

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244526 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433746**

(22) Data zgłoszenia: **2020.04.29**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.02 BUP 31/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.02.05 WUP 06/2024**

(51) MKP:

C12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU, Poznań, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ANNA JANKOWSKA, Poznań, PL
BŁAŻEJ RUBIŚ, Pałędzie, PL
ANNA SZCZERBA, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka, Kraków, PL

(54) Tytuł:

**Zestaw diagnostyczny do wykrywania komórek nowotworowych (CTC)
oraz jego zastosowanie do identyfikacji komórek nowotworowych**

PL 244526 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zestaw diagnostyczny do identyfikacji komórek nowotworowych oraz jego zastosowanie w medycynie, zwłaszcza podczas przeprowadzania wczesnej diagnostyki procesów nowotworzenia, przerzutowania i monitorowania leczenia.

Dotychczas głównym problemem profilaktyki i leczenia nowotworów pozostaje brak możliwości wystarczająco wczesnego wykrywania choroby – żadna z dotychczasowych strategii nie jest wystarczająco specyficzna i czuła. Stąd zaistniała potrzeba opracowania nowego zestawu diagnostycznego obejmującego najbardziej charakterystyczne i unikatowe, a jednocześnie uniwersalne markery choroby nowotworowej w postaci podjednostki beta hormonu gonadotropiny kosmówkowej oraz podjednostki enzymu telomerazy.

Podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG β) oraz katalityczna podjednostka enzymu telomerazy (hTERT) są markerami, które charakteryzują zarówno guzy pierwotne, przerzuty jak i komórki nowotworowe krążące we krwi pacjenta (CTC – ang. Circulating Tumor Cells). Stąd analiza obu jednocześnie może znaleźć zastosowanie w diagnostyce (pozwala na detekcję komórek nowotworowych z guzów, przerzutów oraz CTC), ocenie odpowiedzi na leczenie, długoterminowej obserwacji po leczeniu i prognozowaniu ewentualnej wznowy.

Ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG) jest hormonem zbudowanym z dwóch podjednostek: α (hCG α) i β (hCG β), produkowanym przez komórki łożyska.

Oprócz łożyska, rozrostów i nowotworów trofoblastu także szereg guzów różnego pochodzenia charakteryzuje zdolność wydzielania hCG, zwłaszcza jej podjednostki beta. Jej obecność wyróżnia przerzuty nowotworowe, w tym komórki raka krążące we krwi, oraz koreluje ze słabą odpowiedzią na leczenie i złym rokowaniem.

Przyjmuje się, że podstawowym efektem biologicznym działania hCG β w nowotworach jest zablokowanie procesów apoptozy, czyli programowanej śmierci komórek, co promuje ich wzrost i pozwala na rozwój guza. Wolna podjednostka beta przyczynia się także do neoangiogenezy tj. tworzenia nowych naczyń krwionośnych guza oraz prowadzi do uniewrażliwienia układu immunologicznego pacjenta na komórki nowotworowe. Ekspresja hCG β w komórkach nowotworowych promuje również tranzycję epithelialno-mezenchymalną (EMT – epithelialmesenchymal transition). Stransformowane komórki nabywają zdolności do inwazji i tworzenia przerzutów w odległych narządach. W trakcie EMT często dochodzi także do nabywania chemo- i radiooporności przez komórki odpowiedzialne za tworzenie przerzutów, co drastycznie zmniejsza szansę pacjentów na skorzystanie ze skutecznej terapii onkologicznej. Wolna podjednostka β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej jest także biomarkerem komórek raka krążących we krwi pacjentów – CTC. Obecność wolnej podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej we krwi lub moczu wykrywana jest wyłącznie w ciąży i w chorobie nowotworowej.

Biosynteza hCG wymaga ekspresji genów kodujących podjednostkę alfa i beta. Podjednostka alfa kodowana jest przez pojedynczy gen CGA, a podjednostka beta kodowana jest przez sześć allelicznych genów (CGB3, CGB5, CGB6, CGB7, CGB8, CGB9) znajdujących się w klastrze LHB/CGB. Ponadto, w rejonie LHB/CGB znajdują się jeszcze dwa geny CGB1 i CGB2, do niedawna uważane za pseudogeny. Produkty białkowe tych genów nie zostały dotychczas zidentyfikowane, jednak transkrypty CGB1 i CGB2 odnaleziono w tkankach prawidłowych takich jak: łożysko, jądra i przysadka mózgowa oraz zmienionych nowotworowo; do tej pory potwierdzono ich obecność w komórkach raka sutka, pęcherza moczowego oraz rakach jajnika.

Geny CGB cechuje różny poziom ekspresji. Najbardziej aktywnym transkrypcyjnie genem jest CGB5, z ekspresją wyższą nawet dwadzieścia razy, w porównaniu do pozostałych genów CGB. Poziom ekspresji CGB1 i CGB2 jest niższy niż ekspresja pozostałych genów aż tysiąc razy.

Mimo, że poziom ekspresji CGB1 i CGB2 jest nieproporcjonalnie niższy w porównaniu do całkowitej ekspresji pozostałych CGB, wykazano, że transkrypty tych genów odgrywają istotną rolę w procesie inwazji kosmówki i implantacji zarodka.

Związek ekspresji hCG β z nowotworzeniem jest dobrze udokumentowany, jednak dane literaturowe dotyczą najbardziej aktywnych transkrypcyjnie genów, takich jak CGB3, CGB5 i CGB8. Tymczasem najnowsze badania pokazują, że cząsteczką indukującą wzrost guza i zwiększającą potencjał metastatyczny komórek nowotworowych o działaniu autokrynnym może być produkt białkowy genów CGB1 i CGB2. O ile ekspresja CGB3-9 wydaje się cechować wszystkie rodzaje nowotworów, to aktywność transkrypcyjna CGB1-2 wyróżnia prawdopodobnie raki o podwyższonym potencjale metastatycznym.

Specyficzne zahamowanie ekspresji genów CGB1 i 2 in vitro jest znacznie bardziej skuteczne w zmniejszaniu liczby komórek rakowych niż wyciszanie pozostałych genów CGB. Dlatego to te geny można uznać za kluczowe dla rozwoju raka.

hTERT to katalityczna podjednostka enzymu telomerazy, której ekspresja jest charakterystyczna dla komórek nowotworowych. Ekspresja i aktywność telomerazy korelują z potencjałem proliferacyjnym oraz migracyjnym i adhezyjnym komórek nowotworowych.

Telomeraza jest złożonym kompleksem rybonukleoproteinowym utworzonym m.in. przez dwie kluczowe podjednostki – podjednostkę katalityczną (hTERT, ang. human telomerase reverse transcriptase) wykazującą aktywność odwrotnej transkryptazy oraz cząsteczkę RNA (hTR, z ang. human telomerase RNA) stanowiącą matrycę dla syntezy telomerów.

Telomeraza w ludzkich komórkach odpowiedzialna jest za syntezę wielokrotnie powtórzonej sekcjonukleotydowej sekwencji telomerowej 5'-TTAGGG-3' znajdującej się na końcach chromosomów. Enzym zapobiega tym samym skracaniu telomerów po każdym podziale komórkowym (wynik „problemu replikacji końca”); jego aktywność warunkuje zdolność do przeprowadzania podziałów komórkowych.

Ekspresja i aktywność telomerazy są ograniczone do bardzo niewielkiej liczby prawidłowych komórek człowieka (identyfikowana jest na niskim poziomie ekspresji w komórkach płodu w okresie rozwoju zarodkowego oraz w komórkach macierzystych: bazalnej warstwy naskórka, hematopoetycznych, krypt jelitowych oraz linii płciowej). Co najważniejsze jednak, telomeraza wykrywana jest w ponad 85% wszystkich nowotworów, wliczając w to komórki rakowe guza oraz komórki krążące we krwi.

Jak wykazano, aktywność telomerazy jest warunkowana między innymi przez obecność kluczowej podjednostki białkowej hTERT, stąd może ona stanowić dobry marker diagnostyczny, jak również potencjalny punkt uchwytu dla terapii przeciwnowotworowych.

W komórkach nowotworowych do znaczącego wzrostu biosyntezy telomerazy dochodzi dopiero po rozpoczęciu niekontrolowanych podziałów, już po znacznej utracie podjednostek telomeru. Z tego względu w komórkach nowotworowych, które w trakcie transformacji przeszły już szereg podziałów komórkowych, długość telomerów jest mniejsza niż w komórkach prawidłowych. Z kolei sam fakt skrócenia zakończeń chromosomów może powodować zmniejszenie stabilności genetycznej DNA, co może być kolejnym czynnikiem zaburzającym homeostazę komórki i prowadzącym do dalszych patologicznych zmian. Przywrócenie ekspresji i aktywności enzymatycznej telomerazy jest uznawane za krytyczny moment w procesie nowotworzenia. Zaktywowany kompleks telomerazy stabilizuje końce chromosomów, pozwalając tym samym na nabycie przez komórki nieśmiertelności (w kontekście nieograniczonej liczby podziałów). Samo unieśmiertelnienie nie oznacza fenotypu nowotworowego, jednakże sprzyja uzyskaniu przez komórkę cech nowotworowych. Wykrycie ekspresji i/lub aktywności telomerazy są możliwe już na wczesnym etapie rozwoju choroby nowotworowej, ale mogą również stanowić marker zmian resztkowych u chorych poddanych chemioterapii, dzięki czemu informują o skuteczności prowadzonego leczenia. Ekspresja katalitycznej podjednostki telomerazy hTERT jest także uznawana za charakterystyczną cechę komórek CTC.

Mimo odmienności nowotworów, a nawet różnorodności komórek w obrębie jednego guza, wszystkie typy raków aktywują określone geny, które zapewniają im przetrwanie, wzrost i rozprzestrzenianie się. Takimi genami są geny kodujące podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej i katalitycznej podjednostki telomerazy – CGB i hTERT. Dlatego zestaw diagnostyczny umożliwiający analizę ekspresji tych genów w komórkach nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem CTC, stanowi podstawę przedmiotu wynalazku.

CTC to komórki nowotworowe, które odrywają się od pierwotnego ogniska już na wczesnych etapach tworzenia guza, a po przedostaniu się do krwioobiegu są przenoszone do odległych narządów. Wykazano, że nawet guzy bez klinicznie zaznaczonej metastazy uwalniają do krwioobiegu komórki nowotworowe.

To właśnie rozsiew komórek nowotworowych jest uważany za jedną z ważniejszych przyczyn postępu choroby, niepowodzeń leczenia i, w konsekwencji, zgonów pacjentów. Proces metastazy związany jest z pozyskiwaniem przez komórki nowotworowe zdolności do funkcjonowania niezależnie od masy guza. Uważa się, że komórkami posiadającymi potencjał do zasiedlania nowych nisz w organizmie są inwazyjne komórki nowotworowe krążące we krwi. Stąd przyjmuje się, że ich obecność jest wyznacznikiem zaawansowania choroby i rozsiewu nowotworu z ogniska pierwotnego do odległych narządów. Stwierdzenie obecności CTC ma zatem istotne znaczenie w diagnostyce choroby nowotworowej, ocenie stanu jej zaawansowania i ewentualnego rozsiewu komórek nowotworowych, dzięki czemu

może pomóc w doborze odpowiedniej terapii. Identyfikacja CTC stwarza także możliwość monitorowania i modyfikacji prowadzonej terapii. Co równie istotne, monitoring taki może być prowadzony w mało inwazyjny dla pacjenta sposób – pozwala na identyfikację CTC wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od pacjenta. Dodatkowo, dzięki zaangażowaniu nowoczesnej metody opartej na łańcuchowej reakcji polimerazowej prezentowany wynalazek charakteryzuje się bardzo dużą czułością i wiarygodnością uzyskiwanych wyników.

Szacunkowo, już na wczesnych etapach nowotworzenia, z jednego grama tkanki nowotworowej do układu krążenia wydostaje się codziennie od 10 000 do 3 000 000 CTC. Zważywszy na fakt, że większość komórek CTC ginie, ich ostateczna liczba jest niewielka – jest to około 1–10 CTC na 1 ml pełnej krwi. Mimo to identyfikacja CTC jest możliwa, dzięki zastosowaniu metody qPCR, zapewniającej zwielokrotnienie sygnału pochodzącego z pojedynczej komórki. Sygnał ten stanowi ekspresja swoistych genów aktywnych w CTC.

Wykorzystanie markerów umożliwiających identyfikację CTC może stanowić przełom w diagnostyce nowotworów oraz monitorowaniu przerzutów nowotworowych i skuteczności terapii.

Opracowany nowy zestaw diagnostyczny pozwala na wczesną diagnostykę nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem procesów przerzutowania, opartą na identyfikacji CTC na podstawie badania aktywności genów CGB i hTERT.

Analiza ekspresji genów kodujących hCG β prowadzona jest dla dwóch grup genów CGB: (i) CGB3-9, najaktywniejszych transkrypcyjnie we wszystkich typach nowotworów oraz (ii) CGB 1–2, aktywnych w mniejszym odsetku guzów, charakteryzujących się podwyższonym potencjałem metastatycznym. Rozdzielenie badania tych grup genów może odegrać znaczącą rolę w diagnostyce raka, różnicując guzy agresywne od nieagresywnych.

Z europejskiego zgłoszenia patentowego nr EP2994540 (A2) znany jest sposób badania raka, który obejmuje wykrywanie i/lub pomiar produktu ekspresji genu CGB2 i/lub CGB1. Metody te mają zastosowanie do badań przesiewowych, diagnozowania lub monitorowania innych powszechnych nowotworów nabłonka, w tym raka pęcherza, piersi, szyjki macicy, okrężnicy, endometrium, nerek, płuc (w tym raka drobnokomórkowego płuca – SCLC), nosa/gardła, jamy ustnej/twarzy, jajnika, prostaty, trzustki, pochwy i sromu. Ujawniono także sposoby leczenia nowotworów poprzez obniżenie poziomu ekspresji CGB2 i CGB1 lub ich produktów.

W europejskim zgłoszeniu patentowym nr EP1108789 (A2) ujawniono natomiast metodę ilościowego wyrażania ekspresji mRNA, kodującego aktywne białko hTERT, które jest przydatne do diagnozowania i prognozowania raka.

Z kolejnego europejskiego zgłoszenia patentowego nr EP0687898 (A2) znany jest immunocytochemiczny test analityczny dla beta hCG w ustalonej próbce tkanek lub komórek, który jednolicie i niezawodnie wykazuje obecność hCG beta we wszelkiego rodzaju komórkach nowotworowych.

Z polskiego opisu patentowego nr PL233963 (B1) znany jest zestaw starterów i sond do wykrywania mutacji w genie BRCA1 oraz zastosowanie starterów i sond do genotypowania mutacji genu BRCA1 oraz wykrywania raka sutka.

Polskie zgłoszenie patentowe nr P401271 (A1) ujawnia sposoby i produkty znajdujące zastosowanie w diagnozowaniu genetycznej predyspozycji do chorób u ludzi i polega na ocenie czy w materiale biologicznym badanej osoby występuje specyficzna zmiana konstytucyjna w genie NBS1. Wynalazek obejmuje nową metodę diagnostyczną wykrywającą predyspozycję do agresywnego raka prostaty o złym rokowaniu oraz sposób i zestaw diagnostyczny dotyczący opracowania nowego markera złego rokowania dla raka stercza.

W kolejnym polskim zgłoszeniu patentowym nr P405648 (A1) ujawniono sposób diagnozowania raka wątroby i różnicowania raka wątrobowokomórkowego od przerzutów raka z jelita grubego do wątroby u pacjenta. Sposób obejmuje: – dostarczanie pochodzącej od pacjenta próbki biologicznej, – określenie ilości jednego lub więcej miRNA wybranego z grupy obejmującej miR-146a-5p, miR-125b-5p, miR-141-3p, miR-1269a w próbce biologicznej, – porównanie ekspresji miRNA z poziomem ekspresji miRNA otrzymywanym w grupie kontrolnej, w którym to sposobie u pacjenta diagnozuje się wystąpienie nowotworu i różnicuje jego podłoże, jeśli poziom ekspresji miRNA w próbce biologicznej jest zmieniony względem poziomu ekspresji obserwowanej w próbkach płynów biologicznych pochodzących od zdrowych pacjentów. Wynalazek dotyczy również zastosowania markera miRNA oraz zestawu zawierającego markery.

Z polskiego opisu patentowego nr PL234915 (B1) znany jest sposób wykrywania zwiększonego ryzyka zachorowania na raka nerki oraz zastosowania genotypowych wariantów genów GRHL1 i/lub GRHL2 i/lub GRHL3.

Pomimo istnienia w stanie techniki kompozycji czy testów diagnostycznych do identyfikacji komórek nowotworowych (w tym CTC), obejmujących zastosowanie analizy jednego genu czy markera nowotworowego celem wynalazku było opracowanie zestawu diagnostycznego, który łączyłby markery nowotworowe: hCGB i hTERT. Jednoczesna analiza markerów może znaleźć zastosowanie w diagnostyce, ocenie odpowiedzi na leczenie, długoterminowej obserwacji po leczeniu i prognozowaniu ewentualnej wznowy.

Nieoczekiwanie okazało się, że opracowany nowy zestaw diagnostyczny rozwiązuje następujące problemy techniczne:

1. niskiej wykrywalności CTC. Znane ze stanu techniki testy bazujące na wykrywaniu pojedynczych markerów nie pozwalają na identyfikację wszystkich komórek nowotworowych. Nie wszystkie komórki nowotworowe, przez wzgląd na dynamikę ich zmian morfologicznych i molekularnych, charakteryzuje ekspresja każdego z genów uważanych za markery nowotworowe, włączając w to CGB i hTERT. Dlatego zestaw diagnostyczny łączący dwa markery istotnie zwiększa szanse wykrycia komórek raka.
2. niskiej czułości. Zastosowanie metody ilościowego PCR, specyficznych starterów i sond umożliwiających wykrycie ekspresji badanych markerów na poziomie transkryptu znacznie podnosi czułość metody (w porównaniu do analiz opartych na pomiarach białka) i umożliwia wykrycie pojedynczej komórki nowotworowej.
3. niskiej specyficzności. Aktywność CGB i hTERT jest konieczna dla rozwoju nowotworu, ale poszczególne geny kontrolują odmienne funkcje komórkowe: CGB – blokowanie apoptozy, neoangiogenezę, utratę adhezyjności i migrację, unikanie rozpoznania przez komórki układu immunologicznego; hTERT – nieśmiertelność, tj. nieograniczoną proliferację, adhezyjność i migrację. Stąd panel obejmujący analizę aktywności genów CGB i hTERT pokrywa pełne spektrum procesów charakteryzujących nowotworzenie, na różnych etapach jego rozwoju.
4. braku uniwersalnych markerów nowotworzenia. Ze względu na fakt, że hCGB i hTERT kontrolują rozwój i metastazę różnych raków, niezależnie od pochodzenia, proponowana kompozycja umożliwia diagnostykę wszystkich typów złośliwych nowotworów.
5. braku możliwości przewidzenia przebiegu choroby i efektywności terapii. Proponowany zestaw diagnostyczny, dzięki badaniu obecności transkryptów genów CGB1-2, wyróżniające raki o zwiększonym potencjale metastatycznym, pozwala na wyodrębnienie raków agresywnych, co z kolei wpłynie na dobór odpowiedniej, skutecznej terapii (zastosowanie leczenia bardziej agresywnego lub eksperymentalnego).

Istotę wynalazku stanowi zestaw diagnostyczny do wykrywania krążących komórek nowotworowych (CTC) charakteryzujący się tym, że zawiera: parę starterów specyficznych względem genów CGB3/CGB9, CGB5, CGB6/CGB7 i CGB8 (CGB3-9): startery o sekwencji CGB3-9 F nr 1, CGB3-9 R nr 2 lub startery o sekwencji CGB3-9 F nr 3, CGB3-9 R nr 4 oraz

- parę starterów specyficznych względem genów CGB1 i CGB2: startery o sekwencji CGB 1/2 F nr 5, CGB 1/2 R nr 6 lub startery o sekwencji CGB 1/2 F nr 7, CGB 1/2 R nr 8
- i
- parę starterów specyficznych względem sekwencji mRNA katalitycznej podjednostki enzymu telomerazy hTERT: startery o sekwencji TERT F nr 9, TERT R nr 10 lub startery o sekwencji TERT F nr 11, TERT R nr 12.

Korzystnie, gdy zestaw dodatkowo zawiera sondę CGB1/2 o sekwencji nr 13 lub sondę CGB3-9 o sekwencji nr 14 lub sondę hTERT o sekwencji nr 15.

Korzystnie, gdy zestaw zawiera dodatkowo barwnik fluoroscencyjny wybarwiający dwuniciowy DNA.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie zestawu diagnostycznego określonego powyżej do diagnozowania in vitro nowotworów u ludzi poprzez identyfikację komórek CTC. Korzystnie diagnozowanie obejmuje nowotwory wybrane z grupy: rak piersi, rak jajnika, rak prostaty, rak jelita grubego, rak płuca.

Otrzymany według wynalazku zestaw diagnostyczny do identyfikacji komórek nowotworowych cechuje się: (i) wysoką wykrywalnością CTC – zważywszy na fakt, iż potwierdzenie ekspresji jednego

z badanych genów jest już wskazówką obecności CTC oraz, że nie wszystkie CTC charakteryzuje ekspresja CGB i hTERT jednocześnie, to zestaw diagnostyczny łączący oba markery pozwala na istotne zwiększenie wykrywalności tych komórek we krwi pacjenta; (ii) wysoką czułością wynikającą z zastosowania metody ilościowego PCR, specyficznych sond i starterów, co umożliwia wykrycie badanych markerów na poziomie pojedynczej komórki nowotworowej; (iii) wysoką specyficznością wynikającą z faktu, że poszczególne markery kontrolują odmienne funkcje komórkowe niezbędne dla wzrostu nowotworu na różnych etapach jego rozwoju; (iv) uniwersalnością, jako że hCGB i hTERT kontrolują rozwój i metastazę różnych raków, niezależnie od pochodzenia, zatem proponowana kompozycja umożliwia wykrywanie i diagnostykę wszystkich typów nowotworów; (v) możliwością wyodrębnienia raków o zwiększonym potencjale metastatycznym, co wpłynie na dobór odpowiedniej terapii.

Proponowany zestaw diagnostyczny daje również możliwość wczesnego rozpoznania nowotworu w sposób szybki, precyzyjny, czuły i małoinwazyjny; badanie opiera się na molekularnej analizie ekspresji genów metodą ilościowego PCR w CTC wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od pacjenta.

Należy podkreślić, że nie ma w diagnostyce równie uniwersalnego, specyficznego i czułego zestawu jak prezentowany wynalazek, który pozwala na bardzo wczesne wykrycie ewentualnych zmian nowotworowych w organizmie pacjenta. Ponieważ hCGB i hTERT biorą udział w kontroli szeregu procesów na różnych etapach rozwoju nowotworu, stanowią one zarówno marker rozwijającej się choroby nowotworowej, jak i przerzutów, zmian resztkowych czy wznowy u chorych poddanych chemioterapii/radioterapii, dzięki czemu informują o skuteczności prowadzonego leczenia.

Dzięki zastosowaniu technik opartych o amplifikację, tj. powielenie nawet niewielkich ilości materiału biologicznego (PCR), wynalazek pozwala na analizę obecności komórek raka krążących we krwi z o wiele większą czułością niż dotychczas stosowane metody, wliczając w to cytometrię przepływową czy testy typu ELISA, które opierają się na wykrywaniu białkowych produktów ekspresji genów, a zatem wymagające znacznie większych ilości materiału badawczego. Ponadto, wymienione powyżej metody opierają się przede wszystkim na wykrywaniu obecności markerów komórek nabłonkowych; tymczasem komórki nowotworowe odrywające się od guza, aby móc zasiedlić nową niszę, przechodzą proces transycji epithelialno-mezenchymalnej (EMT), co wiąże się z utratą białek epithelialnych, na których obecności zasadza się zdecydowana większość testów mających na celu wykrywanie CTC.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach wykonania i na podstawie przeprowadzanych badań jednocześnie nie ograniczając jego zakresu oraz w wykazie sekwencji, w którym:

sekwencje 16, 17 i 18 przedstawiają sekwencje mRNA genów CGB1 i CGB2 (dwa warianty transkrypcyjne genu) kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej zdeponowane w bazie danych NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information) oraz sekwencje, do których komplementarne są startery i sonda,

sekwencje 19–23 przedstawiają sekwencje mRNA genów CGB3, CGB5 CGB7 (dwa warianty transkrypcyjne genu) i CGB8 kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej zdeponowane w bazie danych NCBI oraz pozycje starterów i sond,

sekwencja 24 przedstawia sekwencję mRNA genu hTERT kodującego katalityczną podjednostkę enzymu telomerazy zdeponowaną w bazie danych NCBI oraz sekwencje, do których komplementarne są pary starterów i sonda.

Metodyka

Zestaw diagnostyczny według wynalazku opiera się na wykrywaniu przedstawionych poniżej markerów w jednej próbie za pomocą zestawu specyficznych starterów (i sond hydrolizujących) wykrywających ekspresję następujących genów: CGB1/CGB2 i CGB3-CGB9 i hTERT.

1. Identyfikacja transkryptów genów CGB1 i CGB2

Starter 1 CGB 1/2 F – sekwencja nr 5

Starter 1 CGB 1/2 R – sekwencja nr 6

LUB para starterów:

Starter 2 CGB 1/2 F – sekwencja nr 7

Starter 2 CGB 1/2 R – sekwencja nr 8

Sonda CGB1/2 – sekwencja nr 13

Obie pary starterów i sonda zostały zaprojektowane w sposób pozwalający na jednoczesne wykrycie mRNA obu genów, tj. CGB1 i CGB2. Dodatkowo ich specyfika umożliwia identyfikację obydwu znanych wariantów transkryptów genu CGB2.

2. Identyfikacja transkryptów genów CGB3-CGB9

Starter 1 CGB3-9 F – sekwencja nr 1

Starter 1 CGB3-9 R – sekwencja nr 2

LUB para starterów:

Starter 2 CGB3-9 F – sekwencja nr 3

Starter 2 CGB3-9 R – sekwencja nr 4

Sonda CGB3-9 R – sekwencja nr 14

Oznaczenie zdegenerowanych nukleotydów: S-G/C; Y-C/T (część starterów i sonda mają G lub C oraz C lub T w konkretnej lokalizacji podczas syntezy, tak by umożliwić detekcję obydwu wariantów transkrypcyjnych genu).

Startery zostały zaprojektowane w sposób pozwalający na jednoczesne wykrycie mRNA genów CGB3, CGB5 CGB7 (dwa warianty transkrypcyjne genu) i CGB8.

3. Identyfikacja transkryptu hTERT

Starter 1 TERT F – sekwencja nr 9

Starter 1 TERT R – sekwencja nr 10

LUB para starterów

Starter 2 TERT F – sekwencja nr 11

Starter 2 TERT R – sekwencja nr 12

Sonda: TERT P – sekwencja nr 15

Sekwencje par starterów i oligonukleotydowych sond dla poszczególnych markerów stanowiących zestaw służący do detekcji komórek nowotworowych zostały opracowane tak, by optymalne warunki reakcji były zbliżone do standardowo stosowanych w reakcji qPCR (PCR w czasie rzeczywistym).

Reakcja qPCR wykorzystuje polimerazę o aktywności egzonukleazy 5' do 3', co umożliwia detekcję sondy hydrolizującej.

Preferowaną metodą jest identyfikacja transkryptów za pomocą sondy, która hybrydyzuje do specyficznej sekwencji cDNA komplementarnej do mRNA badanego genu. Sonda od końca 5' wyznakowana jest odpowiednią cząsteczką fluorescencyjną, z kolei od końca 3' cząsteczką wygaszacza. Fluorochrom stanowi cząsteczka FAM 6-karboksyfluoresceina, cząsteczkę wygaszacza zaś BBQ Black-Berry Quencher.

Alternatywnym rozwiązaniem jest stosowanie wymienionych par starterów do amplifikacji fragmentów transkryptów badanych genów w obecności barwnika fluorescencyjnego, który wiąże dwuniciowe struktury DNA, np. SybrGreen.

Poziom ekspresji badanych genów może być określany względem genu referencyjnego i/lub krzywej standardowej w sposób odpowiednio względny lub bezwzględny.

W celu amplifikacji DNA badanego markera reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerach zapewniających odczyt fluorescencji.

Profil termiczny reakcji qPCR:

I aktywacja polimerazy – optymalnie: 95°C, 5 – 15 min

II 45 cykli:

1. 94 – 95°C, 10 – 20 s

2. 55 – 65°C, 10 – 30 s*

3. 72°C, 1 – 10 s**

III 4°C, 10 s lub bez ograniczenia; aż do schłodzenia próbek

* *zależne od zestawu odczynników i sekwencji zastosowanych starterów*

** *na tym etapie następuje pomiar fluorescencji*

Ocena ekspresji badanego genu polega na wykryciu w mieszaninie reakcyjnej jego unikatowej sekwencji reprezentowanej przez specyficzny transkrypt czyli mRNA.

Aby prawidłowo ocenić ekspresję genu, najpierw należy przeprowadzić reakcję odwrotnej transkrypcji, w wyniku której na matrycy mRNA uzyskuje się tzw. DNA komplementarny, cDNA (ang. complementary DNA). Ocena obecności i ilości tego cDNA jest miarą ekspresji badanego genu.

Metoda qPCR pozwala obliczyć początkową liczbę kopii badanego cDNA. Reakcja przebiega w ten sposób, że z każdym kolejnym cyklem ilość powstającego specyficznego produktu (liczba kopii cDNA) ulega podwojeniu. Wynik testu jest prezentowany za pomocą oprogramowania komputerowego jako wartość Cq (ang. quantification cycle). Przyrost liczby kopii produktu jest monitorowany, ale dopiero od momentu osiągnięcia poziomu detekcji, czyli momentu, w którym, w trakcie powielania cDNA, poziom fluorescencji znacznika kwasu nukleinowego przekroczy próg nazywany Cq. Im wcześniej poziom fluorescencji wzrasta do poziomu, który umożliwia wiarygodny odczyt, tym większa jest początkowa liczba

kopii badanej sekwencji w próbce na początku reakcji. Tym samym, im mniejsza wartość C_q , tym wyższy poziom ekspresji badanego genu. Za próbę o zerowej ekspresji ($C_q = 0$ – brak ekspresji badanego genu) uznaje się taką, w której amplifikacja specyficznego cDNA nie zachodzi (poziom fluorescencji nie przekracza poziomu progowego) lub zachodzi dopiero po 40. cyklu reakcji qPCR.

Na bazie tego prostego algorytmu oznaczane są różnice w poziomie ekspresji poszczególnych genów między badanymi próbkami (Tab. 1).

Tabela 1. Ocena wyników reakcji qPCR

Amplifikacja	Wynik	Ekspresja genu
$C_q \leq 39$. cyklu	pozytywny	stwierdzona*
$C_q = 40$. Cykl	wątpliwy	wątpliwa
$C_q > 40$. Cyklu	negatywny	Brak
brak fluorescencji ($C_q = 0$)	negatywny	Brak

* im niższa wartość C_q , tym wyższa ekspresja genu

Przeprowadzono szereg reakcji sprawdzających poprawność działania poszczególnych par starterów i sond molekularnych pozwalających na identyfikację ekspresji genów CGB i hTERT w ludzkich tkankach. W każdym z przeprowadzonych eksperymentów matrycę do reakcji qPCR stanowił cDNA. cDNA otrzymano według standardowego protokołu reakcji syntezy, wykorzystując RNA wyizolowany z badanej tkanki. W każdym eksperymencie zastosowano kontrolę negatywną, którą stanowiła prawidłowa tkanka (pobierana podczas operacji wykonywanych z przyczyn innych niż złośliwy nowotwór). Jedynie w przykładzie 1 w kontroli negatywnej matrycę zastąpiono wodą.

Jak opisano w przykładach wykonania, wykrywanie transkryptów może się odbywać za pomocą różnych metod: z zastosowaniem sond hydrolizujących lub z wykorzystaniem fluorescencyjnych barwników DNA (np. Sybr Green).

Ocena ekspresji genów CGB (CGB1-2 i CGB3-9) oraz hTERT opierała się na wartości C_q . Im niższa wartość C_q , tym wyższa ekspresja danego genu.

W przedstawionych poniżej przykładach użycia wynalazku każdy wynik $C_q < 40$. cyklu świadczy o ekspresji badanego genu. $C_q > 40$. cyklu lub $C_q = 0$ jednoznacznie świadczy o braku ekspresji.

Przykład 1

Celem badania było stwierdzenie, czy za pomocą opracowanego zestawu diagnostycznego można wykryć mRNA genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance guza piersi. Przygotowano standardową mieszaninę reakcyjną dla metody qPCR; dla oceny ekspresji badanych genów zastosowano startery i sondy, które przedstawiono w Tab. 2.

Tabela 2. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 1

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 1 CGB1/2 F sekwencja nr 5	Starter 1 CGB1/2 R sekwencja nr 6	Sonda CGB1/2 sekwencja nr 13
CGB3-9	Starter 1 CGB3-9 F sekwencja nr 1	Starter 1 CGB3-9 R sekwencja nr 2	Sonda CGB3-9 sekwencja nr 14
hTERT	Starter 1 TERT F sekwencja nr 9	Starter 1 TERT R sekwencja nr 10	Sonda hTERT sekwencja nr 15

Matrycę (czyli cDNA) do reakcji qPCR otrzymano wykorzystując całkowite RNA wyizolowane z tkanki złośliwego guza piersi. Kontrola negatywna reakcji zawierała wodę dodaną w miejsce matrycy. W wyniku przeprowadzonych reakcji potwierdzono aktywność genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance guza piersi – wyniki przedstawiono w Tab. 3.

Tabela 3. Wyniki reakcji qPCR potwierdzające ekspresję genów markerowych.
Badanie przeprowadzono na tkance raka piersi

ekspresja genu	wartość C _q	
	badana tkanka: guz piersi	kontrola negatywna – H ₂ O
CGB1-2	29	0
CGB3-9	27	0
hTERT	29	0

Otrzymane wartości C_q potwierdzają obecność komórek nowotworowych, reprezentowanych przez transkrypty poszczególnych badanych genów w badanej tkance i mogą świadczyć o zwiększonym potencjale metastatycznym komórek guza piersi. Wartość C_q równa zero, która oznacza brak ekspresji badanych genów, w przypadku kontroli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) zastąpiła woda świadczy o prawidłowo przeprowadzonym eksperymencie.

Przykład 2

Celem badania było stwierdzenie, czy wykorzystując alternatywne warianty starterów można potwierdzić aktywność genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance guza piersi. Postępowano tak jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że użyto innego zestawu starterów (Tab. 4.); matrycą w reakcji qPCR, tak jak w przykładzie 1, było cDNA z tkanki złośliwego guza piersi.

Tabela 4. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 2

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 2 CGB1/2 F sekwencja nr 7	Starter 2 CGB1/2 R sekwencja nr 8	Sonda CGB1/2 sekwencja nr 13
CGB3-9	Starter 2 CGB3-9 F sekwencja nr 3	Starter 2 CGB3-9 R sekwencja nr 4	Sonda CGB3-9 sekwencja nr 14
hTERT	Starter 2 TERT F sekwencja nr 11	Starter 2 TERT R sekwencja nr 12	Sonda hTERT sekwencja nr 15

W wyniku reakcji qPCR przeprowadzonych z wykorzystaniem alternatywnego zestawu starterów uzyskano wyniki potwierdzające aktywność transkrypcyjną genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance guza piersi (Tab. 5) na takim samym poziomie dla poszczególnych genów jak w przykładzie 1 (czego dowodzą wartości C_q). Pokazuje to, że oba zestawy starterów dla każdego z genów zostały zaprojektowane prawidłowo i wykazują ten sam poziom ekspresji dla poszczególnych genów.

Tabela 5. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na tkance guza piersi

ekspresja genu	wartość C _q	
	badana tkanka: guz piersi	kontrola negatywna: H ₂ O
CGB1-2	29	0
CGB3-9	27	0
hTERT	29	0

Przykład 3

Celem badania było stwierdzenie, czy za pomocą opracowanego zestawu diagnostycznego można potwierdzić aktywność transkrypcyjną genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance guza jajnika. Zastosowano skład zestawu diagnostycznego podany w Tab. 6. Badaną próbę stanowiła tkanka raka jajnika. Kontrolę negatywną stanowiła tkanka jajnika niezmiennego nowotworowo.

Tabela 6. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 3

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 2 CGB1/2 F sekwencja nr 7	Starter 2 CGB1/2 R sekwencja nr 8	Sonda CGB1/2 sekwencja nr 13
CGB3-9	Starter 1 CGB3-9 F sekwencja nr 1	Starter 1 CGB3-9 R sekwencja nr 2	Sonda CGB3-9 sekwencja nr 14
hTERT	Starter 2 TERT F sekwencja nr 11	Starter 2 TERT R sekwencja nr 12	Sonda hTERT sekwencja nr 15

W wyniku przeprowadzonych reakcji uzyskano wyniki (Tab. 7) potwierdzające aktywność transkrypcyjną genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance guza jajnika.

Tabela 7. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na tkance guza jajnika

ekspresja genu	wartość Cq	
	badana tkanka: guz jajnika	kontrola negatywna: zdrowy jajnik
CGB1-2	25	0
CGB3-9	25	0
hTERT	30	0

Stosunkowo wysokie wartości Cq otrzymane w przypadku analizy ekspresji genów CGB mogą świadczyć o zwiększonej złośliwości komórek raka jajnika. Wykonany eksperyment nie wykazał aktywności transkrypcyjnej genów CGB i hTERT w jajniku niewykazującym zmian nowotworowych. Wartość Cq=0 dla kontroli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) reakcji qPCR uzyskano z tkanki jajnika bez zmian nowotworowych potwierdza założenia wynalazku: w prawidłowej tkance jajnika brak ekspresji genów CGB i hTERT.

Przykład 4

Celem badania było stwierdzenie, czy za pomocą opracowanego zestawu diagnostycznego można potwierdzić aktywność transkrypcyjną genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w krwi pacjentki z rakiem piersi, wskazującą na obecność komórek raka krążących we krwi (CTC). Zastosowano skład zestawu diagnostycznego podany w Tab. 8. Badaną próbę stanowiły komórki krwi pacjentki z rakiem piersi. Kontrolę negatywną stanowiła krew zdrowej ochotniczki.

Tabela 8. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 4

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 1 CGB1/2 F sekwencja nr 5	Starter 1 CGB1/2 R sekwencja nr 6	Sonda CGB1/2 sekwencja nr 13
CGB3-9	Starter 2 CGB3-9 F sekwencja nr 1	Starter 2 CGB3-9 R sekwencja nr 2	Sonda CGB3-9 sekwencja nr 14
hTERT	Starter 1 TERT F sekwencja nr 9	Starter 1 TERT R sekwencja nr 10	Sonda hTERT sekwencja nr 15

Wyniki reakcji qPCR przedstawiono w tabeli 9. Wykazują one aktywność genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz genu hTERT w krwi pacjentki z rakiem. Nie wykazano aktywności badanych genów w krwi zdrowej ochotniczki.

Tabela 9. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na krwi pacjentki z rakiem piersi

ekspresja genu	wartość C _q	
	badana tkanka: krew pacjentki z rakiem piersi	kontrola negatywna: krew zdrowej ochotniczki
CGB1-2	32	0
CGB3-9	29	0
hTERT	32	0

Potwierdzenie ekspresji genów CGB i hTERT w krwi pacjentki z rakiem piersi świadczy o obecności komórek raka krążących we krwi (CTC). Obecność tych komórek jest z kolei wyznacznikiem metastazy. Wartość C_q=0 w kontroli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) do qPCR uzyskano z komórek krwi zdrowej ochotniczki potwierdza założenia wynalazku: w krwi zdrowej osoby brak ekspresji genów CGB i hTERT.

Przykład 5

Celem badania było stwierdzenie, czy za pomocą opracowanego zestawu diagnostycznego można potwierdzić aktywność transkrypcyjną genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w komórkach obecnych w wysięku z opłucnej pacjenta ze stwierdzonym drobnokomórkowym rakiem płuca. Zastosowano skład zestawu diagnostycznego podany w tabeli 10. Badaną próbę stanowiły komórki obecne w wysięku z opłucnej pacjenta ze stwierdzonym drobnokomórkowym rakiem płuca. Kontrolę negatywną reakcji stanowiło cDNA uzyskane na matrycy RNA wyizolowanego z komórek obecnych w wysięku z opłucnej pacjenta leczonego z przyczyn innych niż nowotwór.

Tabela 10. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 5

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 2 CGB1/2 F sekwencja nr 7	Starter 2 CGB1/2 R sekwencja nr 8	Sonda CGB1/2 sekwencja nr 13
CGB3-9	Starter 2 CGB3-9 F sekwencja nr 3	Starter 2 CGB3-9 R sekwencja nr 4	Sonda CGB3-9 sekwencja nr 14
hTERT	Starter 1 TERT F sekwencja nr 9	Starter 1 TERT R sekwencja nr 10	Sonda hTERT sekwencja nr 15

W wyniku przeprowadzonych reakcji qPCR uzyskano wyniki (Tab. 11) potwierdzające aktywność transkrypcyjną genów CGB 1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w komórkach uzyskanych z wysięku z opłucnej pacjenta z rakiem płuca. W kontroli negatywnej – w komórkach obecnych w wysięku z opłucnej pacjenta leczonego z przyczyn innych niż nowotwór, geny CGB i hTERT nie były aktywne transkrypcyjnie (Tab. 11).

Tabela 11. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na komórkach izolowanych z wysięku z opłucnej pacjenta z rakiem płuca i pacjenta bez zmian nowotworowych

ekspresja genu	wartość C _q	
	badana tkanka: wysięk z opłucnej pacjenta z rakiem	kontrola negatywna: wysięk z opłucnej pacjenta bez raka
CGB1-2	34	0
CGB3-9	28	0
hTERT	33	0

Potwierdzenie ekspresji genów CGB i hTERT w komórkach uzyskanych z wysięku z opłucnej pacjenta z rakiem płuca świadczy o obecności komórek raka w badanym płynie. Wartość C_q=0 w kon-

troli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) do qPCR uzyskano z komórek pacjenta leczącego się z przyczyn innych niż nowotwór potwierdza założenia wynalazku: w wysięku pacjenta nie chorującego na nowotwór brak ekspresji genów CGB i hTERT.

Przykład 6

Celem badania było stwierdzenie, czy za pomocą opracowanego zestawu diagnostycznego można zaobserwować aktywność genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT bez użycia sond hydrolizujących. Zastosowano zestaw starterów identyczny jak w przykładzie 1., różnicą było to, że do mieszanin reakcyjnych wykrywających aktywność transkrypcyjną genów CGB1-2, CGB3-9 i hTERT nie dodano odpowiednich sond (Tab. 12.); wyniki reakcji były identyfikowane dzięki zastosowaniu fluorescencyjnego barwnika Sybr Green. Badaną próbę stanowiła tkanka złośliwego guza jelita grubego. Kontrolę negatywną reakcji stanowiła tkanka jelita grubego bez zmian nowotworowych.

Tabela 12. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 6

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 1 CGB1/2 F sekwencja nr 5	Starter 1 CGB1/2 R sekwencja nr 6	Sybr Green
CGB3-9	Starter 1 CGB3-9 F sekwencja nr 1	Starter 1 CGB3-9 R sekwencja nr 2	Sybr Green
hTERT	Starter 1 TERT F sekwencja nr 9	Starter 1 TERT R sekwencja nr 10	Sybr Green

W wyniku przeprowadzonych reakcji qPCR uzyskano wyniki (Tab. 13.) wskazujące na aktywność genów CGB 1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance guza jelita z wykorzystaniem zestawu starterów jak w przykładzie 1., jednak z zastosowaniem barwnika Sybr Green. W prawidłowej tkance jelita grubego nie stwierdzono aktywności transkrypcyjnej badanych genów.

Tabela 13. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na tkance guza jelita grubego

ekspresja genu	wartość Cq	
	badana tkanka: guz jelita	kontrola negatywna: tkanka jelita niezmiennego nowotworowo
CGB1-2	26	0
CGB3-9	23	0
hTERT	24	0

Potwierdzenie ekspresji genów CGB i hTERT w komórkach uzyskanych z tkanki guza jelita grubego świadczy o: (i) obecności komórek nowotworowych w badanym guzie jelita oraz fakcie, że (ii) ekspresję badanych genów można zidentyfikować również bez zastosowania sondy hydrolizującej, jedynie z użyciem specyficznych starterów i barwnika DNA. Ponadto, niskie wartości Cq otrzymane w przypadku analizy ekspresji badanych genów mogą świadczyć o zaawansowaniu i/lub zwiększonej złośliwości badanego nowotworu. Wartość Cq=0 w kontroli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) do qPCR uzyskano z komórek jelita bez zmian nowotworowych potwierdza założenia wynalazku: w tkance prawidłowego jelita brak ekspresji genów CGB i hTERT.

Przykład 7

Celem badania było stwierdzenie, czy za pomocą opracowanego zestawu diagnostycznego można zaobserwować aktywność transkrypcyjną genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w potencjalnym przerzucie regionalnym, tj. w pachowym węźle chłonnym pacjentki z rakiem piersi. Zastosowano skład zestawu diagnostycznego podany w tabeli 14. Badaną próbkę stanowiła tkanka pachowego węzła chłonnego pacjentki z rozsiały rakiem piersi. Kontrolę negatywną stanowiła tkanka prawidłowego węzła chłonnego.

Tabela 14. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 7

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 1 CGB1/2 F sekwencja nr 5	Starter 1 CGB1/2 R sekwencja nr 6	Sybr Green
CGB3-9	Starter 2 CGB3-9 F sekwencja nr 3	Starter 2 CGB3-9 R sekwencja nr 4	Sybr Green
hTERT	Starter 2 TERT F sekwencja nr 11	Starter 2 TERT R sekwencja nr 12	Sybr Green

W wyniku przeprowadzonych reakcji qPCR wykazano aktywność genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT w tkance węzła chłonnego pacjentki z rakiem piersi (Tab. 15). W węźle o prawidłowej budowie nie zaobserwowano aktywności badanych genów.

Tabela 15. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na tkance węzła chłonnego pacjentki z rakiem piersi

ekspresja genu	wartość Cq	
	badana tkanka: węzeł chłonny pacjentki z rakiem piersi	kontrola negatywna: węzeł chłonny od pacjentki bez raka
CGB1-2	28	0
CGB3-9	30	0
hTERT	30	0

Potwierdzenie ekspresji genów CGB i hTERT w komórkach uzyskanych z tkanki węzła chłonnego pacjentki z rakiem piersi świadczy o inwazji komórek nowotworu i powstaniu przerzutu regionalnego. Ponadto, wyniki potwierdzają wynik badania histopatologicznego, wskazujący na zmiany nowotworowe w pachowym węźle chłonnym pacjentki z rakiem piersi. Wartość Cq w kontroli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) do qPCR uzyskano z komórek węzła chłonnego bez zmian nowotworowych potwierdza założenia wynalazku: w prawidłowej tkance brak ekspresji genów CGB i hTERT.

Przykład 8

Celem badania było stwierdzenie, czy rak jajnika dokonuje inwazji na sąsiadujące tkanki za pomocą opracowanego zestawu diagnostycznego wykazującego aktywność genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT. Zastosowano skład zestawu diagnostycznego podany w tabeli 16. Badaną próbę stanowiła tkanka otrzewnej pacjentki z rakiem jajnika. Kontrolę negatywną stanowiła tkanka otrzewnej uzyskana podczas operacji przeprowadzonej z przyczyn innych niż złośliwy nowotwór.

Tabela 16. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 8

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 1 CGB1/2 F sekwencja nr 5	Starter 1 CGB1/2 R sekwencja nr 6	Sybr Green
CGB3-9	Starter 1 CGB3-9 F sekwencja nr 1	Starter 1 CGB3-9 R sekwencja nr 2	Sybr Green
hTERT	Starter 2 TERT F sekwencja nr 11	Starter 2 TERT R sekwencja nr 12	Sybr Green

Wyniki reakcji qPCR przedstawiono w tabeli 17. Wskazują one, że w tkance otrzewnej pacjentki z rakiem jajnika geny CGB (CGB1-2 i CGB3-9) są aktywne; nie wykazano natomiast aktywności genu hTERT. Tkanka otrzewnej pacjentki bez raka nie wykazywała aktywności transkrypcyjnej badanych genów.

Tabela 17. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na tkance otrzewnej pacjentki z rakiem jajnika

ekspresja genu	wartość C _q	
	badana tkanka: otrzewna pacjentki z rakiem jajnika	kontrola negatywna: otrzewna pacjentki bez raka
CGB1-2	28	0
CGB3-9	30	0
hTERT	0	0

Potwierdzenie ekspresji genów CGB w komórkach uzyskanych z tkanki otrzewnej pacjentki z rakiem jajnika świadczy o inwazji komórek raka w jamie brzusznej. Brak ekspresji genu hTERT nie wpływa na informatywność otrzymanego wyniku, ponieważ – jak zaznaczono powyżej – nie wszystkie komórki raka charakteryzują się ekspresją każdego z genów specyficznych dla złośliwego nowotworu. Wartość C_q w kontroli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) do qPCR uzyskano z komórek otrzewnej bez zmian nowotworowych potwierdza założenia wynalazku: w prawidłowej tkance brak ekspresji genów zarówno CGB jak i hTERT.

Przykład 9

Celem badania było stwierdzenie, czy zmiana w płucach pacjenta z rakiem prostaty jest zmianą nowotworową, np. potencjalnym przerzutem odległym. Wykorzystano opracowany zestaw diagnostyczny wykazujący aktywność genów CGB1-2 i CGB3-9 oraz hTERT.

Zastosowano skład kompozycji diagnostycznej podany w tabeli 18. Badaną próbę stanowiła pobrana podczas biopsji zmieniona tkanka płuca pacjenta z rakiem prostaty. Kontrolę negatywną stanowiła tkanka płuca niezmienną nowotworowo.

Tabela 18. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji qPCR w przykładzie 9

wykrywane geny	nazwa startera sensowego	nazwa startera antysensowego	metoda detekcji produktu qPCR
CGB1-2	Starter 2 CGB1/2 F sekwencja nr 7	Starter 2 CGB1/2 R sekwencja nr 8	Sybr Green
CGB3-9	Starter 1 CGB3-9 F sekwencja nr 1	Starter 1 CGB3-9 R sekwencja nr 2	Sybr Green
hTERT	Starter 1 TERT F sekwencja nr 9	Starter 1 TERT R sekwencja nr 10	Sybr Green

Wyniki reakcji qPCR przedstawiono w tabeli 19. W zmienionej nowotworowo tkance płuca geny CGB3-9 i hTERT były aktywne transkrypcyjnie; nie wykazano aktywności transkrypcyjnej genów CGB1-2. W prawidłowej tkance nie stwierdzono ekspresji badanych genów.

Tabela 19. Wyniki reakcji qPCR. Badanie przeprowadzono na tkance przerzutu do płuca z prostaty – ogniska pierwotnego nowotworu

ekspresja genu	wartość C _q	
	badana tkanka: biopiat płuca u pacjenta z rakiem prostaty	kontrola negatywna: prawidłowa tkanka
CGB1-2	0	0
CGB3-9	33	0
hTERT	32	0

Potwierdzenie ekspresji genów CGB3-9 i hTERT w komórkach uzyskanych podczas biopsji zmiany w płucu pacjenta z rakiem prostaty świadczy o inwazji komórek nowotworu i powstaniu przerzutu

odległego. Na tej podstawie można stwierdzić, że w płucu pacjenta z rakiem prostaty doszło do powstania ogniska nowotworowego; badanie histopatologiczne potwierdziło, że jest to przerzut odległy. Brak ekspresji genów CGB1-2 nie zmienia informatywności wyniku, ponieważ – jak zaznaczono powyżej – nie wszystkie komórki raka charakteryzują się ekspresją każdego z genów specyficznych dla złośliwego nowotworu. Wartość C_q w kontroli negatywnej, gdzie matrycę (cDNA) do qPCR uzyskano z komórek bez zmian nowotworowych potwierdza założenia wynalazku: w prawidłowej tkance brak ekspresji genów zarówno CGB jak i hTERT.

<110> Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<120> Zestaw diagnostyczny do wykrywania krążących komórek nowotworowych (CTC) oraz jego zastosowanie do identyfikacji komórek nowotworowych

<130> P.433746

<140> P.433746

<141> 2023-11-07

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtgtcsagct cacyccagca tctta

25

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agcagccctt ggaacatct

19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tagtgtcsag ctcacyccag c

21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cagcccttgg aacatctcc

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
cccccaaggga gactcaattt 20

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
acatgtctct ctcttagcgg g 21

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
acacccctca ctccctgtc 19

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
atatcttccg caagcactgg 20

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
cttcaccccc aagcctgac 19

<210> 10
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
cgctcgcccc tcttttc 17

<210> 11

<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
gccgattgtg aacatggact 20

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
caccctcgag gtgagacg 18

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
6FAM ctttccatgt ccacatyccc a BBQ 21

<210> 14
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
6FAM ccgaggtgta aagccaggta cacsaggc BBQ 28

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
6FAM cgtcgtggga gccagaacg BBQ 19

<210> 16
<211> 732
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> primer_bind
<222> (124)..(143)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2F nr 7

<220>

<221> primer_bind

<222> (149)..(169)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2F nr 5

<220>

<221> misc_binding

<222> (171)..(192)

<223> Miejsce hybrydyzacji sondy CGB1/2F Nr 13

<220>

<221> primer_bind

<222> (190)..(210)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2R nr 8

<220>

<221> primer_bind

<222> (211)..(230)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2F nr 6

<400> 1

```

ccccagggcc agtgagggcc ctgcgttccg tggcgccccc tggagggagg aaggggaact      60
gcattctgaga gagagcagcc aattgggtcc gctgactctg gccaggttcc cgtgccgcgt      120
ccaacacccc tcaactcctg tctcactccc ccacggagac tcaatttact ttccatgtcc      180
acattcccag tgcttgcgga agatatcccg ctaagagaga gacatgtcaa agaggctgct      240
gctgttgctg ctgctgagca tgggcgggac atgggcatcc aaggagccgc ttcggccacg      300
gtgcgcggcc atcaatgcc aacctggctgt ggagaaggag ggctgccccg tgtgcatcac      360
cgtcaacacc accatctgtg ccggctactg cccaccatg acccgcgctg tgcagggggt      420
cctgcgggcc ctgcctcagg tgggtgtgcaa ctaccgcgat gtgcgcttcg agtccatccg      480
gtcctcctggc tgcccgcgcg gegtgaaccc cgtggtctcc tacgcgctgg ctctcagctg      540
tcaatgtgca ctctgcggcc gcagcaccac tgactgcggg ggtcccaagg accaccctt      600
gacctgtgat gacccccgct tccaggactc ctcttctcca aaggccctc cccccagcct      660
tcaaagtcca tcccgctctc cggggcccta ggacaccccg atctctccac aataaaggct      720
tctcaatccg ca                                                              732

```

<210> 17

<211> 732

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> primer_bind

<222> (124)..(143)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2F nr 7

<220>

<221> primer_bind

<222> (149)..(169)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2F nr 5

<220>

<221> misc_binding

<222> (171)..(192)

<223> Miejsce hybrydyzacji sondy CGB1/2 nr 13

<220>

<221> primer_bind

<222> (190)..(210)

<223> Miejsce hybrydyzacji Startera CGB1/2R nr 8

<220>

<221> primer_bind

<222> (211)..(230)

<223> Miejsce hybrydyzacji Startera CGB1/2R nr 6

<400> 1

ccccagggcc agtgagggcc ctgcgttcg tggcgccccc tggaggagg aagggaact	60
gtatctgaga gagagcagcc aattgggtcc gctgactccg gccgggtcc cgtgccgcgt	120
ccaacacccc tcaactccctg tctcaactccc ccacggagac tcaatttact ttccatgtcc	180
acatccccag tgcttgcgga agatatcccg ctaagagaga gacatgtcaa aggggctgct	240
gctgttgctg ctgctgagca tgggcgggac atgggcatcc aaggagccgc ttcggccacg	300
gtgccgcccc atcaatgcca ccctggctgt ggagaaggag ggctgccccg tgtgcatcac	360
cgtcaacacc accatctgtg ccggctactg cccaccatg acccgctgc tgcaggggggt	420
cctgccggcc ctgcctcagg tgggtgtgcaa ctaccgcgat gtgcgcttcg agtccatccg	480
gtcccttggc tgcccgcgg gcgtgaaccc cgtggtctcc tacgcggtgg ctctcagctg	540
tcaatgtgca ctctgccgcc gcagcaccac tgactgcggg ggtcccaagg accaccctt	600
gacctgtgat gacccccgt tccaggctc ctcttctca aaggccctc cccccagcct	660
tccaagccca tcccgactcc cggggccctc agacaccccg atctctccac aataaaggct	720

tctcaatccg ca

732

<210> 18
 <211> 859
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (85)..(104)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2F nr 7

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (108)..(128)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2F nr 5

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (130)..(151)
 <223> Miejsce hybrydyzacji sondy CGB1/2 nr 13

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (147)..(167)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2R nr 8

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (165)..(186)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB1/2R nr 6

<400> 1
 ctggaggag gaaggggaac tglatctgag agagagcagc caattgggtc cgctgactcc 60
 ggccggggtc ccgtgccgcg tccaacaccc ctcaactcct gtctcaactcc cccacggaga 120
 ctcaatttac ttccatgtc cacatcccca gtgcttgagg aagatatccc gctaagagag 180
 agacatgtca aaggtagggt agatcgacat ttccaggcac caaagatgga gatgttcag 240
 gaaagactgc agggccctcg ggcaccttc acctgcttc aggccatcac tggcatgaga 300
 aggggcagac cagtgtgagc tgtggaagga ggccctcttc tggaggagcg tgacccccag 360
 ggctgctgct gttgctgctg ctgagcatgg gcgggacatg ggcacccaag gagccgcttc 420
 ggccacggtg ccgccccatc aatgccaccc tggctgtgga gaaggagggc tgccccgtgt 480
 gcatcaccgt caacaccacc atctgtgccg gctactgcc caccatgacc cgcgtgctgc 540

```

aggggggtct gccggccctg cctcaggtgg tgtgcaacta ccgcatgtg cgttcgagt      600
ccatccgggt ccttggtgc ccgcggggcg tgaaccccggt ggtctcctac gccgtggctc      660
tcagctgtca atgtgcactc tgccgcccga gcaccactga ctgcgggggt cccaaggacc      720
accccttgac ctgtgatgac ccccgcttcc aggcctctc ttctcaaag gccctcccc      780
ccagccttcc aagcccatcc cgaactcccg ggccctcaga caccctgatc ctcccacaat      840
aaagcttct caatccgca                                                    859

```

```

<210> 19
<211> 933
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (301)..(322)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 3

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (301)..(326)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 1

```

```

<220>
<221> misc_binding
<222> (361)..(389)
<223> Miejsce hybrydyzacji sondy CGB3-9 nr 14

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (406)..(425)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 4

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (408)..(427)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 2

```

```

<400> 1
tgcaggaaag cctcaagtag aggaggggtg aggttcagt ccagcacctt tctcgggtca      60
cggcctctc ctggctccca gaacccacc ataggcagag gcaggccttc ctacacccta      120
ctccctgtgc ctcagcctc gactagtccc tagactcga cgactgagtc tctgaggtca      180
cttcaccgtg gtctccgct cacccttggc gctggaccag tgagaggaga gggctggggc      240

```

```

gtctcgctga gccactctg cgccccctg gccttgctta cctcttgccc cccgaggggt      300
tagtgctgag ctcaccccag catcctatca cctcctggtg gccttgccgc cccacaacc      360
ccgaggtata aagccaggta cacgaggcag gggacgcacc aaggatggag atgttccagg      420
ggctgctgct gttgctgctg ctgagcatgg gcgggacatg ggcatccaag gagccgcttc      480
ggccacgggtg cgcccccatc aatgccaccc tggctgtgga gaaggagggc tgccccgtgt      540
gcacacccgt caacaccacc atctgtgccg gctactgcc cccatgacc cgcgtgctgc      600
agggggtect gccggccctg cctcaggtag tgtgcaacta ccgcgatgtg cgcttegagt      660
ccatccggct ccctggctgc ccgcgcggcg tgaaccccggt ggtctcctac gccgtggctc      720
tcagctgtca atgtgcaactc tgccgccgca gcaccactga ctgcgggggt cccaaggacc      780
accccttgac ctgtgatgac ccccgttcc aggactctc ttcctcaaag gccctccccc      840
ccagccttcc aagcccatcc cgactcccg ggcctcgga caccocgac ctcaccaat      900
aaaggcttct caatccgcaa aaaaaaaaaa aaa                                933

```

```

<210> 20
<211> 877
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (259)..(284)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 3

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (261)..(286)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 1

```

```

<220>
<221> misc_binding
<222> (319)..(347)
<223> Miejsce hybrydyzacji Sondy CGB3-9 nr 14

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (364)..(385)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 2

```

```

<220>
<221> primer_bind

```

<222> (364)..(383)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 4

<400> 1

```

agcaatttgc tcgggtcacg gcctcctcct ggctcccagg accccacccat aggcagaggg      60
aggccttctc acaccctact cctgtgctc ccaggtctga ctagtcccta gcactcgacg      120
actgagtctc tgagatcact tcaccgtggt ctccgctca cccttggcgc tggaccagtg      180
agaggagagg gctggggcgc tccgctgagc cactcctgcg ccccccctggc cttgtctacc      240
tcttgcccc cgaagggtta gtgtcgagct caccacagca tctacaacc tcttggtggc      300
cttgccgccc ccacaacccc gaggtataaa gccagggtaca cgaggcaggg gacgcaccaa      360
ggatggagat gttccagggg ctgctgctgt tctgctgct gagcatgggc gggacatggg      420
catccaagga gccgcttcgg ccacggtgcc gcccaccaa tgccaccctg gctgtggaga      480
aggagggtcg ccccggtgtc atcaccgtca acaccacccat ctgtgccggc tactgcccc      540
ccatgaccgg cgtgctgcag ggggtcctgc cggccctgcc tcagggtggtg tgcaactacc      600
ggcgtgtgcg cttcgagtc atccggctcc ctggtgccc ggcgggctg aaccccgtag      660
tctcctaagc cgtggctctc agctgtcaat gtgcaactctg ccgcccgcgc accactgact      720
gcgggggtcc caaggaccac cccttgacct gtgatgacct ccgcttcag gactcctctt      780
cctcaaagga cctccccccc agccttccaa gtccatccc actcccgggg cctcgggaca      840
ccccgatcct ccacaataa aggtttctca atccgca      877

```

<210> 21

<211> 880

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> primer_bind

<222> (262)..(283)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 3

<220>

<221> primer_bind

<222> (264)..(289)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 1

<220>

<221> misc_binding

<222> (322)..(350)
 <223> Miejsce hybrydyzacji Sondy CGB3-9 nr 14

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (367)..(386)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 4

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (369)..(388)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 2

<400> 1
 tccagcacct ttctcggggtc acggcctcct cctgggtccc aagacccac cataggcaga 60
 ggcaggcctt cctacacctt actctctgtg cctccagcct cgactagtcc ctagcactcg 120
 acgactgagt ctacagaggtc acttcaccgt ggtctccgcc tcatccttgg cgctagacca 180
 ctgaggggag aggactgggg tgctccgtg agccactcct gtgcctcctt ggccttgtct 240
 acttctcgcc ccccgagggt ttagtggtcc gctcactcca gcatcctaca acctcctggg 300
 ggccttgacg cccccacaaa cccgaggtat aaagccaggt acaccaggca ggggacgcac 360
 caaggatgga gatgttccag gggctgctgc tgttgctgct gctgagcatg ggcgggacat 420
 gggcatccag ggagatgctt cggccaagggt gccgccccat caatgccacc ctggetgtgg 480
 agaaggaggg ctgccccgtg tgcatacccg tcaacaccac catctgtgcc ggctactgcc 540
 ccaccatgac ccgcgtgctg caggggggtc tgccggcctt gctcagggtg gtgtgcaact 600
 accgcgatgt gcgcttcgag tccatccggc tccctggtg cccgcggggc gtgaaccccg 660
 tgggtctcta cgcctgggt ctcagctgtc aatgtgcaact ctgccgccgc agcaccactg 720
 actgcggggg tcccaaggac cacccttga cctgtgatga cccccgttc caggcctcct 780
 ctctctcaaa ggccccctcc cccagccttc caagtcctc ccgaactccc gggcctcag 840
 acaccccgat cctcccacaa taaaggcttc tcaatccgca 880

<210> 22
 <211> 1863
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> primer_bind

<222> (1245)..(1266)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 3

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1247)..(1272)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 1

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1304)..(1332)
 <223> Miejsce hybrydyzacji Sondy CGB3-9 nr 14

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1350)..(1369)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 4

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1352)..(1371)
 <223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 2

<400> 1
 gctctaatacg cctgcacgaa gaaccccgcg ctgtctggcc cacccttcac agtatccgac 60
 cggggcgctcc tgaacgcgag ccagctctat ctgaccacct cggcgcgaggga etttcggttc 120
 tatcccaaga cggagccgctc cggatacccc cgcaaggact acctgacctt ctggagctta 180
 gaagagacgc cccaactctg gagtcacgac ccgcagcggc agccctgtct ctgctcttcc 240
 aggcgccttc gagcgccgca cggcggggcca tgtctccggc tcaggaaacc tacagctcct 300
 cgccgcaccc gctccgcgag ctgaccgct tccgccgct ggaggcgact tggggtgggc 360
 cccactggaa gccctgccc ggcatacaca gcgtcccgaa agcctacagc accgagaact 420
 cccgctcagg ccgctgtaag ccggggctag tgggagcctg ccgggccagc cccacccag 480
 acacgcccc tggcgtgggg gcggagcaga gctctgggca gccgctcact acgcggtgct 540
 ggacctaggt gggctcgac tcattaagtc tatccgcagt gtggggacag gactagccca 600
 gacacgcca ctcagctgag gctggatgc ggggaaggga ctaagtccag acaatgtcct 660
 ccgaggctgc ggcgccgag gcaggacaca cctcctgagg gcctattcaa taatcagtta 720
 aatcacctga agcacacgca ttccggggga ccgctccggg catcctggct tgagggtagg 780
 gtgggcggag gttcctaagg gagaggtggg gctcgggctg aatccctcgt tggggggcat 840
 ctgggtcaag tggttccct ggcagcacag tcacggggag acctctctc actgggcaga 900

```

agctaagtcc gaagccgcgc cctcctgtt aggttggaact gtggtgcagg aatggctcaa      960
gtagaggagg gttgaggctt cagtcacga cctttctcgg gtcacggcct cctcctggtt      1020
ccccagaccc caccataggc agaggcaggc cttcctacac cctactctct gtgcctccag      1080
cctcgactag tccttagcac tcgacgactg agtctcagag gtcacttcac cgtgggtctcc      1140
gcctcactct tggcgctaga ccactgaggg gagaggactg ggggtgctccg ctgagccact      1200
cctgtgcctc cctggccttg tctaattctc gcccccgaa gggtagtgtt ccagctcact      1260
ccagcactct acaacctctt ggtggccttg acgccccac aaaccgagg tataaagcca      1320
ggtacaccag gcaggggacg caccaaggat ggagatgttc caggggctgc tctgtgtgct      1380
gctgctgagc atgggcggga catgggcctc caggagatg cttcgccac ggtgcgcgcc      1440
catcaatgcc accctggctg tggagaagga gggctgcccc gtgtgcatca ccgtcaacac      1500
caccatctgt gccggctact gccccacat gaccgcgtg ctgcaggggg tcctgcgggc      1560
cctgcctcag gtggtgtgca actaccgga tgtgcgcttc gagtccatcc ggtccctgg      1620
ctgccgcgcg ggcgtgaacc ccgtggtctc ctacgcgtg gctctcagct gtcaatgtgc      1680
actctgcgcg cgcagcacca ctgactgcgg gggccccaa gaccaccct tgacctgtga      1740
tgacccccgc ttccaggcct cctcttctc aaaggccct cccccagcc ttccaagtcc      1800
atcccgaact ccggggccct cagacacccc gatctccca caataaaggc ttctcaatcc      1860
gca

```

```

<210> 23
<211> 887
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (269)..(290)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 3

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (271)..(296)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9F nr 1

```

```

<220>

```

```

<221> primer_bind
<222> (374)..(393)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 4

<220>
<221> primer_bind
<222> (376)..(395)
<223> Miejsce hybrydyzacji startera CGB3-9R nr 2

<220>
<221> misc_binding
<222> (392)..(420)
<223> Miejsce hybrydyzacji Sondy CGB3-9 nr 14

<400> 1
gcttcagtc agcaccttctc tcgggtcacg gctcctcct ggctccagg accccaccat      60
aggcagaggc aggccttctc acacctact cctgtgcct ccaggctcga ctagtcccta      120
gcactcgacg actgagtctc tgaggctact tcacogtggc ctccgcctca cccttggcgc      180
tggaccagtg agaggagagg gctggggcgc tccgtgagc cactcctgcg cccccctggc      240
cttgtctacc tcttgcccc cgaagggtta gtgtcgagct cactccagca tcctacaacc      300
tcctgggtggc cttgcgcgcc ccacaacccc gaggttttaa gccaggtaca cgaggcaggg      360
gacacaccaa ggatggagat gttccagggg ctgctgctgt tgctgctgct gagcatgggc      420
gggacatggg catccaagga gccgcttcgg ccacgggtgc gcccacataa tgccacctg      480
gtgttgagga aggagggctg ccccggtgtc atcacgtca acaccaccat ctgtgcgggc      540
tactgcccc aatgaccgg cgtgctgcag ggggtcctgc cggccctgcc tcaggtggtg      600
tgcaactacc gcgatgtgcg cttcgagtc atccggctcc ctggctgcc gcgcggcgtg      660
aaccctgtgg tctctacgc cgtggctctc agctgtcaat gtgcaactctg ccgcgcgagc      720
accactgact gcgggggtcc caaggaccac cccttgacct gtgatgacc ccgcttcag      780
gactcctctt cctcaaaggc cctccccc agccttccaa gtccatcccg actcccggg      840
ccctcggaca ccccgatcct ccacaataa aggccttctca atccgca      887
<210> 24
<211> 3210
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> primer_bind
<222> (1866)..(1885)

```

<223> Miejsce hybrydyzacji startera TERT F nr 9

<220>

<221> primer_bind

<222> (1893)..(1913)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera TERT F nr 11

<220>

<221> misc_binding

<222> (1914)..(1933)

<223> Miejsce hybrydyzacji sondy TERT nr 15

<220>

<221> primer_bind

<222> (1940)..(1958)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera TERT R nr 10

<220>

<221> primer_bind

<222> (1956)..(1974)

<223> Miejsce hybrydyzacji startera TERT R nr 12

<400> 1

atgccgcgcg cccccgcgtg ccgagccgtg cgctccctgc tgcgcagcca ctaccgcgag	60
gtgctgccgc tggccacgtt cgtgcggcgc ctggggcccc agggctggcg gctgggtgcag	120
cgcggggacc cggcggcttt ccgcgcgctg gtggcccagt gcctggtgtg cgtgccctgg	180
gacgcacggc cgcgcgcgc cgcgcctcc ttccgccagg tgtcctgcct gaaggagctg	240
gtggcccagag tgctgcagag gctgtgcgag cgcggcgcga agaactgtgt ggcttcggc	300
ttcgcgctgc tggacggggc ccgcgggggc cccccagagg ccttcaccac cagcgtgcgc	360
agctacctgc ccaacacggl gaccgacgca ctgcggggga gggggcglg ggggctgctg	420
ctgcgcgcgc tgggcgacga cgtgctggtt cacctgctgg cacgtgcgc gctctttgtg	480
ctgggtggctc ccagctgcgc ctaccaggtg tgcgggcgc cgtgtacca gctcggcgt	540
gccactcagg ccgcggcccc gccacacgt agtggacccc gaaggcgtct gggatgcgaa	600
cgggcctgga accatagcgt caggggaggc ggggtcccc tgggcctgcc agccccgggt	660
gcgaggaggc gcgggggcag tgccagccga agtctgccgt tgcccaagag gccagggcgt	720
ggcgtgccc ctgagccgga gcggacgcc gttgggcagg ggtcctgggc ccaccgggc	780
aggacgcgtg gaccgagtga ccgtggtttc tgtgtggtgt cacctgccag acccgccgaa	840
gaagccacct ctttgagggt tgcgtctctt ggcacgcgc actcccacc atccgtgggc	900

cgccagcacc acgcggggccc cccatccaca tcgcggccac cagtcacctg ggacacgcct 960
 tgtcccccg tgtaacccga gaccaagcac ttctctact cctcaggcga caaggagcag 1020
 ctgcggccct cttctact cagctctctg aggccagcc tgactggcgc tcggaggctc 1080
 gtggagacca tttttctggg ttccaggccc tggatgccag ggactccccg caggttgccc 1140
 cgctgcccc agcgtactg gcaaatgcgg cccctgtttc tggagctgct tgggaaccac 1200
 gcgcagtgcc cctacggggt gctcctcaag acgcactgcc cgctgcgagc tgcggtcacc 1260
 ccagcagccg gtgtctgtgc ccgggagaag cccagggct ctgtggcggc ccccgaggag 1320
 gaggacacag acccccgctg cctggtgcag ctgctcgc agcacagcag cccctggcag 1380
 gtgtacggct tcgtgcgggc ctgcctgcgc cggtggtgc cccagggct ctgggctcc 1440
 aggcacaacg aacgcgctt cctcaggaac accaagaagt tcatctccct ggggaagcat 1500
 gccaaactct cgctgcagga gctgacgtgg aagatgagcg tgcgggactg cgcttgctg 1560
 cgcaggagcc caggggttgg ctgtgtccg gccgcagagc accgtctgcg tgaggagatc 1620
 ctggccaagt tctgcactg gctgatgagt gtgtacgtcg tcgagctgct caggtctttc 1680
 ttttatgtca cggagaccac gtttcaaaag aacaggctct tttctaccg gaagagtgtc 1740
 tggagcaagt tgcaaagcat tggaatcaga cagcacttga agagggtgca gctgcgggag 1800
 ctgtcggaag cagaggctag gcagcatcgg gaagccaggc ccgcctgct gacgtccaga 1860
 ctccgcttca tccccagcc tgacgggctg cggccgattg tgaacatgga ctacgtcgtg 1920
 ggagccagaa cgttcgcag agaaaagagg gccgagcgtc tcacctcgag ggtgaaggca 1980
 ctgttcagcg tgctcaacta cgagcgggcg cggcgccccg gctcctggg cgcctctgtg 2040
 ctgggcctgg acgatatcca cagggcctgg cgcaccttcg tgctgcgtgt gcgggccag 2100
 gaccgcgcgc ctgagctgta ctttgtcaag gtggatgtga cgggcgcgta cgacaccatc 2160
 cccaggaaca ggctcacgga ggtcatcgcc agcatcatca aacccagaa cacgtactgc 2220
 gtgcgtcgggt atgcctgggt ccagaaggcc gccatgggc acgtccgaa ggccttcaag 2280
 agccacgtct ctacctgac agacctccag ccgtacatgc gacagtctgt ggctcacctg 2340
 caggagacca gcccgctgag ggatgcgctc gtcacgagc agagctctc cctgaatgag 2400
 gcagcagtg gcctcttca cgtcttcta cgcttcatgt gccaccacgc cgtgcgcac 2460
 aggggcaagt cctacgtcca gtgccagggg atcccgagc gctccatct ctccacgtg 2520

```

ctctgcagcc tgtgctacgg cgacatggag aacaagctgt ttgcggggat tcggcgggac      2580
gggetgetcc tgcgttttgg ggatgatttc ttgttggtga cacctcacct caccacggcg      2640
aaaaccttcc tcagctatgc ccggacctcc atcagagcca gtctcacctt caaccggggc      2700
ttcaaggctg ggaggaacat gcgtcgcaaa ctctttgggg tcttgcggtc gaagtgtcac      2760
agcctgtttc tggatttgca ggtgaacagc ctccagacgg tgtgcaccaa catctacaag      2820
atcctcctgc tgcaggcgta caggttttcac gcatgtgtgc tgcagctccc atttcatcag      2880
caagtttgga agaaccacac atttttcctg cgcgtcatct ctgacacggc ctccctctgc      2940
tactccatcc tgaagacca gaacgcaggg atgtcgctgg gggccaaggg cgcgcggggc      3000
cctctgcctc ccgaggccgt gcagtggctg tgccaccaag cattcctgct caagctgact      3060
cgacacccgt tcacctacgt gccactcctg gggtcactca ggacagccca gacgcagctg      3120
agtcggaagc tcccggggac gacgtgact gcctggagg ccgcagccaa cccggcactg      3180
ccctcagact tcaagacat cctggactga                                     3210

```

Zastrzeżenia patentowe

1. Zestaw diagnostyczny do wykrywania krążących komórek nowotworowych (CTC), **znamienny tym**, że zawiera:
 - parę starterów specyficznych względem genów CGB3/CGB9, CGB5, CGB6/CGB7 i CGB8 (CGB3-9): startery o sekwencji CGB3-9 F nr 1, CGB3-9 R nr 2 lub startery o sekwencji CGB3-9 F nr 3, CGB3-9 R nr 4
 - oraz
 - parę starterów specyficznych względem genów CGB1 i CGB2: startery o sekwencji CGB1/2 F nr 5, CGB1/2 R nr 6 lub startery o sekwencji CGB1/2 F nr 7, CGB1/2 R nr 8
 - i
 - parę starterów specyficznych względem sekwencji mRNA katalitycznej podjednostki enzymu telomerazy hTERT: startery o sekwencji TERT F nr 9, TERT R nr 10 lub startery o sekwencji TERT F nr 11, TERT R nr 12.
2. Zestaw diagnostyczny według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodatkowo zawiera sondę CGB1/2 o sekwencji nr 13 lub sondę CGB3-9 o sekwencji nr 14 lub sondę TERT o sekwencji nr 15.
3. Zestaw diagnostyczny według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodatkowo zawiera barwnik fluoroscencyjny wybarwiający dwuniciowy DNA.
4. Zestaw diagnostyczny określony w zastrz. 1–3 do zastosowania w diagnozowaniu in vitro nowotworów u ludzi poprzez identyfikację komórek CTC.
5. Zestaw diagnostyczny według zastrz. 4, **znamienny tym**, że obejmuje diagnozowanie nowotworów wybranych z grupy: rak piersi, rak jajnika, rak prostaty, rak jelita grubego, rak płuca.