



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00465

(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) DIAGNOSTICUL ȘI MONITORIZAREA TUMORILOR  
NEUROENDOCRINE ALE PANCREASULUI, STOMACULUI ȘI  
INTESTINULUI SUBȚIRE ȘI CELE ALE GLANDEI  
SUPRARENALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă pentru identificarea unor tumori neuroendocrine, localizate la nivelul pancreasului, stomacului, intestinului subțire și al glandei suprarenale la un pacient. Metoda conform invenției constă în măsurarea concentrației de VGF și/sau a fragmentelor sale dintr-o probă biologică recoltată de la

pacient, după care valoarea concentrației obținute se corelează cu o valoare de referință de 0,05 p moli/ml, o concentrație mai mare indicând prezența unei tumori sau a recidivelor.

Revendicări: 1



## A. DESCRIEREA INVENȚIEI

### 1. TITLUL INVENȚIEI

**Metodă de diagnosticare și monitorizare a tumorilor neuroendocrine ale pancreasului, stomacului și intestinului subțire și cele ale glandei suprarenale.**

### 2. PRECIZAREA DOMENIULUI TEHNIC LA CARE SE REFERĂ INVENȚIA

Invenția se referă la o metodă de diagnosticare și monitorizare a tumorilor neuroendocrine ale pancreasului, stomacului și intestinului subțire și cele ale glandei suprarenale, care se poate folosi în **domeniul oncologic**.

### 3. PREZENTAREA STADIULUI TEHNICII

Markerii (biomarkerii) sunt substanțe produse de o tumoră sub formă de hormoni, enzime sau alte proteine, iar cantitatea lor este legată de o creștere a tumorii și a numărului de celule tumorale prezente și producătoare de marker. Acești markeri sunt stocați în celulele tumorale și pot fi eliberați în spațiile inter-celulare, trecând apoi în sânge. Interesant, acești markeri pot apărea, prin urmare, în sânge, chiar și atunci când dimensiunea tumorii este mică și nu poate da naștere la simptome clinice.

Biomarkerii semnalizează prezența unei tumori (producătoare de markeri) sau a evoluției sale clinice, chiar și în absența simptomelor clinice. Mai mult decât atât, se referă la un diagnostic într-un mod mai specific și precoce sau poate anunța reapariția unei tumori după terapie. În plus, ei pot fi folosiți limitat în studii de screening, deoarece absența markerului oferă dovezi clinice ale absenței tumorii.

Biomarkerii au intrat în practica de rutină clinică, deoarece aceștia pot fi ușor detectați în sânge, ser sau plasma și testele aferente sunt de obicei practicate de fiecare laborator, acestea putând fi repetate de mai multe ori la același pacient.

Gena VGF codifică pentru un precursor neuropeptid, care este exprimat într-un sub-grup de neuroni ai sistemului nervos central și periferic și în anumite celule neuro-endocrine ale adenohipofizei, ale medulei suprarenale, ale sistemului gastro-intestinal și ale pancreasului. VGF este un factor de creștere nervos și joacă un rol esențial în homeostazia energetică a organismului. Proteina VGF umană este alcătuită din 615 aminoacizi, iar proteinele VGF la

soareci și șobolani au 617 aminoacizi. Proteinele umane și de șobolan prezintă similitudini în proporție de aproximativ 85%. Precursorul neuropeptid este dotat cu o secvență de 22 aminoacizi lungime, care promovează translocația reticulului endoplasmatic.

În precursorul neuropeptid al VGF și în VGF complet matur sunt prezente mai multe fragmente scurte de reziduuri de bază, care sunt potențiale țintă pentru peptidaze, a căror acțiune generează fragmente scurte de peptide de VGF. Astfel de peptide au fost detectate la om și șobolan.

Stark et al, 2001, au identificat 3 fragmente N-terminale de aminoacizi cu lungimi de la 23 - 62 și 26 - 62 (trunchiere la capătul N al peptidului 23-62) și de la 23 la 59 (trunchiere la capătul C al peptidului 23-62) - în lichidul cefalorahidian al pacienților cu tulburări psihice cunoscute. Utilizarea VGF ca marker tumoral serologic pentru tumorile pulmonare a fost propus de către Matsumoto T et al. (Int J Biol Markere 2009; 24:282-5).

#### 4. PREZENTAREA PROBLEMEI TEHNICE

Problema pe care și-o propune să o rezolve prezenta invenție este de a stabili un marker în lichidul biologic examinat, respectiv sânge, ser, plasmă, urină, salivă, secreții sau în extract de țesuturi sau organe, pentru diagnosticarea tumorilor neuroendocrine ale pancreasului, stomacului și intestinului subțire și cele ale glandei suprarenale, producătoare de VGF, prin detectarea și urmărirea proteinei VGF și a fragmentelor sale, fiind o metodă rapidă și accesibilă care minimizează sau chiar elimină riscul rezultatelor fals negative

Am observat, spre surprinderea noastră ca fragmentele VGF sunt prezente în sângele pacienților cu tumori primitive neuro-endocrine ale pancreasului, producătoare de VGF. Mai precis, am remarcat că acest marker neuro-endocrin este prezent în tumori mici T1N0M0, ceea ce nu se întâmplă cu alți markeri tumorali care cresc doar la un volum mare al tumorii. Spre deosebire de toți ceilalți markeri pentru tumorile neuro-endocrine, cum ar fi cromogranina, detectarea fragmentelor VGF în sânge pentru depistarea precoce a tumorii sau a recidivei, nu ar fi expusă riscului de rezultate fals pozitive, deoarece prezența acestui marker peste valorile limită prag ar avea loc numai în prezența unor leziuni cerebrale severe, un eveniment puțin probabil la pacientii cu o tumora neuroendocrina a pancreasului aflată în stadii timpurii.

Invenția este legată de o metodă in vitro de identificare și detectare a prezenței sau de monitorizare a progresiei unei tumori neuroendocrine, producătoare de VGF, localizată la nivelul

pancreasului, stomacului, intestinului subțire și medularei suprarenale, la un pacient, sau pentru a urmări evoluția bolii și rezultatul terapiei.

De asemenea, prezenta metodă reușește să faciliteze localizarea tumorii primare sau a metastazelor sale, chiar și în tumori mici, greu de detectat, sau palpa. Astfel, demonstrarea faptului ca VGF și/sau fragmentele sale prezente la nivel celular în tumorile neuroendocrine ale pancreasului, stomacului, intestinului subțire și medularei suprarenale, permite odată cu detectarea prezenței peptidelor în ser, plasmă, urină, salivă, secreții și extracte de țesuturi și organe, detectarea localizării tumorii primare sau a metastazelor sale, folosind anticorpi marcați cu substanțe radioactive. Acest lucru permite tratamentul chirurgical sau radio-terapeutic, chiar în tumori mici, greu de detectat sau palpa.

## 5. EXPUNEREA INVENȚIEI

### Descrierea invenției.

Am observat, spre surprinderea noastră ca fragmentele VGF sunt prezente în sângele pacienților cu tumori primitive neuro-endocrine ale pancreasului, producătoare de VGF. Mai precis, am remarcat că acest marker neuro-endocrin este prezent în tumori mici T1N0M0, ceea ce nu se întâmplă cu alți markeri tumorali care cresc doar la un volum mare al tumorii. Spre deosebire de toți ceilalți markeri pentru tumorile neuro-endocrine, cum ar fi cromogranina, detectarea fragmentelor VGF în sânge pentru depistarea precoce a tumorii sau a recidivei, nu ar fi expusă riscului de rezultate fals pozitive, deoarece prezența acestui marker peste valorile limită prag ar avea loc numai în prezența unor leziuni cerebrale severe, un eveniment puțin probabil la pacienții cu o tumora neuroendocrina a pancreasului aflată în stadii timpurii.

Invenția de față este, prin urmare, legată de detectarea unor fragmente VGF în sânge pentru un diagnostic precoce al tumorilor neuroendocrine ale pancreasului și ale tumorilor producătoare de VGF ale stomacului, intestinului subțire și ale medularei suprarenale. Mai mult decât atât, aceasta invenție este legată de exploatarea valorii prognostice, în scopul de a detecta (sau exclude), într-un stadiu precoce a unei recidive tumorale.

În plus, demonstrarea faptului că VGF și / sau fragmentele sale sunt prezente la nivel celular în tumorile neuroendocrine ale pancreasului, stomacului, intestinului subțire și medularei suprarenale, permite, odată cu detectarea prezenței peptidelor în sânge, detectarea localizării

tumorii primare sau a metastazelor sale folosind anticorpi marcați cu substanțe radioactive, ceea ce va permite tratamentul chirurgical sau radio-terapeutic, chiar și în tumori mici, greu de detectat sau palpa.

Prin urmare, invenția se referă la o metodă in vitro de identificare și detectare a prezenței sau de monitorizare a progresiei unei tumori neuroendocrine, producătoare de VGF, localizată la nivelul pancreasului, stomacului, intestinului subțire și medularei suprarenale, la un pacient, sau pentru a urmări evoluția bolii și rezultatul terapiei.

Metoda implică:

- a) colectarea și prepararea probelor biologice ale pacientului,
- b) măsurarea concentrației de VGF și / sau a fragmentelor sale în proba biologică.
- c) corelarea valorii concentrației obținute cu o valoare de referință, unde o concentrare mai mare decât valoarea de referință va indica prezența tumorii sau evoluția bolii.

Se va alege proba biologică ce urmează să fie analizată dintre sânge, ser, plasmă, urină, salivă, secreții sau extract de țesuturi sau organe. Conform invenției, pot fi analizate fie proteinele mature cu lungime completă sau peptidele generate de acțiunea proteolitică asupra secvenței VGF. Fragmentele sunt în general de cel puțin 4 aminoacizi și, de preferință vor fi alcătuite din 4 la 20 sau mai mulți aminoacizi (până la 614). Concentrația de VGF sau fragmente conexe în proba biologică va fi determinată prin imun dozare, spectrometrie de masă, electroforeză în gel, gel-filtrare, cromatografie sau HPLC, de preferință cu radioimun dozare sau enzimoimun dozare în faza solida de tip competitiv, secvențial sau simultan, și mai precis, cu imun dozare ELISA.

Într-o procedură de realizare, metoda invenției se aplică pentru identificarea prezenței unei tumori neuroendocrine a pancreasului, stomacului, intestinului subțire și medularei suprarenale, iar în aceste cazuri vom folosi ca valoare de referință valoarea medie a concentrației VGF sau a fragmentelor sale în probele biologice din populația generală sănătoasă, neafectată de o neoplazie.

Într-o altă procedură de realizare, metoda invenției este utilizată pentru a monitoriza evoluția bolii, și, în acest caz, vom folosi ca valoare de referință concentrația de VGF sau a fragmentelor sale în probele biologice, care au fost anterior obținute de la același pacient.

Într-o altă procedură de realizare, metoda invenției permite urmărirea răspunsului la tratament și, în acest caz, valoarea de referință este legată de concentrația de VGF și / sau

fragmente sale în una sau mai multe probe biologice obținute anterior de la același pacient în timpul tratamentului.

Un aspect al invenției este legat de existența unui kit pentru a realiza metoda descrisă aici, un astfel de kit incluzând, în cutii separate, anticorpi anti-VGF și / sau anticorpii secundari marcați cu un marker trasabil și / sau VGF sau fragmente marcate cu un marcator urmăribil și după caz, reactivi și tamponare.

Un alt aspect al invenției se referă la utilizarea VGF a unui fragment imunogen ca marker de tumori neuro-endocrine producătoare de VGF ale pancreasului, stomacului și intestinului subțire și a medulosuprarenalei, pentru testarea în vivo sau in vitro.

### **Descrierea detaliată a invenției**

Un exemplu non-exhaustiv al metodei biologice este reprezentat de un dozaj imunoenzimatic de tip competitiv, secvențial sau simultan în fază solidă, în care un ligand este în concurență cu un trasor pentru interacțiunea cu un obiectiv specific.

Această metodă poate fi utilizată cu molecule de VGF sau peptidele rezultate alcătuite din secvențe de 4 până la 20 de aminoacizi. Aceste dimensiuni ale peptidelor nu vor permite interacțiunea în același timp a doi liganzi specifici cu diferite situsuri ale aceleiași peptide (procedura celor 2 situsuri).

Ligandul este alcătuit, în acest caz, de peptida moleculei de VGF prezentă în lichidul biologic examinat, ce va intra în competiție cu marcatorul (trasorul) în interacțiunea cu situsul de legare, astfel inhibând legarea proporțional cu cantitatea sa. Trasorul este o peptidă marcată cu biotină la capătul N-terminal, marcarea fiind realizată prin legare directă sau utilizând un conector spațial. Situsul de legare este reprezentat de o moleculă capabilă să interacționeze într-o modalitate stabilă și specifică cu o peptidă și care este absorbit într-o fază solidă reprezentată în general de o suprafață de polistiren.

Un situs înalt selectiv este un anticorp, monoclonal sau policlonal, obținut prin imunizarea unui animal cu un ligand imunogenic, conform unor protocoale standardizate. În faza de început a testului, anticorpul purificat este absorbit pe o fază solidă ce a fost anterior activată astfel încât să maximizeze numărul de molecule ce pot fi legate. După saturarea pe suprafața liberă cu albumina, fază solidă este expusă la o mixtură de reacție ce conține proba ce va fi

testată și o cantitate dată de traser. În timpul incubației, peptidul prezent în proba de testare intră în competiție cu traserul biotinilat pentru legarea de anticorpul corespunzător, astfel încât cantitatea de traser legat la faza solidă este invers proporțională cu cantitatea de peptid a traserului din proba de testare. La sfârșitul reacției, moleculele libere, nelegate sunt îndepărtate prin spălare. O cantitate hiperstoichiometrică de streptavidin peroxidaza este apoi adăugată, dând naștere unui complex insolubil polistiren-anticorp-peptidă biotinilată-streptavidin peroxidaza. După spălare și îndepărtarea reactivilor nelegați, enzima (peroxidaza) prezentă în faza solidă este evidențiată prin adugarea unei cantități constante de substrat/cromogen, care este în final citită printr-o procedură de tip fotometric.

Deoarece activitatea enzimatică este invers proporțională cu cantitatea de peptide prezentă în proba de testare, poate fi stabilită o curbă de calibrare, corelând intensitatea semnalului fotometric cu doza de peptide, și va permite astfel, prin interpolare, stabilirea unui conținut analitic al peptidei din proba de testare.

Procedura descrisă mai sus poate fi utilizată pentru a cuantifica una sau mai multe peptide, fiecare necesitând un anticorp specific și un traser. Traserul trebuie să fie preparat împreună cu producerea sintetică a peptidei, prin biotinilarea rezidurilor N-terminale, în timp ce anticorpul ar trebui preparat în conformitate cu procedura descrisă la punctul 8 din prezenta Descriere, adaptată la dimensiunile și caracteristicile structurale ale peptidei VGF ce va fi utilizată.

## 6. PREZENTAREA AVANTAJELOR

- procedura mai rapidă, în vederea diagnosticării tumorilor neuroendocrine ale pancreasului, stomacului și intestinului subțire și cele ale glandei suprarenale;
- permite identificarea prezenței unei tumori neuroendocrine a pancreasului, stomacului, intestinului subțire și medularei suprarenale în stadiu precoce, utilizând probe biologice;
- invenția poate fi utilizată și pe piese de rezecție chirurgicală;
- necesită cantități reduse de lichide biologice sau extract de țesuturi sau organe
- facilitează monitorizarea evoluției bolii;

- permite urmărirea răspunsului la tratament;
- introducerea în practica a utilizării unui kit pentru a realiza metoda descrisă, incluzând, în cutii separate, anticorpi anti-VGF și / sau anticorpii secundari marcați cu un marker trasabil și / sau VGF sau fragmente marcate cu un marcator urmăribil și după caz, reactivi și tamponare;
- este o procedură repetabilă și de înaltă precizie a rezultatului

## 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

### Exemplul 1

Au fost imunizați iepuri de Noua Zeelandă prin administrarea de 2 mg de peptidă dizolvată în soluție salină și adăugată cu adjuvant complet Freund. Au fost efectuate două stimulări la interval de 20 zile utilizând aceeași cantitate de peptida dizolvată în soluție salină. La sfârșitul programului de imunizare, sângele animalului este obținut iar imunoglobulinele din ser sunt purificate prin absorbția proteinei A. Cantitatea lor este măsurată prin fotometrie utilizând coeficientul de absorbție  $\epsilon_{280} = 1,38$  (mg / ml). 150 microlitri de anti-ser policlonal (5 micrograme / ml în tampon fosfat de 50 mM, pH 7,5), sunt adăugate în microgodeurile unei plăci Maxisorp NUNC C8, se incubează peste noapte și imunoglobulinele neabsorbite sunt apoi spălate cu o soluție tampon. Situsurile nesaturate sunt apoi blocate folosind o soluție tampon care conține albumină serică bovină 0,5%, care este lăsată să reacționeze timp de 30 min.

După spălări suplimentare cu soluție salină tamponată, 50 microlitri de ser care urmează să fie analizat (a se vedea mai jos) sau, alternativ, a unei concentrații cunoscute de peptidă, și 100 microlitri de peptidă trasor, dizolvată în ser fiziologic, se adaugă în godeuri. După 2 ore de incubare, godeurile sunt spălate intens și, în final se adaugă în godeuri 150 microlitri de streptavidin-peroxidază (Jackson Immunosearch, cod. 016-030-084), diluată într-o soluție HRP-



StabilPlus (Kem-En-Tec Diagnostics, cod. 4530). Se lasă să reacționeze timp de 60 min. la temperatura camerei, apoi enzima nelegată se spală cu soluție salină. Se adaugă substrat / cromogen (150 microlitri), cu ajutorul unei soluții ready to use TMB One (Kem-En-Tec Diagnostics, cod. 4380), care conține un amestec de peroxid de hidrogen și tetrametilbenzidină. Reacția este oprită după 20 min., prin adăugarea a 100 microlitri de acid sulfuric 2N.

Densitatea optică a microgodeurilor se determină prin măsurarea absorbantei la 450 nm în 10 min. de la oprirea reacției. Cu valorile obținute prin utilizarea unor concentrații cunoscute ale peptidei este posibil să se stabilească o curbă de calibrare monotonă ce corelează densitatea optică a godeului cu concentrația de peptidă care urmează să fie măsurată. Prin verificarea pe această curbă a valorii intensității optice obținute dintr-un eșantion necunoscut (ser de șobolan) este posibil să se obțină concentrația de peptide. Eliberarea în sânge a peptidelor VGF de la o tumoră experimentală neuroendocrine medulosuprarenaliene (PC12 feocromocitom transplantabil la șobolani) a fost verificată cu procedura de mai sus. Celulele PC12 (RCB009) au fost cultivate în vase de 75 cm<sup>2</sup> într-un mediu Dulbecco Eagle modificat (de MDEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, Statele Unite ale Americii), care conține 10% ser fetal bovin (Gibco BRL), într-o atmosferă umedă cu CO<sub>2</sub> 5% - O<sub>2</sub> 21% la 37 ° C. Celule (5x 10<sup>6</sup>) au fost transplantate subcutanat la femele Sprague-Dawley (8 săptămâni, 250 g). La intervale de timp de 15, 30, 45 și 60 zile, au fost obținute probe de sânge din coada. La 60 de zile masa tumora subcutanată a ajuns la o dimensiune palpabilă. S-a stabilit o valoare prag pe baza datelor obținute din probele de sânge de la 10 șobolani de control. În animalele transplantate cu celule PC12 derivate dintr-un feocromocitom a medulosuprarenalei, valorile pozitive s-au obținut deja după 30 de zile de la implantare și au continuat să crească până la 60 de zile. Aceste date dau dovezi experimentale ca peptidele VGF sunt eliberate din celule tumorale în sânge.

### Exemplul 2

Au fost investigați 40 de pacienți ce au prezentat o masă tumorală de 3-5 cm detectată în zona pancreatică la CT și ecografie. Natura leziunii nu a putut fi clarificată înainte de operație. Probe de sânge obținute de la acești pacienți au fost investigate cu procedura ELISA mai sus menționată pentru fragmente VGF. Au fost recoltate probe de sânge de la pacienți cu gastrită ca probe control. Datele obținute au arătat că 10 pacienți cu o tumoare pancreatică au avut valori

mai mari decât valorile prag ale VGF - o valoare mai mica de 0,05p moli/ml este considerata negativa., în timp ce toate cele 10 controale și 30 dintre cei 40 de pacienti au avut valori sub valoarea prag.

Rezultatele au fost comparate cu examenul histologic al tumorilor pancreatice după operație. Tumorile aparținând celor 30 de pacienții "VGF-negativi" corespundeau cu adenocarcinoamele de pancreas exocrin (26 de cazuri) și cu carcinoamele cu celule acinice (2 cazuri) și un caz cu o tumoră neuroendocrina producătoare de somatostatina. Cele 10 cazuri "VGF-pozitive" au corespuns tumorilor neuroendocrine ale pancreasului dovedite prin teste imunohistochimice pozitive pentru markeri neuroendocrine (cromogranină A și sinaptofizina). Ele au fost, de asemenea, VGF-pozitive prin imunohistochimie. Rezultatele indică faptul că procedurile ELISA pentru fragmente VGF permit un anumit diagnostic preoperator de tumori neuro-endocrine ale pancreasului, permițând astfel o planificare adecvată clinică.

9. INDICAREA, DACĂ NU REZULTĂ ÎN MOD EVIDENT DIN CELE DE MAI SUS, A MODULUI ÎN CARE INVENȚIA ESTE SUSCEPTIBILĂ DE APLICARE INDUSTRIALĂ.

Față de cele expuse deja, apreciem că invenția noastră este susceptibilă de aplicare pe scară largă, atât timp cât poate duce la identificarea precoce a tumorilor neuroendocrine ale pancreasului, stomacului și intestinului subțire și cele ale glandei suprarenale precum și la monitorizarea eficientă a evoluției acestora înainte și după aplicarea tratamentului.

## B. REVENDICĂRILE

Metodă pentru diagnosticarea și monitorizarea tumorilor neuroendocrine ale pancreasului, stomacului și intestinului subțire și cele ale suprarenalei, caracterizată prin aceea că după colectarea și prepararea probelor biologice ale pacientului, se procedează la măsurarea concentrației de VGF și/sau a fragmentelor sale în proba biologică, iar valoarea concentrației obținute se corelează cu valoarea de referință, unde o valoare mai mică de 0,05p mol/ml este considerată negativă, astfel, o concentrație mai mare decât valoarea de referință va indica prezența tumorii sau a recidivelor (evoluție nefavorabilă).