



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01192

(22) Data de depozit: 25.11.2010

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• BĂLĂCESCU OVIDIU DANIEL,
STR. LOIUS PASTEUR NR. 59, AP. 38,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• NEAGOE IOANA, BD. N. TITULESCU
NR. 2, AP. 57, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BĂLĂCESCU LOREDANA OFELIA,
STR. LOIUS PASTEUR NR. 59, AP. 38,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• BĂLĂCESCU OVIDIU DANIEL,
STR. LOIUS PASTEUR NR. 59, AP. 38,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• NEAGOE IOANA, BD. N. TITULESCU
NR. 2, AP. 57, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BĂLĂCESCU LOREDANA OFELIA,
STR. LOIUS PASTEUR NR. 59, AP. 38,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(74) Mandatar:
CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ CIUPAN CORNEL, STR.
MESTECENILOR NR. 6, BL. 9E, AP. 2,
CLUJ NAPOCA, JUDEȚUL CLUJ

(54) **METODĂ NANOINVAZIVĂ PENTRU DETECTAREA
CANCERULUI DE PROSTATĂ BAZATĂ PE STUDIUL UNUI
SET DE GENE IMPLICATE ÎN MECANISMUL DE
ANGIOGENEZĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă neinvazivă, pentru detectarea cancerului de prostată, bazată pe studiul nivelului de expresie a unui set de 28 de gene implicate în modularea mecanismului de angiogeneză, prin analiza cantitativă PCR, utilizând plăci cu godeuri sau un senzor specializat, a ARN extras din sânge integral recoltat de la pacient.

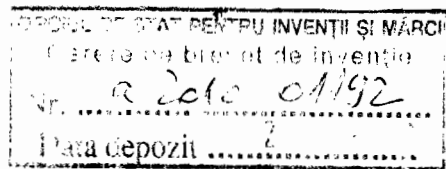
Revendicări: 5
Figuri: 12

	1	2	3	4	5	6	7
A	ANGPT2	ANGPTL3	COL18A1	GOLGA3	CXCL3	EGF1	FISF
B	FLT1	HGF	HPSE	ID1	ID3	IFNB1	IL6
C	LCCT1	LEP	MDK	NOTCH4	PGE	SERPINF1	TGFBR1
D	THBS2	TIMP1	VEGFA	VEGFC	CXCL1	IL8	ITGAV
E	B2M	HPR1	RPL13A	GAPDH	ACTB	GDC	
F	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC	

Fig. 11

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Metodă noninvazivă pentru detectarea cancerului de prostată bazata pe studiul unui set de gene implicate în mecanismul de angiogeneza

Declarație privind sponsorizarea invenției

Această invenție s-a bazat pe un studiu de cercetare finanțat de un grant de tip IDEI cod ID_314/2007, nr. 397/2009 acordat de către Consiliul Național al Cercetării Științifice din Învățământul Superior (CNCSIS).

Prezenta invenție are adresabilitate domeniului medical și se referă la o metodă de diagnostic noninvaziv pentru cancerul de prostată.

La nivel mondial cancerul de prostată (PCa) este al doilea cancer cel mai frecvent diagnosticat la bărbați, cu 782.600 de noi cazuri înregistrate în anul 2007. Creșterea dramatică a incidenței cancerului de prostată este datorată în parte creșterii speranței de viață care duce implicit la creșterea numărului de persoane de vârstă a treia, precum și a îmbunătățirii metodelor de detecție a bolii canceroase în stadii incipiente. În ciuda îmbunătățirii detecției timpurii, rata de mortalitate rămâne destul de ridicată. Screeningul actual se bazează pe tușeu rectal (digital rectal examination - DRE), un test seric al antigenului specific de prostată (PSA) respectiv ecografie transrectală. PSA nu are, specificitate de diagnostic, considerând că mai mult de jumătate dintre bărbații cu nivelul de PSA peste 4.0 ng /ml, nu au PCa la biopsia inițială. Unii autori au ajuns la concluzia că nu există nici un nivel specific al PSA, pe baza cărui să fie grupați pacienții cu PCa față de cei cu boala benignă a prostatei: hiperplazie benignă de prostată (HBP) sau prostatită cronică (PC). Deși biopsia rămâne standardul de aur pentru depistarea cancerului de prostată, sunt necesare teste mai precise cu specificitate mai mare pentru a întări decizia de biopsie a prostatei, dat fiind faptul că un număr destul de mare de pacienți cu boala benignă suporta biopsia fără să fi fost necesar să o facă. Cancerul de prostată prezintă anomalii specifice biochimice care susțin creșterea tumorii prin prevenirea apoptozei și promovarea proliferării tumorale, prin activarea angiogenezei. Investigațiile moleculare ale mecanismelor de tumorigeneză au demonstrat că angiogeneza este unul dintre cele mai importante mecanisme activate în progresia tumorală. Tumorile eliberează o serie de factori autocrini și paracrini care modulează procesul de angiogeneză. În țesutul normal și peritumoral de prostată au fost studiați unii mediatori de angiogeneză, precum factorii de creștere fibroblastici, acizi și bazici (FGFs), factorii de creștere al endoteliului vascular (VEGFs), transformând factorii de creștere (TGF- α și TGF- β), factorul de creștere plachetar-

derivat (PDGF), angiogenine (ANG) , interleukina 8 (IL-8), și factorul de necroză tumorală-alfa (TNF α).

Noi concepte de analiză, ca urmare a decriptării întregului genom uman în 2003 și al apariției tehnologiilor moderne de genomics (microarray, PCR array), în detectarea de noi biomarkeri au stabilit că tiparele (pattern) de transcripție (evaluare de ARN mesager) pot fi folosite ca puncte finale ale diagnosticului, pattern-ul servind ca marker de diagnostic. În schimbul evaluării unui singur biomarker, conform evaluării reduționiste din trecut, tehnologiile moderne (microarray, PCR array) sunt capabile să furnizeze date despre întregul transcriptom sau parțial pentru un mecanism anume (ex. angiogenza), asociate cancerului.

O direcție relativ nouă de genomics este legată de sângele periferic. Aceasta se bazează pe faptul că celulele circulante din sânge monitorizează starea fiziologica a organismului, modificări transcriptionale la nivelul acestora având loc ca răspuns al statusului patologic. Acest domeniu nou este numit *hemogenomics* și se bazează pe ideea că celulele sângelui periferic reprezintă o santinelă sau țesut surrogat ce poate fi utilizat atât ca diagnostic cat și răspuns la terapie. Domeniul oncologic reprezintă una dintre cele mai importante zone de analize genomice, cancerul de prostată fiind printre principalele teme de interes în stabilirea de noi biomarkeri de diagnostic.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă este de a oferi o metodă noninvazivă de diagnosticare a cancerului de prostată bazata pe studiul unui set de gene, din sângele integral, implicate în modularea mecanismului de angiogeneză.

Metoda noninvazivă pentru detectarea cancerului de prostată bazata pe studiul unui set de 28 de gene de interes, implicate în modularea mecanismului de angiogeneză, genele de interes fiind analizate din sângele integral prin extragerea ARN-ului și analiza acestuia prin tehnica de PCR cantitativ cu ajutorul unor plăci cu godeuri sau a unui senzor specializat.

Metoda se bazează pe un studiu prospectiv la care au participat 36 de persoane cu patologie a prostatei: 19 persoane cu cancer de prostată (Pca), 11 persoane cu formă benignă a prostatei (7 hiperplazie benignă (BHP) și 4 prostatice cronice (PC)) respectiv 6 persoane sănătoase constituite ca lot martor (Ctr). Aprobarea studiului s-a făcut de către Comitetul de Etica al Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, iar intrarea pacienților în studiu s-a făcut pe baza unui consimțământ informat și semnat. Diagnosticul pacienților s-a pus prin

examen histologic, marcarea cu Hematoxilina-Eozina, pe baza puncțiilor bioptice (n=12) sau a piesei de prostatectomie.

Recoltarea și prelucrarea probelor

De la toți participanții intrați la studiu s-a recoltat sânge integral, în același interval orar, în tuburi PaxGene, înainte de a primi orice tip de terapie sau a suferi biopsia sau intervenția chirurgicală (prostatectomia). ARN-ul total a fost izolat cu ajutorul unui reactiv specific: *ARN Paxgene Blood Kit (produs Qiagen)* conform instrucțiunilor producătorului. Concentrațiile ARN-ului au fost măsurate cu spectrofotometrul Nanodrop (NanoDrop Technologies). Calitatea de ARN a fost evaluat cu bioanalizorul Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) care folosește sistemul Lab-on-a-chip. Toate probele au trecut rigorile controalelor de calitate și cantitate. Numărul de integritate ARN (RIN-RNA integrity number) și raportul celor două specii ribozomale 28/18S au fost folosite drept controale de calitate. Toate probele incluse în acest studiu au avut un RIN între 7-9 și un raport 28/18S ARN ribozomal mai mare de 1.7. Din punct de vedere cantitativ, toate probele au avut peste 100 ng ARN total/μl.

Evaluarea studiului: studiul a fost împărțit în două părți; partea de analiză (*training study*) și partea de validare a rezultatelor (*testing study*). Probele au fost introduse în analiza consecutiv, pe măsura ce au fost colectate.

Tabelul 1. Datele clinice și patologice (vârsta, PSA, scor Gleason și rezultat HP) ale probelor introduse în *training study*.

Număr proba	Cod proba sânge	Grup studiu	Vârsta	PSA (ng/ml)	Scor Gleason	Examen HP
1	Ctr 1	Control	51	0.6	-	-
2	Ctr 2	Control	53	0.5	-	-
3	Ctr 3	Control	62	1.4	-	-
4	Ctr 4	Control	56	1.2	-	-
5	Ctr 5	Control	55	1.8	-	-
6	Ctr 6	Control	36	0.6	-	-
7	PCa 1	Cancer	79	168	5+4=9	Adenocarcinom acinar de prostata
8	PCa 2	Cancer	73	79.3	3+5=8	Adenocarcinom acinar de prostata
9	PCa 3	Cancer	61	862	3+4=7	Adenocarcinom acinar de prostata
10	PCa 4	Cancer	71	13.5	4+3=7	Adenocarcinom acinar de prostata
11	PCa 5	Cancer	55	92	3+5=8	Adenocarcinom acinar de prostata
12	PCa 6	Cancer	57	351.8	5+3=8	Adenocarcinom acinar de prostata
13	PCa 7	Cancer	71	5.24	1+3=4	Adenocarcinom acinar de prostata

Ctr - Control – Normal Group; PCa – Prostate Cancer

Setul de analiză a cuprins 13 probe (6 Ctr și 7 PCa). Obiectivul acestui studiu a urmărit identificarea în sângele integral a unui profil de expresie genică, pe baza unui set de 84 de gene implicate în modularea angiogenezei, astfel încât să poată fi separați pacienții cu cancer

de prostată de persoanele sănătoase, (cu prostata normală). Caracteristicile clinice și patologice ale persoanelor introduse în *taining study* sunt prezentate în tabelul 1.

Testul de validare a cuprins 23 de probe: 12 PCa și 11 forme benigne de prostată. Caracteristicile clinice și patologice ale persoanelor introduse în *testing study* sunt prezentate în tabelul 2. Obiectivul stabilit pentru studiul de testare a urmărit validarea semnăturii moleculare obținute în studiul de evaluare. Suplimentar s-a verificat specificitatea semnăturii moleculare pentru cancerul de prostată comparativ cu cancerul la sân și cu cel de col uterin (tabelul 3).

Tabelul 2. Datele clinice și patologice (vârsta, PSA, scor Gleason, volum prostata, prezenta tumorală și rezultat HP) ale probelor introduse în *testing study*.

Număr proba	Cod proba sânge	Grup studiu	Vârsta	PSA (ng/ml)	Scor Gleason	Volum prostate (mm)	Prezenta tumora (%)	Examen HP
14	PCa 8	Cancer	67	13.9	4+5=9	45/40/30	-	Adenocarcinom acinar de prostata; pT3bN0MxLOV0
15	PCa 9	Cancer	58	3.4	3+4=7	66/40/34	30%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT2cNxMxLOV0
16	PCa 10	Cancer	56	17	4+3=7	45/50/37	80%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT3bN1MxLOV0R1
17	PCa 11	Cancer	55	10.8	3+4=7	-	-	Adenocarcinom acinar de prostata; pT3bN0MxLOV1R1
18	PCa12	Cancer	65	6.7	3+3=6	-	5%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT2N0MxLOV0R0
19	PCa 13	Cancer	61	7	3+3=6	45/50/40	5%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT2cNxMxLOV0R0
20	PCa 14	Cancer	65	11.3	2+3=5	50/65/40	15%	Prostate adenocarcinoma pT2cN0MxLOV0
21	PCa 15	Cancer	61	8.9	3+3=6	45/50/35	5%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT2cNxMxLOV0R0
22	PCa 16	Cancer	59	7	3+3=6	45/50/40	10%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT2cNxMxLOV0R0
23	PCa 17	Cancer	66	9.5	4+3=7	45/45/20	25%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT3bNoMx
24	PCa 18	Cancer	67	8	3+3=6	-	-	Adenocarcinom acinar de prostata;
25	PCa 19	Cancer	70	6.8	3+2=5	65/65/45	1%	Adenocarcinom acinar de prostata; pT2aN0MxLOV0
26	BP1	Benign	60	4.5	-	-	-	Prostatita cronica
27	BP2	Benign	67	15.9	-	-	-	Prostatita cronica
28	BP3	Benign	65	5.5	-	-	-	Prostatita cronica
29	BP4	Benign	68	4.7	-	-	-	Prostatita cronica
30	BP5	Benign	72	6	-	-	-	Hiperplazie benigna de prostata
31	BP6	Benign	60	5.2	-	-	-	Hiperplazie benigna de prostata
32	BP7	Benign	53	20	-	-	-	Hiperplazie benigna de prostata
33	BP8	Benign	69	7	-	-	-	Hiperplazie benigna de prostata
34	BP9	Benign	70	5	-	-	-	Hiperplazie benigna de prostata
35	BP10	Benign	67	4.6	-	-	-	Hiperplazie benigna de prostata
36	BP11	Benign	62	4.1	-	-	-	Hiperplazie benigna de prostata

BP –Prostate benigna; PCa – Cancer de prostata;

Tehnica de evaluare

Pentru evaluarea nivelului de expresie genică s-a folosit tehnologia *RT² ProfilerTM PCR array*. Optzeci și patru gene (<http://www.sabiosciences.com/Cancer.php>) implicate în modularea angiogenezei au fost evaluate simultan. Analiza celor 84 de gene s-a făcut cu un sistem de analiză comercial (placi de 96 de godeuri) denumit *Human Angiogenesis RT² ProfilerTM PCR Array* (SABiosciences, Qiagen). Sistemul de analiză PCR array combină sensibilitatea unei analize de tip PCR cantitativ (qRt-PCR) cu posibilitatea de clusterizare (clasificare) de tip microarray. Aproximativ 300 ng din total ARN de la fiecare probă au fost folosite pentru sinteza de ADN complementar (ADNc) prin transcripție inversă, folosind kitul comercial *RT² First Strand Kit* (SABiosciences). ADNc a fost ulterior amplificat cu kitul comercial *RT² SYBR Green qPCR Master Mix* (SABiosciences) în plăci de analiză *Human Angiogenesis RT² ProfilerTM PCR Array*, utilizând aparatul LightCycler 480 (Roche). Programul de amplificare a fost setat astfel: 10 min la 95° C pentru activare enzimatică, urmată de 45 de cicluri de 15 s la 95° C și 1 min. la 60° C pentru etapa de amplificare.

Tabelul 3. Datele clinice și patologice (vârsta, stadiul tumorii și examenul HP) pentru pacienții care au fost utilizați pentru testarea specificității semnăturii supervizate obținute pe sângele integral al pacienților cu cancer de prostata.

Număr proba	Cod proba sânge	Grup studiu	Vârsta	Stadiu tumoral	HP exam
1	BR1	Cancer de san	60	III B	CDI, grad Nottingham III
2	BR2	Cancer de san	59	II B	CDI, grad Nottingham I
3	BR3	Cancer de san	57	III B	Carcinom medular atipic, grad Nottingham III
4	BR4	Cancer de san	40	III B	CDI, grad Nottingham I
5	BR5	Cancer de san	55	II B	CDI, grad Nottingham III
6	BR6	Cancer de san	56	II B	CDI, grad Nottingham II
7	BR7	Cancer de san	52	II B	CDI, grad Nottingham II
8	BR8	Cancer de san	62	III B	CLI, grad III
9	BR9	Cancer de san	39	II B	CDI, grad Nottingham II
10	CV1	Cancer de col uterin	60	II B	Carcinom nediferentiat
11	CV2	Cancer de col uterin	59	II B	Carcinom nediferentiat
12	CV3	Cancer de col uterin	57	II B	Carcinom cu celule squamoase
13	CV4	Cancer de col uterin	40	II B	Carcinom cu celule squamoase
14	CV5	Cancer de col uterin	55	II B	Carcinom cu celule squamoase
15	CV7	Cancer de col uterin	56	II B	Carcinom cu celule squamoase

CDI- carcinom ductal invaziv; CLI -carcinom lobular invaziv

Analiza datelor de PCR Array

Modificările de expresie ale celor 84 de gene evaluate au fost evaluate față de pragul critic mediu (CT) citit de aparat ca urmare al punctului de inflexiune al semnalului fluorescent emis ca urmare a procesului de amplificare de tip PCR (reacția în lanț a polimerazei). Nivelele de

expresie genică au fost normalizate față de un set de 5 gene housekeeping (cu nivele de expresie cvasi-constante) (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, și ACTB). Metoda de evaluare a nivelelor de expresie s-a bazat pe analiza $\Delta\Delta Ct$. Testul T a fost folosit pentru compararea statistică a controlului și a grupurilor experimentale: cancer de prostată, respectiv, forma benignă a prostatei (PBH și PC). Valoarea $p < 0,05$ a fost considerată ca fiind statistic semnificativă.

Se dă un exemplu de aplicare a metodei în legătură cu figurile 1, 2, 3, ..., 12, care reprezintă:

- figura 1, pragul (CT) de distribuție (± 1 SD) pentru control, set de formare și de testare prevăzute pentru cancerul de prostată;
- figura 2, clusterizare ierarhică nesupervizată folosind toate cele 84 de gene implicate în modularea proceselor biologice de angiogenează;
- figura 3, cluster supervizat pentru setul de învățare (training set) bazat pe cele 28 de gene candidate (semnătura supervizată);
- figura 4, distribuția celor 28 de gene care compun semnătura supervizată: stânga – gene subexprimate, dreapta – gene supraexprimate;
- figura 5, clusterizare ierarhică pentru probele introduse în setul de testare;
- figura 6, diagrama Vulcano Plot cu distribuția celor 28 de gene statistic semnificative;
- figura 7, clusterizare ierarhică pentru probele de cancer de prostată, patologia benignă a prostatei și prostată normală, pe baza genelor candidate (semnătura supervizată) din setul de trening;
- figura 8, diagrama Vulcano Plot care prezintă distribuția celor 28 de gene ale semanturii supervizate pentru gruparea cancerului de prostată de patologia benignă și prostata normală;
- figura 9, clusterizarea ierarhică pentru testarea specificității semnăturii moleculare a cancerului de prostată ($n=12$) comparativ cu cancerul de sân ($n=9$) și cel de col uterin ($n=5$);
- figura 10, schema logică de analiză noninvazivă;
- figura 11, matricea de analiză cu 28 de gene de interes pentru evaluarea nivelului de expresie genică prin qRT-PCR;
- figura 12, senzor cu markeri pentru determinarea expresiei qRT-PCR a celor 28 de gene de interes.

Etapele de obținere a semnăturii moleculare supervizate, care face obiectul prezentului brevet, s-au bazat pe realizarea unui studiu de cercetare de biologie moleculară care a urmărit să identifice un set de gene cheie, implicate în modularea angiogenezei, la nivelul sângelui integral, pe baza căruia să se diagnosticheze cancerul de prostată de patologia benignă a prostatei, respectiv prostata normală.

Cele 84 de gene implicate în modularea proceselor biologice ale angiogenezei au inclus factori de creștere și receptori lor, chemokine și citokine, molecule de adeziune și de matrice, proteaze și inhibitori ale acestora, precum și factori de transcripție care sunt implicați în dezvoltarea de noi vase de sânge.

Conform evaluărilor de tip PCR cantitativ o genă a fost considerată ca fiind constitutiv exprimată în cazul în care acesta a fost detectată la un CT (punct de inflexiune) de mai puțin de 35 de cicluri. La valori mai mari de 35, genele au fost considerate a nu fi exprimate. În studiul nostru procentul de gene exprimate în studiul de formare și testare au avut valori aproape similare (fig. 1).

Clusterizarea ierarhică nesupervizată pentru setul de evaluare, care s-a bazat pe similitudinile în expresie pentru toate cele 84 de gene, a relevat două grupări distincte - una pentru probele de PCa (partea superioară) și a doua pentru probele de control (partea de jos - figura 2).

Fiecare rând reprezintă un eșantion și fiecare coloană reprezintă o genă. Probele folosite pentru această clasificare au inclus 6 replicare biologice pentru controale (grupul normal) și 7 replicare biologice pentru grupul de cancer de prostată. Bara de culori indică nivelul de exprimare mRNA: roșu = nivel mai ridicat de exprimare a mARN în probe; verde = nivel mai scăzut de exprimare mARN; negru = lipsa de expresie de mARN.

Pentru toate replicatele biologice a fost aplicat testul-t, pentru calcularea nivelelor de expresie semnificative. S-a considerat de interes doar genele cu $-1.5 < \text{nivel de expresie} > 1.5$ și valoarea $p < 0.05$. Prin analiză de sânge s-au identificat 28 din cele 84 de gene diferit exprimate în sângele pacienților cu cancer de prostată comparativ cu sângele subiecților sănătoși. 38 de gene nu au avut semnificație statistică ($p > 0,05$) iar 18 gene nu au fost exprimate. În ceea ce privește genele statistic semnificative, 3 gene au fost supraexprimate iar 25 au fost subexprimate. (Tabelul 4).

Tabelul 4. Gene de interes cu $-1.5 < \text{nivel de expresie} > 1.5$ și valoarea $p < 0.05$, care sunt diferite exprimate în sângele pacienților cu cancer de prostată comparativ cu sângele subiecților sănătoși.

Nume gena	Descriere (banca de gene - NCBI)	Nivele de expresie	
		malign/normal	p value
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	2.38	0.0221
IL8	Interleukin 8	3.87	0.0143
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	2.85	0.0007
ANGPT2	Angiopoietin 2	-5.57	0.0001
ANGPTL3	Angiopoietin-like 3	-7.39	0.0003
COL18A1	antiangiogenic agent; collagen alpha-1(XVIII) chain; endostatin; multi-functional protein MFP	-1.73	0.0317
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	-5.10	0.0333
CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-6.39	0.0001
FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	-5.03	0.0140
FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	-9.45	0.0001
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	-6.47	0.0257
HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	-2.13	0.0016
HPSE	endo-glucuronidase; heparanase	-1.55	0.0197
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	-5.47	0.0002
ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	-1.90	0.0112
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	-4.10	0.0228
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	-4.73	0.0412
LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	-5.91	0.0001
LEP	Leptin	-4.20	0.0040
MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)	-5.51	0.0001
NOTCH4	Notch homolog 4 (Drosophila)	-2.39	0.0011
PGF	Placental growth factor	-6.83	0.0000
SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	-2.46	0.0010
TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1	-1.77	0.0114
THBS2	Thrombospondin 2	-3.46	0.0005
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	-2.74	0.0000
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	-2.08	0.0033
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	-3.00	0.0034

Cele 28 de gene au fost considerate ca fiind grupul de gene de interes (**semnătura supervizată**) pentru gruparea pacienților cu cancer de prostată comparativ cu subiecți sănătoși. Acestea au fost utilizate pentru generarea clusterului de grupare a probelor incluse în *training set* (figura 3). Distribuția celor 28 de gene statistic semnificative ($-1.5 < \text{nivel de expresie} > 1.5$ și valoarea $p < 0.05$), este prezentată în diagrama Vulcano Plot (figura 4). Aceste date au fost obținute folosind softul *PCR array Data Analysis*. Distribuția celor 28 de gene care compun semnătura supervizată, din figura 4, sunt grupate în două categorii: *stânga* – gene subexprimate, *dreapta* – gene supraexprimate.

Semnătura supervizată obținută în testul training a fost utilizată pentru validare în testul de testare. Gruparea ierarhică (clusterizare) a probelor din setul de testare a pus în evidență două clustere principale: unul pentru probele recoltate de la subiecții sănătoși iar al doilea pentru probele recoltate de la pacienții cu cancer de prostată (figura 5). Toate cele 28 gene utilizate pentru această clasificare în setul de testare s-au dovedit a fi statistic semnificativ exprimate, exactitatea acestei clasificări fiind de 100%. Figura 6 reprezintă diagrama Vulcano Plot a datelor din figura 5 și prezintă distribuția celor 28 de gene statistic semnificative.

În pasul următor, am fost interesați să extindem setul de testare incluzând în algoritm un grup mai mare, inclusiv 11 probe benigne de prostată (tabelul 2). Gruparea ierarhică obținută în acest caz, pe baza aceleiași semnături moleculare supervizate, a dus la obținerea a două clustere (grupe), unul care a grupat cancerele de prostată (n=12) și celalalt care a grupat atât probele de prostată normală cât și pe cele din patologia benignă (hiperplazie și prostatită cronică) (n=17) (figura 7). Toate cele 28 de gene folosite pentru această testare extinsă, au avut valori semnificativ statistic ($-1.5 < \text{nivel de expresie} > 1.5$ și valoarea $p < 0.05$), exactitatea acestei clasificări fiind menținută la 100% (figura 8).

În pasul următor s-a verificat specificitatea acestei semnături pentru cancerul de prostată prin compararea cu alte două localizări tumorale, cancer de sân și de col uterin. Pentru acest test s-au utilizat 15 probe de sânge, 9 de la pacienți cu cancer de sân și 6 de la pacienți cu cancer de col uterin (tabelul 3).

Clusterizarea ierarhică a evidențiat două grupuri distincte: unul pentru la pacienții cu cancer de prostată (n = 12), numit ca *grupul de control* și altul care a inclus celelalte două localizări, cancerul de sân (n = 9) denumit *grup 1* și cel de col uterin (n = 6) denumit *grup 2* (figura 9).

Prin compararea semnăturii moleculare a pacienților cu cancer de prostată cu cele ale pacienților cu cancer de sân, s-au identificat 12 din cele 28 gene (42.85%) ca fiind comune, iar între pacienții cu cancer de prostată și cancer de col uterin au fost comune 15 din cele 28 gene (53.57%).

Metoda noninvazivă pentru detectarea cancerului de prostată bazată pe studiul unui set de gene implicate în mecanismul de angiogeneză presupune efectuarea următoarelor etape (figura 10):

1. de la pacienții cu suspiciune de cancer de prostată (pe baza valorii PSA crescute, a tușeului rectal anormal sau a ecografiei transrectale) se va recolta sânge integral;
2. din sângele integral se va extrage ARN-ul prin metoda clasică (fenol-cloroform) sau cu kituri destinate extracției de ARN din sânge: *ARN Paxgene Blood Kit* (produs *Qiagen*);
3. pe baza reacției de PCR array, se va determina printr-un sistem de analiză comercial (placi de 96 de godeuri) denumit *Human Angiogenesis RT² Profiler™ PCR Array* (SABiosciences, Qiagen), expresia simultană a 84 de gene implicate în modularea angiogenezei; se poate utiliza de asemenea o matrice ce conține setul de 28 de gene ce compun semnătura supervizată;
4. se va analiza nivelul de expresie al celor 28 de gene de interes, funcție de care se va stabili diagnosticul de cancer de prostată (3 gene supraexprimate iar 25 subexprimate, conform tabel 4);
5. stabilirea diagnosticului.

Evaluarea nivelului de expresie genică prin qRT-PCR a celor 28 de gene de interes poate fi analizat cu matricea de analiză prezentată în figura 11. Genele de interes sunt plasate pe liniile A-D coloanele 1-7 (culoare galben deschis). Pe linia E, coloanele 1-7 sunt prezentate genele housekeeping, utilizate pentru normalizarea nivelelor de expresie a genelor de interes, iar E6 reprezintă un control de reacție legat de evaluarea contaminării cu ADN genomic. F 1-3 reprezintă controale de reacție pentru etapa de revers transcriere a speciilor de ARN în ADN complementar, ca etapă a reacției de qRT-PCR. F 4-6 reprezintă controalele pozitive ale reacției de qRT-PCR.

Pe baza matricei de analiză din figura 11 s-a propus realizarea unui senzor cu markeri pentru determinarea expresiei qRT-PCR a celor 28 de gene de interes. Senzorul este construit ca un senzor planar imprimat și este compus dintr-o placă 1 cu niște celule 2 (godeuri) și niște contacte 3. Celulele 2 sunt dispuse pe șase linii (A, B, C, D, E, F) și pe șapte coloane 1, 2, 3, ..., 7. Celulele din liniile A, B, C și D conțin reactivi specifici evaluării nivelului de expresie genică a celor 28 de gene de interes, conform tabloului de atribuire din figura 11. Celulele din linia E sunt destinate genelor „housekeeping”, utilizate pentru normalizarea nivelelor de expresie a genelor de interes, iar celula E6 reprezintă un control de reacție legat de evaluarea contaminării cu ADN genomic. Celulele F1, F2 și F3 au rolul de controale de reacție pentru etapa de revers transcriere a speciilor de ARN în ADN complementar, ca etapă a reacției de qRT-PCR. Celulele F4, F5 și F6 reprezintă controalele pozitive ale reacției de qRT-PCR.

Contactele 3, de forma unor pini, sunt dispuse pe două rânduri, amplasate sus-jos, fiecare rând având 21 de contacte. Primul rând de contacte conține trei grupe a, c, f, de câte șapte contacte, corespunzătoare celulelor din liniile A, C, F. Al doilea rând de contacte conține tot trei grupe de câte șapte contacte b, d, e, corespunzătoare celulelor din liniile B, D și E.

Legătura dintre celulele 2 și contactele 3 se realizează prin tehnica imprimării, pe o folie de poliester.

Citirea și evaluarea rezultatelor se face prin conectarea senzorului la un periferic al unui sistem de calcul. Un program oferă diagnosticul pe baza datelor citite. Analiza se face prin tehnica de PCR cantitativ (qRT-PCR), care presupune evaluarea unui semnal fluorescent dat de unul din reactivii ce se utilizează în reacție, respectiv traducerea informației fluorescente în valori numerice ce reprezintă nivele de expresie genică.

Realizarea senzorului în construcție planară, imprimată, conduce la dimensiuni mici fapt ce determină un consum mic de materiale și un preț redus de fabricație, aspect ce face posibilă realizarea sa ca senzor de unică folosință.

O posibilă perfecționare a metodei ar consta în stabilirea unui diagnostic precoce, pentru pacienții cu valoarea normală a PSA. Studiul a inclus un singur pacient cu valoarea PSA =3.4, care s-a încadrat în clusterizare dar nu se poate trage o concluzie de diagnostic precoce pe un singur caz.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- elaborarea unei metode de analiză noninvazivă, sigură și ușor de aplicat;
- posibilitatea diagnosticării cancerului de prostată cu o acuratețe crescută, pe baza unei semnături moleculare ușor de identificat prin analiza sângelui integral;
- posibilitatea de limitare a biopsiilor de prostată pentru pacienții care nu prezintă forma malignă, care de multe ori nu sunt necesare, dar sunt stresante pentru pacienți.

REVENDICĂRI

1. Metodă noninvazivă pentru detectarea cancerului de prostată bazată pe studiul unui set de gene implicate în mecanismul de angiogeneză, **caracterizată prin aceea că**, presupune efectuarea următoarelor etape:

- a. de la pacienții cu suspiciune de cancer de prostată (pe baza valorii PSA crescute, a tușeului rectal anormal sau a ecografiei transrectale) se va recolta sânge integral;
- b. din sângele integral se va extrage ARN-ul prin metoda clasică (fenol-cloroform) sau cu kituri destinate extracției de ARN din sânge: *ARN Paxgene Blood Kit (produs Qiagen)*;
- c. pe baza reacției de PCR array, se va determina printr-un sistem de analiză comercial (placi de 96 de godeuri) denumit *Human Angiogenesis RT² Profiler™ PCR Array* (SABiosciences, Qiagen), expresia simultană a 84 de gene implicate în modularea angiogenezei; de asemenea se poate utiliza o matrice ce conține setul de 28 de gene ce compun semnătura supervizată;
- d. se va analiza nivelul de expresie al celor 28 de gene de interes, funcție de care se va stabili diagnosticul;
- e. stabilirea diagnosticului.

2. Metoda noninvazivă pentru detectarea cancerului de prostată bazată pe studiul unui set de gene implicate în mecanismul de angiogeneză, **caracterizată prin aceea că**, cele 28 de gene de interes, în funcție de care se va stabili diagnosticul sunt următoarele:

Nr.crt.	Nume gena	Descriere (banca de gene - NCBI)
1.	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
2.	IL8	Interleukin 8
3.	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
4.	ANGPT2	Angiopoietin 2
5.	ANGPTL3	Angiopoietin-like 3
6.	COL18A1	antiangiogenic agent; collagen alpha-1(XVIII) chain; endostatin; multi-functional protein MFP
7.	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
8.	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
9.	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
10.	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
11.	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
12.	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
13.	HPSE	endo-glucuronidase; heparanase
14.	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein

15.	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
16.	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
17.	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
18.	LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1
19.	LEP	Leptin
20.	MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
21.	NOTCH4	Notch homolog 4 (Drosophila)
22.	PGF	Placental growth factor
23.	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
24.	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1
25.	THBS2	Thrombospondin 2
26.	TIMP1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1
27.	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
28.	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C

3. Metodă noninvazivă pentru detectarea cancerului de prostată bazată pe studiul unui set de gene implicate în mecanismul de angiogeneză, conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizată prin aceea că**, analiza genelor de interes se face prin conectarea unei matrice ce conține cele 28 de gene de interes implicate în modularea angiogenezei la un sistem de analiză de tip PCR (reacția în lanț a polimerazei) cu rol de evaluare a nivelurilor de expresie a celor 28 de gene, utilizând sonde fluorescente și reactivi (primeri) specifici fiecărei gene, stabilirea nivelului de expresie genică și transformarea valorii colorimetrice (fluorescente) în valori numerice făcându-se prin normalizarea genelor de interes la cele 5 gene housekeeping, nivelul prag al expresiei genice s-a ales 1.5, genele subexprimate având valoarea numerică sub valoarea de prag, iar genele supraexprimate având valoarea numerică peste valoarea de prag.
4. Metoda noninvazivă pentru detectarea cancerului de prostată bazată pe studiul unui set de gene implicate în mecanismul de angiogeneză, conform revendicărilor 1, 2 și 3, **caracterizată prin aceea că**, diagnosticul se va stabili prin evaluarea unei matrice de analiză având liniile A,B,..., F și coloanele 1,2,...,7, matricea alcătuită din: celulele din liniile A, B, C și D conțin reactivi specifici evaluării nivelului de expresie genică a celor 28 de gene de interes, conform următorului tablou de atribuire

	1	2	3	4	5	6	7
A	ANGPT2	ANGPTL3	COL18A1	COL4A3	CXCL3	FGF1	FIGF
B	FLT1	HGF	HPSE	ID1	ID3	IFNB1	IL6
C	LECT1	LEP	MDK	NOTCH4	PGF	SERPINF1	TGFBR1
D	THBS2	TIMP1	VEGFA	VEGFC	CXCL1	IL8	ITGAV
E	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	GDC	
F	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC	

celulele din linia E sunt destinate genelor „housekeeping”, utilizate pentru normalizarea nivelelor de expresie a genelor de interes, iar celula E6 reprezintă un control de reacție legat de evaluarea contaminării cu ADN genomic, celulele F1, F2 și F3 având rolul de controale de reacție pentru etapa de revers transcriere a speciilor de ARN în ADN complementar, ca etapă a reacției de qRT-PCR, iar celulele F4, F5 și F6 reprezintă controalele pozitive ale reacției de qRT-PCR.

5. Metodă noninvasivă pentru detectarea cancerului de prostată bazată pe studiul unui set de gene implicate în mecanismul de angiogeneză, conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că**, pentru determinarea expresiei qRT-PCR a celor 28 de gene de interes utilizează un senzor planar imprimat cu markeri, conectat la un periferic al unui sistem de calcul, senzorul fiind compus dintr-o placă (1) cu niște celule/godeuri (2) și niște contacte (3), de forma unor pini, dispuse pe două rânduri cu câte 21 de contacte, primul rând de contacte conține trei grupe a, c, f, de câte șapte contacte, corespunzătoare celulelor din liniile A, C, F ale matricei de analiză, al doilea rând de contacte conține tot trei grupe de câte șapte contacte b, d, e, corespunzătoare celulelor din liniile B, D și E ale matricei de analiză, legătura dintre celulele (2) și contactele (3) realizându-se prin tehnica imprimării, pe o folie de poliester, diagnosticul fiind oferit de un program prin citirea și evaluarea rezultatelor de la senzor.

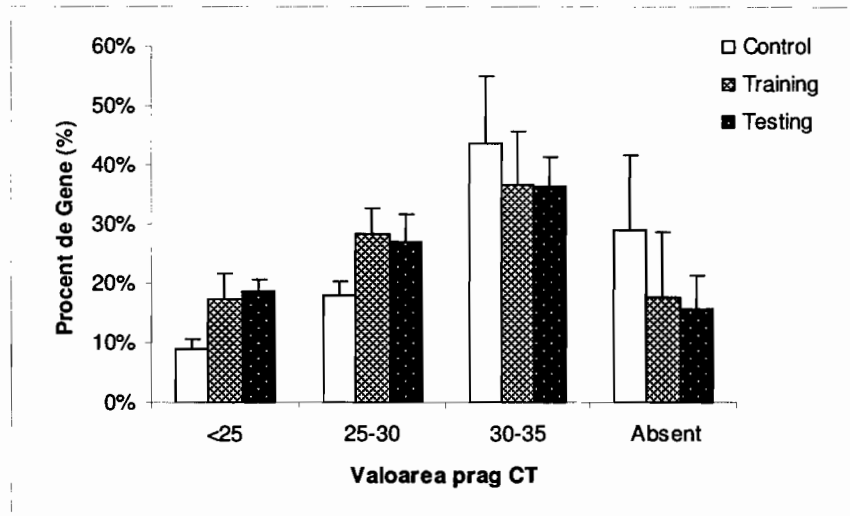


Figura 1

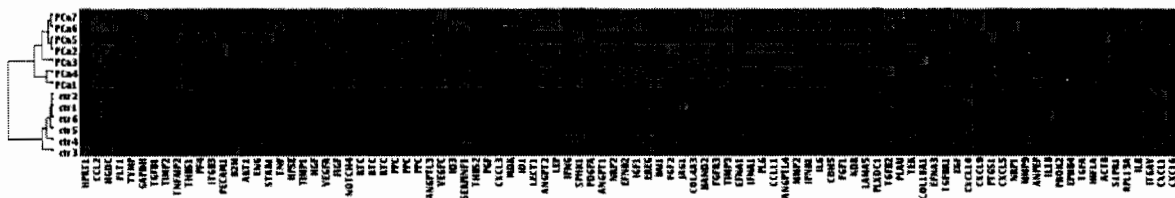


Figura 2

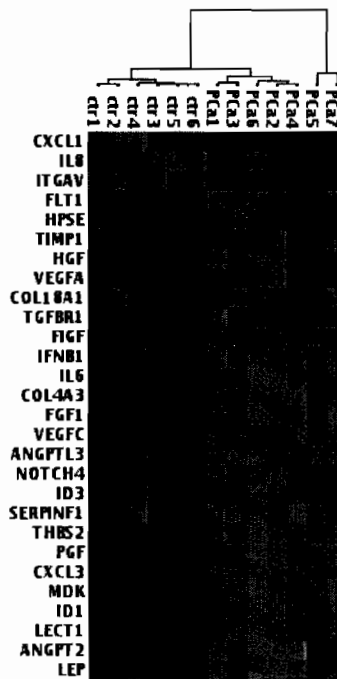


Figura 3

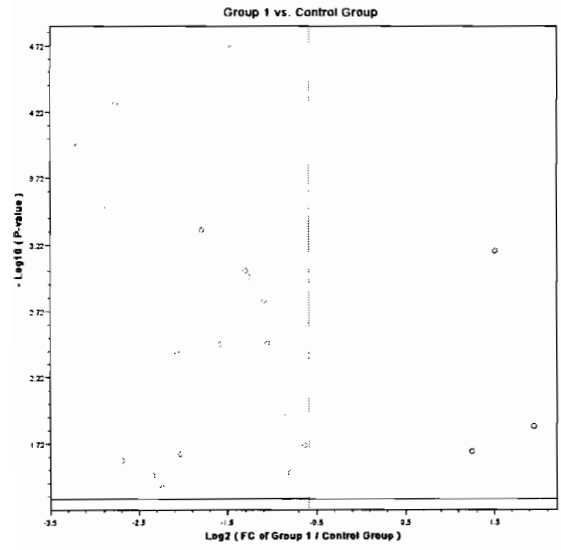


Figura 4

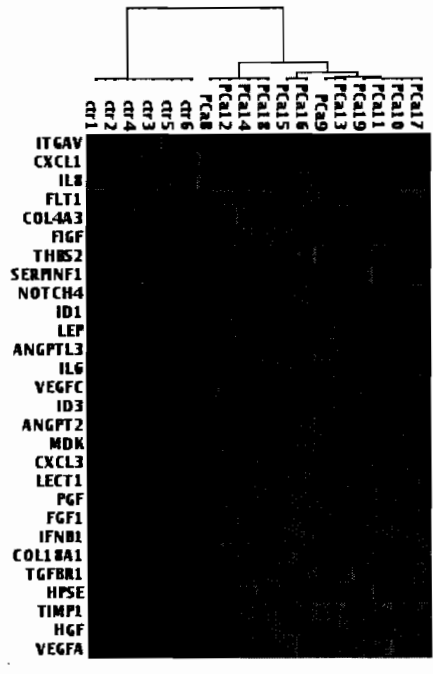


Figura 5

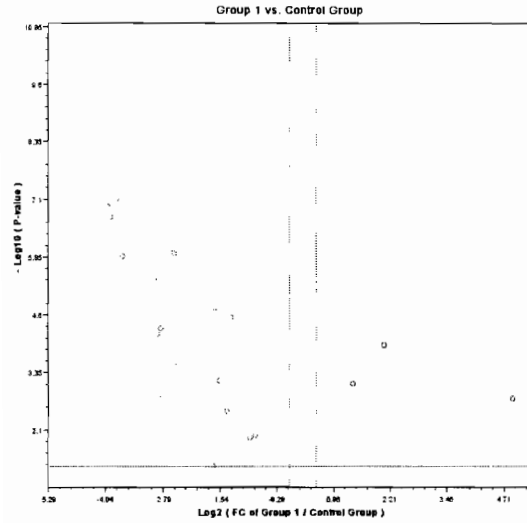


Figura 6

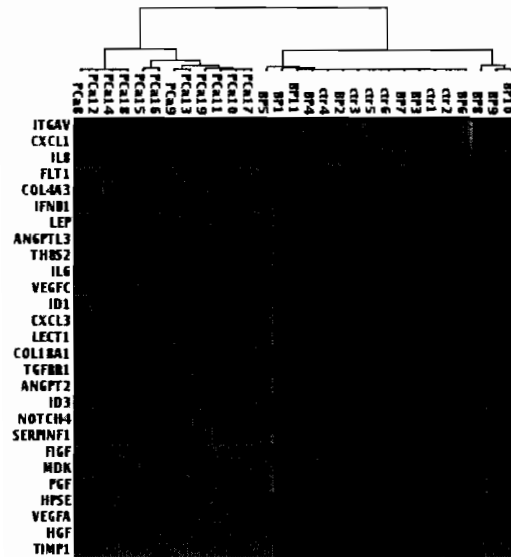


Figura 7

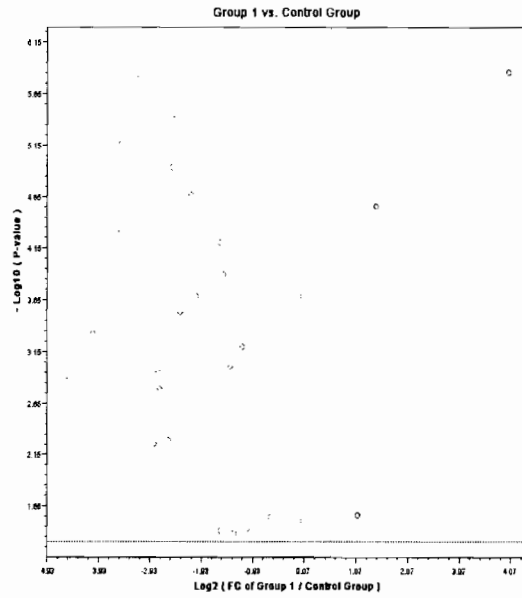


Figura 8

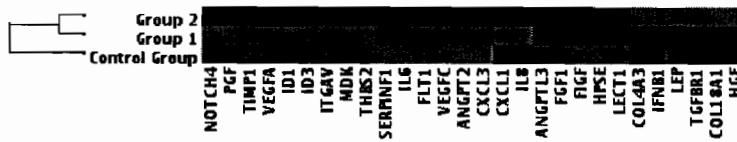


Figura 9

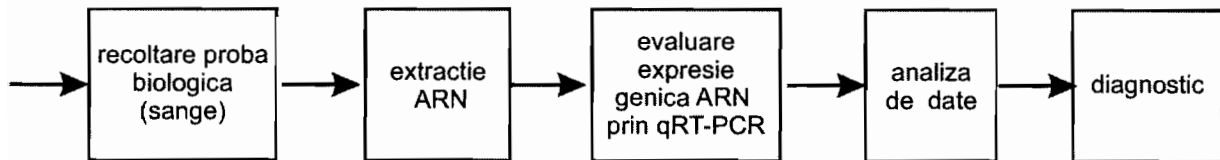


Figura 10

	1	2	3	4	5	6	7
A	ANGPT2	ANGPTL3	COL18A1	COL4A3	CXCL3	FGF1	FIGF
B	FLT1	HGF	HPSE	ID1	ID3	IFNB1	IL6
C	LECT1	LEP	MDK	NOTCH4	PGF	SERPINF1	TGFBR1
D	THBS2	TIMP1	VEGFA	VEGFC	CXCL1	IL8	ITGAV
E	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	GDC	
F	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC	

Figura 11

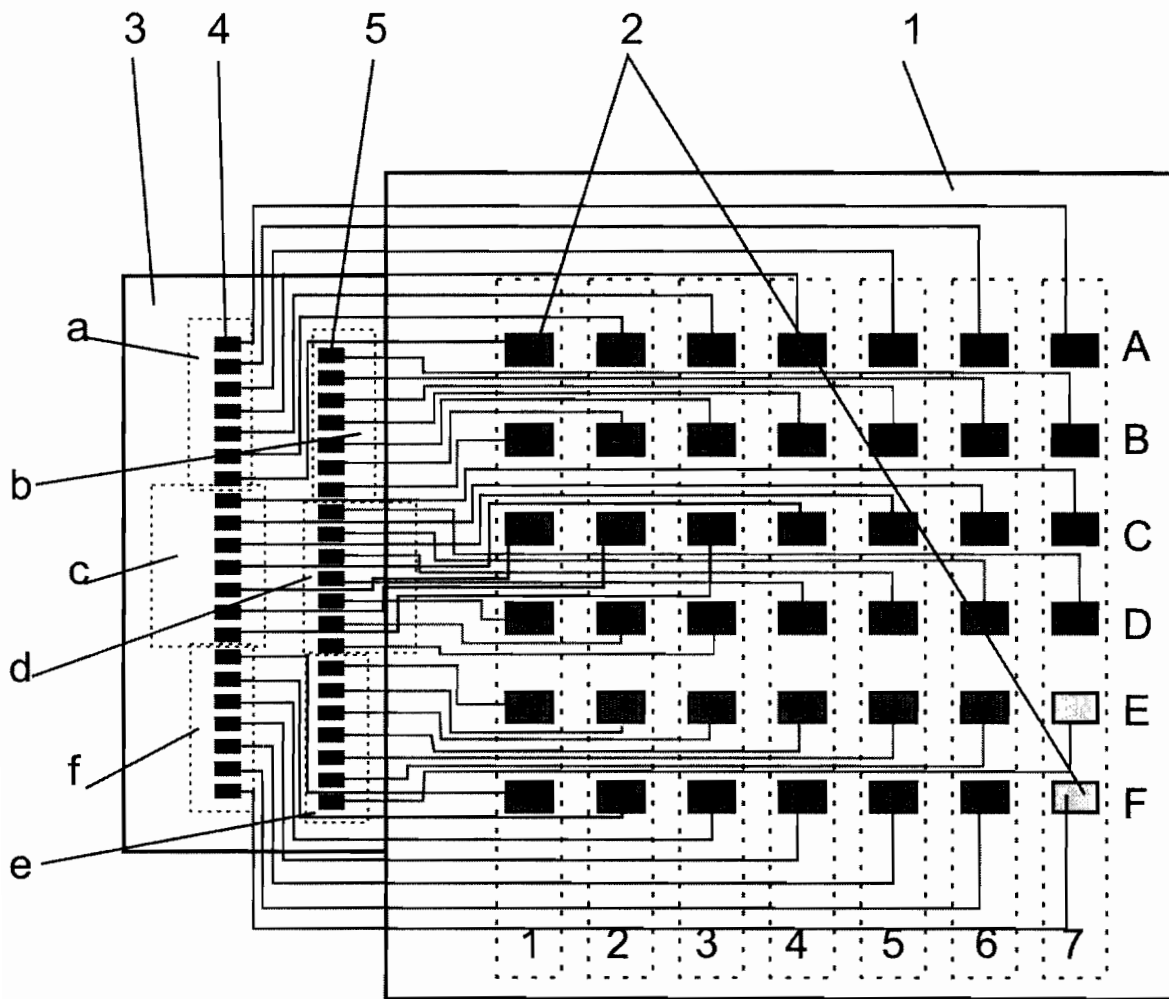


Figura 12