



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107002131 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 29

(21) 申请号 201580061352.0

(22) 申请日 2015.11.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107002131 A

(43) 申请公布日 2017.08.01

(30) 优先权数据
62/078,921 2014.11.12 US
62/083,432 2014.11.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.05.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/060061 2015.11.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/077408 EN 2016.05.19

(73) 专利权人 尼欧基因组学实验室股份有限公司
地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 M·阿尔比塔

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 康艳青 姚开丽

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

(56) 对比文件

WO 2013159035 A2,2013.10.24

WO 2011098901 A1,2011.08.18

CN 1814792 A,2006.08.09

CN 103451314 A,2013.12.18

M. Thangavelu 等.Molecular profiling in diagnosis and determing prognosis of “early” myelodysplastic syndrome.《The 64th annual Meeting of The American Society of Human Genetics》.2014,

P. L. GREENBERG 等.Molecular and genetic features of myelodysplastic syndromes.《International journal of laboratory hematology》.2011,第34卷(第3期),

ITZYKSON R 等.Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia.《J. CLINICAL ONCOLOGY》.2013,第31卷

审查员 颜泉梅

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

作为确认骨髓增生异常综合征诊断的可靠测试的外周血血浆DNA深度测序

(57) 摘要

提供了用于治疗、管理、诊断和监测骨髓增生异常综合征和其他血液系统恶性肿瘤的方法。这些方法包括对来自外周血血浆或血清的无细胞DNA进行的下一代测序分析。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
TET2	41				6					8	41	38	35		6	
CBL	29			45					73					35		
ASXL1	5						44			10	6				7	
U2AF1	32				6					9	18					
RUNX1			7		8			7							8	
IDH2				50	7					8					7	
SF3B1					5	38				19	10					
EZH2					7				41		7				7	
IDH1		50								13						19
TP53			7							9	7					
ETV6			5								6					
ZRSR2										6						

1. 采用下一代测序NGS分析患者外周血血浆或血清样品来源的无细胞DNA突变的试剂在制备用于诊断和监测骨髓增生异常综合征MDS的试剂中的用途，

所述采用下一代测序NGS分析患者外周血血浆或血清样品来源的无细胞DNA突变的试剂通过以下方法对无细胞DNA的一组MDS相关基因进行突变分析：

获得患者的外周血血浆或血清样品；

从所述样品中提取无细胞DNA；

采用NGS鉴定所述一组MDS相关基因的DNA点突变、DNA缺失、DNA插入和DNA易位，并且其中所述一组MDS相关基因包括ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2；并且

如果所述突变分析在所述无细胞DNA样品中检测到DNA点突变、DNA缺失、DNA插入和DNA易位的一个或多个，则确定MDS正在发展。

2. 根据权利要求1所述的用途，其中所述患者显示血细胞减少，但没有明显的核型异常。

3. 根据权利要求1所述的用途，其中所述突变的分析被定期重复以监测所述患者的进展。

4. 如权利要求1、2或3所述的用途，所述诊断和监测的方法进一步包括以下步骤：如果DNA点突变、DNA缺失、DNA插入和DNA易位的一个或多个在所述无细胞DNA样品中被检测到，则制定疾病管理计划。

5. 如权利要求4所述的用途，其中所述疾病管理计划包括选自给予生长因子、输血、去铁胺、促红细胞生成素、化疗剂、干细胞移植及其任何组合的程序。

6. 如权利要求5所述的用途，其中所述化疗剂选自由阿糖胞苷、伊达比星、托泊替康和氟达拉滨所组成的组。

作为确认骨髓增生异常综合征诊断的可靠测试的外周血血浆 DNA深度测序

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年11月11日提交的美国专利申请14/937,937、2014年11月24日提交的美国临时申请62/083,432和2014年11月12日提交的美国临时申请62/078,921的优先权权益,将其全部公开内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于诊断、监测、治疗和管理患有骨髓增生异常综合征和其他血液系统恶性肿瘤的患者的组合物和方法。

背景技术

[0004] 骨髓增生异常综合征(MDS)是一组异质性的以无效造血和发育异常为特征的克隆性血液系统障碍。在MDS中,基因组异常积累在造血干细胞中,作为多向分化损伤并且在早期阶段骨髓(BM)细胞凋亡的结果,导致不同严重程度的外周血细胞减少。该疾病的发病率和死亡率起因于血细胞减少或向急性骨髓性白血病的转化,它们都可能导致由血细胞功能障碍和减少引起的严重的传染病、贫血或出血。

[0005] 血细胞减少(低血细胞计数)起因于骨髓环境内的高细胞凋亡率以及随之发生的细胞向外周血液循环中释放的缺乏(北村(Kitamura)等人,2014;柯鲍(Kerbaudy)等人,2007)。诊断MDS可能具有挑战性,特别是在患者的症状包括血细胞减少而胚细胞不增加的早期阶段期间。有许多反应过程引起血细胞减少,包括药物反应、营养缺乏症或激素缺乏症、以及自身免疫性疾病或慢性感染。

[0006] 诊断MDS的主要标准是外周血细胞减少和发育异常的存在。然而,评价发育异常是主观性的,并且在没有骨髓活检的情况下可能是困难的。但是,适当且早期的诊断对于治疗和管理MDS的进展而言是非常重要的,因为如果在进展为白血病的阶段之前检测到MDS,则缓解的机会要高得多。

[0007] 在出现血细胞减少的患者中,应考虑MDS,但诊断的确认需要骨髓活检及形态学和细胞遗传学评价。MDS的诊断目前需要涉及血液学、形态学和细胞遗传学分析的多学科方法,并且由于仅有约一半的患者表现出细胞遗传学异常的事实可能难以实施。用于治疗MDS的疗法的选择主要取决于疾病严重程度和进展为更晚期疾病的风险。因此,准确预测预后的能力是患者护理的重要组成部分。

[0008] 当前的预后评分系统考虑核型异常和将MDS患者分为风险组的某些临床特征。一些核型异常有助于建立预后并且可以与特定的临床表型相关联。然而,超过一半的MDS患者具有正常的核型,并且具有相同染色体异常的患者保持临床异质性。当核型正常而胚细胞不增加时,依靠主观形态特征来确认MDS的诊断是极其困难的。

[0009] 分子评价可以有助于提供用于证实异常突变体克隆和确认MDS诊断的客观手段(伊日克逊(Itzykson)等人,2013;贝加尔(Bejar)等人,2011;哈弗洛奇(Haferlach)等人,

2014;托 (Thol) 等人,2012;马尔科瓦蒂 (Malcovati) 等人,2014)。由于外周血中的血细胞减少,从外周血细胞提取的DNA的分子研究可能无法以足够敏感性识别异常克隆;因此,从骨髓获得的样品被认为更可靠地检测分子异常并确认MDS的诊断。

[0010] 检测到的异常在预后和确定疗法上具有临床意义。此外,重要的是通过使用能够检测到可能决定总体预后的亚克隆的存在的敏感方法来测试患者(贝加尔 (Bejar) 等人,2013)。MDS是一种骨髓过度细胞凋亡疾病,因为造血细胞浸在血液中,来源于这种细胞凋亡的DNA在循环中是丰富的;这些细胞在细胞凋亡或坏死过程中通过血液以凋亡小体、外来体、微血管、或DNA-蛋白复合物的形式倾泻它们的内容物(贾尔斯 (Giles) 等人,2007)。

[0011] 需要一种可靠的准确方法来诊断MDS,特别是在早期阶段。这类方法将有助于识别将从MDS治疗中受益的患者。此外,由于当前的方法依赖于高侵袭性且令人痛苦的手术的骨髓活检,可以通过不需要从骨髓获得样品的程序来实现治疗和诊断的显著进步。

发明内容

[0012] 在一个实施例中,本发明提供了一种治疗患者的骨髓增生异常综合征 (MDS) 的方法,该方法包括以下步骤:通过进行突变分析来将该患者识别为MDS患者,该突变分析包括对来自患者的外周血血浆或血清的无细胞DNA的下一代测序 (NGS)。可以在不从患者获得骨髓样品的情况下进行这种方法。

[0013] 一个实施例提供了一种诊断和管理患者的方法。这种方法包括以下步骤:从该患者的外周血血浆或血清获得无细胞DNA样品;对该无细胞DNA样品进行突变分析,其中该突变分析包括选自下组的程序,该组由以下各项组成:下一步测序 (NGS)、聚合酶链式反应 (PCR)、杂交捕获及其任何组合;并且如果该突变分析在该无细胞DNA样品中检测到DNA突变,则向该患者给予用于管理选自下组的血液系统恶性肿瘤的治疗,该组由以下各项组成:骨髓增生异常综合征 (MDS)、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[0014] 一个实施例提供了一种诊断和管理患有MDS的患者的方法。这种方法包括以下步骤:从该患者的外周血血浆或血清获得无细胞DNA样品;对该无细胞DNA样品进行突变分析,其中该突变分析包括选自下组的程序,该组由以下各项组成:下一步测序 (NGS)、聚合酶链式反应 (PCR)、杂交捕获及其任何组合;并且如果该突变分析在该无细胞DNA样品中检测到DNA突变,则向该患者给予用于管理骨髓增生异常综合征 (MDS)、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤的治疗。

[0015] 该方法可以在疾病的非常早期阶段帮助诊断和管理患者,包括与健康对照相比骨髓胚细胞增加少于5%的患者。该方法也适用于出现血细胞减少但不表现明显的核型异常的患者。

[0016] 在一些实施例中,该突变分析是对MDS相关基因进行的,包括这样的基因,如ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、ZRSR2和这些基因的任何组合。向无细胞DNA样品在以下基因中的至少一个中显示突变的患者给予MDS治疗:ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2。可以使用各种治疗,包括生长因子、输血、去铁胺、促红细胞生成素、化疗剂、干细胞移植及其任何组合。

[0017] 另外的实施例提供了一种骨髓增生异常综合征 (MDS) 的管理和监测方法。这种方

法至少包括以下步骤：从一组出现血细胞减少的患者中选择患者；从该患者的血浆或血清中获得无细胞DNA样品；对该无细胞DNA样品进行MDS相关基因的突变分析；并且向无细胞DNA样品在这些MDS相关基因中包括一个或多个突变的患者给予用于管理MDS的治疗。MDS相关基因可以选自下组，该组由以下各项组成：ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、ZRSR2及其任何组合。

[0018] 在一些实施例中，在治疗开始后，重复从患者的外周血血浆获得无细胞DNA样品的步骤和对该无细胞DNA样品进行MDS相关基因的突变分析的步骤，并且其中如果在这些MDS相关基因中检测到另外的突变，则修饰该治疗。

[0019] 另外的实施例提供了一种诊断和监测患者的选自下组的血液系统恶性肿瘤的方法，该组由以下各项组成：MDS、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤及其任何组合。这种方法包括以下步骤：从该患者的外周血血浆样品或血清中提取无细胞DNA；使用下一代测序，在该无细胞DNA的一组MDS相关基因中进行突变分析，其中在该组MDS相关基因的一个或多个中检测到一个或多个突变指示该血液系统恶性肿瘤的存在；并且基于检测到一个或多个突变来确定该患者的治疗方案。在该方法的一些实施例中，MDS相关基因选自下组，该组由以下各项组成：ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、ZRSR2及其任何组合。

[0020] 另外的实施例利用来自患者的外周血血浆或血清的无细胞DNA的深度测序来诊断MDS。

[0021] 还提供了一种通过使用下一代测序(NGS)对外周血血浆中的无细胞DNA针对突变进行分析来诊断和监测患者的骨髓增生异常综合征(MDS)的方法。

附图说明

[0022] 图1是患者体内的MDS相关基因的突变分析。被分析的基因列在左栏。每位患者由第一行中从1到16的数字进行标识。通过桑格(Sanger)测序方法和NGS分析两者识别的点突变以黑色显示。通过NGS分析识别但在桑格测序方法中没找到的点突变以粗体加下划线显示。

[0023] 图2是比较来自外周血血浆的无细胞DNA样品和来自外周血血浆的基于细胞的DNA样品的等位基因频率的图。

具体实施方式

[0024] 本发明提供了一种可以对患者(包括非常早期阶段的MDS患者)针对骨髓增生异常综合征(MDS)进行诊断的方法。该测试通过使用下一代测序(NGS)检测和分析来自外周血血浆或血清的无细胞DNA样品，并且在不需要获得骨髓活检的情况下进行。在另外的实施例中，NGS可以与其他敏感测试(例如PCR(聚合酶链式反应)和杂交捕获)组合使用。在另外的实施例中，可以使用以下测试中的至少一种：NGS、PCR和杂交捕获。

[0025] 本发明还提供了一种可以对患者针对其他血液系统恶性肿瘤如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤进行诊断的方法。术语“血液系统恶性肿瘤”与术语“血癌”可互换地使用。这种方法可以在非常早期的阶段对患者进行诊断。该测试通过使用下一代测序(NGS)检测和分析来自外周血血浆或血清的无细胞DNA样品，并且在不需要获得骨髓活检的情况下进行。

[0026] 在另外的实施例中,NGS可以与其他敏感测试(例如PCR(聚合酶链式反应)和杂交捕获)组合使用。在另外的实施例中,可以使用以下测试中的至少一种:NGS、PCR和杂交捕获。

[0027] 另外的实施例提供了一种管理或治疗MDS和其他血液系统恶性肿瘤的方法,该方法包括以下步骤:对来自外周血血浆或血清的无细胞DNA样品进行突变分析。在这种方法中,突变分析包括下一代测序(NGS),其一些实施例中可以与PCR和杂交捕获组合进行。

[0028] 技术人员应认识到术语“治疗”在本公开中被广泛地理解,并且不需要从MDS或其他血液系统恶性肿瘤中完全治愈。术语“治疗”可以与术语“管理”可互换地使用。患者病况的任何改善或患者病况的任何稳定都被认为是治疗或管理。除了稳定化和/或改善之外,治疗或管理还可以包括延迟、减轻或控制MDS或其他血液系统恶性肿瘤的进展,即使不会导致疾病缓解。

[0029] 在一些实施例中,治疗或管理可以包括向被诊断为患有MDS或一些其他血液系统恶性肿瘤的患者的患者给予至少一种选自生长因子、输血、去铁胺、促红细胞生成素、化疗剂和干细胞移植的治疗剂。合适的生长因子包括但不限于粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、白介素-11和雄激素。合适的化疗剂包括但不限于阿糖胞苷。其他合适的化疗剂包括但不限于伊达比星、托泊替康和氟达拉滨。合适的干细胞包括但不限于成血干细胞。

[0030] 在一个实施例中,本方法包括在基因中筛选与MDS和其他血液系统恶性肿瘤相关的突变。此类基因可以包括以下基因中的至少一个:ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2。在一些实施例中,除了ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2中的任一者之外,还可以分析其他基因。

[0031] 应认识到的是,术语“MDS相关基因”被广泛地理解,并且包括已知在患有MDS的患者中突变的任何基因,包括此类其中的突变已经显示与MDS的发生、进展和/或预后相关的基因。

[0032] 应认识到的是,术语“血癌相关基因”被广泛地理解,并且包括已知在患有血液系统恶性肿瘤的患者中突变的任何基因,包括此类其中的突变已经显示与任何血癌的发生、进展和/或预后相关的基因。此类基因包括但不限于ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2。

[0033] 应进一步认识到的是,术语“MDS的早期阶段”应被广泛地理解,并且包括出现血细胞减少但没有检测到骨髓胚细胞的显著增加的患者。此类患者包括与健康对照相比胚细胞计数增加少于5%的那些。

[0034] 术语“突变”被广泛地理解,并且包括DNA点突变、缺失、插入和易位。术语“突变分析”应被广泛地理解,并且包括识别与健康对照相比DNA中以下突变中的至少一种:DNA点突变、DNA缺失、DNA插入和DNA易位。

[0035] 在一些优选实施例中,针对点突变进行突变分析,并且因此与使用核型分析程序的其他方法相比,这种方法具有技术优势,因为核型分析不太可能检测到点突变。因此,本方法提供了诊断核型不显示明显异常但疾病与点突变相关的患者的优势。

[0036] 在一些实施例中,针对点突变分析以下MDS相关基因中的至少一个:ASXL1、ETV6、

EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2。这些基因通过其基因库登录号和下表1中的描述进行标识。

[0037] 表1.MDS相关基因

[0038]	基因	登录	定义
	ASXL1	NM_015338	智人另外的性梳样转录调控因子 1 (ASXL1), 转录物变体 1, mRNA
	ETV6	NM_001987	智人 ets 变体 6 (ETV6), mRNA
	EZH2	NM_152998	智人 zeste 增强子同系物 2 (果蝇)(EZH2), 转录物变体 2, mRNA
	GNAS	NM_000516	智人 GNAS 复合基因座 (GNAS), 转录物变体 1, mRNA
	IDH1	NM_005896	智人异柠檬酸脱氢酶 1 (NADP+), 可溶的 (IDH1), 转录物变体 1, mRNA
	IDH2	NM_002168	智人异柠檬酸脱氢酶 2 (NADPH+), 线粒体的 (IDH2), 转录物变体 1, mRNA
[0039]	NRAS	NM_002524	智人成神经细胞瘤 RAS 病毒 (v-ras) 癌基因同系物 (NRAS), mRNA
	CBL	NM_05188	智人 Cbl 原癌基因, E3 泛素蛋白连接酶 (CBL), mRNA
	PTPN11	NM_080601	智人蛋白酪氨酸磷酸酶, 非受体类型 11 (PTPN11), 转录物变体 2, mRNA
	RUNX1	NM_001754	智人 runt 相关转录因子 1 (RUNX1), 转录物变体 1, mRNA
	SF3B1	NM_012433	智人剪接因子 3b, 亚单元 1, 155 kDa (SF3B1), 转录物变体 1, mRNA
	SRSF2	NM_001195427	智人富丝氨酸/精氨酸剪接因子 2 (SRSF2), 转录物变体 2, mRNA
	TET2	NM_001127208	智人 tet 甲基胞嘧啶双加氧酶 2 (TET2), 转录物变体 1, mRNA
	TP53	NM_001126113	智人肿瘤蛋白 p53 (TP53), 转录物变体 4, mRNA
	U2AF1	NM_1025203	智人 U2 核内小 RNA 辅助因子 1 (U2AF1), 转录物变体 b, mRNA
	ZRSR2	NM_005089	智人锌指 (CCCH 型), RNA 结合基序以及富丝氨酸/精氨酸 2 (ZRSR2), mRNA

[0040] 在另外的实施例中, 针对点突变分析以下MDS相关基因中的至少两个或更多个:

ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2。在另外的实施例中,针对点突变分析一组以下MDS相关基因:ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2。在一些实施例中,与指示MDS(例如血细胞减少、低血红蛋白、疲劳和/或发烧)的其他基因和/或其他异常组合地分析该组MDS相关基因。

[0041] 可从Illumina[®]获得的TruSight[™]骨髓测序面板(Myeloid Sequencing Panel)包括表1的MDS相关基因中的每个。关于表1的MDS相关基因的附加信息(包括序列表)可从国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。

[0042] 从骨髓测序面板中的54个靶基因中选择表1的MDS相关基因。本领域技术人员应意识到,可以选择另外的基因或不同的基因组合。本领域技术人员也应知晓,类似的面板可从许多其他供应商获得,包括安捷伦科技公司(Agilent Technologies)(ClearSeq AML)、集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies)(xGen[®] AML癌症面板)、ARUP实验室(ARUP Laboratories)、生命技术公司(Life Technologies)等。

[0043] 多种方法适用于检测MDS相关基因中的突变。在一些特别优选的实施例中,合适的方法选自非基于桑格的高通量DNA测序技术,缩写为下一代测序(NGS)。在NGS突变分析的一个实施例中,使用适配子,将输入DNA样品切割成短段并退火到载玻片上。进行PCR反应以扩增DNA拷贝数。然后使载玻片与荧光标记的核苷酸、终止子和DNA聚合酶反应。完成一个聚合循环,并拍摄该载玻片的图像。然后通过除去终止子制备下一个循环的载玻片,并且然后在DNA聚合过程中加入下一个碱基。重复该过程,在每次循环中加入一个核苷酸并在每次循环之后记录图像。然后使用计算机处理所捕获的图像并产生DNA序列。

[0044] 技术人员应认识到,可以进行NGS分析的许多其他修改。应进一步认识到的是,术语“NGS分析”被广泛地理解,并且包括通过将DNA样品粘附到固体底物上并且没有根据其长度通过电泳凝胶分离DNA分子进行的任何DNA测序方法。至少在一些实施例中,NGS分析可以用以下试剂盒中的至少一种来进行:可从亿明达公司(Illumina, Inc.)获得的ILLUMINA(SOLEXA) SEQUENCING[™]试剂盒、可从罗氏公司(Roche, Inc.)获得的ROCHE 454 SEQUENCING[™]、可从赛默飞世尔公司(ThermoFisher, Inc.)获得的ION TORRENT:PROTON/PGM SEQUENCING[™]和可从赛默飞世尔公司获得的SOLID SEQUENCING[™]。

[0045] NGS方案的另外的描述可以在如下文献中发现:R. 卢特拉(Luthra)等人,“使用MiSeq针对急性骨髓性白血病进行基于下一代测序的多基因突变筛选:对诊断和疾病监测的适用性(Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq:applicability for diagnostics and disease monitoring)”,血液病学(Haematologica),2014;99(3):465-473;和M.费尔南德斯-梅尔卡多(Fernandez-Mercado)等人,“在del(5q)骨髓增生异常综合征的骨髓障碍中通常突变的25个基因的靶向重排序分析(Targeted re-sequencing analysis of 25 genes commonly mutated in myeloid disorders in del(5q) myelodysplastic syndromes)”,血液病学,2013;98(12):1856-1864。A.莫里(Mori)等人,“下一代测序:免疫学和血液学新工具(Next generation sequencing:new tools in immunology and hematology)”,血液研究(Blood Res.),2013年12月;48(4):242-249中提供了NGS的详细综述。

[0046] 来自患者的各种样品可用于进行MDS相关基因的突变分析。此类样品可以包括来自外周血血浆的细胞和从外周血血浆或血清获得的无细胞DNA(缩写为cf-DNA)。在一些优选实施例中,用从外周血血浆或血清获得的无细胞DNA进行MDS相关基因的点突变分析。因此,本方法提供了向患有血细胞减少的患者提供诊断、治疗、管理和监测的显著技术优势,因为该方法具有高灵敏度并且不需要获得骨髓样品。

[0047] 如图1所示,已经出乎意料地发现,从外周血血浆或血清获得的无细胞DNA的MDS相关基因的NGS突变分析是识别需要MDS治疗的患者的更准确且灵敏的方法。被分析的MDS相关基因显示在图1的左栏,并包括表1中列出的MDS基因。

[0048] 图1报告了16位患者的NGS突变分析结果,在图1的表的第一行中每位患者用数字1至16进行标识。对NRAS外显子3、TET2外显子4和13-16、EZH2外显子10和11以及TP53外显子4进行NGS测序和桑格测序。通过在琼脂糖凝胶上跑胶,确认每个样品的扩增子。合并样品,并使用Illumina[®]实验管理器(Experiment Manager)生成数据表。MiSeq[™]报告器(Reporter)用于分析,且变体工作室(Variant Studio)用于调用。为了确认变体调用,使用NextGene(SoftGenetics公司,州立学院,宾夕法尼亚州)软件。跨整个编码区的平均测序覆盖率(X)为4000,占被测序扩增子的94%。这允许可靠地检测到3%的DNA中存在的突变。

[0049] 来自16位患有早期阶段MDS的患者的外周血血浆中的无细胞DNA的NGS测序显示出至少一个或多个突变基因,从而证实MDS的诊断。来自正常对照的外周血血浆中的无细胞DNA未显示出突变迹象。在8个(50%)样品中检测到另外的突变,这些另外的突变在使用桑格测序分析从全血提取的DNA时未被检测到(图1)。这些另外的突变以粗体加下划线的数字显示,而桑格和NGS测序检测到的突变以常规字体显示。数字表示以百分比计的DNA样品中的突变体等位基因频率。如可以从图1看出的,患者1体内基因ASXL1的突变体等位基因频率为5%。

[0050] 在16位患者中,5位(31%)完全不显示全血DNA异常。如果对全血进行桑格测序,这些样品可能被错误地识别为正常。通过NGS突变分析在外周血血浆中检测到的突变频率<15%,其通常低于桑格测序的检测水平,即使它们在全血DNA中以相同的频率存在。然而,如在通过NGS突变分析测试的样品中证实的,全血DNA中突变体DNA的水平或频率最有可能显著更低。

[0051] 如图2进一步所示的,也出乎意料地发现,与对来自外周血的DNA进行的突变分析相比,对外周血血浆无细胞DNA进行突变分析是一种灵敏地多得多的方法。

[0052] 如图2所示,对从全外周血中提取的5个DNA样品进行NGS突变分析。五个样品中有四个显示出与从外周血血浆无细胞DNA检测到的那些相同的结果。然而,一个样品在RUNX1中显示出7%的突变,这通过NGS在无细胞外周血血浆DNA中检测到,而在全血DNA中未检测到。

[0053] 更重要的是,如通过NGS分析检测到的,所检测到的突变的频率,血浆中的等位基因频率在来自外周血血浆的无细胞DNA中是显著($P=0.008$)更高的,表明更高的灵敏度和肿瘤DNA对血浆的富集(图2)。

[0054] 在一个实施例中,本发明提供了一种用于管理患有MDS的患者的方法,该方法包括不太复杂的、微创的且具有增加的灵敏度的MDS筛查测试。与常规测试相比,执行该测试所需的时间也减少了。

[0055] 在另外的实施例中,本发明提供了一种用于监测患有MDS的患者的方法,该方法包括不太复杂的、微创的且具有增加的灵敏度的MDS筛查测试。与常规测试相比,执行该测试所需的时间也减少了。术语“监测”应被广泛地理解,并且包括治疗完成的同时或之后进行测试以确定患者的疾病状态。监测方法允许医生确定治疗方案是否正在起作用以及是否需要另外的或不同的治疗。

[0056] 另外的实施例允许更快速地识别和启动适当的治疗方案以提供支持性护理以便缓解症状、减慢疾病进展和/或潜在地治愈疾病。

[0057] 可以向通过NGS突变分析诊断的患者给予的已知治疗包括输血治疗、红细胞生成刺激剂、抗生素、药物治疗、有或无干细胞治疗的化疗、进入临床试验或其组合。(A.M扎伊丹(Zeidan)等人,“骨髓增生异常综合征的当前疗法(Current therapy of myelodysplastic syndromes)”,血液研究(Blood Rev.)2013年9月;27(5):243-259)。

[0058] 本发明的方法有助于准确且更频繁地监测患者在治疗期间的进展和/或治疗的修饰,而不需要患者接受另外的骨髓穿刺手术。本发明的方法也大大改善了治疗完成后的随访测试。

[0059] 对外周血血浆或血清中的无细胞DNA使用多个MDS相关基因进行NGS分析,呈现了将患者识别或确认为MDS患者的客观测试。已经发现MDS患者体内的外周血血浆富含肿瘤特异性DNA。此外,血浆中无细胞DNA的突变分析可以检测到具有突变的亚克隆,并可以预测新克隆的出现。使用NGS对外周血血浆中无细胞DNA的分析提供了肿瘤负荷的重要数据,其可用于监测治疗和预测进展,并且也减少进行骨髓活检的需要。

[0060] 在基于来自外周血血浆或血清的无细胞DNA的突变分析的本方法之前,在不进行骨髓活检的情况下,疑似MDS患者的分子异常检测难以完成。当骨髓中的胚细胞计数在正常限度内时,诊断是主观性的,没有通过细胞遗传学或分子研究证实分子异常。

[0061] 由于外周血中的血细胞减少,检测外周血细胞中的分子异常可能是困难的,特别是在早期疾病中,即使当使用高度灵敏的方法时。本发明的方法的评价表明,即使当使用NGS突变分析时,也可能错过外周血细胞中突变的检测。相比之下,在NGS突变分析中使用来自外周血血浆的无细胞DNA更可靠地检测突变。

[0062] 外周血血浆或血清易于得到,并且将它用于诊断或确认MDS的潜力可以显著减少对骨髓活检的需求。

[0063] 尽管不希望受到理论的约束,外周血血浆富含肿瘤DNA的事实被认为是由于MDS中肿瘤细胞的相对高的细胞凋亡。这些肿瘤细胞在骨髓中死亡并在循环中释放其DNA。这种DNA最有可能处于凋亡小体、微血管或蛋白-DNA复合物的形式。

[0064] 在具有可能指示MDS的症状的患者体内的分子异常的证实对于确认诊断、预后和选择治疗途径而言非常重要。这对于患有早期MDS(骨髓中的胚细胞<5%)的患者而言尤其重要。在这组患者中,即使在进行骨髓穿刺和活检后,诊断仍然经常是推测性的。形态学变化可能是微妙的,并且细胞遗传学异常可能并不存在。

[0065] 随着MDS分子表征的最新进展,MDS的诊断在检测异常克隆的存在方面越来越依赖分子测试。此外,检测到的分子异常的类型可以提供用于预测预后以及确定临床过程和治疗的重要信息。

[0066] 另一方面,作为怀疑MDS诊断的主要表现症状的血细胞减少可以在几个反应过程

中看到,并且代表着确定是否需要骨髓活检的诊断困境。

[0067] 通过使用外周血细胞进行分子分析是确认MDS存在的一种可能的方法。然而,由于外周血中的血细胞减少,检测外周血细胞分子异常需要高灵敏度测试,并且NGS突变分析提供比桑格测序显著更好的灵敏度。阴性结果并不总是排除MDS的存在。

[0068] 在征得同意从具有小于5%胚细胞计数的MDS患者获得的样品中,本NGS突变分析在所有情况下都检测到异常,从而支持以下结论:本NGS突变分析是将患者识别为MDS患者的高度准确且灵敏的方法,即使在疾病的早期阶段。

[0069] 与外周血细胞DNA的桑格测序相比,使用无细胞DNA进行的NGS突变分析更准确且更灵敏。也已经确定,与对细胞DNA进行的NGS突变分析相比,血浆无血清DNA的NGS突变分析在检测分子异常和确认MDS诊断方面更为准确和灵敏。还已经出乎意料地发现,无细胞DNA较少被正常细胞DNA稀释并且较多被MDS特异性DNA富集。如图2所示,与使用NGS突变分析的细胞DNA相比,在无细胞DNA中检测到的显著 ($P=0.008$) 更高的突变体等位基因支持这一发现。

[0070] 前述研究(玛(Ma)等人,2009;叶(Yeh)等人,2009;玛等人,2008;玛等人,2007;罗杰斯(Rogers)等人,2004;艾哈迈德(Ahmed)等人,2003;吉拉尼(Jilani)等人,2003)显示,患有更晚期MDS的患者具有更多的循环无细胞DNA,因此在这些情况下,检测分子异常以确认MDS的诊断应该更容易。

[0071] 已经确定无细胞DNA比外周血细胞DNA更可靠地检测MDS患者体内的分子异常,即使当胚细胞计数小于5%时。此外,NGS突变分析比桑格测序更准确,并应被视为在识别患者为MDS患者并给予MDS治疗中分析无细胞DNA的首选方法。

[0072] 实例1.患者和样品

[0073] 从通过骨髓评价确认为患有MDS的16位患者并且从四位年龄匹配的正常对照中收集外周血(PB)样品。所有患者均具有<5%的胚细胞。

[0074] 从外周血血浆中提取无细胞DNA并且从PB细胞中提取细胞DNA。患者的特征列于表2中。

[0075] 表2.患者群体

[0076]

		数量
细胞遗传学	二倍体	13
	Del(6)(q21)	1
	三体 8	1
	综合的	1
性别	女性	7
	男性	9
	中值	范围
WBC	3.5	2.0-16.4
HGB	10.5	9.6-12.6

[0077]

MCV	102.8	91-106
血小板	103	74-194
%淋巴	26.9	14.3-52.4
%单核细胞	9.1	6.3-19.9
%多形核白细胞	59.7	37-77
年龄	73	53-92

[0078] 实例2.DNA分离

[0079] 根据制造商的说明书,使用NucliSens提取试剂盒(生物梅里埃公司(BioMerieux Inc.),达拉谟,北卡罗来纳州)从血浆中分离总核酸。根据制造商的说明书,使用QIAamp DNA血液迷你试剂盒(Blood Mini Kit)(凯杰公司(Qiagen),巴伦西亚,加利福尼亚州)分离来自PB细胞的DNA。

[0080] 实例3.基因测序

[0081] 使用桑格测序和NGS,在以下基因中分析突变:ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1和ZRSR2。使用标准方案进行桑格测序。引物对被设计为涵盖>90%的这些基因中报告的突变。纯化聚合酶链式反应(PCR)产物并使用ABI PRISM 3730XL遗传分析仪(应用生物系统公司(Applied Biosystems),福斯特市,加利福尼亚州)正向和反向测序。使用测序分析软件对测序数据进行碱基调用(base-called),并使用SeqScape软件(应用生物系统公司)进行组装和分析。

[0082] NGS使用亿明达MiSeq系统(圣地亚哥,加利福尼亚州)进行;NGS、扩增和标引按照制造商的推荐进行。通过琼脂糖凝胶跑胶,确认每个样品的扩增子。合并样品,并使用亿明达实验管理器生成实验表。MiSeq报告器用于分析,且变体工作室用于调用。为了确认变体调用,使用NextGene软件(SoftGenetics公司,州立学院,宾夕法尼亚州)。跨整个编码区的平均测序覆盖率为4,000,占被测序扩增子的94%。如果存在至少3%的突变体DNA,则这允许可靠地检测突变。

[0083] 实例4.使用无细胞DNA确认肿瘤异常MDS克隆的存在

[0084] 通过检查骨髓样品和完整的细胞遗传学和分子评估确认这16位患者患有MDS。患者的特征列于表2中。

[0085] 这16位患者中有一位患有慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML),并且其余患者患有难治性贫血。九位患者(56%)为男性。所有16位患者均患有难治性贫血,2位患有环形铁粒幼红细胞难治性贫血。骨髓的细胞遗传学数据显示一位具有综合异常,一位为三体8,并且一位染色体6的长臂缺失。在对血浆无细胞DNA进行NDS突变分析时,所有16位患者显示出至少1个突变基因,从而证实与MDS一致的异常克隆的存在。在来自正常对照个体的四个样品中都没有检测到异常。

[0086] 八位患者(50%)在一个基因中显示出突变,且其余8位患者(50%)在两个或更多个基因中显示出突变(图1)。

[0087] 实例5.无细胞DNA的NGS比外周血细胞DNA的桑格测序更灵敏

[0088] 16位患者中有五位(31%)具有通过无细胞DNA的NGS检测到的突变,而外周血细胞DNA的桑格测序显示无突变迹象。如果已经使用细胞DNA的桑格测序,则这些患者将被认为是MDS阴性的。其余11位患者中,3位(27%)显示出桑格测序未检测出的另外的突变。总体而言,16位患者中有8位(50%)通过NGS在血浆无细胞DNA中显示出通过桑格测序在全血DNA中未检测到的突变。

[0089] 通过NGS在无细胞DNA中检测到的而通过桑格测序在细胞DNA中未检测到的所有突变都具有<20%的等位基因频率(图1)。这可能解释了桑格测序的检测失败。通常,桑格测序的检测水平在15%与20%之间,而NGS测序大约为5%(陈(Chen)等人,2015)。

[0090] 实例6. 与使用细胞DNA相比,使用无细胞DNA的NGS更加灵敏

[0091] 由于NGS的检测水平显著优于桑格测序,所以使用NGS测试外周血细胞DNA,并与五个样品中以无细胞DNA获得的结果进行比较。五对中有四对(80%)显示出相同的结果,且一个样品在无细胞DNA中显示出7%的RUNX1突变,这在来自细胞DNA的DNA中未被检测到。

[0092] 最可能地,这反映了肿瘤特异性DNA对血浆的相对富集。为了证实这一点,将在无细胞DNA中检测到的突变体等位基因频率与在外周血细胞DNA中检测到的进行比较。如图2所示,无细胞DNA中突变体等位基因的水平显著高于来自外周血细胞的细胞DNA中的情况($P=0.008$)。这表明更高灵敏度和血浆中肿瘤DNA的富集(图2)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
TET2	41				6					8	41	38	35		6	
CBL	29			45					73					35		
ASXL1	5						44			10	6				7	
U2AF1	32				6					9	18					
RUNX1			7		8			7							8	
IDH2				50	7					8					7	
SF3B1					5	38				19	10					
EZH2					7				41		7				7	
IDH1		50								13						19
TP53			7							9	7					
ETV6			5								6					
ZRSR2										6						

图1

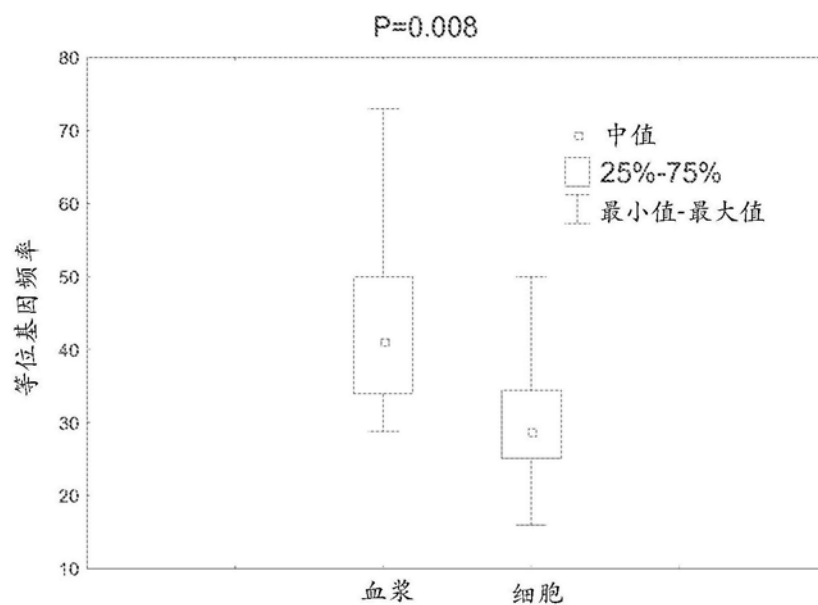


图2