



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00201**

(22) Data de depozit: **13/03/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2022** BOPI nr. **5/2022**

(41) Data publicării cererii:  
**30/09/2015** BOPI nr. **9/2015**

(73) Titular:  
• **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:  
• **POPESCU IONELA DANIELA**,  
STR. SFÂNTUL ELEFTERIE NR. 25,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **ALBULESCU RADU NICOLAE AUREL**,  
STR. ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL. 07,  
SC.C, ET. 2, AP. 125, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **TĂNASE CRISTIANA**,  
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,  
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• **CODRICI ELENA**, STR. CÂMPIA  
LIBERTĂȚII NR. 4, BL. PM 51, SC. 3, ET. 7,  
AP. 117, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **ALBULESCU LUCIAN**, STR.ROȘIA  
MONTANĂ NR.6, BL.O 7, SC.C, ET.2,  
AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• **MIHAI SIMONA**, BD. CAMIL RESSU  
NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **ENCIU ANA-MARIA**, STR. PLUGARILOR  
NR. 1, BL. 94, SC. A, AP. 15, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **NEAGU TEODORA MONICA**,  
STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **CONSTANTINESCU ȘTEFAN**,  
STR. PARIS NR. 7, ET. 1, AP. 2, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**US 2010/0094560 A1**; **J. LIU ȘI AL.**, "MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID PROTEIN FOR GLIOMA AND ITS CLINICAL APPLICATION", CONTEMPORARY ONCOLOGY, NR. 2, VOL. 18, PP. 100-105, 2014; **C. WIBOM ȘI AL.**, "PROTEIN EXPRESSION IN EXPERIMENTAL MALIGNANT GLIOMA VARIES OVER TIME AND IS ALTERED BY RADIOTHERAPY TREATMENT", BRITISH JOURNAL OF CANCER, VOL. 94, PP. 1853-1863, 2006

(54) **METODĂ DE STABILIRE A UNUI SET DE BIOMARKERI PROTEICI PENTRU DIAGNOSTICUL GLIOBLASTOMULUI**



# RO 130589 B1

1           Invenția se referă la o metodă de stabilire a unui set de biomarkeri ce se constituie  
într-o semnătură proteică utilizabilă pentru diagnosticul sau prognosticul pacienților cu  
3 glioblastom. Prezenta invenție realizează o analiză complexă, combinând tehnologii moderne  
de proteomică pentru a descoperi potențiali biomarkeri-candidați utili în diagnosticul tumorilor  
5 cerebrale.

7           Glioblastomul este cea mai frecventă tumoră cerebrală primară asociată cu o supra-  
viețuire relativ scurtă; intervalul mediu de supraviețuire pentru pacienții cu glioblastom  
multiform este de doar 9-12 luni [1]. Deși metodele de diagnostic imagistic sunt principala  
9 metodă de depistare a tumorilor cerebrale asimptomatice, este necesară dezvoltarea unei  
strategii de diagnostic bazate pe tehnologii proteomice cu sensibilitate crescută și raport  
11 cost-eficiență convenabil [2].

13           Identificarea de biomarkeri în vederea diagnosticării tumorilor, stabilirii recurenței și  
monitorizării răspunsului terapeutic constituie un deziderat major în oncologie. În prezent  
eforturi considerabile se concentrează pe metode de diagnostic timpuriu al tumorii, inclusiv  
15 cele care implică detecția de proteine specifice sau profiluri proteomice realizate din biopsii  
cât și din ser/plasmă [3,4].

17           În acest sens identificarea unor noi biomarkeri proteici sau a unor seturi de proteine  
reprezintă o provocare la nivel științific național cât și internațional.

19           Modificările la nivelul expresiei, structurii sau funcției proteinelor pot constitui  
biomarkeri utili în diagnosticul precoce, precum și în evaluarea prognosticului. În acest  
21 context, detectarea unor seturi de biomarkeri cu sensibilitate și specificitate crescute poate  
avea o rată de succes mai mare în diagnostic, față de identificarea unui biomarker unic [5].

23           În literatură, există studii ce prezintă identificarea biomarkerilor serici în glioblastom  
prin metoda SELDI-TOF, demonstrându-se încă o dată că aceasta reprezintă o metodă  
25 promițătoare prin capacitatea de a identifica mai mulți markeri serici cu sensibilitate și  
specificitate mare [6].

27           Liu J. et al, utilizând tehnologia SELDI-ToF MS au realizat screeningul și evaluarea  
biomarkerilor pentru detectarea glioblastoamelor față de control și față de pacienții cu alte  
29 tumori cerebrale benigne [7]. Prin compararea probelor provenite de la pacienți cu  
astrocitoame cu un lot martor, din 15 picuri identificate (m/z 8214,77; 8926,76; 4815,11;  
31 8612,23; 2082,19; 4299,87; 2103,55; 7764,82; 2368,19; 3226,97; 2389,55; 2021,78;  
4469,09; 6457,054; 8702,416) au fost selectați doar 2 biomarkeri cu raportul m/z 8214,8 și  
33 2368,2 ce pot servi ca biomarkeri finali discriminatori. În acest studiu a fost comparat și lotul  
pacienților cu astrocitoame maligne cu un lot de pacienți cu tumori cerebrale benigne. Deși  
35 inițial au fost identificate 22 de picuri, în final doar 2 picuri (m/z 4155,3 și 14047,8) au fost  
selectate ca posibili biomarkeri. Concluzia studiului a fost că analiza SELDI-ToF MS combi-  
37 nată cu un algoritm de rețea neuronală artificială (ANN), ar putea facilita descoperirea de noi  
biomarkeri.

39           Într-un alt studiu care a inclus 140 de probe de ser ce proveneau de la pacienți cu  
astrocitoame maligne, seruri de control și seruri de la pacienți cu alte tumori cerebrale, cu  
41 ajutorul tehnologiei SELDI-ToF MS, o combinație de șapte biomarkeri serici cu identitate  
necunoscută a fost sugerată drept un clasificator semnificativ cu sensibilitate 84,6% și speci-  
43 ficitate 86,4%, pentru a diferenția corect cazurile de astrocitom de lotul control. Printre acești  
biomarkeri, la pacienții cu astrocitom 4 au fost supraexpresiați (m/z 2018, 6633, 7567, 15115)  
45 și 3 au fost subexpresiați (m/z 4286, 8140, 8926). În plus, expresia semnificativ crescută a  
două dintre aceste proteine (m/z 7567 și 15115) a fost detectată în astrocitomul de grad  
47 scăzut comparativ cu astrocitomul de grad înalt [8]. Și în acest studiu concluzia a fost că,  
tehnologia SELDI-ToF MS ar putea facilita în mare măsură descoperirea biomarkerilor serici  
49 în astrocitoame.

# RO 130589 B1

Petrik V. et al, au identificat biomarkeri serici care să îmbunătățească predicția de supraviețuire la pacienții cu tumori cerebrale folosind SELDI-ToF MS. Un pic, identificat ca lanțul-B al glicoproteinei alfa 2-Heremans-Schmid (AHSG), a fost mai puțin exprimat în tumori de grad înalt. Mai mult decât atât, s-a realizat și validarea nivelurile serice de AHSG la setul de pacienți, precum și într-un set independent de probe de ser de la 72 de pacienți cu gliom folosind o metodă turbidimetrică; rezultatele au sugerat AHSG ca un predictor independent de supraviețuire al pacienților cu această patologie. În timp ce nivelurile serice scăzute ale AHSG au fost corelate cu o rată scăzută a timpului de supraviețuire (< 3 luni), s-a constatat că valorile normale în ser pot fi asociate cu prelungirea ratei de supraviețuire (> 2 ani) [9].

Gautam P. et al., au analizat nivelurile de proteine prezente în plasma de la pacienții cu GBM folosind o abordare bazată pe LC-MS/MS iTRAQ. S-au identificat 296 de proteine, din care 61 au prezentat o modificare de 1,5 ori în grupul de pacienți. Niveluri modificate a feritinei (FTL), S100A9, și carnozina 1 (CNDP1), au fost verificate prin ELISA într-un test set de zece probe de plasmă. FTL este un marker de inflamație, de asemenea, implicat în cancer, S100A9 este un membru important al cascadei de semnalizare Ca<sup>2+</sup> raportat ca fiind modificat în țesutul GBM. CNDP1 a fost raportat pentru rolul său în reglementarea nivelului de carnozina, implicat ca un potențial medicament pentru GBM. Acestea și alte proteine din setul de date pot forma puncte de plecare utile pentru alte investigații clinice pentru dezvoltarea de panouri de biomarkeri din plasma pentru GBM [10].

Literatura de brevete evidențiază utilizarea unor seturi de biomarkeri, de exemplu brevetul **US 20110027797** [11] definește un set de biomarkeri constând din gene selectate AP2A2, APOC3, BDNF, CALU, CXCL14, CXCL9, FII, GNRHI, LAD1, LAMP2, LII, PSG9, SERPINC1, GPX3, SPA1CL1 pentru screeningul, detectarea, prognosticul terapiei în compararea astrocitomului de grad mic cu astrocitomul de grad înalt. Abordări asemănătoare sunt descrise în brevetele **WO 2012170711** [12], **EP 2260303** [13] și **US 2010/0094560 A1** [14].

Toate aceste argumente au constituit motive pentru aprofundarea studiului proteomic prin tehnologii de ultima generație, cu scopul final de identificare a unor biomarkeri care pot fi cuantificați în mod obiectiv și care sunt orientativi pentru un anumit status patologic. Odată cu identificarea caracteristicilor discriminatorii -caracterizate și validate, aceste molecule pot reprezenta biomarkeri, care pot fi folosiți prospectiv, pentru a diferenția între loturile incluse în studiu.

Deoarece există o nevoie tot mai mare de dezvoltare a biomarkerilor de diagnostic, prognostic, sau de predicție, am investigat proteine exprimate în probele de ser de la pacienții cu glioblastom folosind spectrometria de masă de tip SELDI - TOF MS.

Problema tehnică pe care încearcă să o rezolve prezenta invenție este de a diagnostica glioblastomul sau de a oferi un prognostic de glioblastom. Soluția tehnică oferită de prezenta invenție constă în:

- identificarea unui set de biomarkeri, care nu sunt abordați încă în practica medicală curentă, lucru esențial cu atât mai mult cu cât există puține date în literatura de specialitate privind rolul acestora în patologia tumorală în general, cu atât mai mult în patologia gliomelor de grad înalt;

- identificarea unor biomarkeri prin analiza profilului proteic în glioblastoame prin spectrometrie de masă SELDI-ToF MS.

Invenția se referă la o metodă de stabilire a unui set de biomarkeri ce se constituie într-o semnătură proteică utilizabilă pentru diagnosticul sau prognosticul pacienților cu glioblastom, care cuprinde determinarea simultană a patru proteine biomarkeri S100A8,

# RO 130589 B1

1 CXCL4, S100A9 și CXCL7 în probe de ser de la pacienți cu glioblastom, comparativ cu o  
2 probă de ser control, nivelul acestor biormakeri fiind supraexprimat în probele de ser de la  
3 pacienții cu glioblastom, comparativ cu proba de ser de control.

Metoda conform invenției constă în identificarea grupului de proteine biomarkeri  
5 S100A8, CXCL4, S100A9 și CXCL7 și validarea acestora, în probele de ser de la pacienții  
cu glioblastom, comparativ cu proba de ser de control. Etapa de identificare cuprinde:

7 - stabilirea profilului proteic prin SELDI-ToF MS, atât pentru probe de ser de la  
pacienți cu glioblastom, cât și pentru probe de ser de la pacienți sănătoși, selecția 11  
9 clustere de proteine relevante exprimate diferențiat în probele de ser de la pacienții cu  
glioblastom, comparativ cu controlul, având mase moleculare 8143,147; 2948,037; 23466,27;  
11 6440,011; 3094,012; 9192,839; 3892,553; 10836,09; 13153,61; 15868,12; 28114,621 Da,  
pentru care picul corepunzător a fost prezent în cât mai multe probe,  $p < 0,05$ , fracționarea  
13 probelor de ser ce conțin clusterelor relevante, în vederea confirmării potențialilor biomarkeri  
în fracțiile corespunzătoare, pe baza proprietăților biofizice ale proteinelor, permițând  
15 fracționarea high-throughput prin utilizarea schimbătorului anionic;

- concentrarea probelor fracționate în vederea realizării unei analize electroforetice  
17 1D, selectarea unor benzi corepunzătoare clusterelor de proteine identificate prin SELDI-ToF  
MS, decuparea acestor benzi, digestia lor cu tripsină, în vederea analizei LC-MS/MS, în  
19 urma analizei prin LC-MS/MS, aplicându-se algoritmul Mascot, pe baza comparației a 63 de  
peptide detectate cu baza de date SwissProt fiind desemnate patru proteine ce corespund  
21 condițiilor de identificare: S100 A8, S100 A9, PF4 și CXCL7. Validarea proteinelor identificate  
prin LC/MS/MS se efectuează utilizând tehnica ELISA.

23 Detalii privind realizarea prezenței invenției sunt prezentate în exemplele următoare,  
care sunt în legătură și cu figurile 1...4 și cu tabelele 1 și 2.

25 Descrierea figurilor:

- fig. 1, prezintă un exemplu de spectre de masă reprezentative SELDI-TOF obținute  
27 pentru cipurile CM10 la pH 4,5 și pH 6,0 (control/glioblastom);

- fig. 2, prezintă spectre cu intensități relative diferite - picurile cu raporturile m/z de  
29 2948,04 și 6440,01 sunt semnificativ scăzute în serul pacienților cu glioblastom în  
comparație cu lotul control;

- fig. 3, prezintă spectre cu intensități relative diferite - picurile cu raporturile m/z de  
31 9192,84, 10836,09, 13153,66 și 23466,27 sunt semnificativ crescute în serul pacienților cu  
glioblastom în comparație cu lotul control;

- fig. 4, prezintă valorile concentrațiilor serice ale proteinei S100A9 la pacienții cu  
35 glioblastom și control, determinate prin metodele ELISA ( $p < 0,001$ , ANOVA).

Descrierea tabelor:

37 - tabelul 1, prezintă clustere de proteine exprimate diferențiat în glioblastom,  
comparativ cu controlul (m/z: masă/sarcină; ↑: Nivelul expresiei de proteine a fost crescută  
39 în glioblastom, comparativ cu controlul; ↓: Nivelul expresiei de proteine a fost scăzută în  
glioblastom, comparativ cu controlul);

41 - tabelul 2 prezintă proteinele identificate în urma procesării datelor utilizând software-  
ul MASCOT (benzile 1D corespunzătoare greutateilor moleculare ale proteinelor exprimate  
43 diferențiat în glioblastom față de controale, stabilite prin analiza SELDI-TOF MS).

45 **Exemplul 1** - Definierea parametrilor optimi de preparare a probelor și selecția  
condițiilor optime de selectare a clusterelor de biomarkeri candidați în vederea analizei prin  
metoda SELDI-ToF MS.

# RO 130589 B1

Au fost colectate probe de ser de la 35 pacienți cu glioblastom - 21 bărbați și 14 femei cu vârsta medie de 60,25 ani (interval 40-80 ani). Au fost colectate probe pentru lot martor de la 30 de subiecți sănătoși - 9 bărbați și 21 femei cu vârsta medie de 39,3 de ani (interval 24-74 ani).	1
Probele de ser au fost alicotate și păstrate la -80°C până la determinare.	3
În vederea analizei SELDI-ToF MS probele au fost pregătite prin denaturare cu tampon conținând 9,5M uree, 2% CHAPS (w/v) 3-[(3-colamido-propil) dimetil-amoniu]-1-propan sulfonat și 1% (w/v) DTT Ditiotreititol.	5
În cadrul acestui model experimental s-a realizat optimizarea protocolului de lucru, astfel un eșantion de probe reprezentative a fost diluat în tampon de legare cu pH diferit și s-au aplicat pe chip-uri Q10 (suprafață anionică) și CM 10 (suprafață cationică). Pentru CM10 intervalul de pH a fost între 3,5-7,0 (acetat de amoniu 50 mM la pH 3,5-5,5; fosfat de sodiu 50 mM la pH 6,0-7,0) iar pentru Q10 a fost între 4,5-8,0 (acetat de amoniu 50 mM pentru pH 5,0-5,5; fosfat de sodiu 50 mM pentru pH 6,0-7,5; tampon Tris HCl 50 mM pentru pH 8,0-8,5). Soluția de matrice ProteinChip SPA (acid sinapinic) conține acetoneitril 100% și acid trifluoroacetic 1%.	7
Protocol de preparare chipuri CM10 și Q10	9
1. S-au diluat probele denaturate 1/10 în soluție tampon.	11
2. S-au montat chipurile în bioprocesor.	13
3. S-au hidratat chipurile cu 200 μL soluție tampon.	15
4. S-au incubat chipurile pentru 10 min, la temperatura camerei, pe agitator (250 rpm). S-a repetat spălarea până la un total de 2 spălări.	17
5. S-a îndepărtat soluția tampon din godeuri și s-a adăugat 100 μL probă în fiecare godeu.	19
6. S-au incubat chipurile pe un agitator pentru 1 h la temperatura camerei.	21
7. S-au îndepărtat probele din godeuri și s-a realizat spălarea lor cu 200 μL soluție tampon pentru 5 min, cu agitare. S-a repetat acest pas de încă 2 ori până la un total de 3 spălări.	23
8. S-a îndepărtat soluția tampon din godeuri și s-a realizat spălarea fiecărui godeu cu 200 μL de apa deionizată, 5 min, cu agitare.	25
9. S-au scos chipurile din bioprocesor și s-au uscat la temperatura camerei, 10 min.	27
10. S-a aplicat 0,5 μL soluție SPA/spot de 2 ori.	29
11. S-au citit chipurilor și s-au analizat spectrele utilizând ProteinChip Reader.	31
Citirea și analiza chipurilor	33
Chipurile au fost citite cu sistemul "Protein Chip DATA Manager". Următoarele setări au fost folosite pentru platforme SELDI-ToF-MS: Target m/z 5 kDa, atenuarea matricei la 2,5 kDa și domeniul de masă între 0-50...100 kDa. Calibrarea externă a fost realizată utilizând standardul de proteine ce cuprinde: recombinant hirudin (6,96 kDa), equine cytochrome c (12,23 kDa), equine myoglobin (16,95 kDa) și carbonic anhidrază (29,00 kDa). Acuratețea de masă (m/Am) a fost calculată la < 0,02% de-a lungul întregului experiment. Zgomotul a fost ajustat pentru a elimina zgomotul chimic la intervale de masă scăzute. Pentru clusterare au fost considerate doar picurile cu un raport semnal-la-zgomot (S/N) > 5 și cu aria de sub pic > 3. Au fost folosite pentru a se genera picurile clusterelor doar picurile calificate care au fost prezente în > 10% din spectre. Masa pentru fiecare cluster a fost setată la 0,3% din masa picului pentru spectrele optimizate la masă scăzută (0-30 kDa) și la 2% din masa picului pentru spectrele optimizate la masă crescută (30-100 kDa). Au fost autodectate picuri cu S/N > 5 în intervalul m/z 2,5-100 kDa. Clusterarele au fost completate utilizând o a doua selecție a picurilor cu S/N > 2 și 0,3% masă, picurile estimate fiind adăugate.	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

# RO 130589 B1

1 În urma analizei spectrelor s-a decis că cele mai bune rezultate au fost obținute pe  
chipul CM10 la pH 4,5 (tampon acetat de amoniu) și la pH 6,0 (tampon fosfat de sodiu)  
3 (fig. 1).

5 **Exemplul 2. Identificarea clusterelor relevante în vederea confirmării potențialilor  
biomarkeri**

7 După ce s-au stabilit condițiile optime de preparare și achiziție a chipurilor s-a  
continuat experimentul, utilizând exemplul 1 pentru toate probele luate în studiu.

9 Prin aplicarea protocolului de măsurare asupra probelor de proteine și analiza  
datelor, pe chipuri CM 10 la pH 4,5, s-a identificat un grup total de 73 de cluster (proteine)  
serice identificabile în probele provenite de la pacienți cu Gliome/Control, pe intervalul de  
11 greutate moleculară 2000-55000 Da. Analiza avansată a distribuției și modificărilor de  
expresie ale celor 73 de cluster a condus la selecția unui grup de 6 cluster (8143,147;  
13 2948,037; 23466,27; 6440,011; 3094,012; 9192,839) ce prezintă cea mai bună putere de  
clasificare între cele două grupuri. Condiția de selecție a clusterelor relevante a fost ca  $p < 0,05$ ,  
15 prezența picului în cât mai multe probe.

17 Prin aplicarea protocolului de măsurare asupra probelor de proteine și analiza  
datelor, pe chipuri CM 10 la pH 6,0, s-a identificat un grup total de 79 de cluster (proteine)  
serice identificabile în probele provenite de la pacienți cu gliome/controale, pe intervalul de  
19 greutate moleculară 2000-55000 Da.

21 Analiza avansată a distribuției și modificărilor de expresie ale celor 79 de cluster a  
condus la selecția unui grup de 5 cluster (3892,553; 10836,09; 13153,61; 15868,12;  
23 28114,621) ce prezintă cea mai bună putere de clasificare între cele două grupuri ( $p < 0,05$ ,  
picul selectat să fie prezent în cât mai multe probe).

25 Clusterelor de proteine relevante sunt prezentate în tabelul 1.

**Exemplul 3. Fraționarea probelor și alegerea fracțiilor relevante**

27 În urma citirii și analizei datelor s-a decis fracționarea probelor de ser ce conțin  
clusterelor relevante alese în exemplul 2, în vederea confirmării potențialilor biomarkeri în  
fracțiile corespunzătoare.

29 Kitul de fracționare a serului este conceput pentru a facilita analiza probelor de ser  
prin fracționarea proteinelor. Fraționarea se bazează pe proprietățile lor biofizice. Setul  
31 permite fracționarea high-throughput prin utilizarea schimbătorului anionic într-o placă cu 96  
godeuri. Pentru realizarea schimbului anionic este necesară rehidratarea plăcii înainte de  
33 utilizare. Probele sunt adăugate în placă și apoi eluate treptat, prin modificarea pH-ului cu  
tamponul de spălare până când sunt colectate șase fracțiuni. Fracțiunile pot fi apoi analizate  
35 utilizând ProteinChip folosind protocolul corespunzător.

Au fost analizate serurile provenite de la pacienții cu glioblastoame.

37 Tampon ProteinChip U9 (9 M uree, 2% CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH 9)

Tampon de rehidratare (50 mM Tris-HCl, pH 9)

39 Tampon de spălare 1 (50 mM Tris-HCl, pH 9)

Tampon de spălare 2 (50 mM Hepes, pH 7)

41 Tampon de spălare 3 (100 mM acetat de Na, pH 5)

Tampon de spălare 4 (100 mM acetat de Na, pH 4)

43 Tampon de spălare 5 (50 mM citrat de Na, pH 3)

Tampon de spălare 6 (33,3% izopropanol, 16,7% acetonitril, Acid 0,1% trifluoroacetic)

45 După preluarea fracțiilor s-a decis analiza următoarelor fracții 1, 3, 4, 5+6 pe chipuri  
CM10, la pH 4,5 (tampon acetat) și 6,0 (tampon fosfat) folosindu-se protocelele de  
47 preparare și citire descrise în exemplul 1.

# RO 130589 B1

În urma analizei spectrelor pe fiecare fracție s-a evidențiat existența clusterelor luate în analiză. În urma analizei statistice a fracțiilor pentru fiecare cluster în parte (p, ROC etc), s-a decis analiza anumitor fracții pentru anumite cluster.	1 3
În fig. 2 și 3 sunt redate spectre reprezentând cluster pentru seturile de probe normale și patologice din cadrul studiului.	5
<b>Exemplul 4. Identificarea biomarkerilor</b>	
Electroforeza 1D	7
Probele fracționate au fost concentrate cu filtre Amicon® Ultra 0,5 mL Filters (3 kDa), folosind tamponul 50 mM Tris pH 8,0, până la un volum final de 50 µL. Probele au fost mai departe concentrate prin reducerea volumului la ~ 20 µL într-un sistem vacuum; 10 µL din probă a fost diluată până la 20 µL cu 8 µL de tampon concentrat 4 x (Invitrogen) și 2 µL DTT (Ditiotreitol) 500 mM.	9 11
Probele au fost fierte 10 min. Probele au fost rulate cu sistemul Novex gel electrophoresis (Invitrogen), gelurile folosite au fost pre-cast 12% BisTris. Standardul de greutate moleculară folosit - See Blue plus 2 pre-stained (Invitrogen) a fost rulat pentru fiecare gel.	13 15
Gelurile au fost fixate și colorate cu Coomassie blue coloidal. Probele concentrate au fost încărcate în gel fără echilibrarea proteinelor totale între fracții. Acest lucru s-a datorat faptului că fiecare fracție conține o cantitate diferită de proteine totale. În unele cazuri cantitatea de proteine totale a fost insuficientă și nu au fost vizibile benzi la colorarea cu Coomassie blue.	17 19 21
În urma analizei cu softul Quantity One, versiunea versiunea 4.6.1, (BioRad) a gelurilor s-a decis alegerea anumitor benzi corespunzătoare clusterelor identificate prin SELDI-TOF MS. Ulterior s-a realizat decuparea benzilor relevante, continuând cu digestia cu tripsină a acestora, în vederea analizei ulterioare LC/MS/MS.	23 25
<i>LC/MS/MS</i>	
<i>Digestia proteinelor</i>	27
Benzile de proteine au fost digerate cu tripsină. Benzile specifice din gel au fost spălate cu 50...100 mM bicarbonat de amoniu, urmat de acetonitril (ACN).	29
Benzile proteice au fost ulterior reduse și alchilate cu 10 mM DTT, respectiv 55 mM iodoacetamida (IAA), ambele dizolvate în 100 mM bicarbonat de amoniu. Benzile au fost decolorate cu 50% 100 mM bicarbonat de amoniu/50% ACN înainte de ciclul de spălarea finală cu 50...100 mM bicarbonat de amoniu și ACN.	31 33
Probele au fost liofilizate și rehidratate în soluție de tripsină (Promega sequencing grade; 20 µg a fost resuspendată în 100 ng/ul cu 0,1% TFA, imediat înainte de folosire a fost diluat la 13 ng/µl cu 50 mM bicarbonat de amoniu). Probele au fost incubate la 4°C pentru 20 min, soluția de tripsină neabsorbită a fost îndepărtată și bucățile de gel au fost imersate în 50 mM bicarbonat de amoniu.	35 37
Probele au fost lăsate la digerat la 37°C pentru 2 h, apoi probele au fost păstrate la temperatura camerei peste noapte. Supernatantul ce conține peptide a fost decantat într-un tub nou și bucățile de gel spălate de 2 ori cu 50...100 mM bicarbonat de amoniu și ACN, de fiecare dată adunând soluția de extracție cu supernatantul inițial. Amestecul de supernatant a fost liofilizat și resuspendat în 25 µl de 5% ACN/0,1% acid formic pentru analiza MS.	39 41 43
<i>Analiza LC/MS/MS</i>	
Biomarkerii identificați prin tehnologia SELDI-ToF-MS au fost analizați ulterior prin LC-MS/MS utilizând sistemul Surveyor LC și LCQ Deca XP Plus (ThermoScientific).	45
Peptidele au fost analizate cu LC/MS/MS utilizând sistemul Surveyor LC și LCQ Deca XP Plus (ThermoScientific) și prin cromatografia de fază inversă (Biobasic column, ThermoScientific; 180 µM x 15 mm) mai mult de 30 min în gradient ACN la o rată de curgere de 3 µl/min.	47 49

# RO 130589 B1

1 Peptidele au fost ionizate cu Electrospray Ionisation și MS/MS au fost achiziționate  
2 cu ioni dependenți de statusul lor de încărcare și de intensitate. Verificările de control al  
3 calității pentru funcționarea optimă a instrumentelor erau în vigoare. Acuratețea masei și  
4 sensibilitatea pentru MS a fost confirmată cu infuzie directă de glufibrioptide (2,5 pmoli/μL)  
5 și performanța LC/MS/MS a fost evaluată cu BSA digerat. Sensibilitatea, timpul de retenție,  
6 peptidele identificate și secvența de proteine acoperită au fost toate în intervalele specificate.  
7 Controlul de calitate cu BSA a fost efectuat înainte și după analiza probei.

Procesarea datelor în urma analizei LC/MS/MS

9 Fișierele de date (.raw) au fost convertite în fișiere generice Mascot folosind  
10 MassMatrix File Conversion Tool (Version 2.0; <http://www.massmatrix.net>) pentru input-ul  
11 în Mascot searching algorithm (Matrix Science). Fișierele de date au fost comparate cu  
12 SwissProt v. (2010\_06) cu taxonomie umană folosind următoarele criterii de căutare: peptide  
13 triptice cu cel mult un situs de clivaj tripsinic, metilarea carbamid cisteinei și oxidarea  
14 metioninelor, care au fost setate ca modificări variabile.

15 Rezultatele căutării în baza de date utilizând software-ul MASCOT au generat un  
16 număr de 63 de peptide, dintre care s-au selectat 4 peptide triptice obținute în funcție de  
17 condițiile stabilite - S100A8, S100A9, CXCL4 (PF4) și CXCL7 - tabelul 2.

18 **Exemplul 5. Validarea proteinelor identificate prin LC/MS/MS utilizând tehnica**  
19 **ELISA.**

20 Determinarea *in vitro* cantitativă a proteinei umane S100A9/calgranulin B în serul  
21 pacienților cu glioblastoam, folosește metoda enzimatică sandwich ELISA (kit Eiaab, Wuhan  
22 Eiaab Science, China).

23 *Principiul metodei*

24 Plăcile prevăzute în acest kit au fost pre-acoperite cu un anticorp specific față de  
25 proteina S100A9. Standardele sau probele s-au adăugat în godeurile corespunzătoare plăcii  
26 de microtitrare împreună cu un anticorp policlonal conjugat cu biotină. S-a adăugat streptavi-  
27 dină conjugată cu peroxidază HRP în fiecare godeu al microplăcii și a urmat incubarea o  
28 perioadă de timp. Apoi s-a adăugat o soluție de substrat TMB (soluție de amplificare a culorii)  
29 în fiecare godeu și culoarea dezvoltată este proporțională cu cantitatea de S100A9.

30 Reacția enzimă-substrat este terminată prin adăugarea de soluție de acid sulfuric și  
31 schimbarea culorii este măsurată spectrofotometric la o lungime de undă de  $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ .  
32 Concentrația de S100A9 în probe este apoi determinată cu ajutorul unei curbe  
33 standard în domeniul de concentrație 0-5000 pg/mL.

34 *Preparare reactivi*

35 Tampon de spălare - Dacă s-au format cristale în concentrat, se lasă la temperatura  
36 camerei și se amestecă ușor până când cristalele s-au dizolvat complet. Se diluează 30 mL  
37 de tampon de spălare concentrat în apa deionizată sau distilată pentru a pregăti 750 mL de  
38 tampon de spălare.

39 Standard - se reconstituie standardul cu 1,0 mL diluent rezultând soluția stoc de  
40 5000 pg/mL. Această operațiune se face cu minimum 15 min înainte de prepararea diluțiilor  
41 seriale. Standardul nediluat servește ca standard ridicat (5000 pg/mL). Diluantul servește ca  
42 standard de la zero (0 ng/mL).

43 *Mod de lucru*

44 S-au pregătit toți reactivii, standardele de lucru și probele indicate în secțiunile  
45 anterioare.

46 1. S-au adăugat 100 microlitri de standard, blanc sau probă. S-a incubat timp de 2 h  
47 la 37°C.



# RO 130589 B1

2. S-a îndepărtat lichidul din fiecare godeu și s-au adăugat 100 microlitri de reactiv de detecție A în fiecare godeu. S-a acoperit placa cu o folie și s-a incubat timp de 1 h la 37°C. 1  
3

3. Cu 5 min înainte de terminarea incubării s-a preparat tamponul de spălare. S-a îndepărtat energic lichidul din godeuri și s-a spălat fiecare godeu cu câte 400 microlitri de tampon de spălare preparat anterior. S-a repetat spălarea de trei ori. La ultima spălare s-a scurs bine placa pe o hârtie de filtru. 5  
7

4. S-au adăugat 100 microlitri de soluție de detecție B a reactivului de lucru în fiecare godeu. Plăcuța s-a acoperit cu o folie nouă și s-a incubat timp de 1 h la 37°C. 9

5. S-au repetat operațiunile de spălare de 5 ori.

6. S-au adăugat 90 microlitri de soluție de substrat în fiecare godeu. Plăcuța s-a acoperit cu o folie nouă și s-a incubat timp de 15-30 min la 37°C, la întuneric. 11

7. S-au adăugat 50 microlitri de reactiv de stopare/godeu. 13

În cazul în care culoare nu este uniformă, se face omogenizare pentru a asigura reacția completă. 15

8. S-a determinat densitatea optică, folosind un cititor de microplăci setat la 450 nm.

Analiza prin ELISA a proteinei S100A9 a serului provenit de la pacienții cu glioblastoame a relevat diferențe semnificative între lotul martor și cel al pacienților, astfel: nivelul seric de la pacienții cu glioblastom a variat între 190,72 pg/mL și 459,68 pg/mL, cu o medie de 277,72 pg/mL în comparație cu nivelul seric de la lotul control care a variat între 96,413 pg/mL și 158,67 pg/mL, cu o medie de 124,25 pg/mL. 17  
19  
21

Aplicarea testului One-Way Anova a arătat diferențe semnificative statistic ( $P < 0,01$ ).

*Tabelul 1* 23

Nr. Crt.	Masa (m/z)	Valoare p	ROC	Expresia diferențiată în glioblastom	
1	8143,15	< 0,001	0,747619	↓	25
2	2948,04	< 0,005	0,673333	↓	27
3	23466,27	< 0,05	0,648571	↑	
4	6440,01	< 0,05	0,648571	↓	29
5	9192,84	< 0,001	0,859048	↑	
6	3092,01	< 0,001	0,859048	↓	31
7	3892,55	< 0,001	0,908571	↓	
8	10836,09	< 0,001	0,811619	↑	33
9	13153,66	0,001	0,911429	↑	
10	15868,12	< 0,001	0,829524	↑	35

# RO 130589 B1

Tabelul 2

Proteină (Acronim)	Proteine-Descriere	Scor	Masă Proteină	m/z peptidă exprimată	Secvență peptide
S100A8_HUMAN	Protein S100-A8 OS = Homo sapiens GN = S100A8 PE = 1 SV = 1	164	10828	637,6	ALNSIIDVYHK
		164	10828	711,64	LLETECPQYIR
		164	10828	1196,38	ELDINTDGAVNFQEF LILVIK
S100A9_HUMAN	Protein S100-A9 OS = Homo sapiens GN = S100A9 PE = 1 SV = 1	287	13234	486,45	LTWASHEK
		287	13234	728,82	LGHPDTLNQGEFK
		287	13234	808,63	QLSFEEFIMLMAR
		287	13234	872,03	VIEHIMEDLDTNADK
		287	13234	904,41	NIETIINTFHQYSVK
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4 OS = Homo sapiens GN = PF4 PE = 1 SV = 2	170	10838	667,44	ICLDLQAPLYK
		170	10838	731,77	KICLDLQAPLYK
		170	10838	789,7	AGPHCPTAQLIATLK
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein OS = Homo sapiens GN = PPBP PE = 1 SV = 3	105	13885	863,03	GKEESLSDLYAELR
		254	13885	529,22	ICLDPDAPR
		254	13885	551,13	NIQSLEVIGK
		254	13885	592,95	KICLDPDAPR
		254	13885	785,48	GTHCNQVEVIATLK
		254	13885	863,27	GKEESLSDLYAELR

## Bibliografie

[1] Sathornsumetee S.; Reardon D.A.; Desjardins A.; Quinn J.A.; Vredenburgh J.J. and Rich J.N., *Molecularly targeted therapy for malignant glioma*. Cancer, 2007, 7/0(1), 13-24.

[2] Wei P.; Zhang W.; Yang L.S.; Zhang H.S.; Xu X.E.; Jiang Y.H.; Huang F.P. and Shi Q., *Serum GFAP autoantibody as an ELISA-detectable glioma marker*. Tumour Biol, 2013, 34(4), 2283-2292.

[3] Cervi D.; Yip T.T.; Bhattacharya N.; Podust V.N.; Peterson J.; Abou-Slaybi A.; Naumov G.N.; Bender E.; Almog N.; Italiano J.E., Jr.; Folkman J. and Klement G.L., *Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth*. Blood, 2008, 777(3), 1201-1207.

[4] Chen S.; Zhao H.; Deng J.; Liao P.; Xu Z. and Cheng Y., *Comparative proteomics of glioma stem cells and differentiated tumor cells identifies S100A9 as a potential therapeutic target*. J. Cell. Biochem., 2013,114(12), 2795-2808.

# RO 130589 B1

- [5] Xiao Z.; Prieto D.; Conrads T.P.; Veenstra T.D. and Issaq H.J. *Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. Mol Cell Endocrinol*, 2005, 230 (1-2), 95-106. 1
- [6] Kocevar, N.; Hudler, P. and Komel, R. *The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. N Biotechnol*, 2013, 30(3), 319-326. 3
- [7] Liu J.; Zheng S.; Yu J.K.; Zhang J.M. and Chen Z., Serum protein fingerprinting coupled with artificial neural network distinguishes glioma from healthy population or brain benign tumor. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 2005, (1), 4-10. 5  
7
- [8] Zhang H.; Wu G.; Tu H. and Huang F., *Discovery of serum biomarkers in astrocytoma by SELDI-TOF MS and proteinchip technology. J. Neurooncol*, 2007, 84(3), 315-323. 9
- [9] Petrik V.; Saadoun S.; Loosemore A.; Hobbs J.; Opstad K.S.; Sheldon J.; Tarelli E.; Howe F.A.; Bell B.A. and Papadopoulos M.C., *Serum alpha 2-HS glycoprotein predicts survival in patients with glioblastoma. Clin Chem*, 2008, 54(4), 713-722. 11  
13
- [10] Gautam P.; Nair S.C.; Gupta M.K.; Sharma R.; Polisetty R.V.; Uppin M.S.; Sundaram C.; Puligopu A.K.; Ankathi P.; Purohit A.K.; Chandak G.R.; Harsha H.C. and Sirdcshmkh R., *Proteins with altered levels in plasma from glioblastoma patients as revealed by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. PLoS One*, 2012, 7(9), e46153. 15  
17
- [11] Kumaravel Somasundaram, P.K., Vani Santosh, Sridevi Hegde, Alangar Sathyanjandas Hegde, Manchanahalli Rangaswamy Satyanarayana Rao., *Method for the Diagnosis of Higher - and Lower-Grade Astrocytoma Using Biomarkers and Diagnostic Kit Thereof. US 20110027797*, 2011. 19  
21
- [12] Traci Pawlowski, K.Y., Ray AKHAVAN. *Circulating biomarkers for cancer. WO 2012170711*, 2012. 23
- [13] Meyer Helmut E, G.M., Stuehler Kai, Reifenberger Guido, Wolter Marietta, *Riemenschneider Markus. Biomarker for the diagnosis of a brain tumor. EP 2260303*, 2014. 25
- [14] Augusto Lois, Bruce Neri, *Methods for diagnosing irritable bowel syndrome, US 2010/0094560 A1*, 2010. 27

# RO 130589 B1

## Revendicări

1

3

1. Metodă de stabilire a unui set de biomarkeri ce se constituie într-o semnătură proteică utilizabilă pentru diagnosticul sau prognosticul pacienților cu glioblastom, care cuprinde determinarea simultană a patru proteine biomarkeri S100A8, CXCL4, S100A9 și CXCL7 în probe de ser de la pacienți cu glioblastom, comparativ cu o probă de ser control, nivelul acestor biomarkeri fiind supraexprimat în probele de ser de la pacienții cu glioblastom, comparativ cu proba de ser de control.

5

7

9

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, constă în identificarea grupului de proteine biomarkeri S100A8, CXCL4, S100A9 și CXCL7 și validarea acestora, în probele de ser de la pacienții cu glioblastom, comparativ cu proba de ser de control, unde etapa de identificare cuprinde:

11

13

- stabilirea profilului proteic prin SELDI-ToF MS, atât pentru probe de ser de la pacienți cu glioblastom, cât și pentru probe de ser de la pacienți sănătoși, selecția 11 clustere de proteine relevante exprimate diferențiat în probele de ser de la pacienții cu glioblastom, comparativ cu controlul, având mase moleculare 8143,147; 2948,037; 23466,27; 6440,011; 3094,012; 9192,839; 3892,553; 10836,09; 13153,61; 15868,12; 28114,621 Da, pentru care picul corepunzător a fost prezent în cât mai multe probe,  $p < 0,05$ , fracționarea probelor de ser ce conțin clusterelor relevante, în vederea confirmării potențialilor biomarkeri în fracțiunile corespunzătoare, pe baza proprietăților biofizice ale proteinelor, permițând fracționarea high-throughput prin utilizarea schimbătorului anionic;

15

17

19

21

23

- concentrarea probelor fracționate în vederea realizării unei analize electroforetice 1D, selectarea unor benzi corepunzătoare clusterelor de proteine identificate prin SELDI-ToF MS, decuparea acestor benzi, digestia lor cu tripsină, în vederea analizei LC-MS/MS, în urma analizei prin LC-MS/MS, aplicându-se algoritmul Mascot, pe baza comparației a 63 de peptide detectate cu baza de date SwissProt fiind desemnate patru proteine ce corespund condițiilor de identificare: S100 A8, S100 A9, PF4 și CXCL7;

25

27

29

iar validarea acestor proteine identificate prin LC/MS/MS se efectuează utilizând tehnica ELISA.

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01);

G01N 33/68 (2006.01)

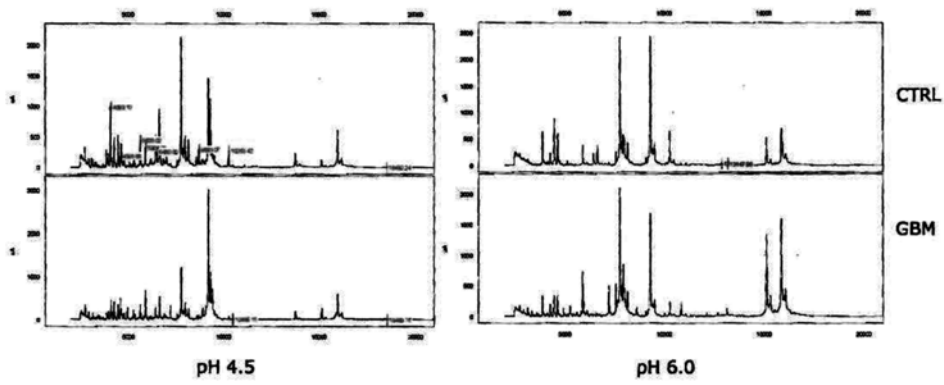


Fig. 1

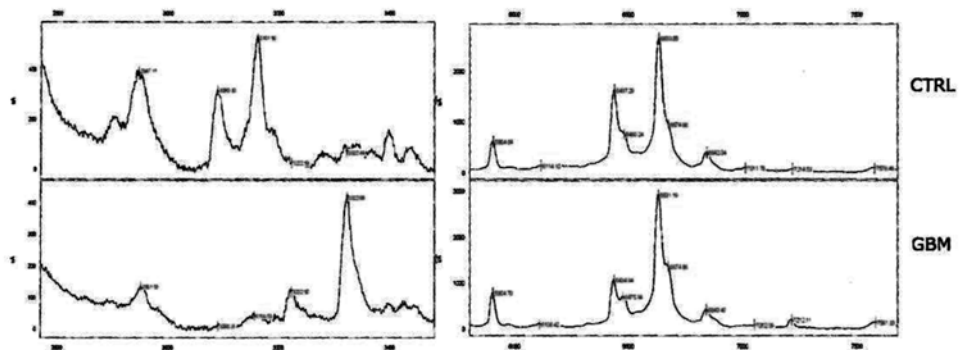


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01);

G01N 33/68 (2006.01)

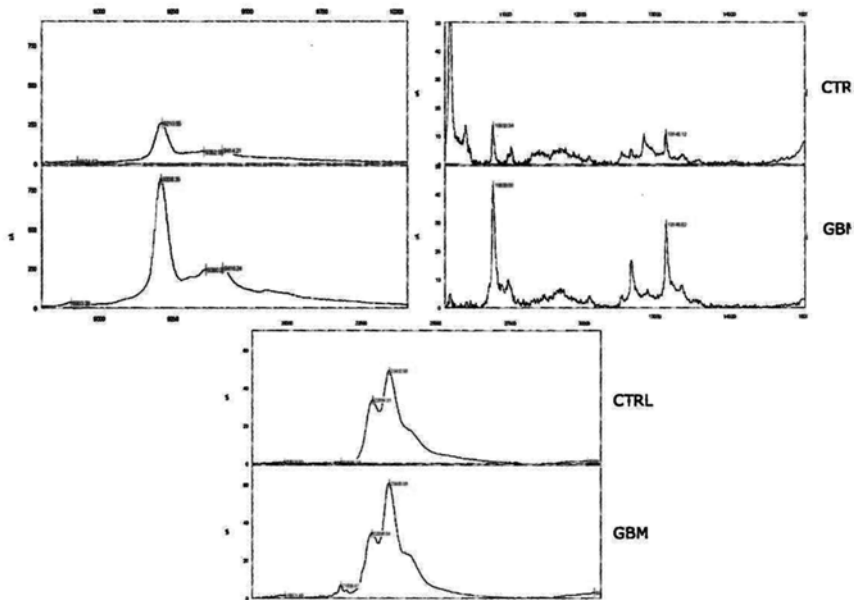


Fig. 3

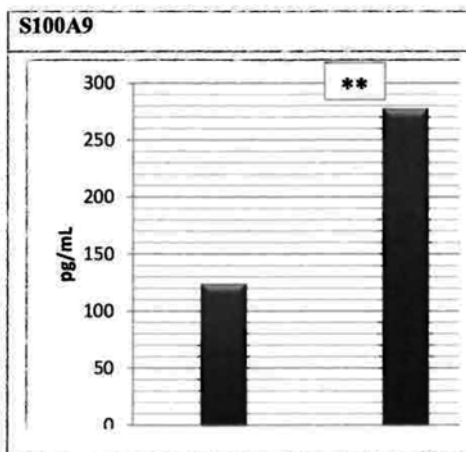


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 227/2022