



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00261**

(22) Data de depozit: **03/04/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/10/2022** BOPI nr. **10/2022**

(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:
• **CODRICI ELENA,**
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4,
BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **TÂNASE 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;
• **STÂNCULESCU RUXANDRA,**
ALEEA ALEXANDRU NR. 9A, ET. 8, AP. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **POPESCU IONELA DANIELA,**
STR. SFÂNTUL ELEFTERIE NR. 25,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MIHAI SIMONA, BD. CAMIL RESSU**
NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **NEAGU ANA-IULIA, CALEA DOBROGEI**
NR. 199, VALU LUI TRAIAN, CT, RO;
• **NECULA LAURA GEORGIANA,**
ȘOS. COLENTINA NR. 10, BL. 6, SC. D,
ET. 8, AP. 167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;

• **MAMBET CRISTINA,**
STR. DR.IACOB FELIX NR. 95, BL. 17,
SC. A,ET. 6, AP. 25, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**M. MANAVI ȘI AL., "GENE PROFILING IN
PAP-CELL SMEARS OF HIGH-RISK
HUMAN PAPILLOMAVIRUS - POSITIVE
SQUAMOUS CERVICAL CARCINOMA",
GYNECOLOGIC ONCOLOGY, VOL. 105,
PP. 418-426, 2007; A. D. SANTIN ȘI AL.,
"GENE EXPRESSION PROFILES OF
PRIMARY HPV16- AND HPV18- INFECTED
EARLY STAGE CERVICAL CANCERS AND
NORMAL CERVICAL EPITHELIUM:
IDENTIFICATION OF NOVEL CANDIDATE
MOLECULAR MARKERS FOR CERVICAL
CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY",
VIROLOGY, VOL. 331, PP. 269-291, 2005;
JAE-WOOK KIM ȘI AL., "THE
EXPRESSION OF RB PATHWAY IN
CERVICAL INTRAEPITHELIAL
NEOPLASIA: PREDICTIVE AND
PROGNOSTIC SIGNIFICANCE", IN
ABSTRACTS PRESENTED FOR THE
THIRTY-SEVENTH ANNUAL MEETING OF
THE SOCIETY OF GYNECOLOGIC
ONCOLOGISTS,
ABSTRACTS/GYNECOLOGIC ONCOLOGY,
VOL. 101, PP. 2-177, 2006; H. J. ISSAQ ȘI
T. D. VEENSTRA, "TWO-DIMENSIONAL
POLYACRYLAMIDE GEL
ELECTROPHORESIS (2D-PAGE):
ADVANCES AND PERSPECTIVES",
BIOTECHNIQUES 25th ANNIVERSARY,
VOL. 44, PP. 697-700, 2008**

(54) **METODĂ DE STABILIRE A UNUI SET DE BIOMARKERI
PENTRU DIAGNOSTICUL SAU PROGNOSTICUL
PACIENTELOR CU CANCER DE COL UTERIN**

Examinator: biochimist **BABALIGEA IRINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și
motivată, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de
invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii
hotărârii de acordare a acesteia

RO 130591 B1

RO 130591 B1

1 Invenția se referă la o metodă de stabilire sau identificare a unui set de biomarkeri
ce se constituie într-o semnătură proteică utilizabilă pentru diagnosticul sau prognosticul
3 pacientelor cu cancer de col uterin, utilizând tehnologii proteomice de ultimă generație.

5 Modificările prezente la nivelul expresiei, structurii sau funcției proteinelor reprezintă
un indicator util în patologia tumorală și prin urmare aceste proteine modificate pot constitui
7 biomarkeri utili în diagnostic, precum și în evaluarea prognosticului sau terapiei. Meca-
nismele care stau la baza apariției cancerului de col uterin sunt complexe, implicând parti-
9 ciparea mai multor proteine supra- sau sub-exprimate. În acest context, încercarea de
detectare a unor seturi de biomarkeri cu sensibilitate și specificitate crescută poate avea o
11 rată de succes mai mare în diagnostic, prognostic și terapie în comparație cu identificarea
unui biomarker unic [1].

13 Cancerul de col uterin reprezintă a doua cauză de deces prin cancer la femei la nivel
mondial, cât și la nivel național, astfel dezvoltarea de noi strategii de diagnostic, prognostic,
15 precum și de tratament necesită o preocupare intensă [2]. Screening-ul realizat cu testul
Papanicolau, cât și testarea și vaccinarea HPV (*human papilloma virus*) au condus la
17 scăderea incidenței și mortalității datorate cancerului de col uterin; cu toate acestea, cancerul
de col uterin rămâne o cauză majoră de deces în populația feminină [3]. Evenimentul
19 declanșator al cancerului de col uterin invaziv este reprezentat de infecția cu diferite tipuri
de HPV. Interesant este faptul că expresia oncogenei virale este necesară, dar nu suficientă
21 pentru a declanșa cancerul de col uterin, fiind implicați o multitudine de alți factori pentru
progresia tumorală [4]. Astfel, sunt depuse eforturi majore în cercetarea biomedicală pentru
23 identificarea de noi factori co-cancerigeni și pentru înțelegerea mecanismelor celulare și
moleculare implicate în dezvoltarea cancerului de col uterin. Pentru atingerea acestui
25 obiectiv, strategiile de analiză proteomică constituie instrumente puternice pentru descifrarea
mecanismelor complexe care stau la baza interacțiunii dintre infecția virală și modificarea
27 expresiei diferitelor proteine implicate în rezistența la apariția apoptozei, creșterea și
diferențierea celulară tumorală, care împreună conduc la apariția cancerului de col uterin [4].

29 La ora actuală se depun eforturi considerabile pentru a descoperi noi medicamente
și pentru a dezvolta terapii în vederea tratării cancerului de col uterin [5]. Astfel, cercetările
31 realizate în ultimii ani cu scopul de a identifica noi seturi de biomarkeri pentru diagnostic,
prognostic și terapie la nivelul cancerului de col uterin reprezintă un deziderat major în lumea
științifică atât la nivel internațional cât și național.

33 Proteomica are un rol important în identificarea rapidă de noi proteine țintă și de
asemenea ajută la elucidarea evenimentelor moleculare care stau la baza dezvoltării și
35 progresiei tumorale. Prin compararea profilului expresiei proteinelor între țesutul tumoral
provenit de la pacienți cu cancer de col uterin și control pot fi identificați noi biomarkeri
37 proteici implicați în cancerul de col uterin [6, 7].

39 În cancerul de col uterin au fost identificate numeroase modificări la nivelul ciclului
celular, ca urmare a infecției cu HPV. Aceste modificări includ supraexprimarea diferitelor
41 ciclone și inhibitori CDK [8]. Aceste modificări au fost investigate pentru potențiala utilitate în
diagnosticul clinic al cancerului de col uterin. Până în prezent, niciunul dintre acești markeri,
43 supraexprimați în neoplazia HPV-indusă, nu manifestă sensibilitate sau specificitate
suficientă pentru detectarea precisă a cancerului de col uterin (fie pentru leziunile CIN2+ în
45 histologie, fie celule pozitive HSIL în citologie) putând fi astfel utilizați ca markeri moleculari
independenți într-un test de diagnostic clinic [9].

47 Procesul de diagnostic este dificil, în mare măsură datorită heterogenității tumorilor
cervicale, cât și limitării tehnicilor de histologie; astfel, este dificil de anticipat răspunsul indivi-
49 dual la terapie în funcție de diagnosticul histologic. În acest scop s-a încercat identificarea
unor biomarkeri proteici cu capacitate de anticipare a evoluției tumorilor cervicale, în vederea
dezvoltării și utilizării lor în terapii țintite.

RO 130591 B1

Identificarea de noi biomarkeri și stabilirea profilului proteic în cancer poate oferi o contribuție semnificativă în vederea optimizării diagnosticului, prognosticului, a deciziei terapeutice și a evaluării răspunsului la tratament. În vederea realizării acestui deziderat este importantă realizarea studiului proteomic al tumorilor cervicale, respectiv analiza proteomului la nivelul biopsiilor.

Identificarea de noi biomarkeri în diferite tipuri de tumori cu ajutorul aplicațiilor proteomice utilizate și în prezentul brevet, constituie subiectul unor cercetări la nivel internațional, aceste studii fiind publicate în literatura de specialitate.

Pe site-ul European Patent Office sunt prezentate câteva brevete ce implică utilizarea tehnologiei 2D-DIGE în evidențierea unor seturi de biomarkeri în cancer. Brevetul **US 2011097738** [10] prezintă o metodă proteomică de screening pentru a diagnostica hepatocarcinomul celular HCC într-un stadiu incipient. În acest brevet, prin utilizarea tehnologiei 2D-DIGE, a fost definită carboxilesteraza 1 (hCE1) din plasma umană ca biomarker pentru HCC, nivelul secreției acestei proteine fiind mai mare la pacienții cu HCC decât la voluntarii sănătoși. Brevetul **CN 102053159** [11] descrie un grup de proteine cu expresie diferențială în țesutul pancreatic provenit dintr-un model de cancer pancreatic timpuriu, proteinele identificate prin 2D-DIGE având o specificitate crescută, aceste proteinele putând fi utilizate ca biomarkeri pentru diagnosticarea precoce a cancerului pancreatic, oferind astfel o metodă eficientă pentru diagnosticul clinic precoce al cancerului pancreatic. Abordări similare sunt descrise și în brevetul **JP 2007215412** [12].

Au fost publicate în literatura științifică non-brevet o serie de studii privind expresia genică în cazul carcinoamelor de celule scuamoase comparativ cu celulele epiteliale scuamoase cervicale benigne sau în cazul cancerelor cervicale aflate în stadiu incipient față de culturi primare normale de keratocite cervicale [13, 14]. Au fost de asemenea efectuate analize de imunohistochimie pe probe prelevate din colul uterin al unor paciente care au fost supuse unor proceduri de biopsie sau conizație pentru a verifica expresia p16^{INK4a}, CDK4 și pRb [15].

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 biomarkeri cu rol în evaluarea agresivității tumorilor de col uterin. Echipa noastră de cercetare a menționat în mai multe publicații internaționale și naționale necesitatea obținerii unui panel de biomarkeri, care să confere o putere de decizie ridicată față de biomarkerii individuali în diagnosticul precoce, adecvarea terapiei și monitorizarea evoluției cancerului [16, 17].

Aceste argumente au constituit motive pentru aprofundarea studiului proteomic asupra cancerului de col uterin, folosind tehnologii proteomice de ultimă generație, cu scopul final de identificare a unor biomarkeri cuantificabili 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 loturile incluse în studiu.

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve prezenta invenție este de a diagnostica sau prognostica cancerul de col uterin. Soluția tehnică constă în:

- identificarea unui set de biomarkeri neabordați încă în practica medicală curentă, a căror variație de expresie constituie un indicator pentru modificările patologice de la nivelul colului uterin;

- identificarea unor biomarkeri prin analiza profilului proteic în cancerul de col uterin prin tehnologii proteomice de ultimă generație;

RO 130591 B1

1 - realizarea unui algoritm de clasificare bazat pe combinația de tipare de semnături
moleculare (set de biomarkeri); acest algoritm de clasificare este aplicabil pentru completa-
3 rea diagnosticului și evaluarea prognosticului în cazul cancerului de col uterin.

Invenția are ca obiect o metodă de stabilire a unui set de biomarkeri ce se constituie
5 într-o semnătură proteică utilizabilă pentru diagnosticul sau prognosticul pacientelor cu
cancer de col uterin, care constă în identificarea simultană a trei proteine biomarkeri CDK4,
7 ciclina B1 și p16^{INK4a} în probe de țesut tumoral prelevate de la paciente cu cancer de col
uterin, și respectiv, în probe de țesut peritumoral prelevat de la aceleași paciente, prin elec-
9 troforeză diferențială bidimensională în gel (2D-DIGE) și validare prin Western Blot, nivelul
acestor proteine fiind supraexprimat de peste de 3 ori în probele de țesut tumoral față de
11 țesutul peritumoral.

În metoda conform invenției identificarea simultană a celor trei proteine CDK4, ciclina
13 B1 și p16^{INK4a} constă în liza tisulară a probelor de țesut tumoral și peritumoral, determinarea
concentrației de proteine din probe, îndepărtarea substanțelor de interferență din probe prin
15 precipitarea cantitativă a proteinelor și resuspendarea acestora într-o soluție compatibilă cu
focalizarea izoelectrică, marcarea probelor cu agenți de marcarea fluorescenți pentru
17 electroforeză diferențială bidimensională în gel (2D-DIGE), focalizarea izoelectrică a probelor
marcate și separarea proteinelor în funcție de greutatea moleculară prin electroforeză
19 diferențială bidimensională, identificarea a 15 proteine care au fost supraexprimate de mai
mult de trei ori în țesutul tumoral în comparație cu țesutul peritumoral, cu greutate moleculară
21 cuprinsă între 15-50 Kda, pH = 5,5-7,5, compararea rezultatelor cu librăria de date World 2D-
Page și desemnarea a trei proteine, și anume CDK4 cu greutatea moleculară de 33 kDa și
23 pl 6,55, ciclina B1 cu greutatea moleculară de 48 kDa și pl 7,1 și inhibitorul kinazei 2A ciclin-
dependentă p16^{INK4a} cu greutatea moleculară de 16 kDa și pl 5,5.

25 Detalii privind realizarea prezentei invenții sunt prezentate în exemplele următoare.
Descrierea figurilor

27 Fig. 1, prezintă un exemplu de geluri 2D-DIGE obținute din țesut tumoral (A) și
peritumoral (B).

29 Fig. 2, prezintă proteina identificată la greutatea moleculară de 48 kDa și pl 7,1.

Fig. 3, prezintă proteina identificată la greutatea moleculară de 16 kDa și pl 5,5.

31 Fig. 4, prezintă proteina identificată la greutatea moleculară de 33 kDa și pl 6,55.

33 Fig. 5, prezintă supraexpresia proteinei CDK4 într-un carcinom cervical, cu infecție
HPV versus țesut peritumoral.

35 Fig. 6, prezintă supraexpresia ciclonei B1 într-un carcinom cervical, cu infecție HPV
versus țesut peritumoral.

37 Fig. 7, prezintă supraexpresia proteinei p16^{INK4a} într-un carcinom cervical, cu infecție
HPV versus țesut peritumoral.

39 Fig. 8, prezintă nivelul seric al markerului tumoral CA 125 la cazurile la care a fost
identificat setul de biomarkeri.

Exemplul 1

Prepararea probelor în vederea analizei priri metoda 2D-DIGE

41 Au fost colectate probe de țesut tumoral și peritumoral "(margine de rezecție liberă
43 de tumoră - considerat control) de la 8 paciente cu carcinom de col uterin, cu infecție HPV,
cu vârsta medie de 46,61 ani (interval 41-55 ani), operate în Spitalul Clinic de Urgență
45 „Sfântul Pantelimon", Clinica de Obstetrică Ginecologie. Fragmente de țesut au fost
prelevate intraoperator, repartizate în tampoane specifice prelucrării ulterioare și păstrate la
47 -80°C până la determinare. Probele au fost prelucrate având semnat acordul informat al
pacientelor.

RO 130591 B1

Pre-rehidratarea stripurilor

Această etapă s-a realizat cu soluție de rehidratare care conține amfoliții corespunzătoare IPG stripului cu care s-a lucrat, respectiv 3-11 și soluție DeStreak. Rolul acestei etape a fost de a transforma grupările tiol în bisulfide stabile și de a proteja grupările bisulfidice de oxidarea nespecifică. Peste soluția de rehidratare a fost plasat stripul, iar peste acesta ulei mineral. Pre-rehidratarea s-a făcut cu 10-20 h înainte de încărcarea probelor în stripuri.

Liza tisulară

S-a realizat triturarea a 300 mg țesut tumoral și peritumoral pe gheață și spălarea de 3-5 ori cu tampon fosfat salin (TFS). După îndepărtarea TFS, fragmentele de țesut au fost omogenizate la 4°C cu tampon de liză (uree 7 M; tiouree 2 M; CHAPS 2%; DTT 1%; EDTA 0,5 mM, inhibitori de proteaze 1%); raportul țesut:tampon liză a fost de 1:2 (w:v). S-au centrifugat probele la 18000 rpm, timp de 10 min la 4°C, s-a preluat supernatantul urmând a se determina concentrația de proteine din probă.

Determinarea concentrației de proteine

S-a realizat în vederea încărcării unei cantități corecte de proteine, corespunzătoare cu lungimea stripului ales în experiment cât și cu tipul colorației, în final dorindu-se obținerea unor rezultate comparabile. Această etapă a fost realizată cu 2D Quant kit (GE Healthcare) dar poate fi realizată și cu alte kituri compatibile cu substanțele folosite în tamponul de liză.

1. S-a pregătit curba standard utilizând Albumină Serică Bovină (BSA) - diluții seriale de soluție standard de la 50 μg/μL până la 0 μg/μL. Volumul final a fost de 30 μL/probă. Curba și probele s-au lucrat în duplicat.

2. S-a adăugat 500 μL precipitant/tub (standard și probe); vortexare scurtă și incubare 2-3 min la temperatura camerei.

3. S-a adăugat 500 μL co-precipitant/tub; vortexare scurtă și centrifugare la 10000 x g pentru 5 min. Sedimentul a fost vizibil și s-a îndepărtat supernatantul. S-au re-centrifugat scurt probele și s-a îndepărtat supernatantul rămas.

4. S-a adăugat 100 μL de reactiv cupric și 400 μL de apă ultrapură/tub. Vortexare scurtă.

5. S-a adăugat 1 mL de reactiv de culoare de lucru/tub (100 părți de reactiv de culoare A cu 1 parte reactiv de culoare B). Vortexare imediată.

6. Incubare 15-20 min la temperatura camerei și citirea absorbantei la 480 nm utilizând apă ultrapură ca referință, imediat după adăugarea reactivului de culoare de lucru. S-a utilizat curba standard pentru determinarea concentrației de proteine din probe.

Îndepărtarea substanțelor de interferență din probe s-a realizat în vederea pregătirii probelor pentru electroforeza 2D-DIGE, altfel rezultatele obținute ar putea fi neconcludente din cauza conductivității mari sau a concentrației scăzute de proteine. Procedura acționează prin precipitarea cantitativă a proteinelor, lăsând în soluție substanțele de interferență - detergenți, săruri, lipide, acizi nucleici și fenolici. Ulterior proteinele au fost resuspendate într-o soluție compatibilă cu focalizarea izoelectrică din prima dimensiune. Această etapă a fost realizată cu Clean-up kit (GE Healthcare), dar poate fi realizată și cu alte kituri disponibile comercial.

Soluția tampon de spălare s-a păstrat la -20°C peste noapte înainte de utilizare. Toate etapele s-au realizat cu probele pe gheață.

1. S-a transferat o cantitate de 1-100 μL lizat tisular (conținând 50 μg proteină/probă) în tuburi de 1,5 mL.

2. S-a adăugat 300 μL precipitant peste probe și s-au vortexat. Incubare 15 min pe gheață.

3. S-a adăugat 300 μL co-precipitant peste probe și s-au vortexat.

RO 130591 B1

1 4. S-au centrifugat probele la 12000 g pentru 5 min; este vizibil sedimentul de
proteine. S-a aruncat supernatantul fără a disturba sedimentul.

3 5. S-a adăugat 40 μL de co-precipitant peste sediment. Incubarea probelor 5 min pe
gheață.

5 6. S-au centrifugat probele la 12000 g pentru 5-10 min; îndepărtarea supernatantului.

7 7. S-a adăugat 25 μL de apă ultrapură și s-au vortexat probele 5-10 sec. Sedimentul
este dispersat, dar nu dizolvat.

9 8. S-a adăugat 1 mL de soluție tampon de spălare (răcit în prealabil) și 5 μL aditiv de
spălare. S-au vortexat probele până când sedimentul este complet dispersat.

11 9. S-au incubat probele la -20°C pentru 40 min. În acest interval de timp s-au vortexat
probele pentru 20-30 s o dată la fiecare 10 min.

10. S-au centrifugat tuburile la 12000 g pentru 5 min.

11. S-a preluat supernatantul, iar sedimentul a fost lăsat 5 min la aer.

15 12. S-a resuspendat sedimentul într-un volum corespunzător de tampon de
lucru/soluție compatibilă cu IEF.

Exemplul 2 - marcarea probelor/controlului intern

Toate probele se prepară conform exemplului 1.

Controlul și ajustarea pH-ului

S-a ajustat pH-ul probelor la 8,5 și s-a realizat marcarea acestora cu fluorocromi.

Marcarea cu CyDye a probelor și a standardului intern

Reconstituirea CyDye

1. S-a adăugat 5 μL dimetilformamidă (DMF) în fiecare fiolă de CyDye.

2. S-a realizat centrifugarea și apoi vortexarea viguroasă a fiolelor pentru 30 s.

3. S-au centrifugat fiolele cu CyDye timp de 30 s la 12000 g.

Marcarea probelor:

1. S-a adăugat un volum de probă corespunzător pentru 50 μg proteină într-un tub.

2. S-a adăugat 1 μL de CyDye diluat (400 pmol) în tubul cu probă.

3. S-a realizat centrifugarea scurtă, iar tuburile au fost lăsate pe gheață pentru 30
min, la întuneric.

4. S-a adăugat 1 μL de lizină 10 mmol/L pentru stoparea reacției. S-a realizat
centrifugarea scurtă și s-au lăsat 10 min pe gheață, la întuneric.

Notă: Probele sunt marcate cu Cy3 și Cy5.

Marcarea standardului intern:

n - numărul de geluri din experiment

1. S-a adăugat un volum de standard intern echivalent cu $n \times 50 \mu\text{g}$ proteină într-un
tub.

2. S-au adăugat $n \mu\text{L}$ de Cy2 în tubul cu standardul intern.

3. S-a realizat centrifugarea scurtă, iar tuburile au fost lăsate pe gheață pentru
30 min, la întuneric.

4. S-a adăugat $n \mu\text{L}$ de lizină 10 mmol/L pentru stoparea reacției. S-a realizat
centrifugarea scurtă și s-au lăsat 10 min pe gheață la întuneric.

Probele sunt aplicate direct pe gelul stripului rehidratat (3-1 1NL), prin sistemul de
cup-loading, în tăvița de izoelectrofocalizare.

Se aplică ulei mineral pe strip și peste probe.

Exemplul 3 - Focalizarea izoelectrică

Focalizarea izoelectrică (IEF) - într-un gradient de pH, sub influența unui câmp
electric, o proteină se va deplasa în gradient până la locul unde încărcătura sa electrică va
fi zero.

RO 130591 B1

După așezarea stripurilor în tăvița de izoelectrofocalizare, aceasta se introduce în celula Protean IEF (Bio-Rad), se conectează la electrozi și se programează conform protocolului de lucru optimizat. Astfel, după aplicarea probelor, voltajul este crescut în mod gradual până la valoarea necesară pentru focalizare și este păstrat la acest nivel timp de câteva ore. Un voltaj inițial scăzut minimizează agregarea proteinelor din probă.

Programul de IEF: timp de rehidratare 1 h, temperatura 20°C, curentul per strip 75 μ A, lungimea stripului 18 cm, gradientul de pH al stripului 3-11 NL, etapa 1 - step & hold la 150 V timp de 3 h, etapa 2 - step & hold la 300 V timp de 3 h, etapa 3 - gradient la 1000 V timp de 6 h, etapa 4 gradient - la 10000 V timp de 1 h, Etapa 5 step & hold la 10000 V timp de 2 h, etapa 6 - la 300 V timp de 3 h.

Exemplul 4 - Separarea proteinelor în a 2-a dimensiune într-un gel de poli(acrilamidă), în funcție de greutatea moleculară.

Migrarea proteinelor în a 2-a dimensiune s-a realizat pe geluri de poli(acrilamidă) de 12% care au fost lăsate peste noapte la polimerizat.

Tamponul de electroforeză folosit - Tris/Glicină/SDS IX. Stripurile 3-1 1NL de 18 cm au fost incubate 20 min cu 5 mL tampon de echilibrare I și 5 mL tampon de echilibrare II, pe agitator.

Tamponul de echilibrare I are rolul de a reduce grupările sulfhidril și s-a preparat astfel: 6 M Uree, 2% SDS, 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, 20% glicerol, 2% (w/v) DTT și soluție glicerol 30% până la completarea volumului final.

Tamponul de echilibrare II are rolul de a alchila grupările sulfhidril și s-a preparat astfel: 6 M Uree, 2% SDS, 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, 20% glicerol, 0,5 g iodoacetamidă și soluție glicerol 30% până la completarea volumului final.

După echilibrare s-a realizat plasarea stripurilor pe geluri. Peste gelul de poli(acrilamidă) se toarnă gel de agaroză în care se introduce stripul fără a se forma bule de aer. Pentru vizualizarea migrării corecte s-a încărcat un marker de greutate moleculară/gel.

Electroforeză propriu-zisă s-a realizat la 7mA per gel timp de 1 h și apoi la 25 mA per gel peste noapte cu sistemul Protean II xi Cell (BioRad).

Exemplul 5 - Analiza imaginilor și identificarea biomarkerilor

Gelurile au fost scanate la 3 lungimi de undă diferite, respectiv 488nm (Cy2), 532nm (Cy3) și 633nm (Cy5) cu ajutorul scanner-ului Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare). Imaginile obținute au fost analizate și prelucrate cu softurile ImageMaster 2D Platinum Software (GE Healthcare) și PDQuest (BioRad). Pentru calibrarea sistemelor în vederea stabilirii greutății moleculare a fost utilizat standardul 2D SDS-PAGE (BioRad).

Au fost identificate peste 1500 de spoturi/proteine în ambele tipuri de țesut analizate (tumoral și peritumoral/control). După prelucrarea și editarea imaginilor, au fost detectate ~1359 spoturi în probele de țesut tumoral și ~1297 spoturi în țesutul control. Spoturile s-au încadrat în ambele cazuri într-un interval de mărime de 10-90 kDa și un interval de pH de 4,5-8,5. Au fost selectate ca spoturi semnificative acele spoturile care au prezentat la nivelul țesutului tumoral o expresie unică și o creștere de trei ori sau chiar mai mare în volumul normalizat față de imaginile din control ($p < 0,01$). Ca rezultat al unei analize comparative între spoturile provenite din țesut tumoral versus control s-a constatat că aproximativ 109 de proteine au fost exprimate diferențiat/supra-exprimate în țesutul tumoral. Dintre acestea au fost identificate 15 proteine care au fost supra-exprimate de mai mult de trei ori (ca densitatea) în țesutul tumoral în comparație cu controlul. Aceste proteine au fost determinate ca proteine ce au variat în greutate moleculară între 15-50 kDa cu pH de 5,5-7,5. Acest profil proteic de expresie a fost reproductibil pentru fiecare probă în parte.

RO 130591 B1

1 Din compararea cu bazele de date (World 2D-PAGE-repository), au putut fi
2 identificate ca posibili candidați, pe baza valorilor pI și a greutății moleculare următoarele
3 proteine:

- 4 - CDK4 cu greutatea moleculară de 33 kDa și pI 6,55;
- 5 - ciclina B1 cu greutatea moleculară de 48 kDa și pI 7,1;
- 6 - inhibitorul kinazei 2A ciclin-dependentă (p16^{INK4a}) cu greutatea moleculară de 16
7 kDa și pI 5,5.

Rezultatele analizei proteomice prin 2D-DIGE sunt redată în fig. 1...4.

9 **Exemplul 6 - Validarea prin Western blot a proteinelor identificate**

10 S-a realizat verificarea diferențelor între expresia biomarkerilor proteici - CDK4,
11 ciclina B1 și p16^{INK4a} la nivelul țesutului tumoral și peritumoral provenit de la pacienți cu
12 cancer de col uterin, prin analiza Western blot.

13 Într-un gel SDS-PAGE 12% s-a încărcat o cantitate de 25 μg proteină/probă. Înainte
14 de încărcare s-a realizat fierberea proteinelor din proba cu DTT în vederea ruperii punților
15 disulfidice. Ulterior a avut loc migrarea proteinelor în funcție de greutatea moleculară la 20
16 mA/gel, aproximativ 3 h.

17 După finalizarea migrării proteinelor în gel, acestea s-au transferat la 100 V, timp de
18 2 h pe membrane PVDF. Tamponul de transfer conține 3,03 g TRIS, 14,4 g glicină. 200 mL
19 metanol și se aduce la 1 L cu apă ultrapură (s-a păstrat la frigider câteva ore înainte de
20 folosire). S-a realizat blocarea prin incubarea membranelor în soluție de blocare 5% (5 g
21 non-fat dry milk și TBS/Tween), pe agitator, peste noapte la 4°C.

22 Membranele au fost ulterior incubate cu anticorpi primari CDK4(C-22): sc-260 (Santa
23 Cruz Biotechnology), ciclina B1(H-433):sc-752 (Santa Cruz Bioiechnology) și p16(H-156):
24 sc-759 (Santa Cruz Biotechnology) în diluție 1/200 cu TBS-Tween suplimentat 2% BSA,
25 pentru o oră la temperatura camerei, cu agitare. Controlul pozitiv al încărcării s-a realizat cu
26 anticorp primar de β-actină (C4): sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology).

27 După spălarea cu TBS-Tween, membranele au fost incubate 60 min cu anticorpi
28 secundari - goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology) în diluție 1/10000
29 cu TBS-Tween pentru CDK4, ciclina B1 și p16 și goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005 (Santa
30 Cruz Biotechnology) în diluție 1/10000 cu TBS-Tween pentru β-actină.

31 Imunoreactivitatea proteinelor a fost detectată utilizând leitul Super Signali West Pico
32 Chemiluminescent Substrat (ThermoScientific). De asemenea, se pot folosi și alte kituri având
33 la bază principiul de chemiluminescență.

Rezultatele analizei Western blot sunt redată în fig. 5...7.

35 **Exemplul 7 - Determinarea markerului seric tumoral CA 125**

36 Pentru pacienții la care s-a realizat analiza proteomică cu identificarea de noi
37 proteine a fost luat în studiu serul, în vederea determinării nivelului seric al markerului tumoral
38 clasic CA 125, prin metoda Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA).

39 Testele VIDAS CA 125 (kit-uri BioMerieux, Franța) sunt teste automate cantitative
40 și prin ele se realizează o măsurare cantitativă a nivelului pentru CA 125 în serul uman prin
41 metoda ELFA realizat cu analizorul miniVIDAS. Principiul de determinare combină metoda
42 sandwich de imunodetecție cu două enzime cu o detectare finală fluorescentă (ELFA).

43 Valorile obținute la pacienți au variat pentru CA 125 între 48 UI/mL și 238 UI/mL cu
44 o medie de 55,76 UI/mL (p < 0,05). Intervalul de referință biologic pentru CA 125 este
45 < 35 UI/mL.

46 Rezultatele obținute au evidențiat o corelare statistic semnificativă între proteinele
47 nou identificate și nivelul seric al markerului tumoral clasic CA 125 (p < 0,05) (fig. 8).

RO 130591 B1

Bibliografie	1
[1] Xiao Z.; Prieto D.; Conrads T.P.; Veenstra T.D. and Issaq H.J. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. <i>Mol Cell Endocrinol</i> , 2005. 25(9(1-2)), 95-106.	3
[2] Peralta-Zaragoza O.; Bermudez-Morales V.H.; Perez-Plasencia C.; Salazar-Leon J.; Gomez-Ceron C. and Madrid-Marina V., <i>Targeted treatments for cervical cancer: a review</i> , <i>Onco Targets Ther</i> , 2012, 5(315-328).	5 7
[3] Moriarty A.T. p16INK4a-is the future of cervical cancer screening rosy? <i>Cancer Cytopathol</i> , 2012, 120(5), 291-293.	9
[4] Di Domenico F.; De Marco F. and Perluigi M., <i>Proteomics strategies to analyze HPV-transformed cells: relevance to cervical cancer</i> . <i>Expert Rev Proteomics</i> , 2013, 10(5), 461-472.	11
[5] Witkiewicz A.K.; Knudsen K.E.; Dicker A.P. and Knudsen E.S., <i>The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments</i> . <i>Cell Cycle</i> , 2011, 70(15), 2497-2503.	13 15
[6] Bae S.M.; Min H.J.; Ding G.H.; Kwak S.Y.; Cho Y.L.; Nam K.H.; Park C.H.; Kim Y.W.; Kim C.K.; Han B.D.; Lee Y.J.; Kim do K. and Alin VV.S. <i>Protein expression profile using two-dimensional gel analysis in squamous cervica cancer patients</i> . <i>Cancer Res Treat</i> , 2006, 38(2), 99-107.	17 19
[7] Zhao Q.; Wu Y.M.; He Y.; Wang X.L.; Chen S.; Qian X.H. and Zhang Y.X. <i>[Analysis of differentially expressed proteins in normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous carcinoma tissues]</i> , <i>Zhonghva Zhong Liu Za Zhi</i> , 2013, 35(12), 914-920.	21 23
[8] Zhao M; Kim Y.T.; Yoon B.S.; Kim S.W.; Kang M.H.; Kim S.H.; Kim J.H.: Kim J.W. and Park Y.W., <i>Expression profiling of cyclin B1 and D1 in cervical carcinoma</i> . <i>Exp Oncol</i> , 2006, 25(1), 44-48.	25
[9] De Freitas A.C.; Coimbra E.C. and Leitao, M.D. <i>Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis</i> . <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2014,1845(2), 91-103.	27 29
[10] US 20110097738. Plasma biomarker tool for the diagnosis of liver cancer comprising liver carboxylesterase 1 and liver cancer screening method. 2011.	31
[11] CN 102053159. Related protein group with differential expression in early pancreatic cancer model and application thereof. 2011.	33
[12] JP 2007215412. Method For Judging Malignant Metastatic Stomach Cancer. 2007.	35
[13] M. Manavi și al. "Gene profiling in Pap-cell smears of high-risk human papillomavirus -positive squamous cervical carcinoma" <i>Gynecologic Oncology</i> , 2007, vol. 105, pp. 418-426	37
[14] A. D. Santin și al. "Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy", <i>Virology</i> , 2005, vol. 331, pp. 269-291	39 41
[15] Jae-Wook Kim și al. "The expression of RB pathway in cervical intraepithelial neoplasia: Predictive and prognostic significance" in "Abstracts Presented for the Thirty-Seventh Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists", <i>Abstracts/Gynecologic Oncology</i> , 2006, vol. 101, S2 - S177.	43 45

RO 130591 B1

- 1 [16] Tănase CP.; Dima S.; Mihai M.; Răducan E.; Nicolescu M.I.; Albulescu L.;
Voiculescu B.; Dumitraşcu T.; Cruceru L.M.; Leabu M.; Popescu. I. and Hinescu M.E.
3 *Caveolin-1 overexpression correlates with tumour progression markers in pancreatic ductal*
adenocarcinoma, J. Mol. Histol, 2009, 40(1), 23-29.
- 5 [17] Radu Albulescu, E.C, Ionela Daniela Popescu, Simona Mihai, Laura Georgiana
Necula, Daniel Petrescu, Mihaela Teodoru, Cristiana Pistol Tanase. *Cytokine Patterns in*
7 *Brain Tumour Progression*, Mediators of Inflammation. Mediators of Inflammation, 2013,
<http://dx.doi.Org/10.1155/2013/979748>.

RO 130591 B1

Revendicări

- 1
- 3
- 5
- 7
- 9
- 11
- 13
- 15
- 17
- 19
- 21
- 23
- 25
- 27
1. Metodă de stabilire a unui set de biomarkeri ce se constituie într-o semnătură proteică utilizabilă pentru diagnosticul sau prognosticul pacientelor cu cancer de col uterin, **caracterizată prin aceea că**, constă în identificarea simultană a trei proteine biomarkeri CDK4, ciclina B1 și p16^{INK4a} în probe de țesut tumoral prelevate de la paciente cu cancer de col uterin, și respectiv, în probe de țesut peritumoral prelevat de la aceleași paciente, prin electroforeză diferențială bidimensională în gel (2D-DIGE) și validare prin Western Blot, nivelul acestor proteine fiind supraexprimat de peste de 3 ori în probele de țesut tumoral față de țesutul peritumoral.
 2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, identificarea simultană a celor trei proteine CDK4, ciclina B1 și p16^{INK4a} constă în liza tisulară a probelor de țesut tumoral și peritumoral, determinarea concentrației de proteine din probe, îndepărtarea substanțelor de interferență din probe prin precipitarea cantitativă a proteinelor și resuspendarea acestora într-o soluție compatibilă cu focalizarea izoelectrică, marcarea probelor cu agenți de marcarea fluorescenți pentru electroforeză diferențială bidimensională în gel (2D-DIGE), focalizarea izoelectrică a probelor marcate și separarea proteinelor în funcție de greutatea moleculară prin electroforeză diferențială bidimensională, identificarea a 15 proteine care au fost supraexprimate de mai mult de trei ori în țesutul tumoral în comparație cu țesutul peritumoral, cu greutate moleculară cuprinsă între 15-50 Kda, pH = 5,5-7,5, compararea rezultatelor cu librăria de date World 2D-Page și desemnarea a trei proteine, și anume CDK4 cu greutatea moleculară de 33 kDa și pl 6,55, ciclina B1 cu greutatea moleculară de 48 kDa și pl 7,1 și inhibitorul kinazei 2A ciclin-dependentă p16^{INK4a} cu greutatea moleculară de 16 kDa și pl 5,5.
 3. Metodă conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că**, în etapa de focalizare izoelectrică probele marcate se aplică pe stripuri 3-11NL.

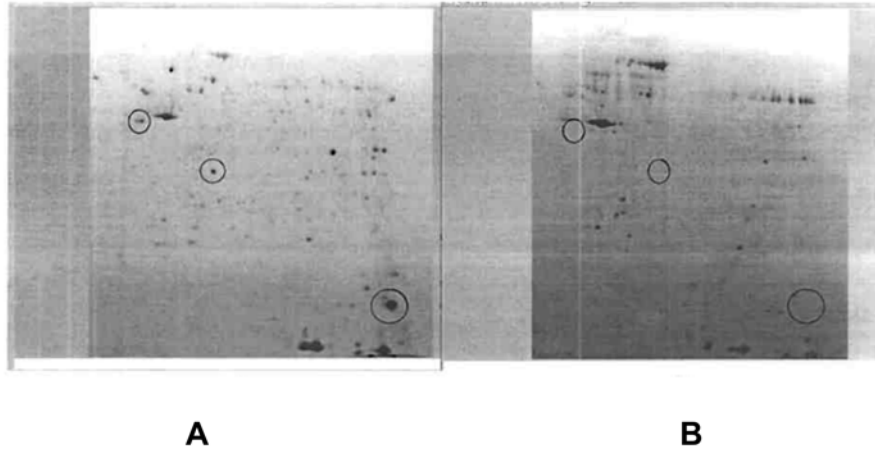


Fig. 1

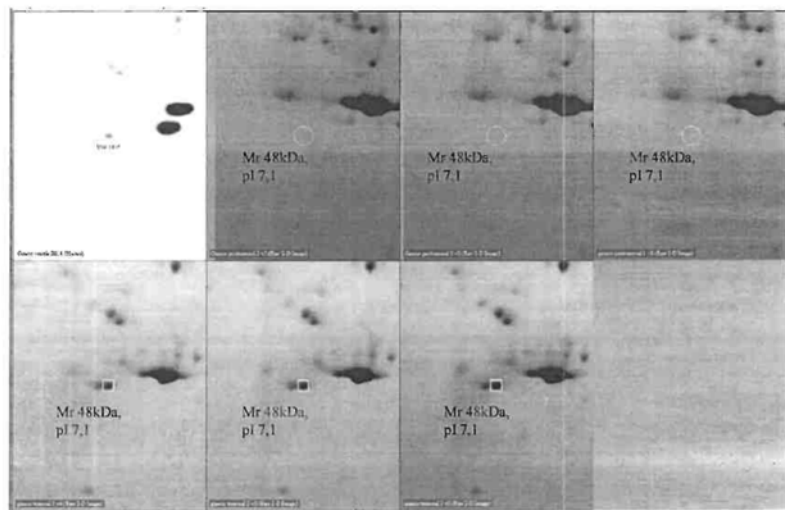


Fig. 2

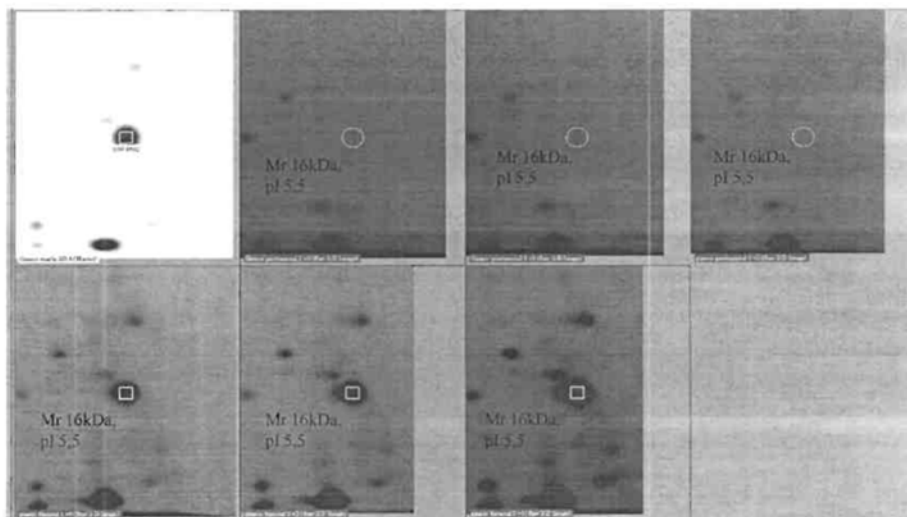


Fig. 3

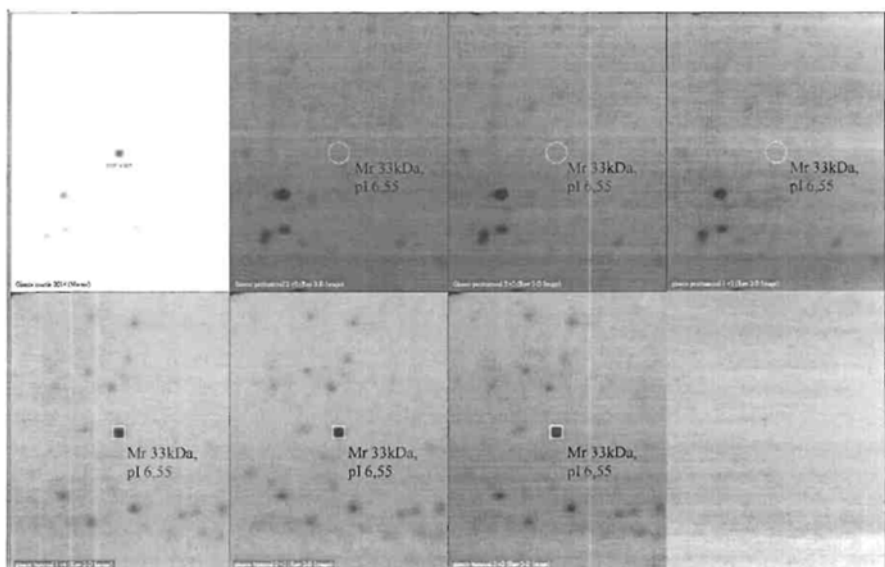


Fig. 4

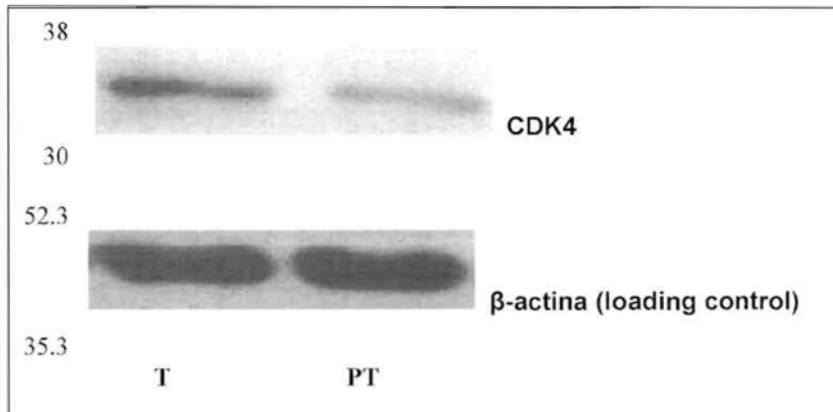


Fig. 5

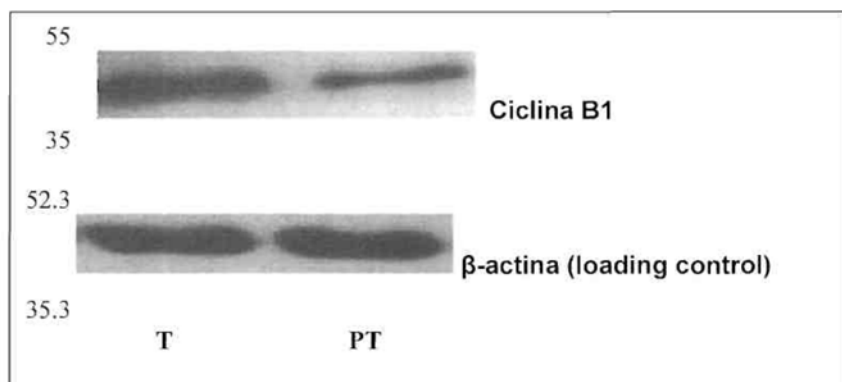


Fig. 6

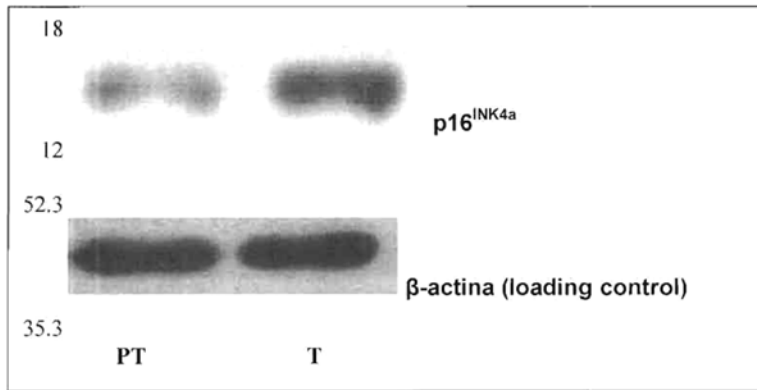


Fig. 7

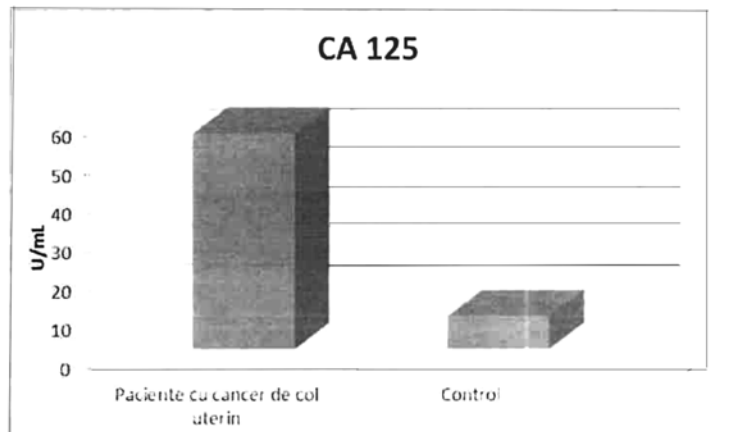


Fig. 8

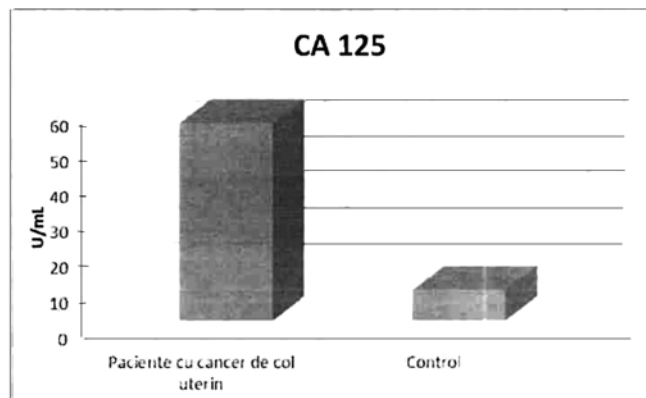


Fig. 8

