



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01378**

(22) Data de depozit: **09/12/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **26/02/2016** BOPI nr. **2/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**30/08/2013** BOPI nr. **8/2013**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL ONCOLOGIC  
"PROF. DR. ION CHIRICUȚĂ" DIN  
CLUJ-NAPOCA, 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.LOUIS PASTEUR NR.59, AP.38,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **BĂLĂCESCU LOREDANA OFELIA,  
STR.LOUIS PASTEUR NR.59, AP.38,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **NEAGOE IOANA,  
BD.NICOLAE 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, SC.1,  
AP. 2, CLUJ NAPOCA, JUDEȚUL CLUJ**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**US 2010/0292087 A1; EP 1702989 A1**

(54) **METODĂ DE PREDICȚIE A RĂSPUNSULUI LA  
RADIO-CHIMIOTERAPIE ÎN CANCERUL DE COL UTERIN  
PRIN STUDII DE GENOMICĂ FUNCȚIONALĂ**



# RO 128780 B1

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

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

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

11 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  
13 col uterin invaziv (*Epidemiology, clinical features, and diagnosis of invasive cervical  
cancer*), arată că incidența și rata de mortalitate sunt disparate la nivel mondial. În țările  
15 dezvoltate s-a observat în ultimii 50 de ani o scădere cu 75% atât în incidență, cât și în  
mortalitate produse de cancerul de col uterin. În contrast, în țările în curs de dezvoltare  
17 cancerul de col uterin reprezintă a doua cauză de mortalitate și morbiditate legate de cancer,  
cu 371200 de noi cazuri înregistrate anual, și cu o mortalitate de 50%. De asemenea, în  
19 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.

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

25 Cercetarea în patologia colului uterin vizează identificarea de noi ținte moleculare  
premergătoare stabilirii unor terapii individualizate în predicția răspunsului la terapia cu  
27 cisplatină 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  
29 36...40% în IIIB.

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

35 **WO 200709365, "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 analiza *in vitro*, într-un eșantion de testare, și care ia în  
37 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  
39 pentru predicția răspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin în cancerul de col uterin.

41 **US 2010/0292087 A1** prezintă o metodă pentru a prezice evoluția clinică a tumorilor  
prin furnizarea expresiei genelor dintr-o probă tumorală. Metoda utilizează un nou filtru  
43 genetic pentru a identifica gene care contribuie la răspunsul chimioterapeutic, folosind probe  
clinice de cancer epitelial, încorporate în parafină fixată cu formalină, în special cancer  
ovarian seros. Metoda este utilă pentru previzionarea reacției tumorale la agenți chimio-  
45 terapeutici, inclusiv agenți de alchilare, cisplatină, antimetaboliți, alcaloizi din plante și anti-  
biotice antitumorale. Un filtru microarray a arătat că probe încorporate în parafină, imobilizate  
47 în formol, pot identifica gene legate de răspunsul chimioterapeutic cu randament de 86%.

# RO 128780 B1

EP 1702989 A1 se referă la o metodă de clasificare a pacienților cu cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), pentru selectarea unei chimioterapii eficiente și pentru estimarea de supraviețuire a acestor pacienți cu NSCLC, bazată pe determinarea nivelului de metilare a genei 14-3-3 sigma. Statutul de metilare a genei 34-3-3 sigma poate fi determinat ușor într-o probă de ser.	1 3 5
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”.	7
Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta o metodă eficientă de analiză moleculară, care să asigure rezultate bune privind predicția răspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin în cancerul de col uterin loco-regional avansat.	9 11
Metoda de predicție a răspunsului la radio-chimioterapia cu cisplatin în cancerul de col uterin prin studii de genomică funcțională, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că va cuprinde efectuarea următoarelor etape:	13
a) se recoltează biopsii de la pacientele cu cancer de col uterin loco-regional avansat;	15
b) din biopsii se extrage ARN-ul total, prin metoda cu kituri de extracție, cum ar fi <i>Qiagen Rneasy mini kit</i> ;	17
c) se sintetizează sonde microarray cu marcaj one-color cu fluorocromul Cy3 cu kituri Agilent, cum ar fi <i>Low Input Linear Amplification Kit</i> ;	19
d) sondele microarray se hibridează pe lame Agilent 4x44k, folosind kituri specifice, cum ar fi <i>Gene Expression Hybridization Kit</i> ;	21
e) se face analiza bioinformatică pentru identificarea setului de gene de interes, folosind softuri destinate tehnologiei Agilent, cum ar fi <i>Feature Extraction și Gene Sping GX</i> ;	23
f) se face analiza de funcționalitate moleculară folosind softul <i>Ingenuity</i> ;	25
g) se stabilește predicția la terapie pe baza rezultatului molecular.	25
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	
- elaborarea unei metode de analiză predictivă pentru răspunsul la radio-chimioterapia cu cisplatin în cancerul de col uterin;	27
- posibilitatea alegerii unei terapii individualizate, bazate pe o analiză moleculară anterioară.	29
Metoda se bazează pe un studiu prospectiv la care au participat 65 de paciente cu cancer de col uterin loco-regional avansat (stadiu IIB-III B), pe baza unor criterii de includere stabilite anterior. De la toate pacientele s-au prelevat probe biologice (țesut) înainte de inițierea radio-chimioterapii cu cisplatin.	31 33
Aprobarea studiului s-a făcut de către Comitetul de Etică 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 și marcarea cu Hematoxilina-Eozina.	35 37
Se dă în continuare un exemplu de aplicare a metodei în legătură cu fig. explicative 1...8, ce reprezintă:	39
- fig. 1, evaluarea cantității și a încărcăturii de Cy3 în sondele de microarray sintetizate din ARN-ul mesager al probelor de interes;	41
- fig. 2, imagine lama microarray 4x44k (251485031609_S01_H);	43
- fig. 3, normalizarea prin metoda Quantile a intensităților pentru cele două grupuri luate în studiu: răspuns - galben, non răspuns - verde, a. intensități brute, b. intensități normalizate;	45
- fig. 4, reprezentarea Vulcano plot pune în evidență gene supra- și subexprimate de 1,5 ori, la un $p < 0,05$ în NR vs CR;	47

# RO 128780 B1

1 - fig. 5, clusterizarea ierarhică aglomerativă supervizată, realizată pentru grupul  
2 genelor diferit exprimate între NR și CR (albastru - nivel de expresie scăzut în NR vs CR,  
3 roșu - nivel de expresie crescut în NR vs CR );

4 - fig. 6, principalele căi canonice implicate în modularea răspunsului la terapia cu  
5 cisplatin în patologia colului uterin;

6 - fig. 7, analiza funcțională a principalelor molecule implicate în repararea leziunilor  
7 ADN, care stau la baza rezistenței la terapie în cancerul de col uterin locoregional avansat  
(analiza Ingenuity);

8 - fig. 8, schema logică de analiză predictivă.

## Exemplu

### *Recoltarea și prelucrarea probelor*

9 Probele tisulare au fost recoltate în aceleași condiții, și stocate în azot lichid până la  
10 utilizarea lor ulterioară. ARN-ul total a fost izolat după politrone cu kitul RNeasy minikit  
11 (Qiagen), conform instrucțiunilor producătorului. Evaluarea de calitate și cantitate s-au făcut  
12 prin nanotehnologii (NanoDrop Technologies și Bioanalyzer 2100). Toate probele au trecut  
13 rigorile controalelor de calitate și cantitate. Numărul de integritate ARN (RIN-RNA integrity  
14 number) și raportul celor două specii ribozomale 28/18 S au fost folosite drept controale de  
15 calitate. Toate probele incluse în acest studiu au avut un RIN cuprins în intervalul 7...9 și un  
16 raport 28/18 S ARN ribozomal mai mare de 1,7. Din punct de vedere cantitativ, toate probele  
17 au avut peste 100 ng ARN total/μl.

18 Au fost alese pentru studiul de genomică funcțională 24 de probe, 12 cu răspuns  
19 complet la terapie (RC) și 12 fără răspuns la terapie (NR), evaluarea fiind făcută la 6 luni  
20 post radio-chimioterapie.

### *Evaluarea studiului*

21 Studiul de genomică funcțională s-a făcut prin tehnologia Agilent cu lame 4x44k WHG  
22 (Whole Human Genome), folosind un monocolor cu Cy3.

23 Sinteza de sonde microarray s-a făcut cu *kitul Low Input Linear Amplification Kit* al  
24 Agilent, conform instrucțiunilor producătorului, plecând de la o cantitate de 1000 ng ARN  
25 total. Sondele sintetizate au fost evaluate pentru cantitate și activitate, utilizând  
26 spectrofotometrul nanodrop ND-1000 (fig. 1). Activitatea sondelor microarray a fost calculată  
27 și pe baza formulelor de mai jos:

$$\frac{(Concentratia\ de\ cARN) \times 30\ \mu l (volum\ de\ elutie)}{1000} - ug\ cARN$$

$$\frac{Concentratia\ de\ Cy3}{Concentratia\ de\ cARN} \times 1000 - pmol\ Cy3 / ug\ cARN$$

28 Activitatea specifică minimă pentru sondele microarray utilizate pentru hibridare pe  
29 lame microarray 4x44k a fost de 6 pmol/ug cRNA. Cantitatea de sondă utilizată pentru  
30 hibridare a fost de 1250 ng, specifică tipului de lamă microarray 4x44k, într-un volum maxim  
31 de soluție de hibridare de 8 μl.

32 Hibridarea sondelor microarray s-a realizat utilizând reactivii specifici din *kitul Gene  
33 Expression Hybridization Kit*, produs de compania Agilent. Hibridarea s-a făcut la o  
34 temperatură de 65°C, timp de 17 h. Post hibridare lamele au fost spălate în două băi cu  
35 concentrații diferite de triton (Wash Buffer 1 și Wash Buffer 2). Ulterior lamele au fost supuse  
36 unui tratament cu Acetonitril și Stabilization and Drying Solution (produs Agilent), având drept  
37 scop prevenirea degradării marcajului fluorescent de către ozonul atmosferic.

# RO 128780 B1

După uscare, lamele au fost scanate la 2 rezoluții diferite (low and high), cu un scanner Agilent (model G 2565 BA), pentru a prinde atât semnalele cu intensități scăzute, cât și semnalele cu intensități foarte mari (fig. 2).	1 3
Două dintre probe (NR) nu au trecut condițiile de calitate post hibridare, și au fost eliminate din studiu (fig. 1, poziția 3).	5
<i>Tehnica de analiză a datelor microarray</i>	
Pentru analiza bioinformatică s-au utilizat softurile Feature Extraction, Gene Spring GX și Ingenuity. Imaginile lamelor microarray generate de scanner reprezintă datele brute ale experimentului. Utilizând algoritmul implementat în softul Feature Extraction (FE), intensitățile semnalelor fluorescente au fost transformate în informații numerice care cuantifică nivelul de expresie genică din probele analizate. A fost utilizat protocolul GE2_107_Sep09 și designul 014868_D_F_20100804. Post scanare a fost evaluată calitatea procesului de hibridare. Rapoartele de calitate generate de FE au pus în evidență erori aditive $\leq 10$ , pentru cele două grupuri luate în studiu, ceea ce a corespuns standardelor de calitate pentru lamele microarray.	7 9 11 13 15
<i>Preprocesarea și analiza diferențială a datelor microarray</i>	
Preprocesarea și analiza diferențială a datelor s-a realizat cu softul Gene Spring GX. Etapa de preprocesare a cuprins:	17
- eliminarea controalelor pozitive și negative;	19
- normalizarea inter-array;	
- sumarizarea secvențelor duplicate de pe array;	21
- filtrarea spoturilor saturate și neuniforme.	
În procesul de normalizare inter-array a fost folosită metoda Quantile. Această metodă transformă distribuțiile datelor în distribuții identice pentru a putea fi comparate pe picior de egalitate (fig. 3).	23 25
După normalizare, au fost reținute pentru analiză doar secvențele pentru care spoturile corespunzătoare nu au fost marcate ca saturate și neuniforme în cel puțin 19 din 22 de probe (CR și NR). La finalul etapei de preprocesare s-au obținut 41089 de secvențe.	27
Diferențele moleculare între probele luate în studiu au fost puse în evidență printr-o metodă nesupervizată, și anume, clusterizarea ierarhică aglomerativă. Scopul metodelor de clusterizare este de a diviza genele sau probele în grupuri (cluster), pe baza similarității dintre acestea, folosind corelații sau distanțe euclidiene. Aceste analize confirmă faptul că probele cu proprietăți biologice similare tind să aibă un profil molecular asemănător. Pentru această clusterizare măsurarea similarității a fost făcută pe baza distanțelor euclidiene, iar ca metodă de grupare a clusterelor a fost aleasă metoda ward. Clusterizarea ierarhică aglomerativă a pus în evidență formarea a două cluster corespunzătoare celor două grupuri luate în studiu.	29 31 33 35
Pentru identificarea secvențelor diferit exprimate între grupurile luate în studiu s-a aplicat testul t nepereche și corecția FDR pentru testări multiple. Cut off-ul pentru valoarea p ajustat a fost stabilit la 0,05, iar pentru valoarea fold change, la $\pm 1,5$ . Au fost identificate 2896 de gene diferit exprimate între grupul probelor fără răspuns (NR) și grupul probelor cu răspuns (CR) recoltate înainte de terapie (fig. 4). Dintre acestea, 1583 de gene au fost supraexprimate, iar 1313 au fost subexprimate în NR comparativ cu CR.	37 39 41
În continuare s-a realizat o clusterizare ierarhică aglomerativă supervizată, realizată pentru grupul genelor diferit exprimate. Acest tip de analiză supervizată a pus în evidență separarea a două cluster distincte, unul care integrează doar probele cu lipsă de răspuns (NR), și altul care integrează probele cu răspuns complet (RC) (fig. 5).	43 45
<i>Analiza funcțională a datelor microarray</i>	47
Ulterior au fost investigate implicațiile acestor gene la nivelul interacțiunilor moleculare, utilizând softul Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Au fost identificate principalele funcții celulare	49

# RO 128780 B1

1 și moleculare în care aceste gene sunt implicate. Cea mai importantă cale canonică implicată  
în răspunsul la terapie a fost cea care a avut în prim plan gena BRCA1 și setul de gene  
3 implicate în modularea acesteia.

Reprezentarea grafică a rețelelor moleculare a făcut posibilă stabilirea genelor  
5 nodale, a tipului de interacțiune dintre acestea și a produșilor acestora. Pentru analiza  
funcțională s-a avut în vedere evaluarea mecanismelor principale care stau la baza inducerii  
7 rezistenței la cisplatin. Astfel, au fost evaluate rețelele moleculare implicate în capacitatea  
reparatorie a leziunilor la nivelul ADN. Acest mecanism este considerat ca fiind implicat în  
9 inducerea rezistenței la terapie ca urmare a unor posibile modificări de fenotip care apar la  
nivelul celulelor tumorale, respectiv, la câștigarea unor avantaje de reparare a leziunilor la  
11 nivelul ADN, în funcție de care este indusă apoptoza.

Prin urmare, accentul principal al acestei analize a ținut cont de clasa de gene  
13 implicate în repararea leziunilor mono- și dublu catenare pe care le induce cisplatinul și  
radioterapia la nivelul celulelor tumorale. În funcție de tipul de acțiune al acestor gene, supra-  
15 sau subexpresie, se poate face o predicție asupra răspunsului sau lipsei de răspuns la  
terapie, pachetul de gene identificat fiind parte a unei analize supervizate care a grupat  
17 probele biologice în funcție de răspunsul la terapie.

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

Analiza rețelelor moleculare a dus la identificarea unui număr de gene nodale de  
21 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  
23 modularea reparării leziunilor ADN induse de terapie (cisplatin) au fost: BRCA1, BRCA2,  
RAD51, BRCC3, HMGB1, BRAT1, ABCB10, FNCl, FANCD2, BLM, ERCC4, ERCC6, PMS2,  
25 MSH6, RFC1. Toate aceste gene identificate au avut niveluri de expresie crescute în probele  
NR comparativ cu lotul CR, unde s-au înregistrat niveluri scăzute de expresie ale acestor  
27 gene. Nivelurile crescute ale acestor gene semnifică o capacitate crescută de reparare a  
leziunilor mono și dublu catenare induse de terapie și radiații și cisplatin (fig. 7).

Acest aspect se traduce printr-o acțiune redusă a cisplatinului la nivelul celulelor  
29 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  
31 acumulare de leziuni la nivel ADN, ceea ce va duce la o activare a mecanismului de  
apoptoză și, în final, la creșterea eficienței terapiei antitumorale.

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

37 1. se recoltează țesut prin biopsie cervicală de la pacienții cu cancer de col locoregio-  
nal avansat (stadiul IIB-III B);

39 2. din biopsie se extrage ARN-ul prin metoda kiturilor de extracție *RNeasy mini kit*  
(Qiagen);

41 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  
43 cu răspuns complet la radio-chimioterapie, și pacienți fără răspuns la radio-chimioterapie;

45 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  $\pm 1,5$  și un p ajustat de minimum 0,05;

# RO 128780 B1

5. validarea genelor de interes identificate din setul obținut prin reacția microarray, prin reacția de qRTPCR; 1
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 apoptoză și, în final, la creșterea eficienței terapiei antitumorale. Niveluri crescute de expresie ale acestor gene vor previziona un răspuns complet la tratamentul cu radio-chimioterapie în cancerul de col uterin. 3  
5  
7

# RO 128780 B1

## Revendicări

1

3

1. Metodă de predicție a răspunsului la radio-chimioterapie cu cisplatin în cancerul de col uterin, prin studii de genomică funcțională, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde efectuarea următoarelor etape:

5

a) se recoltează biopsii de la pacientele cu cancer de col uterin loco-regional avansat;

7

b) din biopsii se extrage ARN-ul total prin metoda cu kituri de extracție, cum ar fi *Qiagen Rneasy minikit*;

9

c) se sintetizează sonde microarray cu marcaj one-color cu fluorocromul Cy3 cu kituri Agilent, cum ar fi *Low Input Linear Amplification Kit*;

11

d) sondele microarray se hibridează pe lame Agilent 4x44k, folosind kituri specifice, cum ar fi *Gene Expression Hybridization Kit*;

13

e) se face analiza bioinformatică pentru identificarea setului de gene de interes, folosind softuri destinate tehnologiei Agilent, acum ar fi *Feature Extraction și Gene Spring GX*;

15

f) se face analiza de funcționalitate moleculară folosind softul *Ingenuity*;

g) se stabilește predicția la terapie pe baza rezultatului molecular.

17

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** selectarea unui set de gene de interes, utilizat în analiza bioinformatică, se realizează prin analiza rețelelor moleculare care au dus la identificarea unui număr de gene nodale de interes în cancerul de col uterin rezistent la terapie, respectiv, NR, comparativ cu grupul de cancer de col uterin cu răspuns la terapie, respectiv, RC, dintre care s-au selectat cele mai importante 15 gene nodale implicate în modularea reparării leziunilor ADN induse de terapie: BRCA1, BRCA2, RAD51, BRCC3, HMGB1, BRAT1, ABCB10, FNCL, FANCD2, BLM, ERCC4, ERCC6, PMS2, MSH6, RFC1, genele selectate având niveluri de expresie crescute în probele NR comparativ cu lotul CR, unde s-au înregistrat niveluri scăzute de expresie, iar analiza bioinformatică se face cu softul *Feature Extraction, Gene Spring GX, Ingenuity* pentru un nivel de expresie  $\pm 1,5$  și valoare  $p < 0,05$ .

19

21

23

25

27

29

3. Metodă conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** analiza genelor de interes implicate în repararea leziunilor ADN induse de radio-chimioterapie se identifică prin microarray, prin tehnica de qRT-PCR, gena housekeeping utilizată pentru normalizarea datelor fiind gena 18 S.

31

33

4. Metodă conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** se bazează pe evaluarea nivelului de expresie a unui set de 15 gene implicate în modularea răspunsului la repararea leziunilor ADN induse de radio-chimioterapie, supraexpresia setului de gene indicând o lipsă de răspuns sau un răspuns parțial, în timp ce lipsa de expresie a acestora indică un răspuns complet la terapie.

35



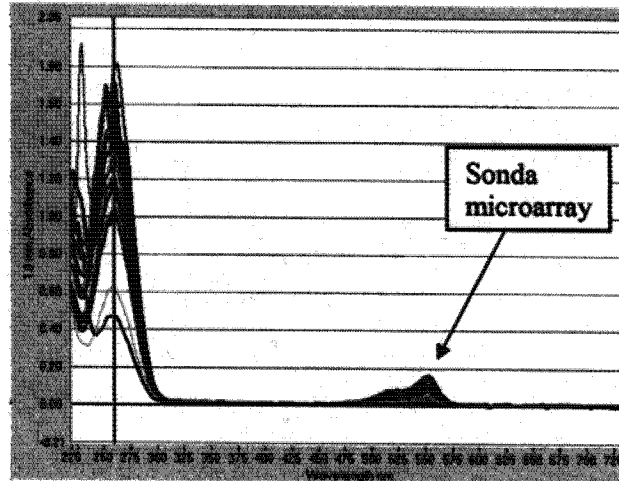


Fig. 1

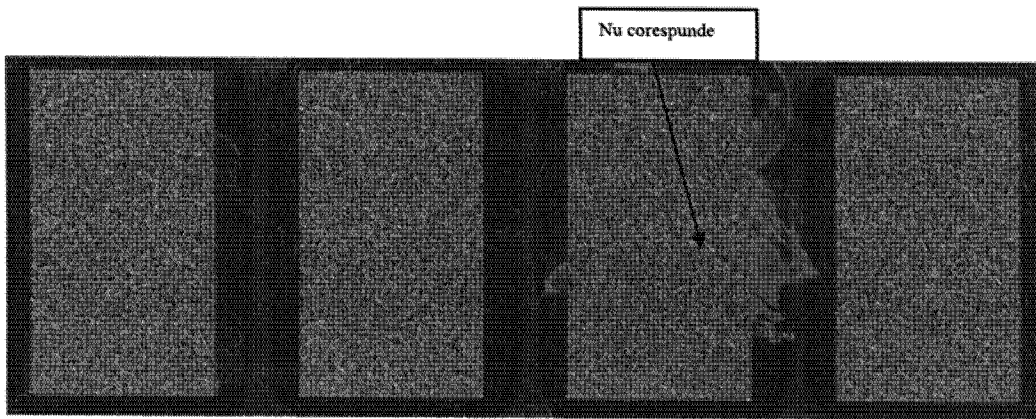


Fig. 2

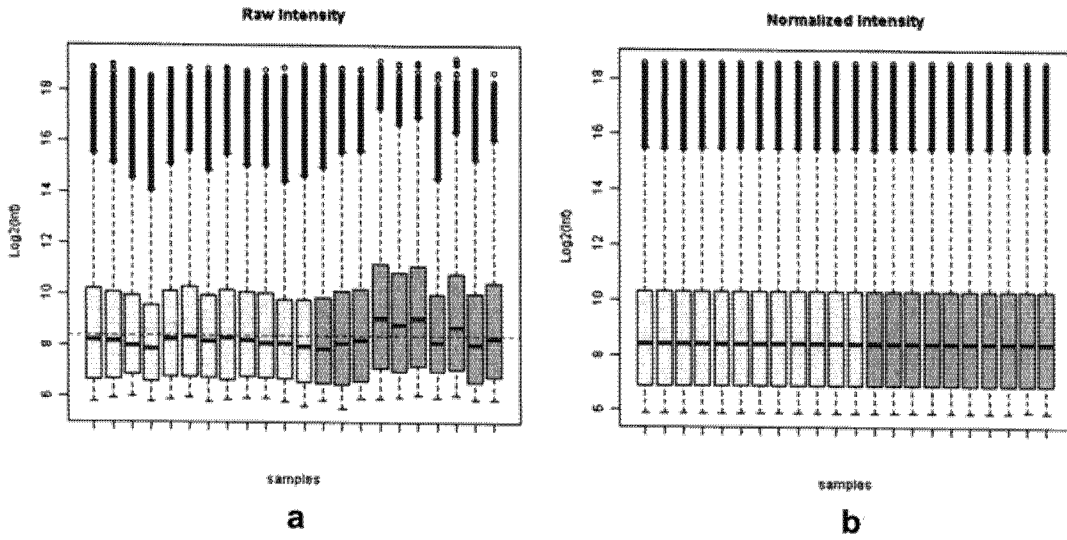


Fig. 3

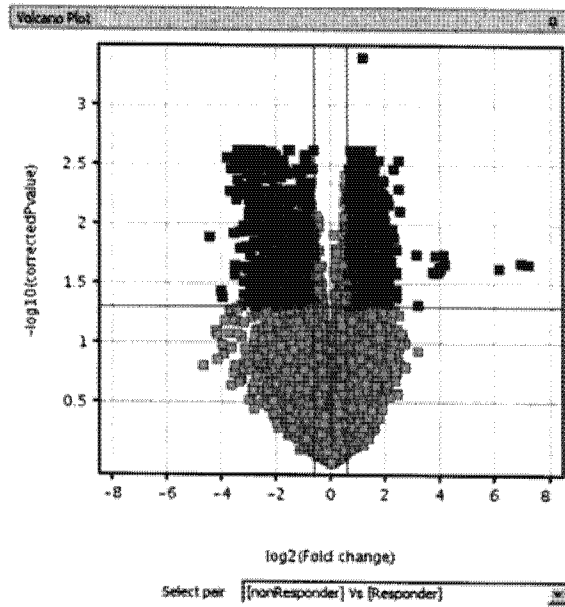


Fig. 4

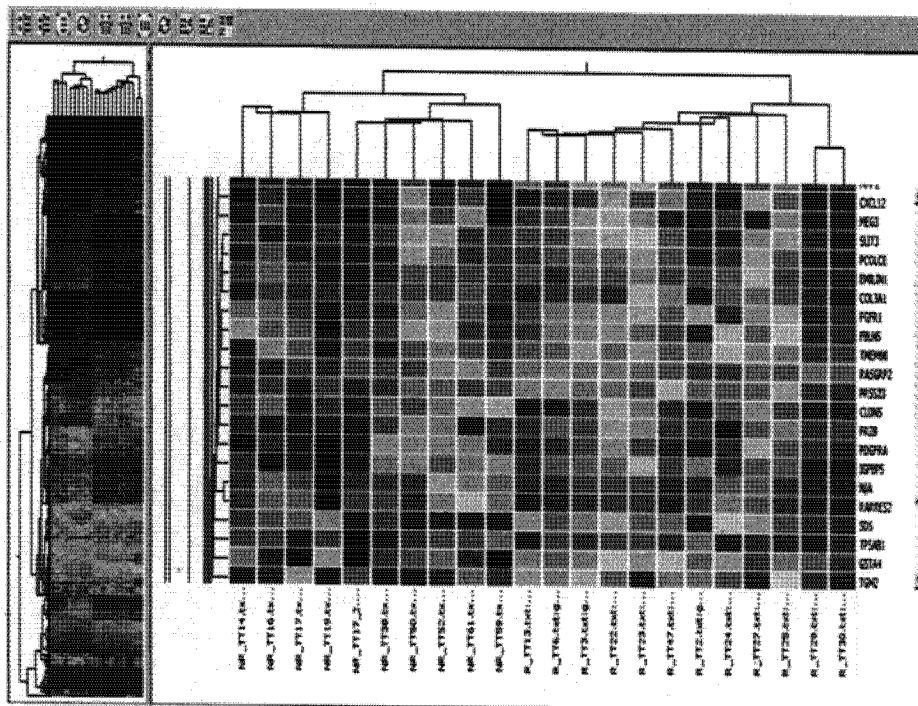


Fig. 5

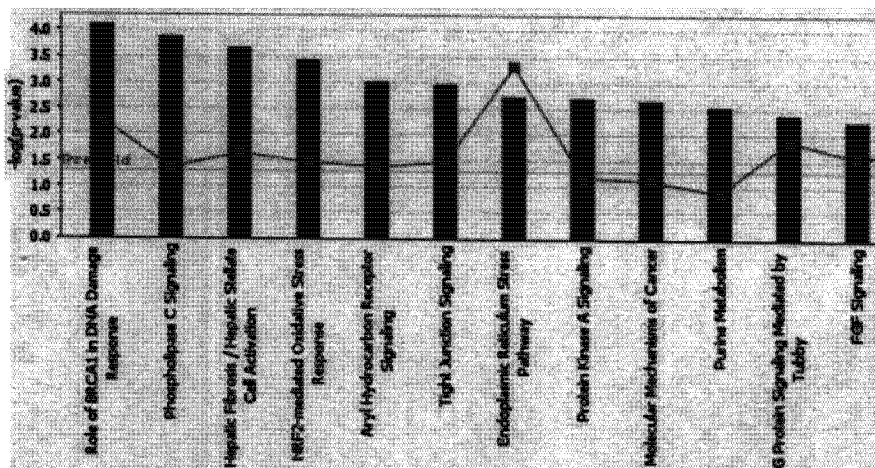


Fig. 6

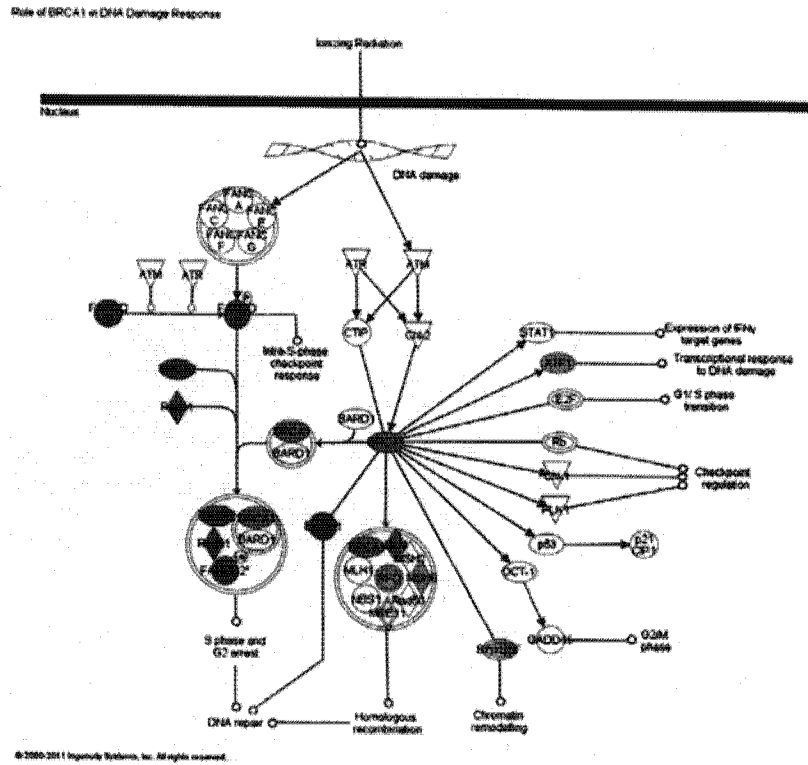


Fig. 7

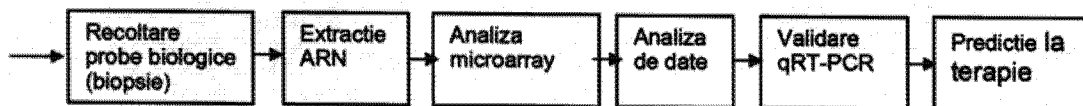


Fig. 8



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 102/2016