



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00409**

(22) Data de depozit: **28/05/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2018** BOPI nr. **8/2018**

(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:
• **TĂNASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, 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;**
• **CODRICI ELENA,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4,
BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MIHAI SIMONA, BD. CAMIL RESSU
NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34,
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;**
• **POPESCU IONELA DANIELA,
STR. SFÂNTUL ELEFTERIE NR. 25,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CONSTANTINESCU ȘTEFAN,
STR. PARIS NR. 7, ET. 1, AP. 2, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**WO 2012/115885; A. CARLSSON Ș.A.,
"PLASMA PROTEOME PROFILING
REVEALS BIOMARKER PATTERN
ASSOCIATED WITH PROGNOSIS AND
THERAPY SELECTION IN
GLIOBLASTOMA MULTIFORME
PATIENTS", PROTEOMISC CLIN. APPL.,
VOL. 4, PP. 591-602, 2010; XAVIER ROBIN,
"PANELS OF BIOMARKERS TO IMPROVE
PATIENT CLASSIFICATION IN BRAIN
DISEASE", TEZĂ DE DOCTORAT,
[https://xavier.robin.name/files/papers/thesi
s.pdf](https://xavier.robin.name/files/papers/thesi_s.pdf), GENEVA, 2012**

(54) **METODĂ DE STABILIRE A UNUI SET DE BIOMARKERI
SOLUBILI PENTRU DIAGNOSTICUL, PROGNOSTICUL
SAU MONITORIZAREA GLIOBLASTOMULUI, ȘI METODĂ
PENTRU DIAGNOSTICUL, PROGNOSTICUL
SAU MONITORIZAREA GLIOBLASTOMULUI BAZATĂ
PE UTILIZAREA ACESTUI SET**



RO 130590 B1

1 Invenția se referă la o metodă de stabilire a unui set de biomarkeri solubili pentru
diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea glioblastomului, precum și la o metodă pentru
3 diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea glioblastomului bazată pe utilizarea acestui set.
Setul de biomarkeri solubili utilizabil la diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea glioblas-
5 tomului este reprezentat de un complex de citokine și factori angiogenici. Glioblastoamele
reprezintă cele mai agresive tumori intracraniene, fiind foarte rezistente la tratament, pacienții
7 având o rată medie de supraviețuire de 15 luni (1).

 Mecanismele moleculare care stau la baza acestor caracteristici clinice pot fi expli-
9 cate prin existența unor profile specifice genetice și moleculare ale celulelor tumorale. Studii
recente indică instabilitate genetică (în special în cazul pacienților cu indice al ratei de supra-
11 viețuire scăzut), modificări cromozomiale, mutații somatice și polimorfisme (2). Cunoscând
comportamentul acestor celule tumorale, se pune întrebarea dacă în afara caracteristicilor
13 intrinseci, componenta inflamatorie, prezentă ca urmare a dezvoltării tumorale, poate
influența și ea dezvoltarea clinică a glioblastoamelor.

 Legătura dintre inflamație și cancer a fost sugerată pentru prima oară de Virchow în
15 1863, care arăta că în țesuturile neoplazice există "infiltrate" limforeticulare și focare de infla-
mație cronică. Studiile experimentale ale ultimilor ani vin în sprijinul conceptului descris de
17 Virchow (3). Într-o formulare sintetică, Collota et al. (4) definește inflamația drept "al șaptelea
semn distinctiv al cancerului". Răspunsul organismului la cancer prezintă multe analogii cu
19 procesul de inflamație și reparație tisulară: celulele inflamatorii și citokinele prezente la
nivelul tumorilor contribuie la creșterea, progresia și imunosupresia masei tumorale și mai
21 puțin la constituirea unui sistem de apărare antitumoral.

 Astfel, susceptibilitatea și severitatea cancerului sunt adeseori asociate cu polimorfis-
23 mele funcționale la nivelul genelor care controlează activitatea citokinelor. Balkwill și
Mantovani descriu plastic anomaliile genetice drept "chibritul care aprinde focul" în cancer,
25 în timp ce inflamația poate reprezenta "combustibilul care alimentează focul" (3).

 Inițierea și progresia tumorală constituie un proces complex care implică mutații la
27 nivel genomic, factori tisulari, factori de micromediu și mediatori ai inflamației. În cadrul
micromediului tumoral markerii inflamatori sunt responsabili pentru proliferarea celulelor,
29 invazia tumorală, angiogeneză marcată și suprimarea anumitor funcții ale sistemului imunitar
(5). Numeroase studii au arătat că majoritatea țesuturilor tumorale sunt asociate cu procese
31 inflamatorii. Cu toate acestea, o legătură clară între inflamație și cancer nu a fost încă
demonstrată.
33

 În conformitate cu nivelul actual al cunoașterii, molecule individuale de tipul citokine-
35 lor, factorilor angiogenici și factorilor de creștere au fost identificate, fiind implicate în tumo-
rigeneză, progresia tumorală, fenomene traduse în particularități clinice ale patologiei tumo-
37 rale. Factorul endotelial de creștere vasculară (VEGF) și semnalizarea mediată de acesta
sunt semnalate ca relevante pentru neovascularizare în glioblastom (6) și în alte cancere (7,
39 8) și, de asemenea, acesta este identificat ca țintă terapeutică pentru terapii anti-tumorale
utilizând molecule anti-VEGF (9). De remarcat însă faptul că nu există mențiuni privind utili-
41 zarea setului de molecule în calitate de „biomarker multiplu”, în vederea diagnosticării, stra-
tificării sau monitorizării pacienților. Glioblastomul reprezintă cea mai frecventă și letală formă
43 de tumoră cerebrală. Prognosticul este rezervat în special pentru glioamele de grad avansat,
cel mai frecvent neoplasm primar al sistemului nervos central, având o incidență între 8 și
45 27%, și reprezentând 40% din tumorile cerebrale (10). O gamă variată de citokine prezintă
expresii diferite în cancer, inclusiv în glioblastoame. Modificările apar la interacțiunea dintre
47 celulele tumorale și non-tumorale, ca, de exemplu, macrofagele, limfocitele sau celulele

RO 130590 B1

stromale, și oferă suport pentru creștere, angiogeneză, invazie și metastazare tumorală (11...13).	1
În tumorile cerebrale, microvascularizația locală prezintă o expresie modificată a proteinelor membranare, având ca rezultat extravazarea sanguină. Un rol important în aceste procese îl au mediatorii inflamației, cum ar fi citokinele, factorii de angiogeneză și de creștere (14).	3
Stabilirea unui diagnostic cât mai timpuriu și o clasificare cât mai precisă a pacienților reprezintă o condiție vitală pentru succesul terapiei; de asemenea, posibilitatea de a monitoriza post-terapeutic pacienții, inclusiv pentru a detecta recidivele prin metode sensibile și puțin invazive, poate conduce la o ameliorare semnificativă a calității actului terapeutic și a calității vieții. Până în prezent, arsenalul metodologic rămâne relativ sărac în astfel de mijloace de detecție. Literatura de brevete evidențiază utilizarea unor seturi de biomarkeri tisulari; de exemplu, Brevetul US 20100144540 (15) definește un set de biomarkeri tisulari constând din PTEN, EGFRvIII, EGFR, IGF-1R pentru a stabili prognosticul rezultatului terapiei. Abordări similare sunt descrise în brevetele US 20120270333 (16) și US 20070208074 (17). O analiză exhaustivă a domeniului este publicată în jurnalul de specialitate "Recent Patents on Biomarkers" (18).	5
În cererea de brevet internațională WO 2012/115885 sunt descrise seturi de biomarkeri, caracterizați din punct de vedere calitativ/semi-cantitativ (molecule supra-exprimate sau sub-exprimate) în diferite patologii (19).	7
Dezavantajele soluției este absența evaluării cantitative a celor 4 molecule propuse în prezentul brevet, absența asocierii acestora într-un set individual, precum și absența utilizării lor în diagnosticul, prognosticul și monitorizarea în mod specific a glioblastomului. De asemenea, majoritatea seturilor propuse în acest brevet, referitor la patologii tumorale, sunt reprezentate de biomarkeri de tip ADN, ARNm și microARN.	9
Articolul publicat în 2010 de Carlsson et al./Protcomics Clin. Appl. 2010, 4, 591-602, propune semnături proteice plasmatică la pacienți cu glioblastom, tratați prin imunoterapie, cu rol în clasificarea și stratificarea riscului preoperator (20). Aceste semnături se bazează pe altă configurație de molecule, deci nu includ setul propus în prezenta invenție, iar metoda de detecție utilizată este semi-cantitativă.	11
Teza de doctorat din 2012 a lui Xavier Robin (publicată pe pagina https://xavier.robin.name/files/paper/thesis.pdf) trece în revistă metodele de evaluare statistică a biomarkerilor, dar clasificările nu au aplicație concretă în domeniul identificării de biomarkeri în cancer (21). Soluția propusă nu se referă la glioblastom sau la alte boli tumorale.	13
Până în prezent, în literatura de specialitate, atât la nivel național, cât și internațional, nu sunt menționate brevete sau cereri de brevet care să facă referire la utilizarea unui set/comparație de citokine solubile utilizabil în evaluarea agresivității tumorilor cerebrale.	15
Problema tehnică rezolvată de prezenta invenție o reprezintă diagnosticarea timpurie a tumorilor cerebrale, cu precădere a glioblastomului, clasificarea precisă a pacienților și monitorizarea lor post-terapeutică, prin realizarea și utilizarea unui set unitar și inventiv de biomarkeri circulanți de natura proteică.	17
Un prim obiect al invenției îl reprezintă o metodă de stabilire a unui set de biomarkeri ce se constituie într-o semnătură moleculară utilizabilă pentru diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea pacienților cu glioblastom care cuprinde determinarea simultană și dozarea citokinelor IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF, INF γ , IL-4, IL-10 și IL-12, și a factorilor angiogenici VEGF și FGF-2 în probe de ser prelevate de la pacienți cu glioblastom și, respectiv, în probe de ser prelevate de la subiecți sănătoși, și obținerea unui profil de expresie caracterizat prin:	19
- supraexpresia citokinelor IL-6, IL-1 β și TNF α , în medie de peste 3 ori la pacienții cu glioblastom față de lotul martor;	21

RO 130590 B1

1 - supraexpresia VEGF, FGF-2, IL-8, IL-2 și GM-CSF, de peste 2 ori la pacienții cu glioblastom față de martori;

3 - subexpresia IL-4 și IL-12, la nivel mediu față de lotul martor, 57%, respectiv 84%, din cazurile cu glioblastom;

5 pe baza acestui profil de expresie sunt selectați ca relevanți biomarkerii IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF, ce se constituie în semnătura moleculară utilizabilă pentru diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea pacienților cu glioblastom.

7 Un alt obiect al invenției îl reprezintă o metodă pentru diagnosticul, prognosticul sau
9 monitorizarea glioblastomului la un pacient cu tumoră cerebrală prin determinarea cantitativă
simultană a valorilor concentrațiilor serice ale unui set de citokine și factori angiogenici,
11 alcătuit din IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF, într-o probă de ser prelevată de la un pacient, și com-
pararea acestor valori cu cele ale concentrațiilor proteinelor serice menționate în serul
13 normal din lotul martor, valorile concentrațiilor serice la pacienții cu glioblastom fiind cuprinse
între 8...40, 10...165, 5...25 și, respectiv, 110...900 pg/mL, valori care sunt de 1,5...10 ori mai
15 mari față de valorile medii în serurile normale.

Avantajele prezentei invenții constau din:

17 - superioritatea diagnosticului bazat pe complexul de biomarkeri comparativ cu
oricare biomarker individual;

19 - posibilitatea detecției și cuantificării simultane a unui set de biomarkeri;

- utilizarea de material biologic ce se recoltează prin procedee minim invazive;

21 - repetabilitatea în timp a prelevărilor de probe biologice și a analizelor, permițând
monitorizarea evoluției post-terapeutice a pacienților.

23 Colectivul de inventatori a menționat în mai multe publicații internaționale și naționale
necesitatea obținerii unui panel de biomarkeri, cu predilecție serici, care să confere o putere
25 de decizie ridicată față de biomarkerii individuali în diagnosticul precoce, adecvarea terapiei
și monitorizarea evoluției cancerului (22, 23).

27 Soluția conform invenției constă în definirea și utilizarea unui set unitar de biomarkeri
circulanți de natură proteică, în diagnosticul, prognosticul și monitorizarea tumorilor
29 cerebrale, cu precădere a glioblastomului. Setul de biomarkeri descris în prezenta invenție
este exprimat atât în valori cantitative, cât și în valori relative (grade de supra-exprimare).

31 Soluția tehnică presupune realizarea unui set de biomarkeri, prin măsurarea
simultană a concentrației unor citokine și factori angiogenici ce se constituie într-o semnătură
33 moleculară utilizabilă pentru diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea pacienților cu
tumori cerebrale.

35 Setul de biomarkeri, conform prezentei invenții, este constituit dintr-un complex de
citokine și factori angiogenici (IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF). Variațiile de concentrație ale
37 acestora, comparativ cu nivelul mediu de concentrație în serurile normale (valorile de refe-
rință), permit construirea unui instrument pentru stabilirea diagnosticului unor tumori cere-
39 brale, estimarea severității modificării patologice, stratificarea pacienților în vederea consti-
tuirii unei terapii țintite, estimarea răspunsului la terapie, precum și predicția sau detecția
41 recidivei.

Concentrațiile acestor biomarkeri se pot determina prin diferite metode cunoscute în
43 domeniu, atât prin măsurători individuale (de exemplu, ELISA), sau prin metode de dozare
simultană (multiplex), ca, de exemplu, Luminex-xMAP sau Protein Array.

45 Fiecare dintre componente poate fi utilizată individual pentru clasificare, dar utilizarea
lor simultană, în conformitate cu prezenta invenție, îmbunătățește semnificativ precizia diag-
47 nosticului.

RO 130590 B1

Soluția tehnică rezolvată de invenție constă în realizarea unui complex de molecule solubile - citokine și factori angiogenici - a căror variație de concentrație constituie un indicator pentru modificările patologice induse de tumorile cerebrale. 1

Aceasta permite, de asemenea, realizarea unui algoritm de clasificare bazat pe combinația de tipare de semnături moleculare (complexul de citokine/factori angiogenici); acest algoritm de clasificare este aplicabil pentru diagnostic, prognostic sau monitorizare în cazul tumorilor cerebrale. Setul de biomarkeri este detectabil în probe prelevabile în mod repetat, prin metode minim invazive, astfel încât poate fi aplicat și pentru monitorizarea post-terapeutică a pacienților, predicția recidivelor și detecția timpurie a acestora. 3 5 7 9

Se dau, în continuare, exemple de realizare a prezentei invenții, în legătură și cu fig. 1...3, care prezintă: 11

- fig. 1, modificarea expresiei citokinelor serice IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF la pacienții cu glioblastom; 13

- fig. 2, nivelurile concentrațiilor serice ale citokinelor pro-inflamatorii IL 1- β , IL-6, TNF α la pacienți cu glioblastom versus control; 15

- fig. 3, valorile concentrațiilor serice ale VEGF la pacienții cu glioblastom și control. 17

Astfel, datele din fig. 1 reprezintă valorile medii + deviația standard ale gradului de modificare a concentrației comparativ cu media concentrațiilor serice la normali, cele din fig. 2 reprezintă valorile medii în urma analizei în triplicat + deviația standard $p < 0,05$ (ANOVA), iar datele din fig. 3 sunt determinate prin metodele Luminex-xMAP (sus) și ELISA (jos) $p < 0,05$ (ANOVA). 19 21

Exemplul 1

Potrivit unui prim exemplu de realizare, s-a realizat analiza de date pe probe de ser de la pacienți cu glioblastom și, respectiv, subiecți sănătoși, care să permită o selecție inventivă a setului de biomarkeri care fac obiectul invenției. Astfel, au fost colectate probe de ser de la 55 de pacienți cu glioblastom - 28 bărbați și 27 femei, cu vârste medii de 58 și, respectiv, 62 de ani, și un interval de 37...79 ani. Au fost colectate probe pentru lotul martor de la 20 de subiecți sănătoși - 12 bărbați și 8 femei, cu vârsta medie de 57 de ani și intervalul de 25...70 ani. 23 25 27 29

Probele de ser au fost alicotate și păstrate la -80°C până la analiză. Din probele prelevate au fost analizate sub-probe (alicote) prin metoda xMAP - Luminex. În vederea analizei, se utilizează kitul de reactivi Human Cytokine 12-plex Kit (R&D Systems), pentru determinarea simultană a citokinelor IL-1 β - IL-2, IL-6, IL-8, TNF α GM-CSF, INF γ , IL-4, IL-10 și IL-12 și a factorilor angiogenici VEGF și FGF-2. S-a efectuat dozarea proteinelor serice din toate probele care s-au luat în lucru. 31 33 35

S-a pregătit o placă pentru prepararea probei și măsurare:

- s-au umectat godeurile necesare pentru probe, controale și calibratori; 37

- s-au distribuit, în triplicat, câte 20...100 μ L din probele de ser în godeurile pregătite și s-au diluat la 150 μ L cu Tampon de reacție; 39

- s-au distribuit în godeurile programate calibratori și control;

- s-a reconstituit amestecul de microsferă de captură, amestecând, de exemplu, câte 20...80 μ L din fiecare tip de microsferă, aducându-se la volumul final cu Tampon de reacție (1...4 mL); 41 43

- s-au aplicat câte 25...50 μ L din amestecul de microsferă de captură pentru moleculele țintă și s-a incubat plăcuța 0,5...4 h la temperatura camerei, cu agitare; 45

- s-a îndepărtat prin filtrare fluidul din godeuri, utilizând un dispozitiv special;

- s-a spălat cu Tampon de reacție și s-a îndepărtat prin filtrare fluidul din godeuri, utilizând un dispozitiv special; 47

RO 130590 B1

- 1 - s-a administrat în toate godeurile selectate amestecul de Anticorpi de detecție și
conjugat SAPE (Streptavidină-Ficoeritrină);
- 3 - s-a incubat la temperatura camerei, ferit de lumină, cu agitare moderată, timp de
15...180 min;
- 5 - s-a îndepărtat excesul de lichid prin filtrare, utilizând dispozitivul special;
- s-au suspendat microsferile din godeuri în Tampon de reacție;
- 7 - s-au măsurat concentrațiile de citokine folosind aparatul Luminex 200 și programul
StarStation;
- 9 - s-a procedat la normalizarea concentrațiilor de citokine și factori de creștere,
utilizând ca factor de normalizare concentrația de proteine;
- 11 - s-a procedat la analiza corelației dintre concentrația normalizată a citokinelor în
grupurile „Glioblastom” și „Martor”, utilizând ca instrumente statistice analiza One Way Anova
și Pearson, folosind un pachet de calcul statistic adecvat (de exemplu SPSS, Gnumeric). Ca
13 valoare prag de semnificație se consideră $p < 0,05$;
- 15 - în urma analizei, s-a identificat o semnătură moleculară caracterizată prin urmă-
toarele:
- 17 - supraexpresie a citokinelor IL-6, IL-1 β și TNF α , în medie de peste 3 ori la
pacienții cu glioblastom față de lotul martor;
- 19 - supraexpresia VEGF, FGF-2, IL-8, IL-2 și GM-CSF, de peste 2 ori la pacienții
cu glioblastom față de martori;
- 21 - subexpresia IL-4 și IL-12, la nivel mediu față de lotul martor, în 57%,
respectiv 84%, din cazurile cu glioblastom.
- 23 Profilul de expresie este redat în fig. 1...3.
Pe baza analizei profilului de expresie se rețin, în vederea construirii setului complex
25 de biomarkeri, ca fiind cele mai relevante, IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF.
Concentrațiile celor 4 biomarkeri în serul normal sunt în intervalele 0...8, 0...25, 0...8,
27 respectiv 50...125 pg/mL.
Prin măsurarea simultană a complexului de biomarkeri IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF în
29 serul pacienților cu tumori cerebrale, s-au obținut nivele de concentrație cuprinse între 8...40,
10...165, 5...25 și, respectiv, 110...900 pg/mL, și mediane ale concentrației de 24,5; 60; 13
31 și, respectiv, 350 pg/mL.
Concentrațiile celor 4 biomarkeri, în cazurile de glioblastom sunt de 1,5...10 ori mai
33 mari față de media valorilor normale.
S-au calculat valorile indicilor de expresie (definiți ca raportul dintre concentrația
35 măsurată în probe și media concentrațiilor aceluiași analit în grupul control).
S-a testat capacitatea de clasificare individuală a fiecăruia dintre cei 4 biomarkeri,
37 pentru un interval de valori prag ale indicelui de expresie cuprins între 1,5 și 5 pe un set de
probe randomizate și anonimizate.
- 39 S-a atribuit identitatea POZITIV (Glioblastom) sau NEGATIV (Normal). Identitatea
POZITIV se atribuie dacă este respectată condiția ca valoarea determinată să fie mai mare
41 sau egală cu valoarea prag. Operațiunea se realizează pentru toți biomarkerii și valorile prag,
prin utilizarea unui program de calcul (SPSS).
- 43 S-a analizat capacitatea de clasificare, stabilindu-se, pentru fiecare analit și valoare
prag, numărul de predicții adevărat pozitive (AP), adevărat negative (AN), fals pozitive (FP)
45 și fals negative (FN).
Pentru fiecare dintre analiții individuali, se calculează valoarea ariei de sub Curba
47 Caracteristicii de Operare a Receptorului (ROC-AUC).
S-a stabilit valoarea prag a indicelui de supraexpresie, astfel încât să se asigure cel
49 mai ridicat raport între clasificările adevărate și false.

RO 130590 B1

S-a construit, într-un program de calcul statistic (de exemplu, SPSS, Biomarker Pattern Software) algoritmul de clasificare bazat pe combinația celor 4 biomarkeri, utilizând valoarea prag a indicelui de supraexpresie. 1
3

Exemplul 2

Exemplul al doilea de realizare are în vedere pașii necesari pentru validarea metodei de diagnostic, prognostic și monitorizare a tumorilor cerebrale, în particular a glioblastomului, prin utilizarea setului de biomarkeri determinat anterior. S-a procedat astfel, după cum urmează: 5
7

- un set de 25 alicote au fost codificate astfel încât realizarea procedeelelor să se deruleze fără a se cunoaște identitatea (test orb); 9

- probele anonimizate au fost supuse analizei prin metoda de analiză xMAP-Luminex; 11

- pentru analiză, se realizează un amestec de detecție care conține microsferă de detecție pentru IL-1 β , TNF α , IL-6 și VEGF, componente ale kitului Human Cytokine 12-plex Kit (R&D Systems); 13

- s-a efectuat dozarea proteinelor serice în toate probele care s-au luat în lucru; 15

- s-a pregătit placa pentru prepararea probei și măsurare;

- s-a distribuit în triplicat câte 20...100 μ L din probele de ser în godeurile pregătite și s-a diluat la 150 μ L cu Tampon de reacție; 17

- s-au distribuit în godeurile programate calibratori și control; 19

- s-a reconstituit amestecul de microsferă de captură, amestecând, de exemplu, câte 20...80 μ L din fiecare tip de microsferă de captura care s-au adus la volumul final cu componenta Tampon de reacție (1...4 ml); 21

- s-au aplicat câte 25...50 μ L din amestecul de microsferă care conțin anticorpii de captură pentru moleculele țintă și s-a incubat 0,5...4 h la temperatura camerei, cu agitare; 23

- s-a îndepărtat prin filtrare fluidul din godeuri, utilizând dispozitivul special; 25

- s-a spălat cu Tampon de reacție și s-a îndepărtat prin filtrare fluidul din godeuri;

- s-a administrat în toate godeurile selectate amestecul de Anticorpi de detecție și conjugat SAPE (Streptavidina-Ficoeritina); 27

- s-a incubat la temperatura camerei, ferit de lumină, cu agitare moderată, timp de 15...180 min; 29

- s-a îndepărtat excesul de lichid prin filtrare, utilizând dispozitivul special; 31

- s-au suspendat microsferăle din godeuri în Tampon de reacție;

- s-a măsurat concentrațiile de citokine folosind aparatul Luminex 200 și programul StarStation; 33

- s-a procedat la normalizarea concentrațiilor de citokine și factori de creștere, utilizând ca factor de normalizare concentrația de proteine; 35

- s-a aplicat algoritmul bazat pe semnătura moleculară stabilită în exemplul 2 pentru clasificarea probelor analizate în categoriile POZITIV, respectiv NEGATIV; 37

- după clasificarea pe baza complexului de biomarkeri (semnăturii moleculare), se restabilește identitatea probelor și se compară datele stabilite cu datele reale, și se compară predicțiile. 39
41

Performanțele obținute sunt redată în tabelele 1, 2 și 3. 43

Tabelul 1

Biomarker	IL-1 β	IL-6	TNF α	VEGF
ROC-AUC	0,916	0,918	0,896	0,829

 45

RO 130590 B1

În tabelul 1 se prezintă valorile indicatorilor de performanță Aria de sub Curba Caracteristicii de Operare a Receptorului (Area Under the Curve Receiver Operation Characteristic, ROC-AUC). Capacitatea de clasificare (diagnostic) a unui biomarker este cu atât mai bună cu cât valoarea ROC-AUC este mai ridicată.

Tabelul 2

Biomarker	IL-1 β	IL-6	TNF α	VEGF
Total cazuri	25	25	25	25
Pozitive	17	17	17	17
Negative	8	8	8	8
Rezultat clasificare				
Pozitive	14	17	17	12
Negative	11	8	8	15
Adevărat pozitive	13	16	16	12
Adevărat negative	7	7	7	7
Fals pozitive	1	1	1	0
Fals negative	4	1	1	8

Tabelul 2 prezintă performanțele demonstrate de cei 4 biomarkeri, utilizați individual pentru stabilirea diagnosticului, pentru un set de 25 de probe aleatorii, prin estimarea corectitudinii predicțiilor, analizându-se pentru fiecare din variante scorurile de predicție corectă și eronată pentru ambele categorii (pozitiv și negativ).

Tabelul 3

Total cazuri	25
Pozitive	17
Negative	8
Rezultat clasificare	
Pozitive	16
Negative	9
Adevărat pozitive	16
Adevărat negative	8
Fals pozitive	0
Fals negative	1

Tabelul 3 prezintă performanțele demonstrate de complexul de 4 biomarkeri, utilizați simultan pentru stabilirea diagnosticului, pentru un set de 25 de probe aleatorii, prin estimarea corectitudinii predicțiilor, analizându-se scorurile de predicție corectă și eronată pentru ambele categorii (pozitiv și negativ).

Bibliografia

1. Westermarck B., *Glioblastoma - a moving target*, Upsala Journal of Medical Sciences, 2012;117(2):251-6. Epub 2012/04/20.

2. Bleeker F.E., Molenaar R.J., Leenstra S., *Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma*, Journal of neuro-oncology, 2012, 108 (1):11-27, Epub 2012/01/25.

RO 130590 B1

3. Balkwill F., Mantovani A., *Inflammation and cancer: back to Virchow?*, Lancet. 2001;357(9255):539-45. Epub 2001/03/07. 1
4. Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*, Carcinogenesis. 2009; 30(7):1073-81. Epub 2009/05/27. 3
5
5. Paola Larghi C.P., Elena Riboldi, Paola Allavena, Alberto Mantovani and Antonio Sica, *Tumor-Infiltrating Inflammatory Cells as Possible Therapeutic Targets*, The Inflammatory Milieu of Tumors: Cytokines and Chemokines that Affect Tumor Growth and Metastasis, 2012. pp. 14-28. 7
9
6. Hamerlik P., Lathia J.D., Rasmussen R., Wu Q., Bartkova J., Lee M., et al., *Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth*, The Journal of experimental medicine, 2012; 209(3):507-20, Epub 2012/03/07. 11
7. Wehland M., Bauer J., Magnusson N.E., Infanger M., Grimm D., *Biomarkers for anti-angiogenic therapy in cancer*, International journal of molecular sciences. 2013;14(5):9338-64. Epub 2013/05/01. 13
15
8. Sharma T., Dhingra R., Singh S., Sharma S., Tomar P., Malhotra M., et al., *Aflibercept: a novel VEGF targeted agent to explore the future perspectives of anti-angiogenic therapy for the treatment of multiple tumors*, Mini reviews in medicinal chemistry, 2013;13(4):530-40, Epub 2013/01/16. 17
19
9. Yun S. M., Jung K. H., Lee H., Son M. K., Seo J. H., Yan H. H., et al., *Synergistic anticancer activity of HS-173, a novel PI3K inhibitor in combination with Sorafenib against pancreatic cancer cells*, Cancer letters. 2013;331(2):250-61. Epub 2013/01/24. 21
23
10. Sato A., Sakurada K., Kumabe T., Sasajima T., Beppu T., Asano K., et al., *Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastomas*, Neurosurgical review. 2010;33(2):175-83; discussion 83-4. Epub 2010/02/06. 25
27
11. De Palma M., Venneri M.A., Galii R., Sergi Sergi L., Politi L.S., Sampaolesi M, et al., *Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors*, Cancer cell. 2005;8(3):211-26, Epub 2005/09/20. 29
12. Hagemann T., Wilson J., Burke F., Kulbe H., Li N. F., Pluddemann A., et al., *Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype*, J Immunol. 2006;176(8):5023-32. Epub 2006/04/06. 31
13. Iwami K., Natsume A., Wakabayashi T., *Cytokine networks in glioma*, Neurosurgical review., 2011;34(3):253-63; discussion 63-4. Epub 2011/06/10. 33
14. Candi E., Knight R.A., Spinedi A., Guerrieri P., Melino G., *A possible growth factor role of IL-6 in neuroectodermal tumours*, Journal of neuro-oncology, 1997;31(1-2):115-22. Epub 1997/01/01. 35
37
15. Chakarvati A PR, Waldron D, Ang, A, Dolled-Filhart MP, Molinaro A, Waldron A., inventor; *Correlation of molecular markers with clinical outcome in GBM patients radiation treated with or without gefitinib patent US 2010144540*. 2010. 39
16. Gustavson M., Pinard R., Waldron A., Waldron D. E. , inventor; *Association of biomarkers with patient outcome. patent US 20120270333*. 2012. 41
17. Bonni A. M., Iglesia, N., Konopka, G, inventor; *Methods and compositions for treating and preventing tumors*, US patent US 20070208074. 2007. 43
18. Enciu A. M., C. M., Tanase C., *Recent Patents on Glioblastoma Signaling, Recent Patents on Biomarkers*. 2013;3(2):98-109. 45
19. CARIS LIFE SCIENCES LUXEMBOURG HOLDINGS SARLLLRdM, L2124 Luxembourg, Grand-Duche de Luxembourg (LU), inventor; *CIRCULATING BIOMARKERS*2012. 47
49

RO 130590 B1

- 1 20. Carlsson A., Persson O., Ingvarsson J., Widegren B., Salford L., Borrebaeck C.A.,
2 et al., *Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and*
3 *therapy selection in glioblastoma multiforme patients*, Proteomics Clinical applications.
4 2010;4(6-7):591-602. Epub 2010/12/08.
- 5 21. Robin X. Panels of Biomarkers to Improve Patient Classification in Brain
6 Diseases: Faculte des sciences de l'Universite de Geneve 2012.
- 7 22. Tanase C. P., Dima S., Mihai M., Raducan E., Nicolescu M. I., Albuлесcu L., et
8 al., *Caveolin-1 overexpression correlates with tumour progression markers in pancreatic*
9 *ductal adenocarcinoma*, Journal of molecular histology. 2009;40(1):23-9. Epub 2009/01/23.
- 10 23. Tanase C. P., Neagu M., Albuлесcu R., Hinescu M. E., *Advances in pancreatic*
11 *cancer detection*, Advances in clinical chemistry. 2010;51:145-80. Epub 2010/09/23.

RO 130590 B1

Revendicări

1. Metodă de stabilire a unui set de biomarkeri solubili, ce se constituie într-o semnătură moleculară utilizabilă pentru diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea pacienților cu glioblastom care cuprinde determinarea simultană și dozarea citokinelor IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF, INF γ , IL-4, IL-10 și IL-12 și a factorilor angiogenici VEGF și FGF-2 în probe de ser prelevate de la pacienți cu glioblastom și, respectiv, în probe de ser prelevate de la subiecți sănătoși, și obținerea unui profil de expresie caracterizat prin:
- supraexpresia citokinelor IL-6, IL-1 β și TNF α , în medie de peste 3 ori la pacienții cu glioblastom față de lotul martor;
 - supraexpresia VEGF, FGF-2, IL-8, IL-2 și GM-CSF, de peste 2 ori la pacienții cu glioblastom față de martori;
 - subexpresia IL-4 și IL-12, la nivel mediu față de lotul martor, 57%, respectiv 84%, din cazurile cu glioblastom; pe baza acestui profil de expresie sunt selectați ca relevanți biomarkerii IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF, ce se constituie în semnătura moleculară utilizabilă pentru diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea pacienților cu glioblastom.
2. Metodă pentru diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea glioblastomului la un pacient cu tumoră cerebrală, prin determinarea cantitativă simultană a valorilor concentrațiilor serice ale unui set de citokine și factori angiogenici, alcătuit din IL-1 β , IL-6, TNF α și VEGF, într-o probă de ser prelevată de la un pacient, și compararea acestor valori cu cele ale concentrațiilor proteinelor serice menționate în serul normal din lotul martor, valorile concentrațiilor serice la pacienții cu glioblastom fiind cuprinse între 8...40, 10...165, 5...25 și, respectiv, 110...900 pg/mL, valori care sunt de 1,5...10 ori mai mari față de valorile medii în serurile normale.

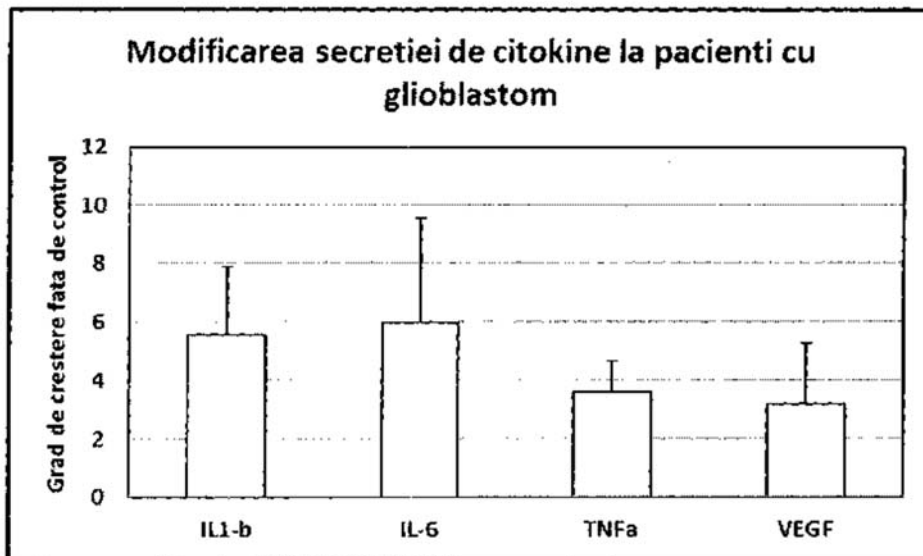


Fig. 1

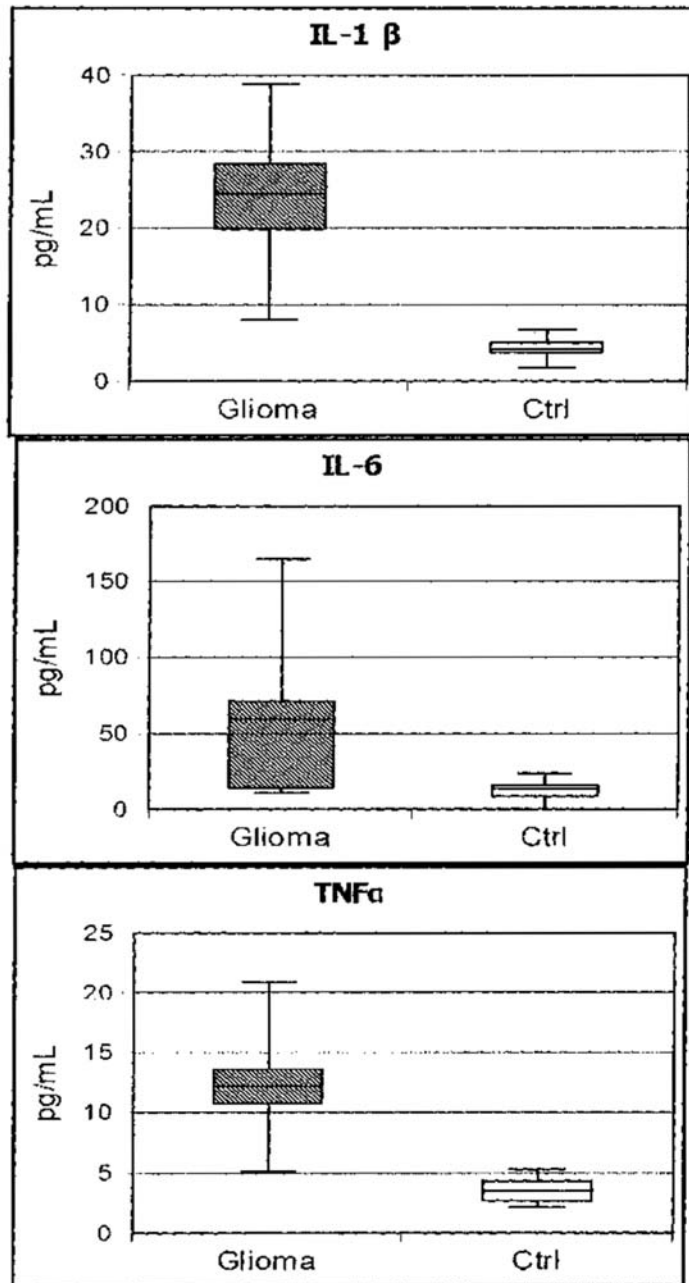


Fig. 2

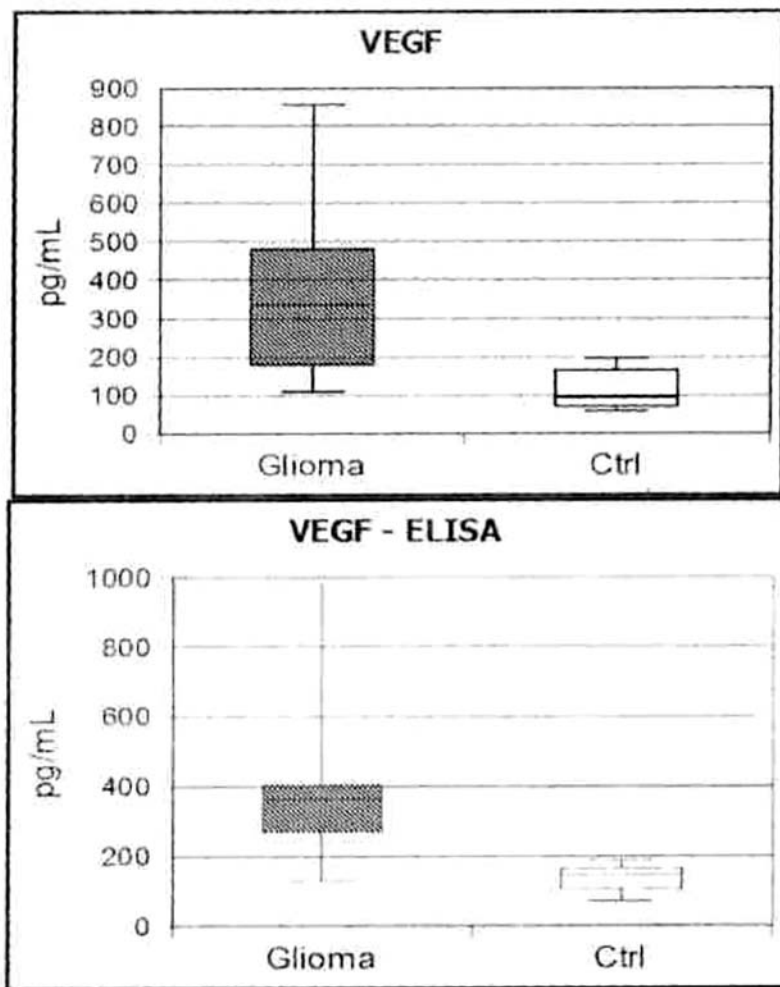


Fig. 3

