



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00409

(22) Data de depozit: 28.05.2013

(41) Data publicării cererii:  
30.09.2015 BOPI nr. 9/2015

(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:  
• 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

(54) SET DE BIOMARKERI SOLUBILI PENTRU DIAGNOSTICUL,  
PROGNOSTICUL ȘI MONITORIZAREA TUMORILOR  
CEREBRALE

(57) Rezumat:

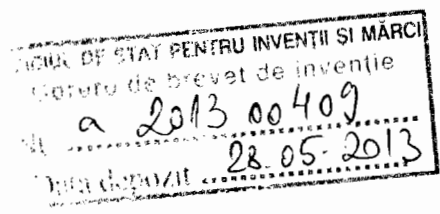
Invenția se referă la o metodă de identificare a unui set de biomarkeri utilizați pentru prognosticul și diagnosticul unor tumori cerebrale. Metoda conform invenției constă în determinarea simultană a concentrației serice și în plasmă, din probe de la pacienți cu glioblastom, versus control al unui complex de citokine și factori angiogenici IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  și VEGF care sunt de 1,5 ... 10 ori mai

crescute față de media valorilor normale, și utilizarea simultană a acestora ca set de biomarkeri pentru monitorizarea unor tumori cerebrale.

Revendicări: 1  
Figuri: 3



JL



## DESCRIEREA INVENȚIEI

### DENUMIREA INVENȚIEI: **SET DE BIOMARKERI SOLUBILI PENTRU DIAGNOSTICUL, PROGNOSTICUL ȘI MONITORIZAREA TUMORILOR CEREBRALE**

Prezenta invenție se referă la un set de biomarkeri solubili (complex de citokine și factori angiogenici), utilizabil la diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea tumorilor cerebrale.

Glioblastoamele reprezintă cele mai agresive tumori intracraniene, fiind foarte rezistente la tratament, pacienții având o rată medie de supraviețuire de 15 luni (1).

Mecanismele moleculare care stau la baza acestor caracteristici clinice pot fi explicate 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 supraviețuire scăzut), modificări cromozomiale, mutații somatice și polimorfisme (2). Cunoscând comportamentul acestor celule tumorale, se pune întrebarea dacă în afara caracteristicilor 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 1863, care arăta că în țesuturile neoplazice există "infiltrate" limforeticulare și focare de inflamație cronică. Studiile experimentale ale ultimilor ani vin în sprijinul conceptului descris de 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 procesul de inflamație și reparație tisulară: celulele inflamatorii și citokinele prezente la nivelul tumorilor contribuie la creșterea, progresia și imunosupresia masei tumorale și mai puțin la constituirea unui sistem de apărare anti – tumoral.

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

Inițierea și progresia tumorală constituie un proces complex care implică mutații la nivel genomic, factori tisulari, factori de micromediu și mediatori ai inflamației. În cadrul

micromediului tumoral markerii inflamatori sunt responsabili pentru proliferarea celulelor, invazia tumorală, angiogeneza marcată și suprimarea anumitor funcții ale sistemului imunitar (5). Numeroase studii au arătat că majoritatea țesuturilor tumorale sunt asociate cu procese inflamatorii. Cu toate acestea, o legătură clară între inflamație și cancer nu a fost încă demonstrată.

În conformitate cu nivelul actual al cunoașterii, molecule individuale de tipul citokinelor, factorilor angiogenici și factorilor de creștere au fost identificate, fiind implicate în tumorigeneză, progresia tumorală, fenomene traduse în particularități clinice ale patologiei tumorale. 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, 8) și de asemenea este identificat ca țintă terapeutică pentru terapii anti-tumorale utilizând molecule anti-VEGF (9). De remarcat însă faptul că nu există mențiuni privind utilizarea setului de molecule în calitate de „biomarker multiplu” în vederea diagnosticării, stratificării sau monitorizării pacienților.

Glioblastomul reprezintă cea mai frecventă și letală formă de tumoră cerebrală. Prognosticul este rezervat în special pentru gliomele de grad avansat – cel mai frecvent neoplasm primar al sistemului nervos central, având o incidență între 8 și 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 celulele tumorale și non-tumorale ca de exemplu macrofagele, limfocitele sau celulele stromale și oferă suport pentru creștere, angiogeneza, invazie și metastazare tumorală (11-13). 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 angiogeneza și de creștere (14).

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 semnificativă ameliorare 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 ex.

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 **US20120270333** (16) și **US20070208074** (17). O analiză exhaustivă a domeniului este publicată în jurnalul de specialitate "Recent Patents on Biomarkers"(18).

Până în prezent nu sunt menționate în literatura de specialitate, atât la nivel național cât și internațional, brevete care să facă referire la utilizarea unui set/combinatie de citokine solubile utilizabil în evaluarea agresivității tumorilor cerebrale. Colectivul nostru a menționat în mai multe publicații internaționale și naționale necesitatea obținerii unui panel de biomarkeri, cu predilecție serici, care să confere o putere de decizie ridicată față de biomarkerii individuali în diagnosticul precoce, adecvarea terapiei și monitorizarea evoluției cancerului (19, 20).

Prezenta invenție realizează un set de biomarkeri, prin măsurarea simultană a concentrației unor citokine și factori angiogenici ce se constituie într-o semnătură moleculară utilizabilă pentru diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea pacienților cu tumori cerebrale.

Avantajele prezentei invenții constau din:

- superioritatea diagnosticului bazat pe complexul de biomarkeri comparativ cu oricare biomarker individual;
- posibilitatea detecției și cuantificării simultane a unui set de biomarkeri;
- utilizarea de material biologic ce se recoltează prin procedee minim invazive;
- repetabilitatea în timp a prelevărilor de probe biologice și a analizelor permițând monitorizarea evoluției post-terapeutice a pacienților.

Setul de biomarkeri, conform prezentei invenții, este constituit dintr-un complex de citokine și factori angiogenici (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  și VEGF). Variațiile de concentrație ale acestora, comparativ cu nivelul mediu de concentrație în serurile normale (valorile de referință) permit construirea unui instrument pentru stabilirea diagnosticului unor tumori cerebrale, estimarea severității modificării patologice, stratificarea pacienților în vederea constituirii unei terapii țintite, estimarea răspunsului la terapie precum și predicția sau detecția recidivei.

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

Fiecare dintre componente poate fi utilizată individual pentru clasificare, dar utilizarea lor simultană, în conformitate cu prezenta invenție, îmbunătățește semnificativ precizia diagnosticului.

Problemele rezolvate de invenție constau 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;
- 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.

Detalii privind realizarea prezentei invenții sunt prezentate în exemplele următoare.

### **Descrierea figurilor**

Figura 1. Prezintă modificarea expresiei citokinelor serice IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  și VEGF la pacienții cu glioblastom. Datele reprezintă valorile medii + deviația standard ale gradului de modificare a concentrației comparativ cu media concentrațiilor serice la normali.

Figura 2. Prezintă nivelurile concentrațiilor serice ale citokinelor pro-inflamatorii IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  la pacienți cu glioblastom versus control. Datele reprezintă valorile medii în urma analizei în triplicat + deviația standard  $p < 0,05$  (ANOVA).

Figura 3. Prezintă valorile concentrațiilor serice ale VEGF la pacienții cu glioblastom și control, determinate prin metodele Luminex-xMAP (sus) și ELISA (jos)  $p < 0,05$  (ANOVA).

### **Descrierea tabelelor**

Tabelul 1: 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: 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: 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).

### Exemplul 1

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 între 25-70 ani.

Probele de ser au fost alicotate și păstrate la  $-80^{\circ}$  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 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , GM-CSF, INF $\gamma$ , 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.

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

- s-au umectat godeurile necesare pentru probe, controale și calibratori.
- s-a distribuit în triplicat câte 20-100  $\mu$ L din probele de ser în godeurile pregătite și s-a dilueat la 150  $\mu$ L cu Tampon de reacție.
- s-a distribuit în godeurile programate calibratori și control.
- s-a reconstituit amestecul de microsferă de captură, amestecând de exemplu, câte 20-80  $\mu$ L din fiecare tip de microsferă, aducându-se la volumul final cu Tampon de reacție (1 - 4 mL).
- s-au aplicat câte 25-50  $\mu$ L din amestecul de microsferă de captură pentru moleculele țintă și s-a incubat placuța 0,5-4 ore la temperatura camerei, cu agitare.
- 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.
- s-a administrat în toate godeurile selectate amestecul de Anticorpi de detecție și conjugat SAPE (Streptavidină-Ficoeritrină).
- s-a incubat la temperatura camerei, ferit de lumină, cu agitare moderată, timp de 15-180 minute.
- s-a îndepărtat excesul de lichid prin filtrare, utilizând dispozitivul special.
- s-au suspendat microsferile din godeuri în Tampon de reacție.
- s-au măsurat concentrațiile de citokine folosind aparatul Luminex 200 și programul StarStation.
- s-a procedat la normalizarea concentrațiilor de citokine și factori de creștere, utilizând ca factor de normalizare concentrația de proteine.
- 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 ex. SPSS, Gnumeric). Ca valoare prag de semnificație se consideră  $p < 0,05$ .
- în urma analizei, s-a identificat o semnătură moleculară caracterizată prin următoarele:
  - o Supraexpresie a citokinelor IL-6, IL-1 $\beta$  și TNF $\alpha$  în medie de peste 3 ori la pacienții cu glioblastom față de lotul martor;
  - o Supraexpresia VEGF, FGF-2, IL-8, IL-2 și GM-CSF de peste 2 ori la pacienții cu glioblastom față de martori;
  - o Subexpresia IL-4 și IL-12, la nivel mediu față de lotul martor, în 57%, respectiv 84% din cazurile cu glioblastom.
- Profilul de expresie este redat în figurile 1-3.
- Pe baza analizei profilului de expresie se rețin, în vederea construirii setului complex de biomarkeri, ca fiind cele mai relevante IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  și VEGF.
- Concentrațiile celor 4 biomarkeri în serul normal sunt în intervalele 0-8, 0-25, 0-8, respectiv 50-125 pg/mL.
- Prin măsurarea simultană a complexului de biomarkeri IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  și VEGF în 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 60; 24,5; 13 și respectiv 350 pg/mL.

- Concentrațiile celor 4 biomarkeri în cazurile de glioblastom sunt de 1,5 - 10 ori crescute față de media valorilor normale.

### **Exemplul 2**

- S-au calculat valorile indicilor de expresie (definiți ca raportul dintre concentrația măsurată în probe și media concentrațiilor aceluiași analit în grupul control).
- S-a testat capacitatea de clasificare individuală a fiecăruia dintre cei 4 biomarkeri, pentru un interval de valori prag ale indicelui de expresie cuprinse între 1,5 și 5 pe un set de probe randomizate și anonimizate.
- S-a atribuit identitatea POZITIV (Glioblastom) sau NEGATIV (Normal). Identitatea POZITIV se atribuie dacă este respectată condiția că Valoarea determinată este mai mare sau egală cu valoarea prag. Operațiunea se realizează pentru toți biomarkerii și valorile prag, prin utilizarea unui program de calcul (SPSS).
- 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) și fals negative (FN).
- Pentru fiecare dintre analiții individuali, se calculează valoarea ariei de sub Curba Caracteristicii de Operare a Receptorului (ROC-AUC).
- S-a stabilit valoarea prag a indicelui de supraexpresie astfel încât să se asigure cel mai ridicat raport între clasificările adevărate și false.
- 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.

### **Exemplul 3**

- Un set de 25 alicote din probele de la exemplul 1 au fost codificate astfel încât realizarea procedurilor să se deruleze fără a se cunoaște identitatea (test orb).
- Probele anonimizate au fost supuse analizei prin metoda de analiza xMAP – Luminex. Pentru analiză se realizează un amestec de detecție care conține microsferă de detecție



pentru IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 si VEGF, componente ale kitului Human Cytokine 12-plex Kit (R&D Systems).

- s-a efectuat dozarea proteinelor serice în toate probele care s-au luat în lucru.
- s-a pregătit placa pentru prepararea probei și măsurare:
- s-a distribuit în triplicat câte 20-100  $\mu$ L din probele de ser în godeurile pregătite și s-a diluat la 150  $\mu$ L cu Tampon de reacție.
- s-au distribuit în godeurile programate calibratori și control.
- s-a reconstituit amestecul de microsferă de captură, amesteând, de exemplu, câte 20-80  $\mu$ L din fiecare tip de microsferă de captura care s-au adus la volumul final cu componenta Tampon de reacție (1 - 4 mL)
- s-au aplicat câte 25-50  $\mu$ L din amestecul de microsferă care conțin anticorpii de captură pentru moleculele țintă și s-a incubat 0,5 - 4 ore la temperatura camerei, cu agitare.
- s-a îndepărtat prin filtrare fluidul din godeuri, utilizând dispozitivul special.
- 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-Ficoeritrina).
- s-a incubat la temperatura camerei, ferit de lumină, cu agitare moderată, timp de 15-180 minute.
- s-a îndepărtat excesul de lichid prin filtrare, utilizând dispozitivul special.
- s-au suspendat microsferile din godeuri în Tampon de reacție.
- s-a măsurat concentrațiile de citokine folosind aparatul Luminex 200 și programul StarStation.
- s-a procedat la normalizarea concentrațiilor de citokine și factori de creștere, utilizând ca factor de normalizare concentrația de proteine.
- s-a aplicat algoritmul bazat pe semnătura moleculară stabilită în exemplul 2 pentru clasificarea probelor analizate în categoriile POZITIV, respectiv NEGATIV.
- 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.
- Performanțele obținute sunt redate în tabelele nr. 1, 2 și 3.

### Revendicări

1. Un set de biomarkeri solubili, constând dintr-un complex de citokine și factori angiogenici IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  și VEGF, pentru diagnosticul, stratificarea, prognosticul sau monitorizarea pacienților cu tumori cerebrale. Valorile concentrațiilor serice ale celor patru biomarkeri la pacienții cu tumori cerebrale sunt de 1,5-10 ori mai mari decât valorile medii în serurile normale.
2. Un procedeu pentru construirea unui instrument de clasificare pentru diagnosticul, stratificarea sau monitorizarea pacienților cu tumori cerebrale, bazat pe măsurarea și utilizarea simultană a setului de biomarkeri de la Revendicarea 1.
3. Utilizarea setului de biomarkeri de la Revendicarea 1 pentru diagnosticarea, prognosticul, monitorizarea pacienților cu tumori cerebrale.

FIGURI

Figura 1

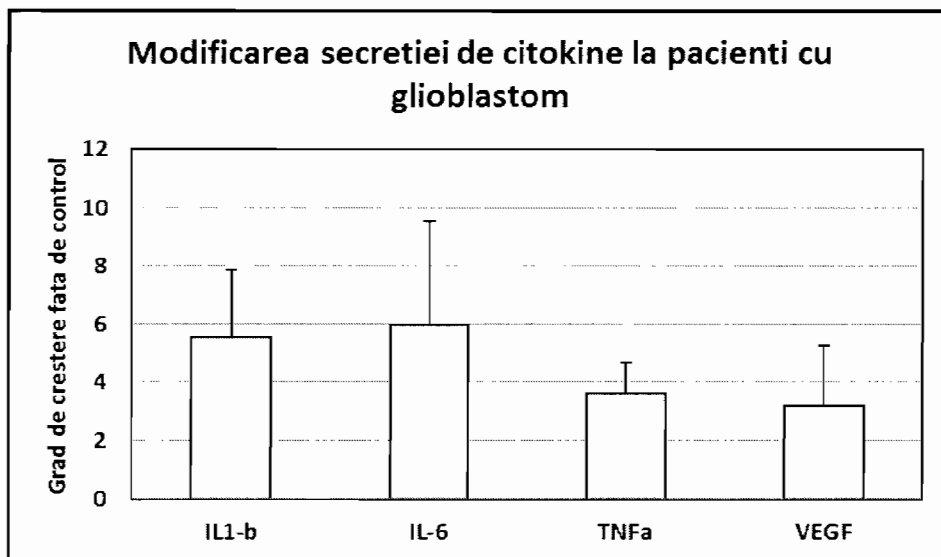


Figura 2

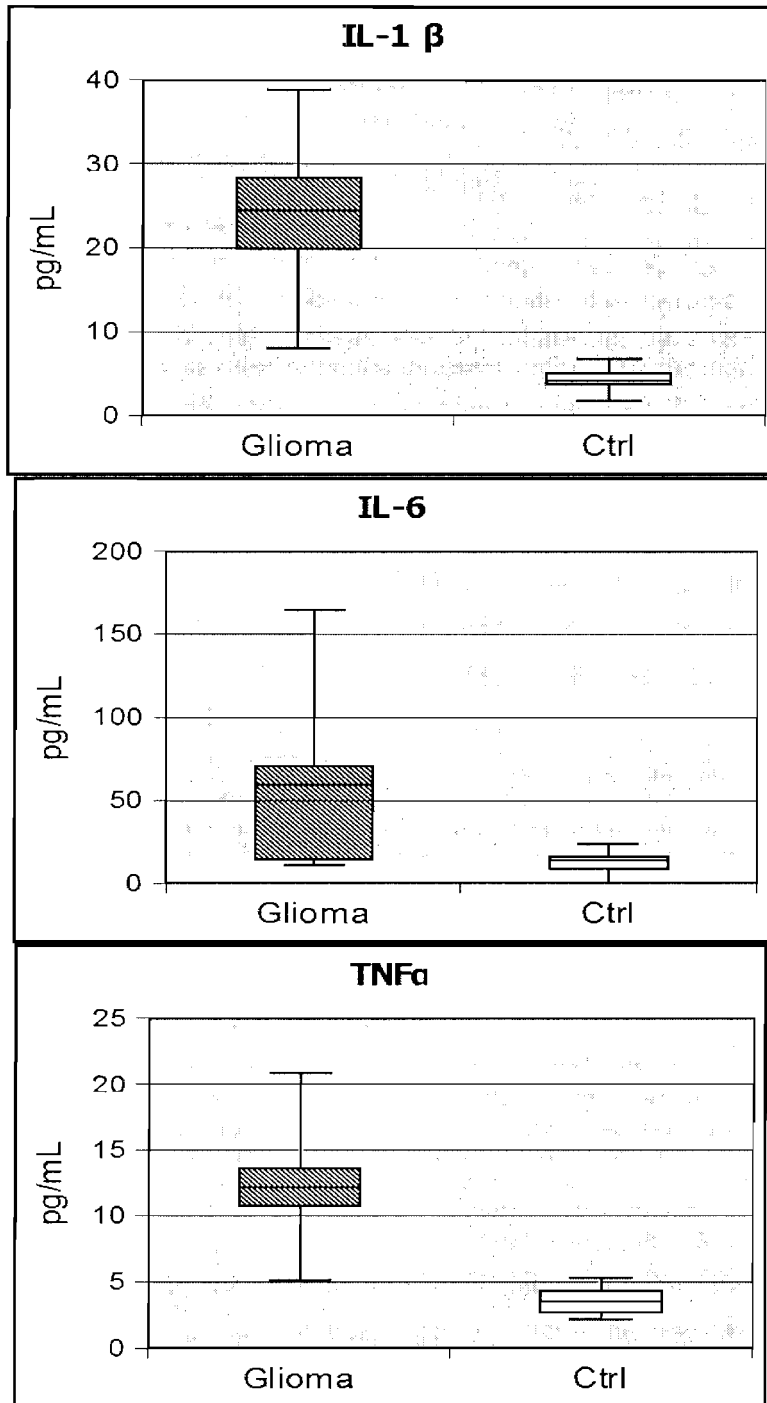
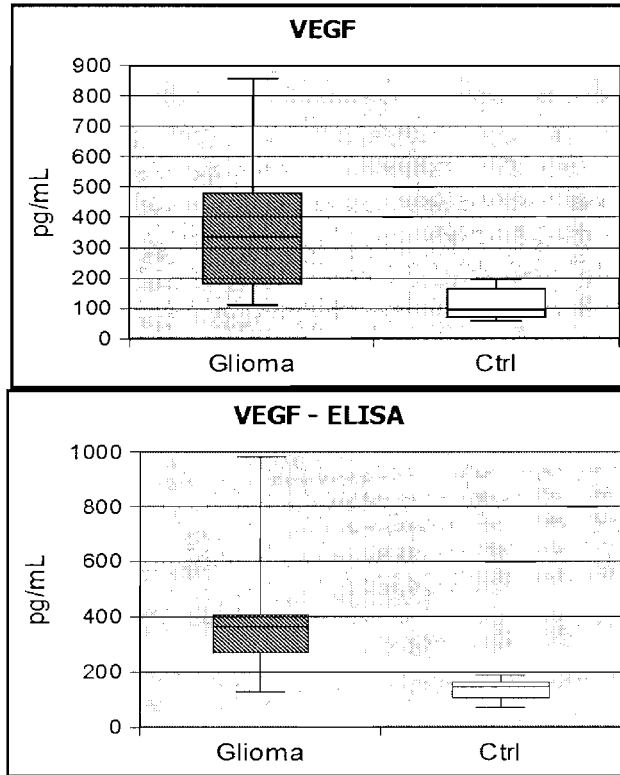


Figura 3



**Tabelul 1**

Biomarker	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF $\alpha$	VEGF
ROC-AUC	0,916	0,918	0,896	0,829

Tabelul 2

<b>Biomarker</b>	<b>IL-1β</b>	<b>IL-6</b>	<b>TNFα</b>	<b>VEGF</b>
Total cazuri	25	25	25	25
Pozitive	17	17	17	17
Negative	8	8	8	8
<b>Rezultat clasificare</b>				
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 3**

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