportban a TNF α szintet with TRACKER Premium Infliximab kittel mértük. A 11-13. ábrák pontdiagramjai mutatják az összehasonlítást.

	Reumatoid artritisz		Crohn-betegség	
	NR vs R a kiinduláskor	kiindulás vs kéthetes	NR vs R a kiinduláskor	kiindulás vs kéthetes
IL6	0,2	0,03	0,2	0,005
IL8	0,3	0,01	0,9	0,06
IL12	0,05	0,05	0,6	0,8
IFN γ	0,5	0,5	0,02	0,06
TNF	0,2	0,67		

6. táblázat: A citokinek ELISA mérésének statisztikái. A p-értékeket az NR vs R és kiindulási vs kéthetes citokin szintek adatainak statisztikai analizisével határoztuk meg, amihez Mann-Whitney U tesztet használtunk. A pirossal jelölt értékek a statisztikailag szignifikáns értékek.

A TNF α , az infliximab és az anti-infliximab ELISA teszteket LISA –TRACKER Premium Infliximab kittel is elvégeztük. A kiték korlátozott számára tekintettel csak a tesztcsoport mintáit vontuk be a vizsgálatba. A minták a következők voltak:

TNF α	17 RA kiindulási,	17 RA kéthetes	7 RA 14 hetes
Infliximab	16 CD kéthetes	19 RA kéthetes	7 RA 14 hetes
Anti-infliximab	17 CD kéthetes	19 RA kéthetes	7 RA 14 hetes

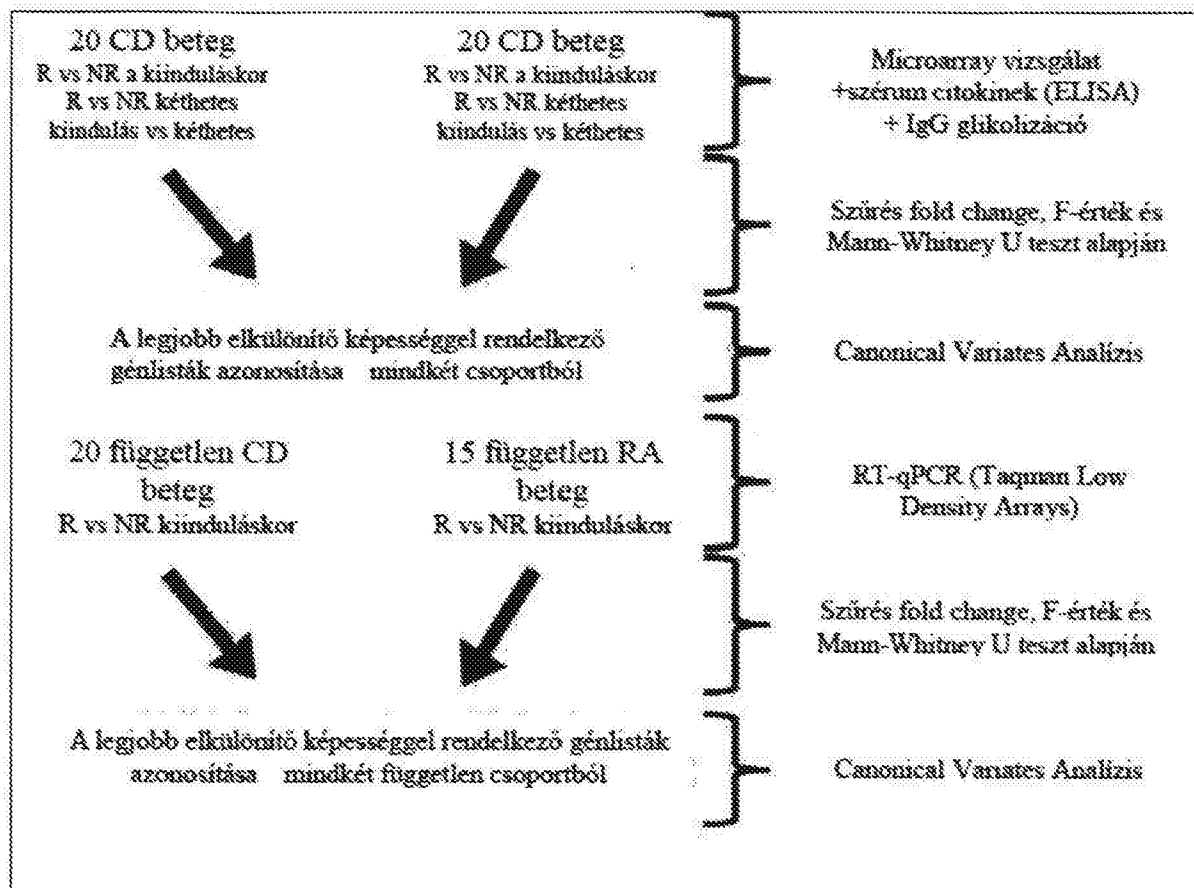
A TNF α szint tehát csak a tesztcsoport mintáin lett meghatározva, de sem a kiindulási mintákban, sem a 2 hetes mintában, sem a kiindulási és 2 hetes eredmények összehasonlítása során nem észleltünk eltérést (14-16. ábrák).

Az infliximab és az infliximab elleni antitest szintjét az RA és CD tesztcsoport 2 hetes és 14 hetes mintáiban mértük (17-19. ábra). Az infliximab elleni antitest szintjét csak abban a 3 beteg mintájából lehetett detektálni, akiknek a 14 hetes mintájában az infliximab szintje 0 volt.

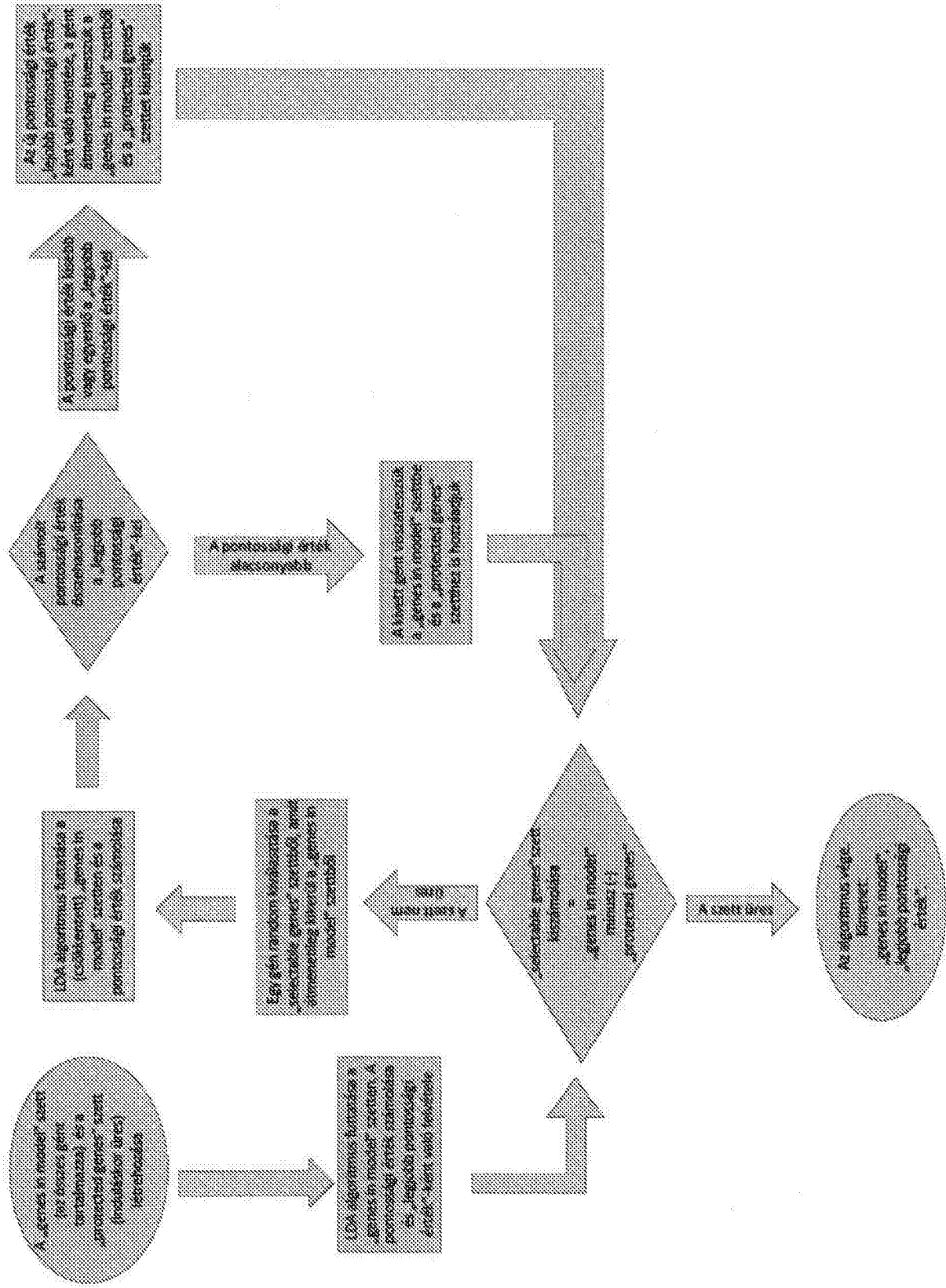
Igénypontok

1. *In vitro* eljárás TNF α inhibitorral történő kezelés hatékonyságának előrejelzésére, amely eljárás tartalmazza perifériás vér mintából
 - a CNTNAP3, CYP4F3, GZMB, MME, MX1, RAVER2, SERPINB10 és TNFAIP6 géneket tartalmazó génpanel; vagy
 - a CNTNAP3, CYP4F3, EPSTII, MME, RGS1, SERPINB10 és TNFAIP6 géneket tartalmazó génpanel; vagy
 - az FCGR3A, GPAM, GZMB, IFI35, MME, PTGS2, RAVER2, RFC1 és RSAD2 géneket tartalmazó génpanel
 expressziós szintjének meghatározását rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben vagy
 - az ARHGEF12, ENDOD1, FCGR1A, GCLC, GPR34, KAT2B, MAP1LC3B és ODC1 géneket tartalmazó génpanel; vagy
 - az ABCC4, AIDA, ARHGEF12, CADM2, FMN1, KAT2B, ODC1, PCYT1B és RNASE2 géneket tartalmazó génpanel; vagy
 - az AIDA, CADM2, GCLC, KAT2B, MMD, PCYT1B, PIP5K1B, RIOK3 és RNF11 géneket tartalmazó génpanel
 expressziós szintjének meghatározását gyulladással járó bélbetegségben szenvedő betegekben.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a választott gének relatív expressziós szintjét egy normalizáló génhez viszonyítva határozzuk meg.
3. Az 1 vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a TNF α inhibitor TNF α elleni antitest, TNF-el fuzionált fehérje vagy rekombináns TNF-kötő fehérje.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a TNF α inhibitor adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliximab vagy pegsunercept.
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy további lépésként az említett gének expressziós szintjét összehasonlítjuk a fogékony és nem fogékony csoportok referens értékeivel.
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expressziós szint perifériás vér mintából történő meghatározása az mRNS szint mennyiségi mérésével történik.
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy további lépésként egy biomarker fehérje szintjét is meghatározzuk.

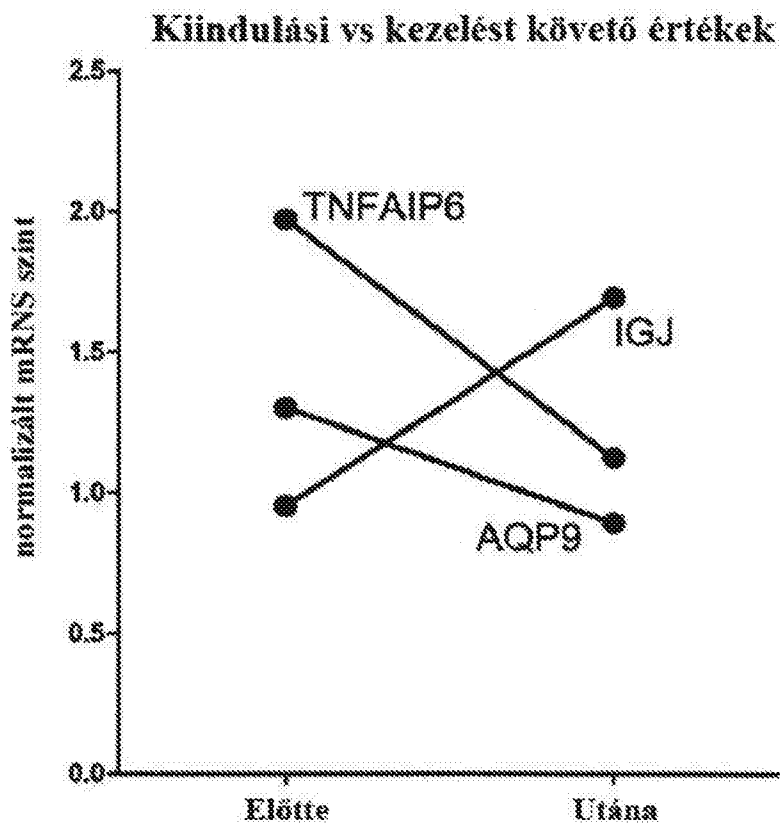




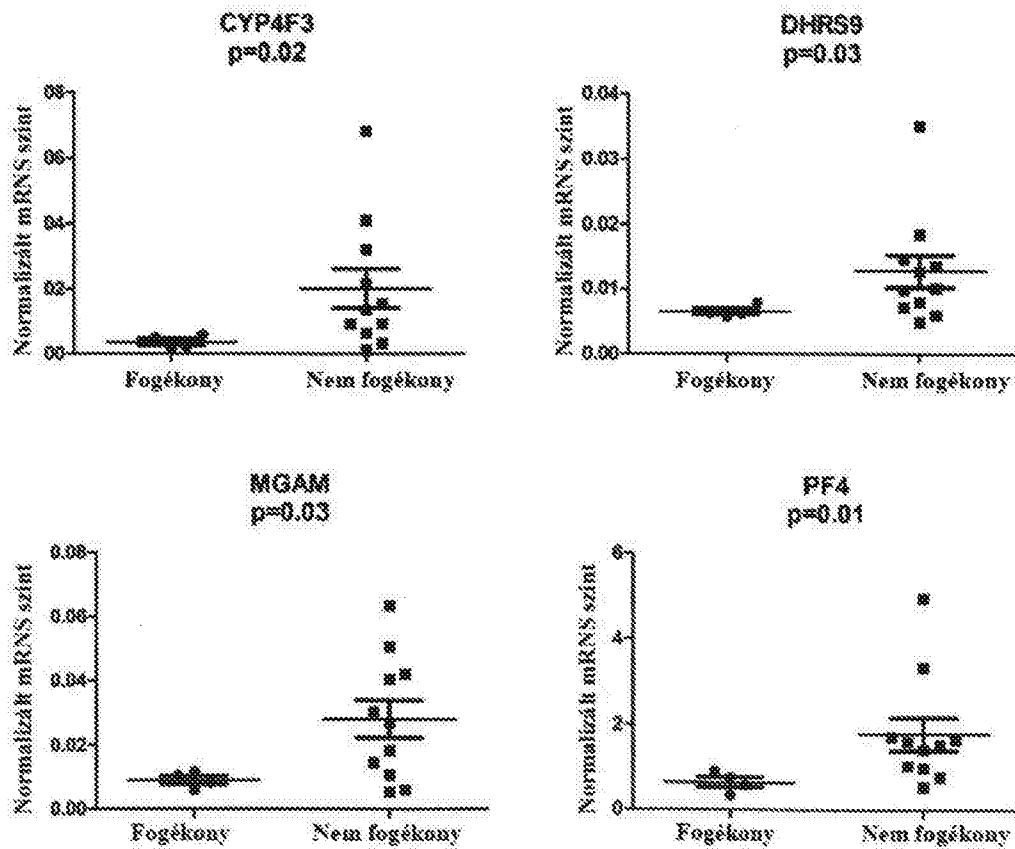
1. ábra



2. ábra

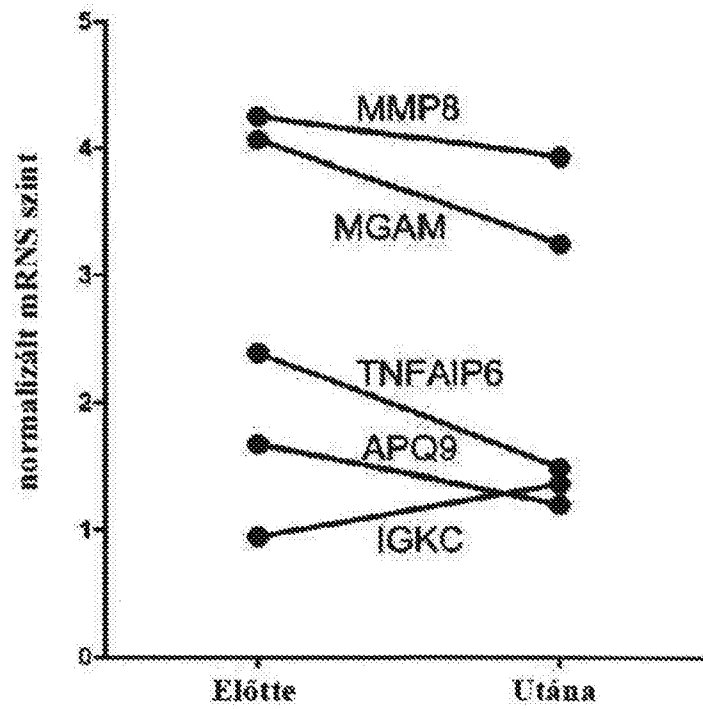


3. ábra

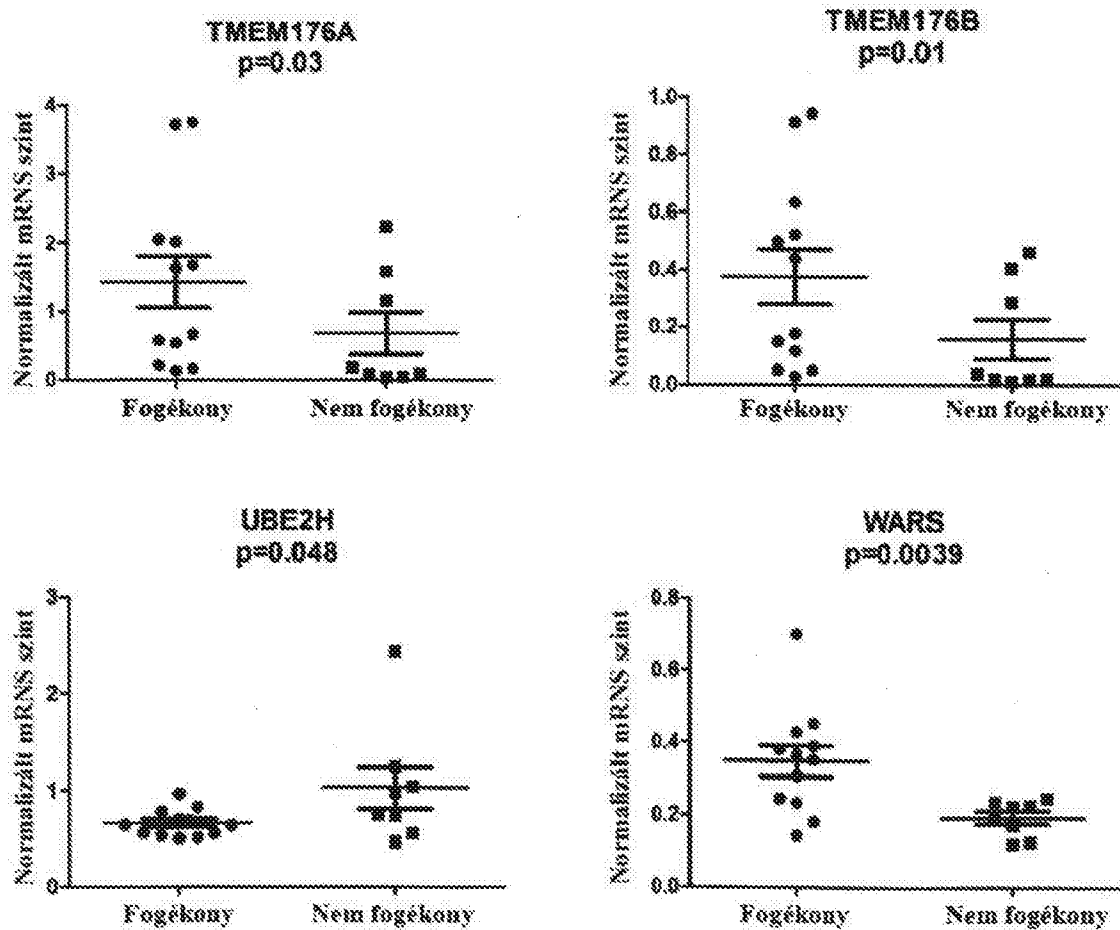


4. ábra

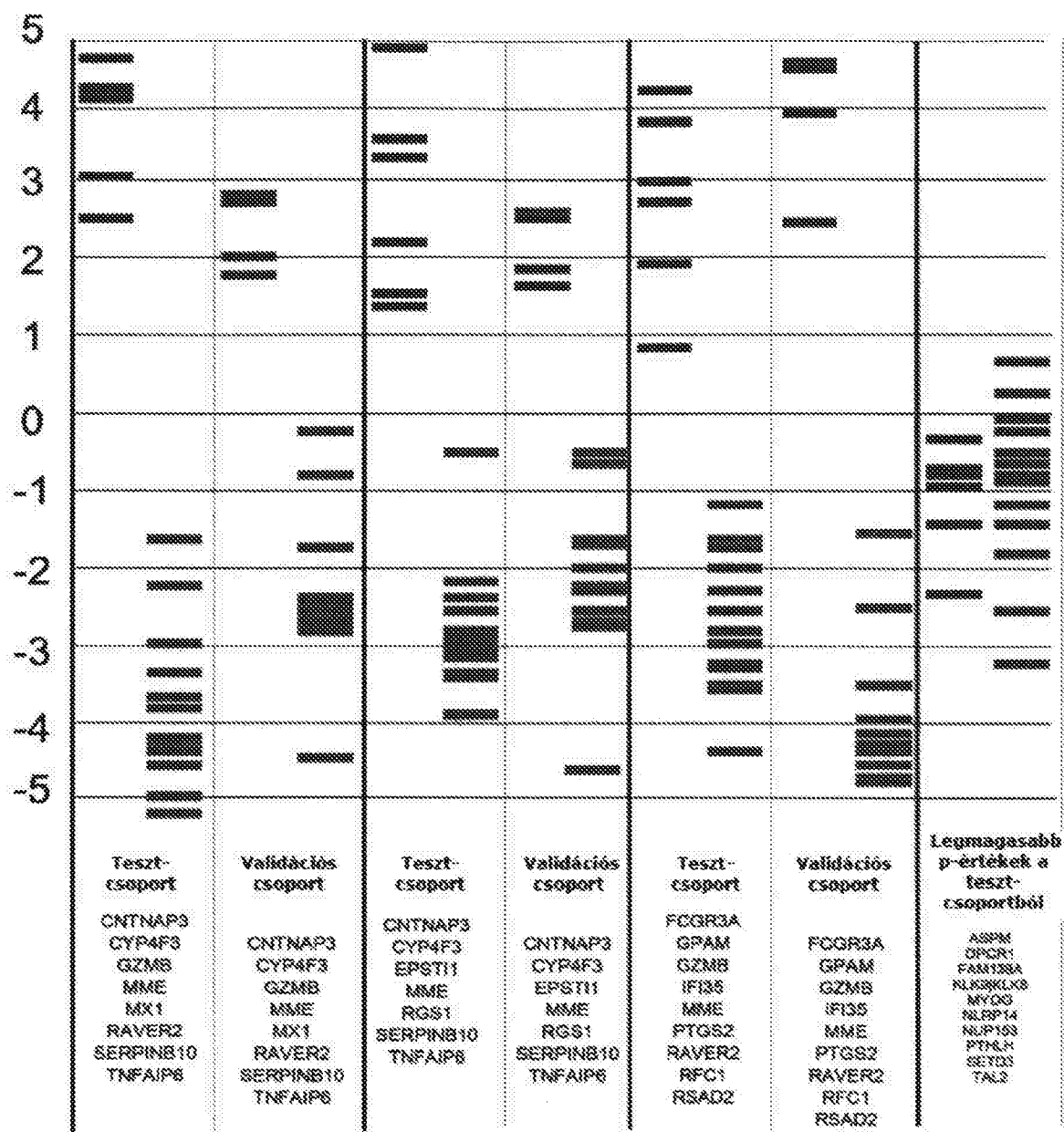
Kiindulási vs kezelést követő értékek



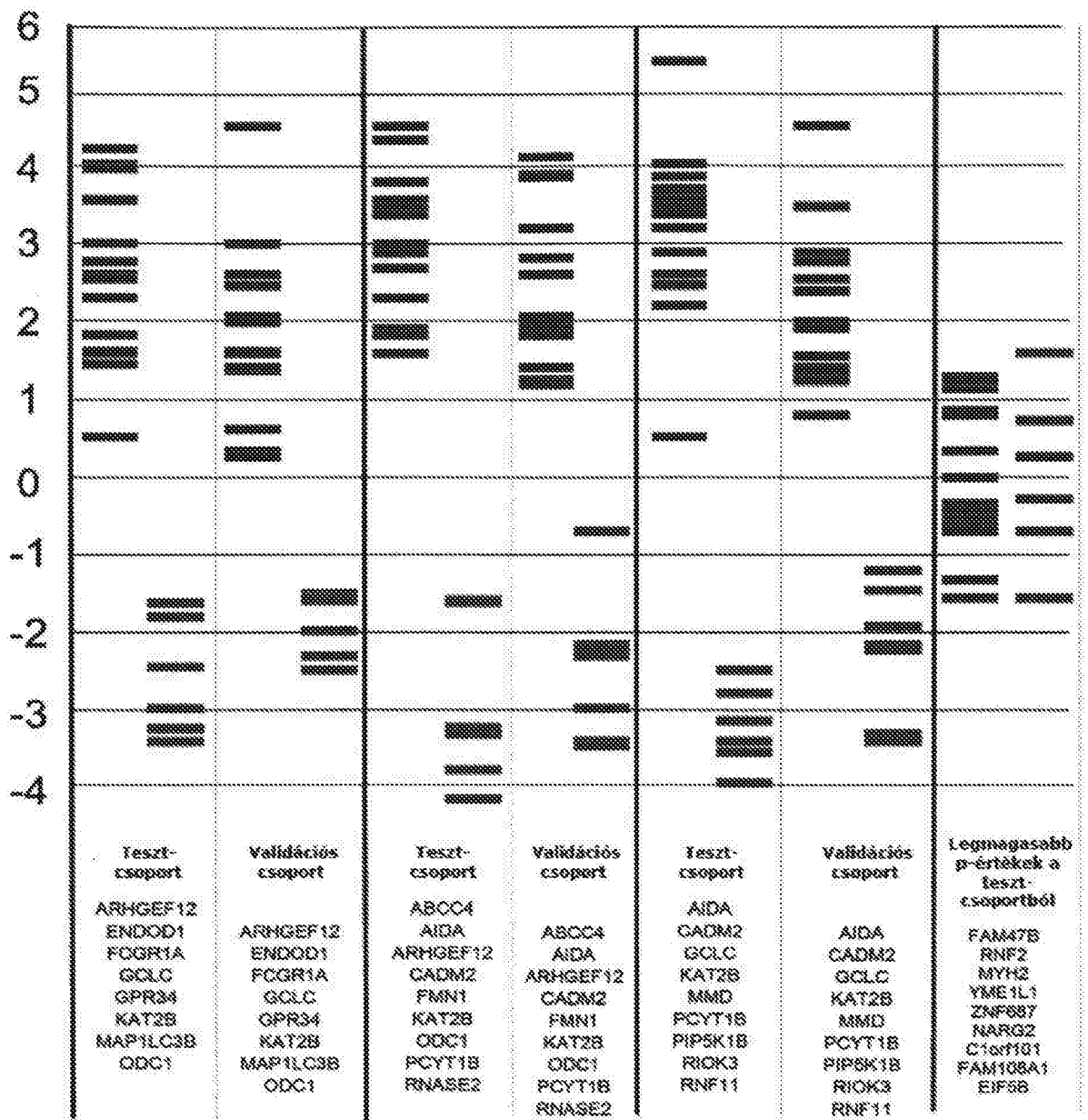
5. ábra



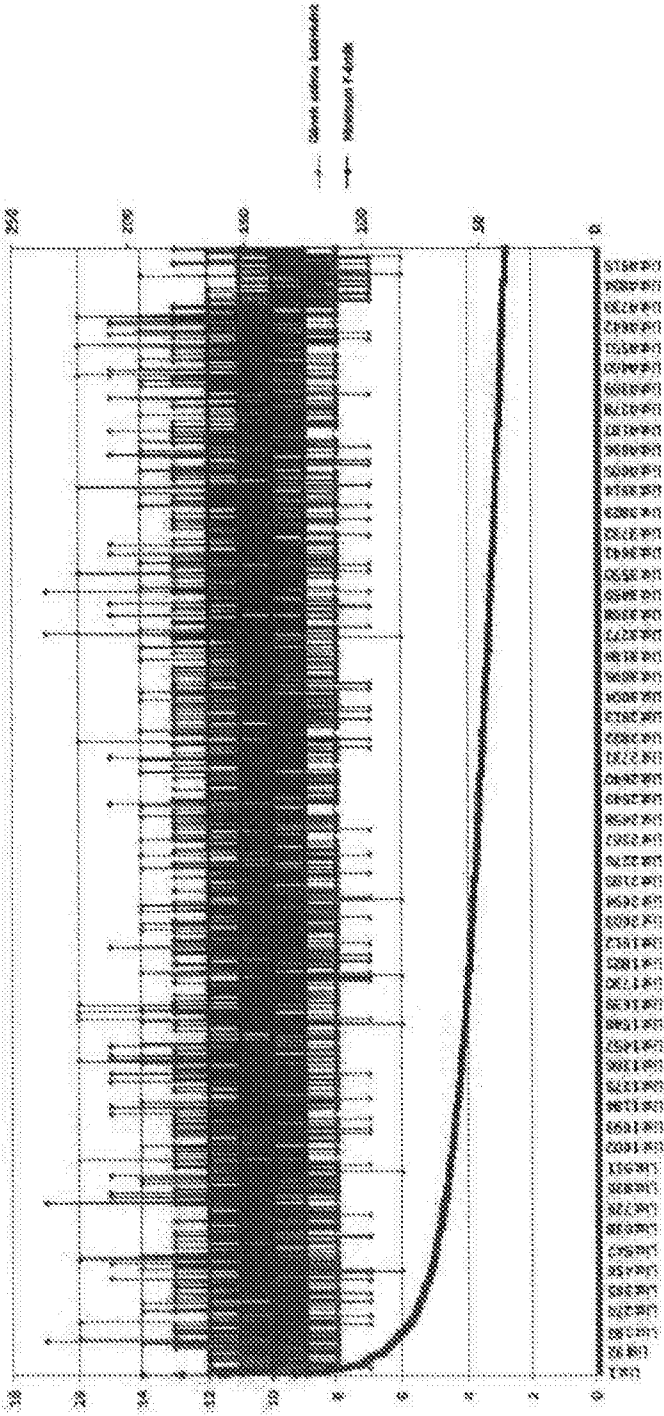
6. ábra



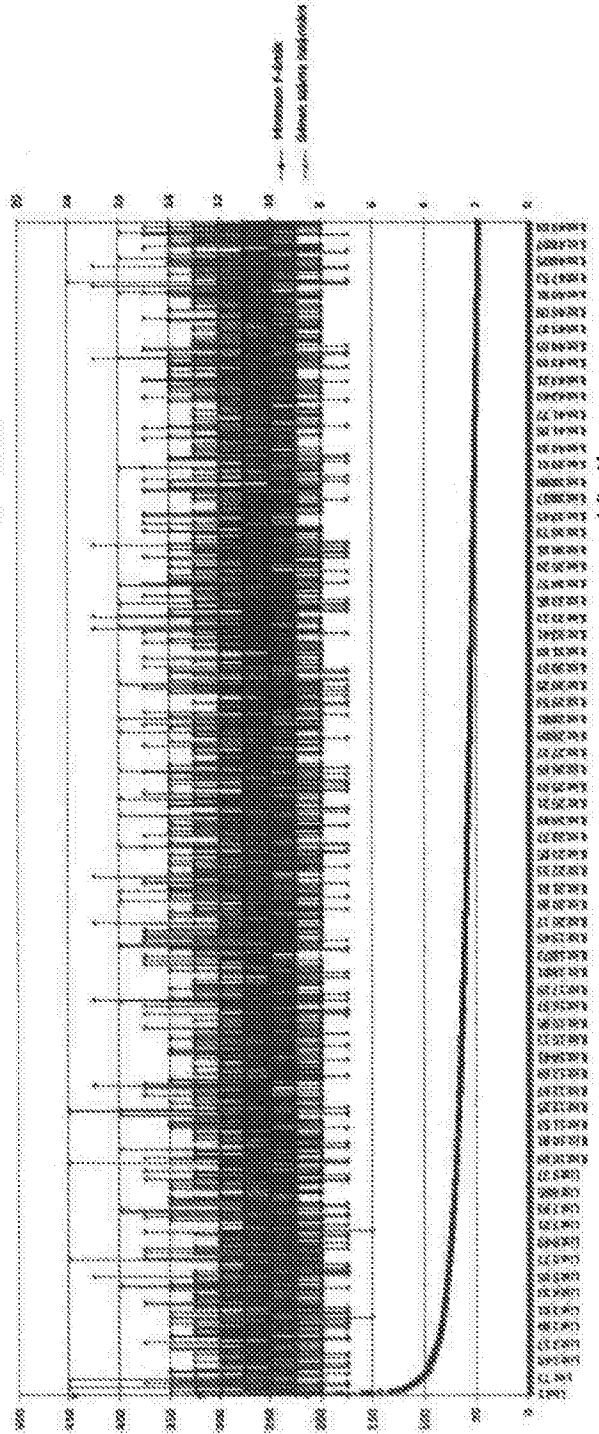
7. ábra



8. ábra

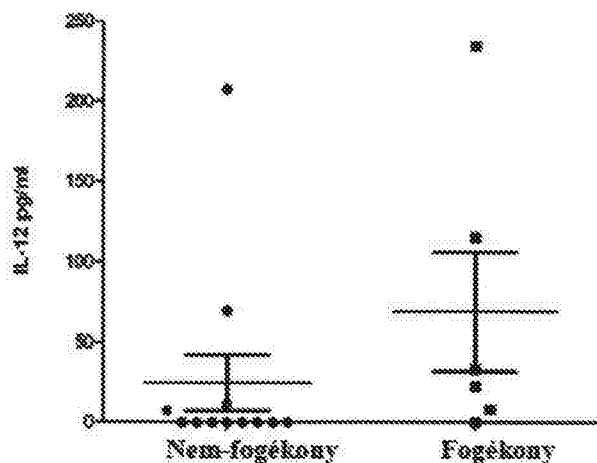


9. ábra

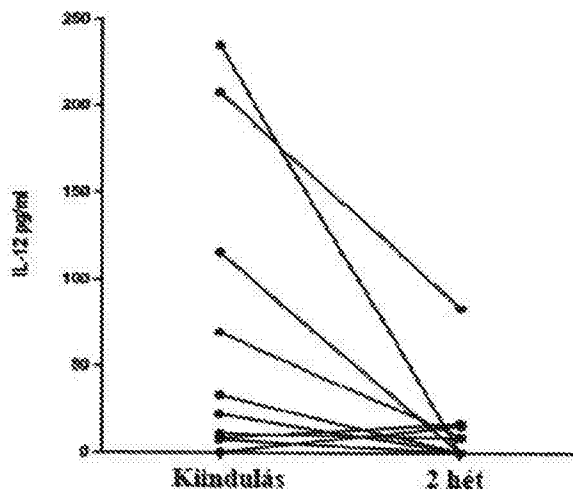


10. ábra

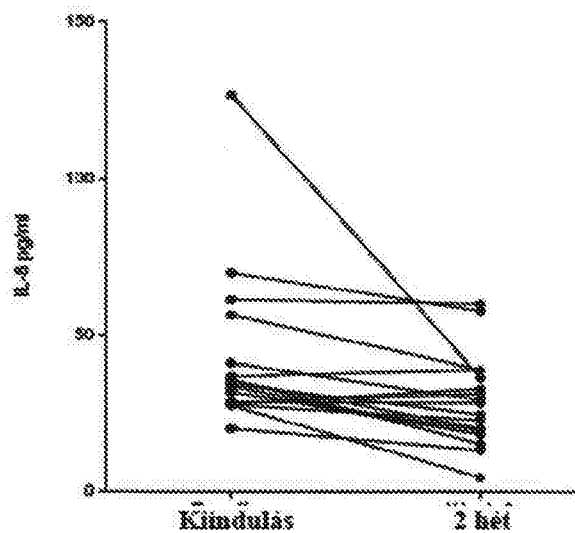
IL-12 kiindulási mennyisége (pg/ml)
reumatoid artritisz esetén
 $p=0,05$



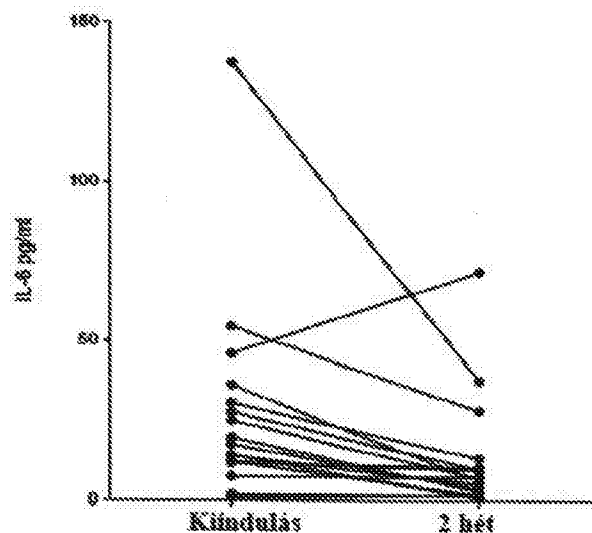
IL-12 mennyisége (pg/ml)
reumatoid artritisz esetén
 $p=0,05$



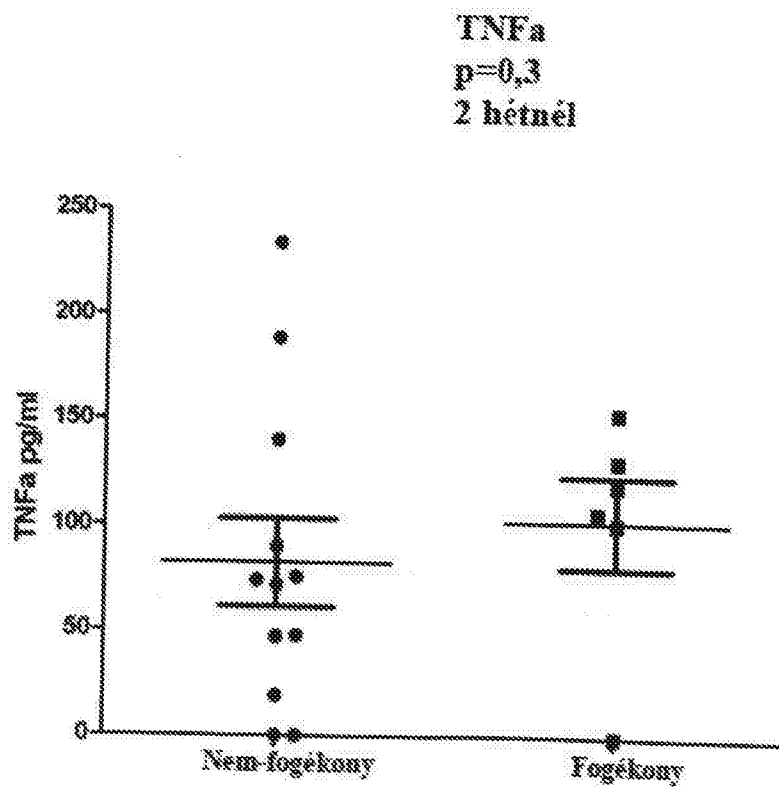
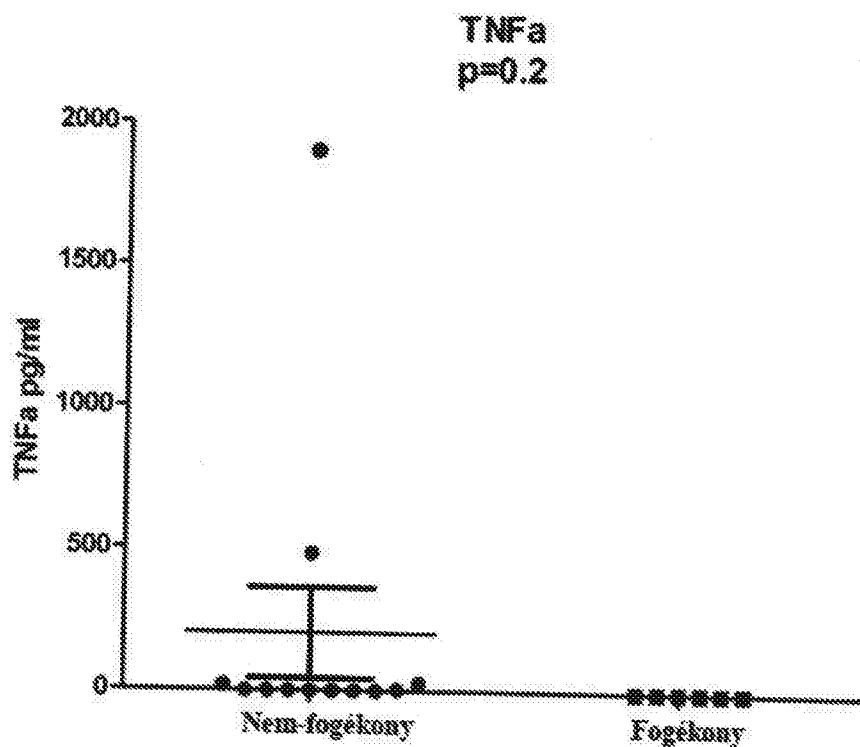
IL-8 mennyisége (pg/ml)
reumatoid artritisz esetén
 $p=0,01$

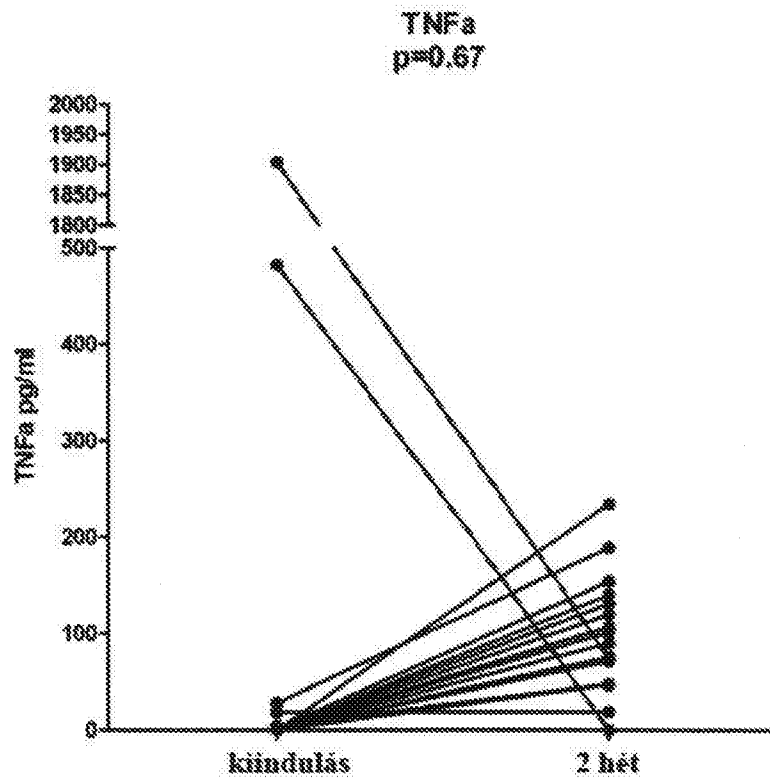


IL-6 mennyisége (pg/ml)
reumatoid artritisz esetén
 $p=0,03$

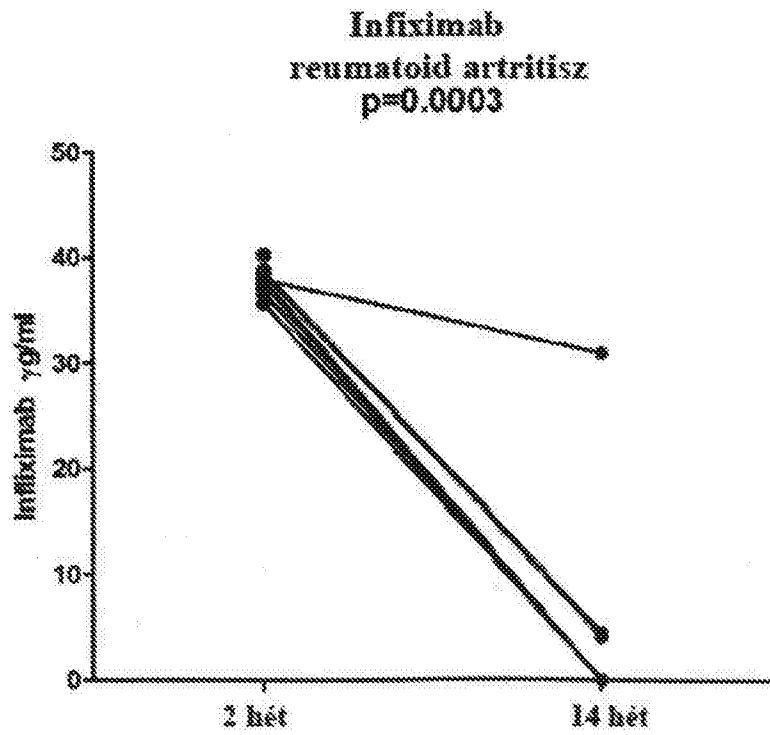


13. ábra

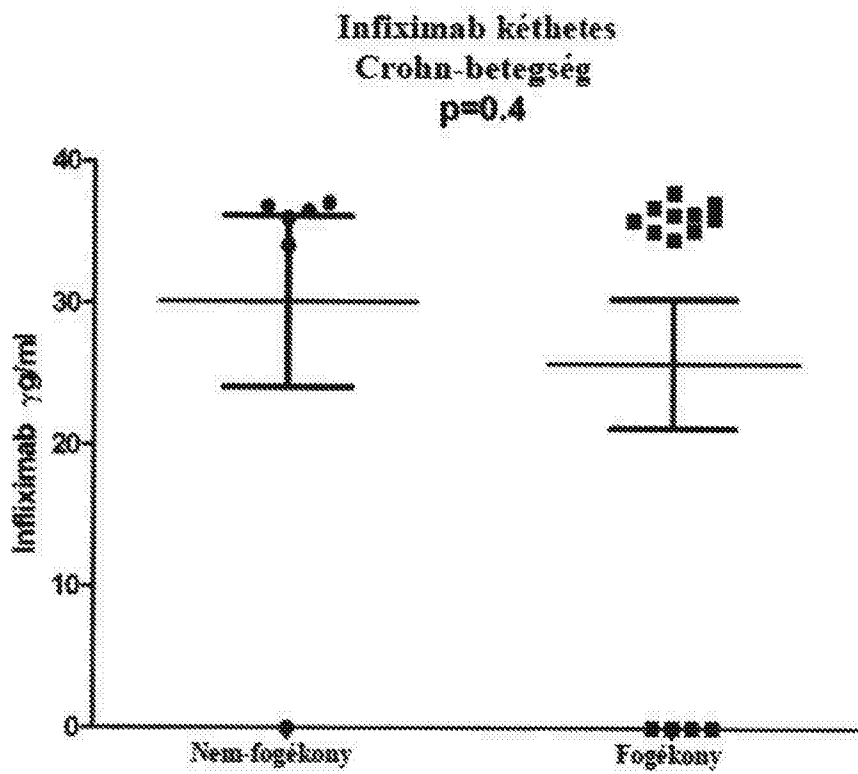




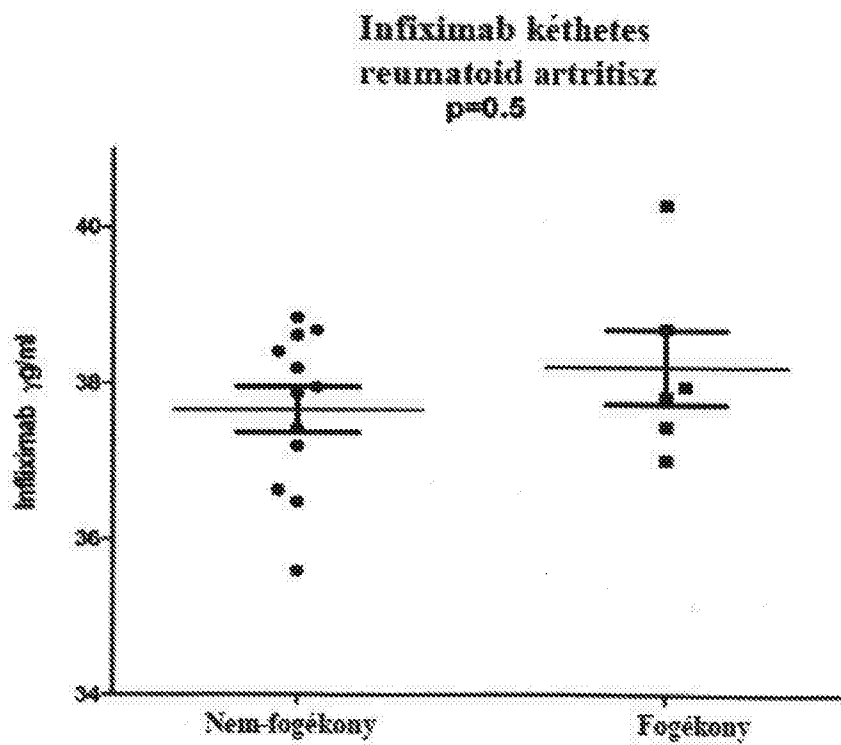
16. ábra



17. ábra



18. ábra



19. ábra