



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00466

(22) Data de depozit: 20.06.2013

(41) Data publicării cererii:
30.01.2015 BOPI nr. 1/2015

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GIANNI BUSSOLAȚI,
STR. PENEȘ CURCĂNUL NR. 14, AP. 71,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ARDELEANU CARMEN MARIA,
STR. OLARI NR. 40, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• COMANESCU MARIA VICTORIA,
STR. GRIGORE ALEXANDRESCU NR. 108
A, AP. 10, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ DE PREZERVAREA FOSFOPROTEINELOR PRIN
FIXAREA UNOR FRAGMENTE TISULARE ORGANICE ÎN
FORMOL RECE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de conservare a unor fragmente tisulare organice, utilizată pentru detectarea markerilor de predicție a răspunsului la terapii. Metoda conform invenției constă în fixarea fragmentelor tisulare cu o secvență de formol rece-etanol rece la o temperatură de 1...8°C, timp de 2...35 h, după care se deshidratează prin imersie în etanol rece 95%, timp de

1..7 h, în final țesuturile fiind incluse în parafină, rezultând simultan conservarea histologică a țesuturilor și a caracteristicilor moleculare de diagnostic - grupări fosfat din fosfoproteine.

Revendicări: 4



A. DESCRIEREA INVENȚIEI

1. TITLUL INVENȚIEI:

Metodă de prezervarea fosfoproteinelor prin fixarea unor fragmente tisulare organice în formol rece.

2. PRECIZAREA DOMENIULUI TEHNIC LA CARE SE REFERĂ INVENȚIA

Invenția se referă la o metodă de prezervare a fosfoproteinelor prin fixarea unor fragmente tisulare organice în formol rece, care se poate folosi în domeniul referitor la fixarea unor probe de țesuturi organice, de obicei pentru histopatologie, folosind formol.

3. PREZENTAREA STADIULUI TEHNICII

Fixatorul de elecție utilizat în histopatologic este reprezentat de o soluție de formaldehidă în apă ("formol"), concentrația tipică fiind astfel între 3% și 8%. Fixarea, un proces necesar în managementul biopsiilor pentru diagnosticul histopatologic, permite conservarea structurii țesuturilor, caracteristicilor celulare și proprietăților antigenice, astfel încât detectarea imunohistochimică a determinantilor antigenici ai proteinelor țesutului a devenit o practică comună în laboratoare de histopatologie, în scopul de a descoperi nu numai modelul diferențiere în diferite tumori, dar (și chiar mai important), șansele de răspuns la terapii personalizate.

Din păcate, procedurile de fixare și includere la parafina, așa cum se practică în mod obișnuit, pot împiedica detectarea precisă a markerilor de predicție a răspunsului la terapii. Într-adevăr, influența variațiilor în etapele preanalitice prin care trece fragmentul tisular (în special, fixare) este tot mai mult recunoscută ca fiind o problemă majoră în diagnosticul anatomopatologic, deoarece împiedică analiza corectă a specimenului și enunțarea unei indicații terapeutice cu cel mai bun răspuns, ambele esențiale în contextul medicinei personalizate.

Confrunțați cu această problemă, am căutat să identificăm un protocol standardizat de fixare cu formol, care să fie aplicabil la o gamă largă de tipuri de țesuturi și optim atât din punctul de vedere al vitezei de fixare cât și al conservării caracteristicilor moleculare de diagnostic.

Modificările proteice postranslazionale, cum ar fi spre exemplu fosforilarea sunt cunoscute ca fiind indicatori importanți ai activității cailor de semnalizare și reprezintă biomarkeri clinici promițători, dar ele pot fi foarte dificil de măsurat în țesuturile fixate din cauza variabilelor

preanalitice [Siddiqui și Rimm, 2010; Pinhel et al, 2010; Bonnos et al, 2011; Baker et al, 2005; Bai et al, 2011] și, în principal din cauza activării nocive a fosfatazelor. Fixarea în formol înainte de analiza fosfo-proteinelor, trebuie să formeze legături încrucisate cu proteinele tisulare și să inactiveze enzimele de tip fosfataza care ar putea elimina fosfații din proteine; nerealizarea oricărei dintre aceste sarcini într-un țesut necorespunzător fixat face imposibilă studiarea acestor țesuturi și utilizarea lor ca și teste de diagnostic. Datorită existenței acestei probleme, am căutat să identificăm un protocol standardizat de fixare în formol, care să fie aplicabil unei game largi de tipuri de țesuturi și optimizat atât pentru viteză și conservarea caracteristicilor moleculare de diagnostic.

Începând cu studii biochimice de bază ale proteinelor, am dezvoltat rațional un protocol nou de fixare bazat pe biochimia formolului, am demonstrat aplicabilitatea largă la histopatologia standard și în cele din urmă, am arătat că acest nou protocol duce la rezultate acceptabile ale testelor imunohistochimice pentru diferite ținte, inclusiv cele de tip fosfo-proteic.

În prezent, în practica de rutină țesuturile (biopsiile și piesele de rezecție) se fixează în formaldehidă 4% în apă cu tampon fosfat de 0,1 M și pH 7,2 (Formalina). Numărul de fragmente tisulare procesate astfel este de ordinul milioane pe plan global. Acest tip de fixare se realizează în mod obișnuit prin scufundarea fragmentelor tisulare în formalina pentru o perioadă de timp ce variază de la câteva ore la 24 ore. Acest procedeu se realizează în mod obișnuit la temperatura camerei. Până în prezent nu există studii în ceea ce privește utilizarea formalinei rece pentru a obține în același timp conservarea histologică a țesuturilor (pentru diagnostic) și păstrarea grupărilor fosfat ale fosfoproteinelor.

4. PREZENTAREA PROBLEMEI TEHNICE

Problema pe care și-o propune să o rezolve prezenta invenție este aceea de a obține o mai bună preservare a integrității fosfoproteinelor în fragmentele tisulare organice fixate în formalina.

Utilizarea țesuturilor fixate în formalina și incluse în parafină ar oferi perspective majore și exploatarea unor arhive enorme prezente în întreaga lume. De aceea, scopul invenției noastre este propunerea unei metode pentru a îmbunătăți integritatea fosfoproteinelor în fragmentele tisulare organice fixate în formalina. Acest scop a fost obținut prin utilizarea metodelor descrise în cerințele independente. Cerințele dependente dezvoltă mai departe ideea centrală a invenției. Va

rugam sa luati in considerare faptul ca in cadrul prezentei descrieri si formularea cerintelor, formalina reprezinta un agent fixator diluat ce determina legarea proteinelor (crosslink). De aceea, in contextul acestei cereri, termenul de formalina nu se limiteaza la o solutie de formaldehida in apa.

Am observat ca imersia unui fragment tisular in formalina la temperatura camerei pentru mai multe ore (cum este recomandat de obicei, vezi Goldstein et al., 2003; Goldstein et al., 2007) conduce la prezervare morfologica si antigenica optima, dar la o conservare de calitate scazuta a grupărilor fosfat.

Pe de altă parte, fixarea în formol la rece (2-5°C) pentru o perioadă de timp ce variază între 18 și 30 ore (de obicei 24), urmate de imersia în etanol 95% rece pentru o perioadă de timp între 2 și 4 ore, suficient pentru o penetrare completă a fragmentului tisular, a dus la o păstrare optimă nu doar a proprietăților morfologice (histologice) și antigenice, dar și a grupărilor fosfat.

5. EXPUNEREA INVENȚIEI

Un prim aspect al invenției se referă la o metodă pentru fixarea probelor tisulare organice, metoda cuprinzând cel puțin următoarele etape:

- cufundarea țesutului în formol lichid la o temperatură cuprinsă între 1 ° C și 8 ° C, de preferință, 2 ° C la 5 ° C, pentru o primă perioadă de timp ce variaza de la cateva ore la 24 ore;
- imersie în etanol 95% rece (2-5 ° C) sau alt agent de deshidratare pentru o perioadă de timp suficientă pentru impregnarea completă a specimenului tisular (de obicei 2-4 ore).

Prima perioadă de timp poate varia între 2 ore și 35 ore.

A doua perioadă de timp poate fi între 2 și 6 ore.

Înainte de deshidratarea țesutului, formolul în exces poate fi spălat cu un lichid de înlocuire, de preferință o soluție salină.

Formolul poate fi pre-răcit înainte de imersia fragmentului tisular.

După pasul b.), țesutul poate fi deshidratat într-unul sau mai multe alcooluri și apoi inclus la parafină.

Etapele descrise mai sus de trecere a fragmentelor tisulare în condiții de temperatură scăzută sunt destul de dificil de efectuat în mod obișnuit în laboratoarele de anatomie patologică și din acest motiv am automatizat procedura.

Un alt aspect al invenției se referă la un sistem automat de fixare pentru fixarea probelor tisulare organice cu formol, procesorul fiind prevăzut cu:

O unitate de răcire pentru furnizarea formolului rece la cuva de prelucrare, în care formolul este răcit la o temperatură cuprinsă între 1 ° C și 8 ° C, și

- o unitate de control pentru transferul formolului rece către cuva de prelucrare;
- o unitate de răcire pentru furnizarea etanolului 95% rece la cuva de prelucrare, în care etanolul este răcit la o temperatură cuprinsă între 1 ° C și 8 ° C;

Sistemul poate cuprinde în plus un rezervor de lichid de înlocuire, unde unitatea de control este proiectată pentru spălarea fragmentului tisular din cuva de prelucrare și cufundat în formolul rece cu lichidul de înlocuire și/sau etanol rece înainte de procesul de includere la parafină. Sistemul poate cuprinde în plus o interfață de utilizator pentru setări și, opțional, sunt afișate grafic temperatura / timp din cuva de prelucrare.

Prezenta invenție descrie o procedură prin care tesuturile fixate cu formol păstrează încă o bună integritatea a fosfo-proteinelor, astfel încât procedurile de imunohistochimie folosind anticorpi specifici pot fi folosite pe aceste tipuri de material tisular (fragmente tisulare FFPE - fixate în formol, incluse la parafină- din tumori umane), permițând astfel demonstrarea căilor de activare metabolica care implică grupuri de fosfat (de exemplu, fosfo-mTOR și fosfo-AKT). Aceasta va deschide apoi perspectiva tratamentului pacienților cu medicamente care au fost concepute selectiv (Allen et al, 2013; Lin et al, 2013) .

Tesuturile sunt procesate in formol, dar in loc de realizarea imersiei la temperatura camerei, tesuturile sunt imersate timp de mai multe ore in formol rece (2-4°C). Ulterior, tesuturile procesate in formol rece sunt tratate in conditii de temperatura scazuta timp de 2-6 ore in agenti de deshidratat precum etanol 95%.

Baza rationala a acestui proces descris in inventie este urmatoarea:

Fixarea tisulara prin formaldehida, i.e. formarea de legaturi incrucisate, este cunoscuta ca fiind un proces incet, ce necesita mai multe ore pentru a fi complet (Hewitt et al., 2008). Fixarea

este precedata de o patrundere rapida a reactivilor prin membranele celulare, adanc in tesuturi la o viteza de aproximativ 1 mm pe ora (Hewitt et al., 2008).

Se considera ca in timpul acestei faze rapide de patrundere prin membranele celulare, ce precede procesul lent de fixare prin legaturi incrucisate, poate aparea activarea fosfatazelor si lezarea ireversibila a fosfoproteinelor. De fapt, distrugerea membranara ar duce la eliberarea unor enzime tisulare si in perioada lunga de timp de fixare completa a proteinelor (ce implica inhibitia activitatii enzimatic), fosfatazele ar fi activ implicate in producerea de leziuni.

Pe baza acestei ipoteze, s-a considerat in continuare ca activitatea fosfatazelor ar fi inhibata de temperaturi scazute. De aceea, intr-unul din exemplele descrise in aceasta inventie, formolul ce patrunde in tesuturi este racit la 4°C. In etapa ulterioara, avand deja avantajul ca tesuturile sunt deja fixate in formol rece, procesul este completat prin imersia in etanol rece. Aceasta etapa este justificata prin faptul ca etanolul este un bun fixator prin coagulare. Daca, dupa prima etapa, fragmentele tisulare ar fi transferate in etanol la temperatura camerei si avand in vedere ca deshidratarea tisulara dureaza cateva ore (2-6), in acest timp fragmentele tisulare ar fi in continuare expuse la actiunea fosfatazelor active. Deci, este necesara deshidratarea in conditii de temperatura scazuta. Ulterior se realizeaza imediat includerea la parafina.

6. PREZENTAREA AVANTAJELOR INVENȚIEI

- Oferă posibilitatea unei detectări precise a markerilor de predicție a răspunsului la terapii,
- Asigură o analiză corectă a specimenului și enunțarea unei indicații terapeutice cu cel mai bun raspuns,
- Reprezintă un protocol standardizat, aplicabil la o gamă largă de țesuturi,
- Reprezintă un protocol optim atât din punctul de vedere al vitezei de fixare cât și din punct de vedere al conservării caracteristicilor moleculare de diagnostic,

7. PREZENTAREA PE SCURT A FIGURILOR DIN DESENE

Față de invenția prezentată, nu sunt desene sau figuri.

8. PREZENTAREA ÎN DETALIU A CEL PUȚIN UNUI MOD DE REALIZARE A INVENȚIEI REVENDICATE

Proceduri de colectare a fragmentelor

Imediat după intervenția chirurgicală, fragmentele tisulare rezecate din 5 tumori de colon și 5 tumori mamare, au fost transferate către laboratorul de anatomie patologică și procesate fără întârziere. Din fiecare specimen s-au prelevat 3 fragmente ce au fost procesate după cum urmează:

a) Procedura de fixare de rutină: fragmentele au fost fixate 24h în formol neutru 4% la temperatura camerei, procesate uzual și incluse la parafină;

b) Procedura de fixare în conformitate cu invenția (fixare la rece): fragmentul tisular a fost scufundat în formol neutru 4% pre-răcit pe o perioadă de timp variind între 4 și 24 h; ulterior au fost transferate în etanol 95% pre-răcit timp de 2-6h. Apoi fragmentele tisulare au fost procesate de rutină prin deshidratare cu alcool și includere la parafină.

c) Fragmente proaspete congelate și pastrate la -80°C până la realizarea unor analize de tip Western blot.

Colorare uzuală, reacții imunohistochimice și analiza western blot

Din fragmentele tisulare FFPE s-au realizat secțiuni de $4\ \mu\text{m}$ ce au fost colorate de rutină cu hematoxilina și eozina (H&E). Testele imunohistochimice s-au realizat pe secțiunile tisulare utilizând o platformă automată de procesare de tip Bond (Leica) și s-au utilizat următorii anticorpi primari:

anti-Phospho-mTOR Rabbit, 49F9 against Ser2448 (Cell Signaling)

anti-Phospho-AKT Rabbit, 736E11 against Ser473 (Cell Signaling)

Am inclus controale pozitive și negative (omisiunea anticorpului primar și a serului IgG corespondent) la fiecare testare imunohistochimică.

Pentru analiza Western blot, s-a urmărit procedura descrisă:

Toate fragmentele au fost omogenizate și lizate în tampon de liza TNE suplimentat cu cocktail inhibitor de protează 1% (Complete, Roche Diagnostic Corporation). Concentrația

proteica a fost evaluata utilizand kitul BCA protein assay kit (Pierce, Milwaukee, WI, USA), si 50 mg proteine au fost eluate in 8% SDS-PAGE si transferate pe membrane de nitroceluloza. Migrarea pe membrana a fost blocata pentru 1 ora cu BSA 5% in tampon TBS – Tween 0,1% si incubata peste noapte la 4°C cu anticorpilor primari anti-fosfo-mTOR si anti-fosfo-AKT (reactivi obtinuti de la Cell Signaling Technology cu exceptia beta-actinei de la Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Proteinele imunoreactive au fost vizualizate utilizand anticorpi antisoarece sau anti-iepure (1:3000 si respectiv 1:1000) conjugati cu HRP (peroxidaza din hrean) si marcaj chemoluminescent (Amersham Biosciences) ca substrat. Toate experimentele de western blot au fost verificate imunohistochimic, ca a doua metoda pentru p-mTOR si p-AKT.

Rezultate

Fragmentele tisulare (tumori de colon si mamare) primite proaspete din salile operatorii au fost procesate in paralel. Din fiecare caz, un fragment a fost procesat de rutina, iar unul sau doua fragmente au fost procesate la rece.

Urmatoarele aspecte au fost inregistrate:

- 1) pastrarea caracteristicilor morfologice (histologice)
- 2) Reactia imunohistochimica la markerii phospho-mTOR si phospho-AKT
- 3) Semnalizarea in analiza Western blot pentru prezenta p-mTOR si p-AKT

Nu s-a observat nici o diferenta morfologica intre tesuturile procesate de rutina si cele procesate prin metoda de fixare la rece. Lamele au fost examinate de medicii anatomopatologi ce nu au fost infomati de metoda utilizata pentru fiecare lama, ei alegand metoda noua ca fiind optima. Nu s-au identificat artefacte de distorsiune sau retractie.

S-a observat o corelatie semnificativa intre datele obtinute pe fragmentele proaspete prin analiza Western blot si marcajul imunohistochimic pentru p-mTOR si p-AKT. Dimpotriva, in concordanta cu datele din literatura, marcajul imunohistochimic pentru acelasi marker pe fragmentele fixate de rutina nu au prezentat corelatie cu analiza Western blot si reflecta probabil legarea nespecifica a anticorpului cu proteine nefosforilate.

Pornind de la principiul acceptat ca patrunderea formolului in tesuturi si fixarea reprezinta 2 fenomene distincte, inter-corelate, prima fiind rapida si a doua lenta, am enuntat ipoteza ca in timpul acestui interval de timp, fosfatazele tisulare pot actiona liber odata eliberate din compartimentele celulare. Doar in etape ulterioare ele vor fi denaturate si inhibitate de

deshidratare. Deoarece etapa initiala de penetrare nu este afectata de temperatura, am enuntat procedura descrisa de fixare la rece.

Deoarece formolul patrunde in tesuturi cu o viteza de 1 mm pe ora, presupunem ca o sectiune de 4mm dintr-o tumora colonica sau mamara, va fi fixata complet in 2 ore (actiunea are loc din ambele parti), dar in experimentul descris am extins imersia pe o durata de timp variind intre 4 si 24h. Nu am putut identifica diferente intre fragmentele pastrate in formol rece pentru perioade mai lungi sau mai scurte de timp.

La sfarsitul perioadei de "penetrare la rece", completarea procesului este realizata prin imersiunea in etanol rece. Daca, dupa prima etapa, tesuturile ar fi transferate in etanol la temperatura camerei, si deoarece deshidratarea dureaza cateva ore (2-6), in acest timp tesuturile ar fi inca expuse la fosfatazele active. De aceea este necesara deshidratarea in conditii de temperatura scazuta. Deshidratarea ulterioara si includerea la parafina se realizeaza conform procedurilor de rutina.

Dupa parerea noastra, posibilitatea obtinerii de fragmente tisulare fixate in formol si incluse la parafina care sa mentina reziduuri fosfat imunoreactive, asa cum este permis de procedura descrisa aici, deschide perspective de caracterizare a tumorilor in conformitate cu caile metabolice activate si extinde posibilitatile de exploatare a tesuturilor arhivate in laboratoarele de anatomie patologica.

B. REVENDICĂRI

Metodă de prezervare a fosfoproteinelor prin fixarea unor fragmente tisulare organice în formol rece, caracterizată prin aceea că se realizează un proces de fixare cu o secvență formol rece-etanol rece, în primă etapă fragmentele tisulare fiind puse în formol rece, la o temperatură între 1°C și 8°C, preferabil 2°C până la 5°C, pentru o perioadă de timp cuprinsă între 2 și 35 ore, ulterior procesul fiind completat prin deshidratare cu agenți de deshidratare răciți, respectiv prin imersia în etanol rece 95%, pentru o perioadă de timp cuprinsă între 1 și 7 ore iar în final țesuturile sunt incluse la parafina.

REVENDICĂRI DEPENDENTE

1. Procedeu, conform revendicării precedente, în care înainte de încălzirea țesuturilor, formolul în exces este spălat cu un lichid de înlocuire, de preferință o soluție salină.
2. Procedeu, conform oricăreia din revendicările precedente, caracterizat prin aceea că formolul este pre-răcit înainte de imersia țesuturilor.
3. Utilizarea unui fragment tisular organic non-congelat, fixat cu formaldehidă, utilizând o metodă conform oricăreia din revendicările precedente, pentru colorarea imunohistochimică pentru grupurile fosfo-proteice.
4. Utilizarea unui fragment tisular organic non-congelat, fixat cu formaldehidă, utilizând o metodă conform oricăreia dintre revendicările 1 la 6, pentru colorarea imunohistochimică pentru p-mTOR și p-AKT.