



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01378

(22) Data de depozit: 09.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. 8/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL ONCOLOGIC "PROF. DR.
ION CHIRICUTA", STR. REPUBLICII
NR. 34-36, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. EMIL ISAC NR. 13,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

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

• BĂLĂCESCU LOREDANA OFELIA,
STR. LOIUS PASTEUR NR. 59, AP. 38,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• NEAGOE IOANA, BD. N. TITULESCU
NR. 2, AP. 57, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ALEXANDRU IRIMIE, STR. ADY ENDRE
NR. 40, 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 DE PREDICȚIE A RĂSPUNSULUI LA
RADIO-CHIMIOTERAPIE ÎN CANCERUL DE COL UTERIN
PRIN STUDII DE GENOMICĂ FUNCȚIONALĂ**

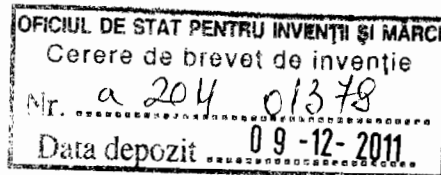
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de predicție a răspunsului la radio-chimioterapie cu cisplatin, în cancerul de col uterin. Metoda conform invenției constă din studii de genomică funcțională, pe baza analizei unui set de gene din probele biologice prelevate de la pacienți, înainte de inițierea tratamentului și determinarea genelor nodale, implicate în modularea reparării leziunilor ADN, induse de terapie, prin parcurgerea următoarelor etape: recoltarea probelor,

extragerea ARN total, sintetizarea microarray cu marcaj monocolor, hibridarea pe lame, analiza bioinformatică pentru identificarea setului de gene de interes, analiza de funcționalitate moleculară și stabilirea predicției la terapia de bază, pe baza rezultatului molecular, cu posibilitatea alegerii unei terapii individuale.

Revendicări: 4
Figuri: 8





Metoda de predicție a răspunsului la radio-chimioterapie în cancerul de col uterin prin studii de genomica funcțională.

Declarație privind sponsorizarea invenției

Această invenție s-a bazat pe un studiu de cercetare finanțat de un grant de tip parteneriate nr. 42160/2008 acordat de către Planul Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare II, „Parteneriate în domeniile prioritare”.

Prezenta invenție are adresabilitate domeniului medical și se referă la o metodă de predicție a răspunsului la terapie în cancerul de col uterin.

Cancerul de col uterin reprezintă al treilea cancer cel mai frecvent diagnosticat și a patra cauză de deces prin cancer la femei la nivel mondial, reprezentând 9% (529800) din totalul cazurilor noi de cancer și de 8% (275100) din totalul deceselor provocate de cancer în rândul femeilor în anul 2008. Dintre acestea, 85% dintre cazuri au fost înregistrate în țările în curs de dezvoltare.

În România cancerul de col uterin reprezintă o reală problemă de sănătate publică, atât în ceea ce privește frecvența, cât și mortalitatea, situându-se pe primul loc în Europa și locul 6 în lume.

Ultimele informații furnizate de baza de date UpToDate, ce reunește informațiile din peste 375 de jurnale de specialitate și alte surse, în domeniul epidemiologiei cancerului de col uterin invaziv (*Epidemiology, clinical features, and diagnosis of invasive cervical cancer*) arată că incidența și rata de mortalitate sunt dispartate la nivel mondial. În țările dezvoltate s-a observat în ultimii 50 de ani o scădere cu 75% atât în incidența, cât și mortalitatea produse de cancerul de col uterin. În contrast, în țările în curs de dezvoltare cancerul de col uterin reprezintă a doua cauză de mortalitate și morbiditate legate de cancer, cu 371.200 de noi cazuri înregistrate anual și cu o mortalitate de 50%. De asemenea în rândul țărilor în curs de dezvoltare și al celor slab dezvoltate este estimată o creștere alarmantă cu triplarea numărului de cancere de col uterin până în anul 2050.

Discrepanța majoră între aceste date este data de implementarea instituțională a programelor de prevenție a apariției cancerului de col uterin la nivelul țărilor puternic industrializate respectiv inexistența sau slabă implementare a programelor prevenționale în celelalte țări.

Cercetarea în patologia colului uterin vizează identificarea de noi tinte moleculare premergătoare stabilirii unor terapii individualizate în predicția răspunsului la terapia cu cisplatina în stadiile avansate IIB–IIIB. Tratamentul clasic al cancerului de col uterin avansat loco-regional asigură o supraviețuire la 5 ani de 66-76% în stadiul IIB, 45-56% în IIIA și 36-40 % în IIIB.

Din cercetarea făcută în bazele de date pentru invenții s-a constatat că există mai multe invenții care prezintă metode bazate pe analiză moleculară și care au ca scop predicția sau diagnoza cancerului, dar nu s-a găsit o metodă care să permită determinarea răspunsului la radio-chimioterapie cu cisplatin.

Brevetul WO200709365 “Method for the molecular diagnosis of prostate cancer and kit for implementing same” prezintă o metodă de analiză moleculară utilizată pentru diagnosticul cancerului de prostată, bazată pe analiză *in vitro*, într-un eșantion de testare, și care ia în considerare acțiunea sinergetică a unor subgrupuri de gene selectate dintr-un grup de 60 de gene determinate de inventatori. Metoda prezentată în această invenție nu are aplicabilitate pentru predicția răspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin în cancerul de col uterin.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă este de a oferi o metodă eficientă de analiză moleculară, care să asigure rezultate bune privind predicția răspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin în cancerul de col uterin locoregional avansat.

Metoda de predicție a răspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin în cancerul de col uterin prin studii de genomica funcțională, conform invenției, se bazează pe analiză unui set de gene din probele biologice prelevate de la pacienți înainte de inițierea radio-chimioterapiei, determinarea genelor nodale implicate în modularea reparării leziunilor ADN induse de terapie și presupune efectuarea următoarelor etape: recoltarea probelor, extragerea de ARN total, sintetizarea microarray cu marcaj one-color, hibridarea pe lame, analiză bioinformatică pentru identificarea setului de gene de interes, analiză de funcționalitate moleculară și stabilirea predicției la terapie pe baza rezultatului molecular.

Metoda se bazează pe un studiu prospectiv la care au participat 65 de pacienți cu cancer de col uterin loco-regional avansat (stadiu IIB-IIIB), pe baza unor criterii de includere stabilite

anterior. De la toate pacinetele s-au prelevat probe biologice (tesut) înainte de initierea radio-chimioterapiei cu cisplatin.

Aprobarea studiului s-a făcut de către Comitetul de Etică al Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuta" Cluj-Napoca, 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.

Se da în continuare un exemplu de aplicare a metodei în legătură cu figurile explicative 1, 2, ..., 8, care reprezintă:

- figura 1, evaluarea cantității și a încărcăturii de Cy3 în sondele de microarray sintetizate din ARN-ul mesager al probelor de interes ;
- figura 2, imagine lama microarray 4x44k (251485031609_S01_H);
- figura 3, normalizarea prin metoda Quantile a intensităților pentru cele două grupuri luate în studiu: *raspuns* – galben, *nonraspuns* - verde a) intensități brute, b) intensități normalizate;
- figura 4, reprezentarea Vulcano plot pune în evidență gene supra și subexprimate de 1.5 ori, la un $p < 0.05$ în NR vs CR ;
- figura 5, clusterizarea ierarhică aglomerativă supervizată, realizată pentru grupul genelor diferit exprimate între NR și CR (albastru – nivel de expresie scăzut în NR vs CR, roșu – nivel de expresie crescut în NR vs CR);
- figura 6, principalele căi canonice implicate în modularea răspunsului la terapia cu cisplatin în patologia colului uterin;
- figura 7, analiză funcțională a principalelor molecule implicate în repararea leziunilor ADN, care stau la baza rezistenței la terapie în cancerul de col uterin locoregional avansat (analiză Ingenuity);
- figura 8, schema logică de analiză predictivă.

Recoltarea și prelucrarea probelor

Probele tisulare au fost recoltate în aceleași condiții și stocate în azot lichid până la utilizarea lor ulterioară. ARN-ul total a fost izolat după politrone cu kitul *RNeasy mini kit* (Qiagen), conform instrucțiunilor producătorului. Evaluarea de calitate și cantitate s-au făcut prin nanotehnologii (NanoDrop Technologies și Bioanalyzer 2100). Toate probele au trecut rigurile 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/ μ l.

Au fost alese pentru studiul de genomica functionala 24 de probe, 12 cu raspuns complet la terapie (RC) si 12 fara raspuns la terapie (NR), evaluarea fiind facuta la 6 luni post radiochimioterapie.

Evaluarea studiului

Studiul de genomica functionala s-a facut prin tehnologia Agilent cu lame 4x44k WHG (Whole Human Genome), folosind un monocolor cu Cy3.

Sinteza de sonde microarray s-a facut cu kitul *Low Input Linear Amplification Kit* al (Agilent) conform instructiunilor producatorului, plecand de la o cantitate de 1000 ng ARN total. Sondele sintetizate au fost evaluate pentru cantitate si activitate, utilizand spectrofotometrul nanodrop ND-1000 (Figura 1).

Activitatea sondelor microarray a fost calculata si pe baza formulelor de mai jos:

$$\frac{(\text{Concentratia de cARN}) \times \text{Vol}(\text{volum de studiu})}{1000} = \mu\text{g cARN}$$

$$\frac{\text{Concentratia de Cy3}}{\text{Concentratia de cARN}} \times 1000 = \text{pmol Cy3} / \mu\text{g cARN}$$

Activitatea specifica minima pentru sondele microarray utilizate pentru hibridare pe lame microarray 4x44k a fost de 6 pmol/ μ g cRNA. Cantitatea de sonda utilizata pentru hibridare a fost de 1250 ng, specific tipului de lama microarray 4x44k, intr-un volum maxim de solutie de hibridare de 8 μ l.

Hibridarea sondelor microarray s-a realizat utilizand reactivii specifici din kitul *Gene Expression Hybridization Kit*, produs de compania Agilent. Hibridarea s-a facut la o temperatura de 65^o C timp de 17 ore. Post hibridare lamele au fost spalate in doua bai cu concentratii diferite de triton (Wash Buffer 1 si Wash Buffer 2). Ulterior lamele au fost supuse unui tratament cu Acetonitril si Stabilization and Drying Solution (produs Agilent) avand drept scop prevenirea degradarii marcajului fluorescent de catre ozonul atmosferic.

Dupa uscare, lamele au fost scanate la 2 rezolutii diferite (low and high) cu un scanner Agilent (model G2565 BA) pentru a prinde atat semnalele cu intensitati scazute, cat si semnalele cu intensitati foarte mari (Figura 2).

Doua dintre probe (NR) nu au trecut conditiile de calitate post hibridare si au fost eliminate din studiu (Figura 1 pozitia 3).

Tehnica de analiza a datelor microarray

Pentru analiza bioinformatica s-au utilizat softurile Feature Extraction, Gene Spring GX si Ingenuity. Imaginile lamelor microarray generate de scanner reprezinta datele brute ale experimentului. Utilizand algoritmul implementat in softul Feature Extraction (FE), intensitatile semnalelor fluorescente au fost transformate in informatii numerice care cuantifica nivelul de expresie genica din probele analizate. A fost utilizat protocolul GE2_107_Sep09 si designul 014868_D_F_20100804. Post scanare a fost evaluata calitatea procesului de hibridare. Rapoartele de calitate generate de FE au pus in evidenta erori aditive ≤ 10 , pentru cele doua grupuri luate in studiu, ceea ce a corespuns standardelor de calitate pentru lamele microarray.

Preprocesarea si analiza diferentiala a datelor microarray

Preprocesarea si analiza diferentiala a datelor s-a realizat cu softul Gene Spring GX. Etapa de preprocesare a cuprins:

- eliminarea controalelor pozitive si negative
- normalizarea inter-array
- sumarizarea secventelor duplicate de pe array
- filtrarea spoturilor saturate si neuniforme

In procesul de normalizare inter-array a fost folosita metoda Quantile. Aceasta metoda transforma distributiile datelor in distributii identice pentru a putea fi comparate pe picior de egalitate (Figura 3).

Dupa normalizare, au fost retinute pentru analiza doar secventele pentru care spoturile corespunzatoare nu au fost marcate ca saturate si neuniforme in cel putin 19 din 22 probe (*CR* si *NR*). La finalul etapei de preprocesare s-au obtinut 41089 secvente.

Diferentele moleculare intre probele luate in studiu au fost puse in evidenta printr-o metoda nesupervizata si anume, clusterizarea ierarhica aglomerativa. Scopul metodelor de clusterizare este de a diviza genele sau probele in grupuri (cluster) pe baza similaritatii dintre acestea, folosind corelatii sau distante euclidiene. Aceste analize confirma faptul ca probele cu proprietati biologice similare tind să aiba un profil molecular asemanator. Pentru aceasta clusterizare masurarea similaritatii a fost făcută pe baza *distantelor euclidiene*, iar ca metoda

de grupare a clusterelor a fost aleasa *metoda ward*. Clusterizarea ierarhica aglomerativa a pus in evidenta formarea a doua clusteres corespunzatoare celor doua grupuri luate in studiu.

Pentru identificarea secventelor diferit exprimate între grupurile luate în studiu s-a aplicat testul t nepereche și corecția FDR pentru testari multiple. Cut off-ul pentru valoarea p ajustat a fost stabilit la 0.05, iar pentru valoarea fold change la ± 1.5 . Au fost identificate 2896 gene diferit exprimate între grupul probelor fara raspuns (NR) și grupul probelor cu raspuns (CR) recoltate înainte de terapie (Figura 4). Dintre acestea 1583 gene au fost supraexprimate, iar 1313 au fost subexprimate in NR comparativ cu CR.

In continuare s-a realizat o clusterizare ierarhica aglomerativa supervizata, realizata pentru grupul genelor diferit exprimate. Acest tip de analiza supervizata a pus in evidenta separarea a doua clusteres distincte, unul care integreaza doar probele cu lipsa de raspuns (NR) și altul care integreaza probele cu raspuns complet (RC) (Figura 5).

Analiza functionala a datelor microarray

Ulterior au fost investigate implicatiile acestor gene la nivelul interactiunilor moleculare utilizand softul Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Au fost identificate principalele functii celulare și moleculare in care aceste gene sunt implicate. Cea mai importanta cale canonica implicata in raspunsul la terapie a fost cea care a avut in prim plan gena BRCA1 și setul de gene implicate in modularea acesteia.

Reprezentarea grafica a retelelor moleculare a facut posibila stabilirea genelor nodale, a tipului de interactiune dintre acestea și produsii acestora. Pentru analiza functionala s-a avut in vedere evaluarea mecanismelor principale care stau la baza inducerii rezistentei la cisplatin. Astfel au fost evaluate retelele moleculare implicate in capacitatea reparatorie a leziunilor la nivelul ADN. Acest mecanism este considerat ca fiind implicat in inducerea rezistentei la terapie ca urmare a unor posibile modificari de fenotip care apar la nivelul celulelor tumorale, respectiv la castigarea unor avantaje de reparare a leziunilor la nivelul ADN, functie de care este indusa apoptoza.

Prin urmare, accentul principal al acestei analize a tinut cont de clasa de gene implicate in repararea leziunilor mono- și dublu catenare pe care le induce cisplatinul și radioterapia la nivelul celulelor tumorale. Functie de tipul de actiune al acestor gene, supra sau sub expresie, se poate face o predictie asupra raspunsului sau lipsei de raspuns la terapie, pachetul de gene identificat fiind parte a unei analize supervizate care a grupat probele biologice functie de raspunsul la terapie.

Au fost integrate cinci rețele moleculare care au integrat gene diferite, dar care au creat o rețea unică de cooperare între moleculele țintă.

Analiza rețelilor moleculare a dus la identificarea unui număr de gene nodale de interes în cancerul de col uterin rezistent la terapie (NR) comparativ cu grupul de cancer de col uterin cu răspuns la terapie (RC). Cele mai importante gene nodale implicate în modularea reparării leziunilor ADN induse de terapie, (cisplatin) au fost: BRCA1, BRCA2, RAD51, BRCC3, HMGB1, BRAT1, ABCB10, FNCl, FANCD2, BLM, ERCC4, ERCC6, PMS2, MSH6, RFC1. Toate aceste gene identificate au avut nivele de expresie crescute în probele NR comparativ cu lotul CR, unde s-au înregistrat nivele scăzute de expresie ale acestor gene. Nivelele crescute ale acestor gene semnifică o capacitate crescută de reparare a leziunilor mono și dublu catenare induse de terapie și radiații și cisplatin (Figura 7).

Acest aspect se traduce printr-o acțiune redusă a cisplatinului la nivelul celulelor tratate, ceea ce reprezintă un răspuns parțial la terapie. În cazul în care aceste gene sunt subexprimate, ineficiența de reparare a leziunilor induse de cisplatin poate duce la o acumulare de leziuni la nivel ADN ceea ce va duce la o activare a mecanismului de apoptoză și în final la creșterea eficienței terapiei anti-tumorale.

Metoda predictivă pentru radio-chimioterapia cancerului de col uterin este bazată pe studiul unui set de gene implicate în capacitatea reparatorie a leziunilor la nivel ADN în mecanismul de angiogeneză și presupune efectuarea următoarelor etape (Figura 8):

1. se recoltează țesut prin biopsie cervicală de la pacienții cu cancer de col locoregional avansat (stadiul IIB-IIIIB);
2. din biopsie se extrage ARN-ul prin metoda kiturilor de extracție *RNeasy mini kit* (Qiagen);
3. pe baza reacției de microarray, tehnologia Agilent, folosind lame pangenomice 4x44k, se analizează nivelul global de expresie genică între probe care provin de la pacienți cu răspuns complet la radio-chimioterapie și pacienți fără răspuns la radio-chimioterapie;
4. analiza bioinformatică și de funcționalitate realizată prin softurile Feature Extraction, Gene Spring și Ingenuity pune în evidență clase de gene diferit exprimate. Sunt alese genele cu nivel de expresie mai mare de ± 1.5 și un p ajustat de minim 0.05;
5. validarea genelor de interes identificate din setul obținut prin reacția de microarray, prin reacția de qRT-PCR;
6. utilizarea setului de gene pentru stabilirea predicției la terapie. În cazul în care aceste gene sunt subexprimate, ineficiența de reparare a leziunilor induse de cisplatin poate

duce la o acumulare de leziuni la nivel ADN ceea ce va duce la o activare a mecanismului de apoptoza si in final la cresterea eficientei terapiei anti-tumorale. Nivele crescute de expresie ale acestor gene vor previziona un raspuns complet la tratamentul cu radio-chimioterapie in cancerul de col uterin.

Prin aplicarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

- elaborarea unei metode de analiza predictiva pentru raspunsul la radio chimioterapia cu cisplatin in cancerul de col uterin;
- posibilitatea alegerii unei terapii individualizate bazate pe o analiza moleculara anterioara.

Revendicari

1. Metoda de predictie a raspunsului la radio-chimioterapie cu cisplatin in cancerul de col uterin prin studii de genomica functionala, **caracterizata prin aceea ca**, presupune efectuarea urmatoarelor etape:
 - a. se recolteaza biopsii de la pacientele cu cancer de col uterin loco-regional avansat;
 - b. din biopsii se extrage ARN-ul total prin metoda cu kituri de extractie (*Qiagen Rneasy mini kit*);
 - c. se sintetizeaza sonde microarray cu marcaj one-color cu fluorocromul Cy3 cu kituri Agilent (*Low Input Linear Amplification Kit*);
 - d. sondele microarray se hibrideaza pe lame Agilent 4x44k folosind kituri specifice (*Gene Expression Hybridization Kit*);
 - e. se face analiza bioinformatica pentru identificarea setului de gene de interes folosind softuri destinate tehnologiei Agilent (*Featarte Extraction si Gene Sping GX*);
 - f. se face analiza de functionalite moleculara folosind softul Ingenuity;
 - g. se stabileste predictia la terapie pe baza rezultatului molecular.

2. Metoda de predictie a raspunsului la radio-chimioterapie cu cisplatin in cancerul de col uterin prin studii de genomica functionala, conform revendicarii 1, **caracterizata prin aceea ca**, selectarea unui set de gene de interes utilizat in analiza bioinformatica se realizeaza prin analiza retelelor moleculare care au dus la identificarea unui numar de gene nodale de interes in cancerul de col uterin rezistent la terapie (NR) comparativ cu grupul de cancer de col uterin cu raspuns la terapie (RC), dintre care s-au selectat cele mai importante 15 gene nodale implicate in modularea repararii leziunilor ADN induse de terapie: BRCA1, BRCA2, RAD51, BRCC3, HMGB1, BRAT1, ABCB10, FNCI, FANCD2, BLM, ERCC4, ERCC6, PMS2, MSH6, RFC1, genele selectate avand nivele de expresie crescute in probele NR comparativ cu lotul CR, unde s-au inregistrat nivele

scazute de expresie, iar analiza bioinformatica se face cu softul Feature Extraction, Gene Spring GX, Ingenuity pentru un nivel de expresie ± 1.5 si valoare $p \leq 0.05$.

3. Metoda de predictie a raspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin in cancerul de col uterin prin studii de genomica functionala, conform revendicarilor 1 si 2, **caracterizata prin aceea ca**, analiza genelor de interes implicate in repararea leziunilor ADN induse de radio-chimioterapie se identifica prin microarray, prin tehnica de qRT-PCR, gena housekeeping utilizata pentru normalizarea datelor fiind gena 18S.
4. Metoda de predictie a raspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin in cancerul de col uterin, conform revendicarii 2, **caracterizata prin aceea ca**, se bazeaza pe evaluarea nivelului de expresie a unui set de 15 gene implicate in modularea raspunsului la repararea leziunilor ADN induse de radio-chimioterapie, supraexpresia setului de gene indicand o lipsa de raspuns sau un raspuns partial, in timp ce lipsa de expresie a acestora indica un raspuns complet la terapie.

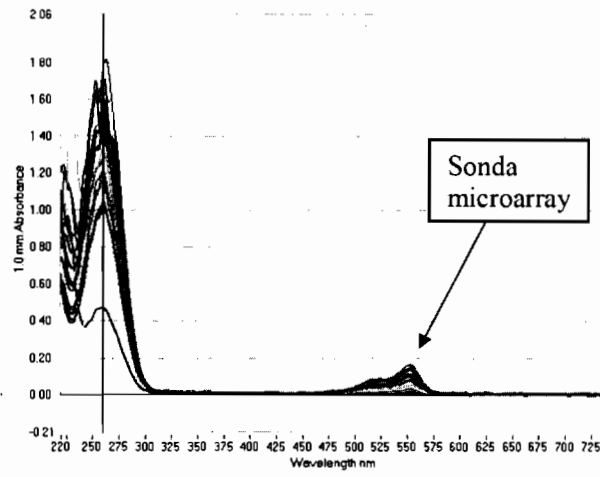


Figura 1

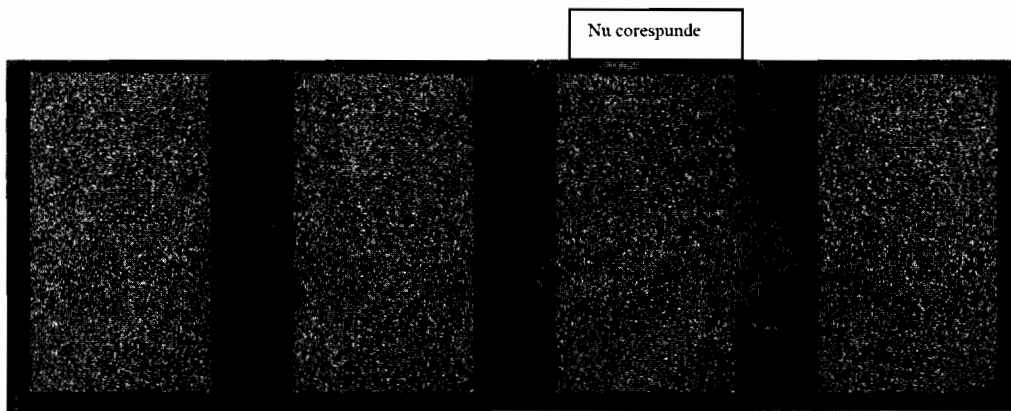


Figura 2

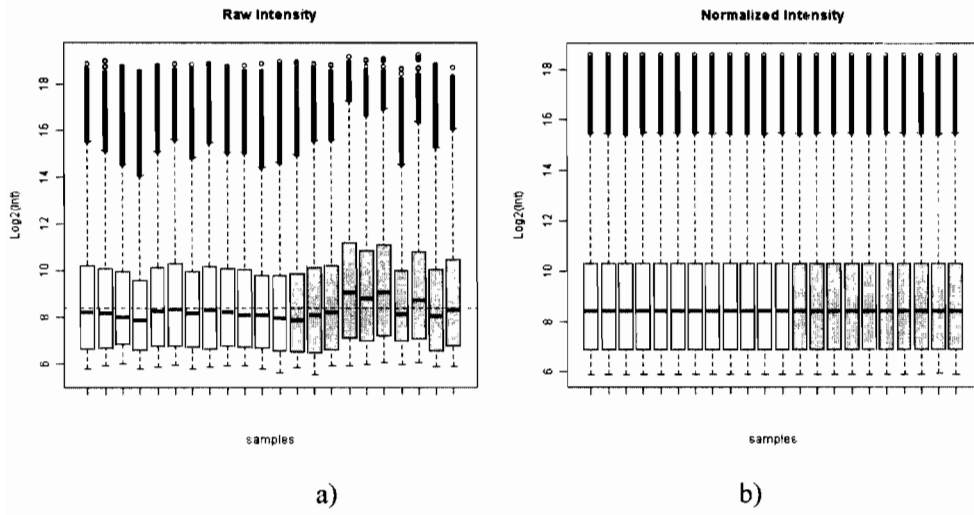


Figura 3

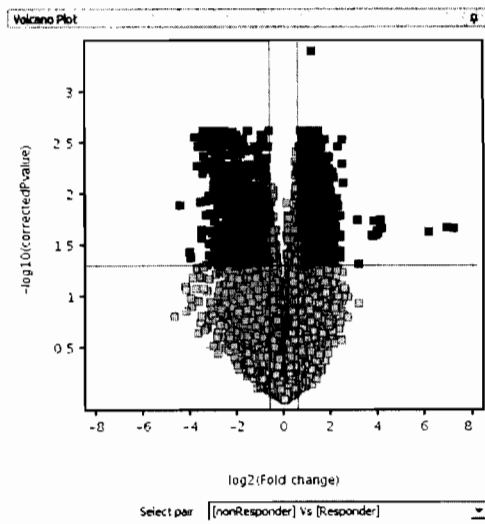


Figura 4

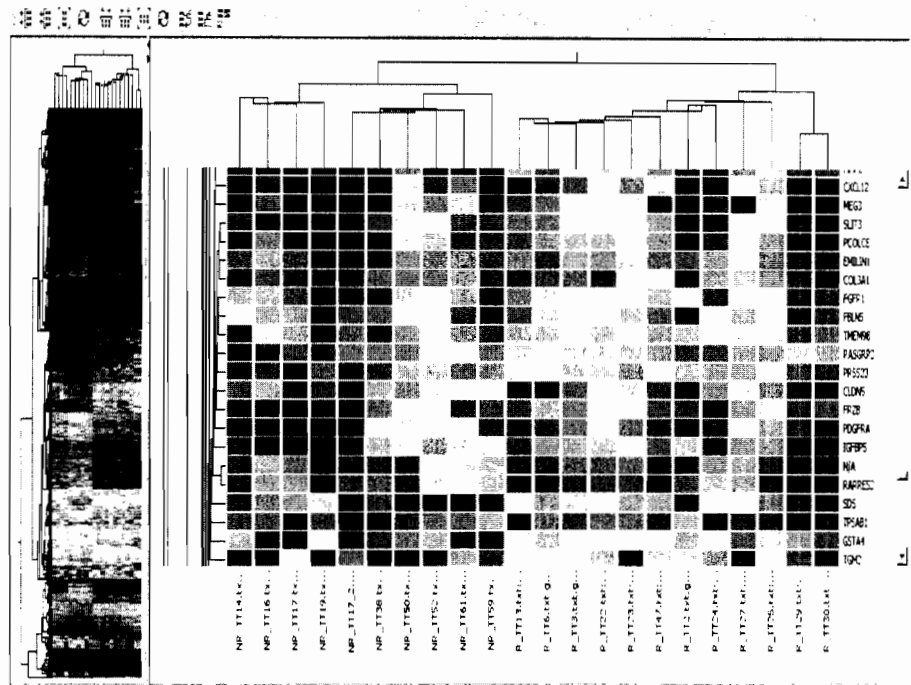


Figure 5

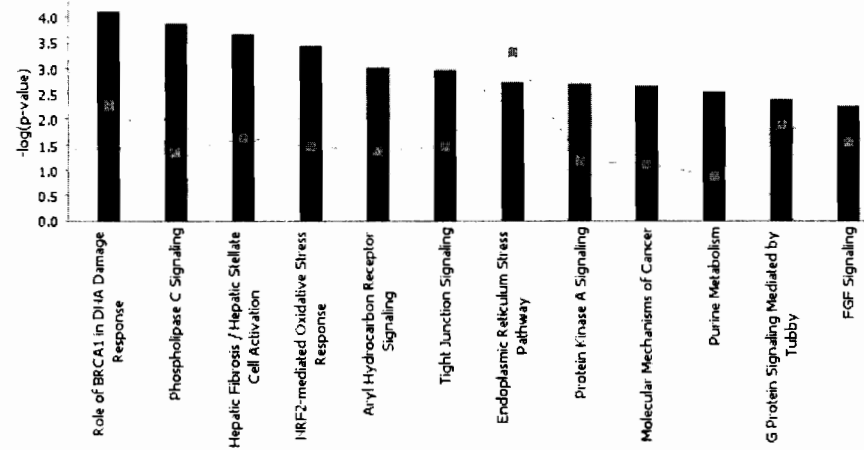


Figure 6

26

Role of DNA-AT in DNA Damage Response

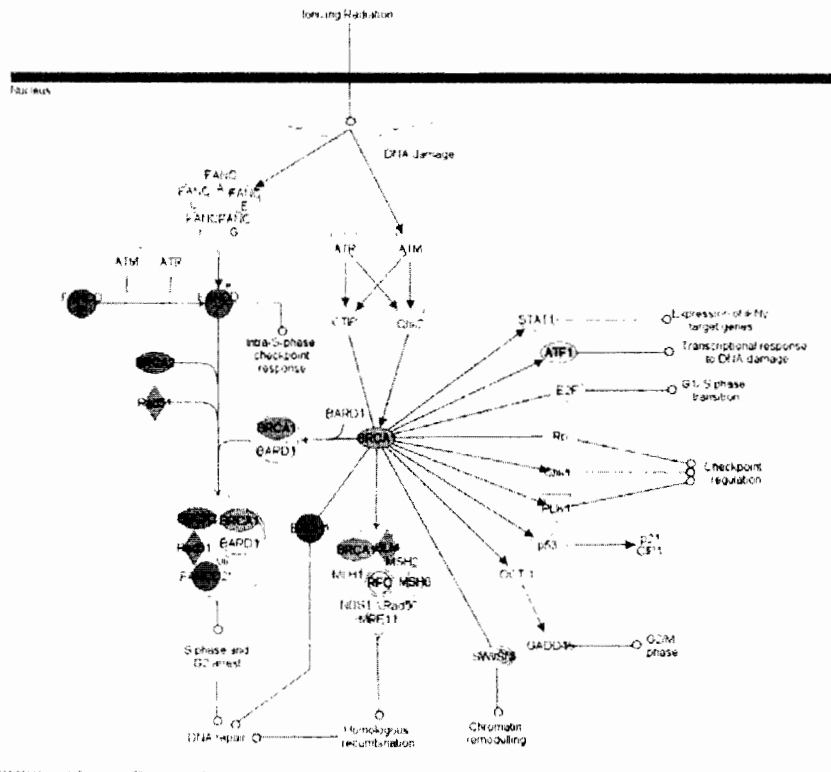


Figura 7



Figura 8