

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901986581A1

Publication Date

20130412

Applicant

XEPTAGEN S.P.A.

Title

METODO PER DIAGNOSTICARE LA PRESENZA DI CANCRO ALLA
PROSTATA

XEPTAGEN S.P.A. - VENEZIA**TITOLO****METODO PER DIAGNOSTICARE LA PRESENZA
DI CANCRO ALLA PROSTATA**

5

DESCRIZIONE**Riassunto**

Il presente brevetto descrive un metodo per diagnosticare la presenza di cancro alla prostata. Il metodo è in grado di rilevare la presenza del cancro alla prostata in una popolazione di uomini. Sulla base della presente
10 invenzione il metodo comprende le fasi di (a) determinazione della quantità di PSA-IgM presente in un campione biologico del soggetto; (b) determinazione della quantità di PSA totale presente in un campione biologico del soggetto; (c) determinazione della quantità di PSA libero presente in un campione biologico del soggetto; (d) determinazione del
15 volume prostatico del soggetto; (e) definizione dell'età del soggetto; (f) correlazione della presenza o meno del cancro alla prostata nel soggetto in esame con un valore predeterminato e stabilito con campioni di pazienti con diagnosi di cancro alla prostata o malattia benigna conosciuta sulla base della combinazione matematica di tutte o alcune delle quantità elencate nei
20 punti a. b. c. d. e.

Background dell'invenzione

Una delle principali cause di morte per tumore nel sesso maschile, secondo solo al cancro al polmone, è il cancro alla prostata (PCa); un uomo su nove di età superiore ai 65 anni è affetto da cancro alla prostata (Abate-Shen and
25 Shen, Genes Dev, 2000, 14:2410; Ruijter *et al.*, Endocr Rev, 1999, 20:22).

Gli strumenti più comunemente utilizzati per verificare la presenza del cancro alla prostata sono, rispettivamente, l'esplorazione digito-rettale (DRE) e il test dell'antigene-prostatico specifico (PSA), che è ritenuto un marcatore per il cancro alla prostata in quanto secreto esclusivamente dalle cellule prostatiche. Un elevato livello sierico di PSA può indicare la presenza di PCa. Una prostata sana produce solitamente una quantità stabile ed in genere inferiore ai 4 nanogrammi per millilitro, mentre le cellule tumorali producono quantità crescenti che dovrebbero corrispondere alla gravità del cancro. Un livello di PSA compreso tra 4 e 10 ng/ml può sollevare il sospetto che un paziente sia affetto da cancro alla prostata, mentre livelli superiori a 50 ng/ml indicano con maggior sicurezza la presenza di PCa in stadio avanzato.

La biopsia effettuata con prelievi multipli in varie regioni della prostata rappresenta il metodo di riferimento per la formulazione di una diagnosi di cancro alla prostata.

Il tipo di trattamento dipende dallo stadio a cui si trova il tumore. Gli uomini con un'aspettativa di vita inferiore ai 10 anni che hanno un punteggio di Gleason basso e un tumore localmente confinato alla prostata, spesso non ricevono alcun trattamento. I trattamenti per i tumori più aggressivi comprendono quelli chirurgici come la prostatectomia radicale (RP), in cui la prostata è completamente rimossa (con o senza metodica nerve-sparing) oppure il trattamento radiante, applicato attraverso un fascio di radiazioni diretto verso la prostata (radioterapia) o tramite ioni radioattivi a basso dosaggio che vengono impiantati all'interno della prostata per uccidere le cellule tumorali a livello locale (brachiterapia). La terapia ormonale anti-

androgeno viene impiegata da sola o, preferibilmente, in combinazione con la chirurgia o la radioterapia. La terapia ormonale utilizza analoghi LH-RH (luteinizing hormone-releasing hormones), che bloccano la produzione di testosterone da parte dell'ipofisi. Una volta iniziata la terapia, i pazienti sono sottoposti ad iniezioni di analoghi LH-RH per il resto della vita.

5

Mentre i trattamenti chirurgici ed ormonali sono spesso efficaci per il cancro alla prostata localizzato, uno stadio avanzato della malattia resta sostanzialmente incurabile. L'inibizione della produzione degli androgeni è la terapia più comune per PCa avanzati e determina l'apoptosi delle cellule maligne androgeno-dipendenti e la temporanea regressione del tumore. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, il tumore ricompare e può proliferare indipendentemente dai segnali degli androgeni (tumore ormone-resistente).

10

L'avvento dello screening dell'antigene prostatico specifico ha portato ad un incremento delle diagnosi di PCa ma ha significativamente ridotto le morti associate a questo tipo di cancro. Tuttavia, solo nel 20-30% degli individui sottoposti a biopsia viene riscontrato il cancro. (Kantoff and Talcott, Hematol. Oncol. Clinics N Amer, 1994, 8(3): 555)

15

Infatti, una limitazione importante del test del PSA sierico è il basso livello di specificità al cancro alla prostata soprattutto nella fascia intermedia di rilevazione del PSA (4-10 ng / ml). Inoltre, elevati livelli sierici di PSA sono spesso trovati in pazienti con patologie benigne come l'iperplasia prostatica benigna (BPH) e le prostatiti, fornendo informazioni dubbie riguardo alla possibile presenza del tumore.

20

Per incrementare il valore predittivo positivo del test del PSA sono state sviluppate strategie alternative che includono la normalizzazione con l'età,

25

la determinazione del rapporto di PSA libero su quello totale, la correlazione con il volume prostatico (PSA density) e il calcolo del tasso di cambiamento dei valori di PSA nel tempo (PSA velocity).

5 Ad ogni modo, la sensibilità nella diagnosi del PCa rimane scarsa, e l'utilizzo su ampia scala del PSA come primo strumento per la rilevazione del cancro ha portato ad un drammatico aumento del numero di biopsie prostatiche effettuate (Jacobsen *et al.*, JAMA, 1995, 274:1445), con un inevitabile aumento di campioni bioptici con risultato negativo.

10 Risulta evidente quindi come sia indispensabile l'identificazione di nuovi biomarcatori e/o parametri diagnostici supplementari nella diagnosi del cancro alla prostata.

I depositari della presente invenzione hanno precedentemente identificato un nuovo biomarcatore per il cancro alla prostata, PSA-IgM, ovvero l'immunocomplesso costituito da PSA e IgM (European Application N° EP 10182565 e domanda divisionale PCT /IT04/583, Beneduce *et al.* Cancer Prevent Detect., 2007, 31: 402-407). Questo nuovo biomarcatore presenta una specificità nel rilevamento del cancro alla prostata maggiore rispetto all'uso di PSA.

20 Si è ora sorprendentemente trovato che la specificità di rilevamento del cancro alla prostata con PSA-IgM può essere ulteriormente aumentata correlando i valori di PSA-IgM con i valori di PSA libero e PSA totale e altri parametri fisiologici, come per esempio, l'età del paziente e il volume prostatico.

25 Costituisce quindi un primo oggetto della presente invenzione un metodo per la diagnosi del cancro alla prostata, per mezzo, ma non esclusivamente,

della combinazione di marcatori circolanti e parametri fisiologici.

Nella presente invenzione, con diagnosi del cancro alla prostata si intende la capacità di distinguere soggetti affetti da cancro alla prostata da quelli con malattie benigne. Le malattie benigne includono iperplasia prostatica benigna, prostatiti ed altre sindromi benigne correlate alla prostata.

5

Il metodo comprende le seguenti fasi:

- a. Determinazione della quantità di PSA-IgM presente in un campione biologico del soggetto;
- b. Determinazione della quantità di PSA totale presente in un
- c. Determinazione della quantità di PSA libero presente in un
- d. Determinazione del volume prostatico del soggetto;
- e. Definizione dell'età del soggetto.

10

- f. Correlazione con la presenza o meno del cancro alla prostata nel soggetto in esame ad un valore predeterminato e stabilito con campioni di pazienti con diagnosi di cancro alla prostata o malattia benigna conosciuta sulla base della combinazione matematica di tutte o alcune delle quantità elencate nei punti a. b. c. d. e.

20

Sulla base della presente invenzione il campione biologico può essere un qualsiasi liquido fisiologico, tra cui, a titolo di esempio, sangue, siero, plasma, liquido seminale e urine.

Per la determinazione delle diverse forme di PSA, comprese quelle complessate con le IgM, sono impiegati preferibilmente, ma non

25

esclusivamente, saggi di tipo immunometrico.

Il volume prostatico del soggetto viene determinato preferibilmente, ma non esclusivamente, attraverso l'ecografia prostatica transrettale oppure il valore stimato al DRE. A titolo di esempio la stima del volume prostatico espressa
5 in ml può essere determinata considerando la forma della prostata come un ellissoide come segue: $0.523 \times \text{larghezza (cm)} \times \text{altezza (cm)} \times \text{lunghezza (cm)}$. La larghezza e l'altezza vengono misurate sul piano assiale mentre la lunghezza su quello sagittale nel punto di massimo diametro.

In conformità con l'applicazione della presente invenzione, l'intervallo di
10 accettabilità del PSA totale è compreso tra 0 e 100 ng/ml ma è preferibilmente superiore a 4 ng/ml, o superiore a 2 ng/ml per soggetti con familiarità al cancro alla prostata.

In conformità con l'applicazione della presente invenzione, l'intervallo di accettabilità del volume prostatico è compreso tra 10 e 300 ml.

15 In conformità con l'applicazione della presente invenzione, con la dicitura PSA-IgM si intende qualsiasi forma di PSA complessata con le immunoglobuline di classe M (IgM).

In conformità con l'applicazione della presente invenzione, la procedura di correlazione potrebbe riguardare la sola quantità di PSA-IgM oppure una
20 combinazione matematica tra PSA-IgM con una o più delle seguenti quantità: PSA totale, PSA libero, volume prostatico, età del soggetto, PCA3, forme precursori e/o inattive del PSA, ma non solo. La combinazione matematica può espletarsi attraverso diverse funzioni quali addizione, sottrazione, divisione, moltiplicazione, logaritmo, esponenziale,
25 inclusione/esclusione secondo valori predefiniti o la combinazione di questi.

Costituisce quindi un secondo oggetto della presente invenzione la combinazione matematica

che può essere suddivisa nei seguenti 4 stadi:

5 Stadio 1 – inclusione/esclusione: per pazienti con PSA-IgM/PV > 40 la probabilità predittiva per il cancro alla prostata (stadio 4) è del 90%.

Stadio 2 - normalizzazione: i livelli di PSA-IgM possono essere normalizzati (PSA-IgM_{norm}) con età e volume prostatico del paziente in esame come segue:

$$\text{PSA IgM}_{\text{norm}} = \frac{1}{(\beta_{21} \cdot \text{PSA IgM})^{\beta_{22}}} \cdot \left(\frac{1}{(\beta_{31} \cdot \text{PV})^{\beta_{32}}} - \frac{1}{\text{Ln}(\beta_{41} \cdot \text{PV})^{\beta_{42}}} \right) \cdot (\beta_{11} \cdot \text{Age})^{\beta_{12}}$$

10 Stadio 3 - logit: i valori di PSA-IgM e quelli di PSA totale possono essere combinati secondo un modello di regressione logistica permettendo di ottenere un indice predittivo per il cancro alla prostata (iXi) come segue:

$$iXi = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{PSA IgM}_{\text{norm}} + (\beta_{21} \cdot (\text{tPSA} + 0.1))^{\beta_{22}}$$

15 Stadio 4 - probabilità: infine, la probabilità predittiva per il cancro alla prostata (iXip) può essere rappresentata come segue:

$$iXip = \frac{1}{1 + e^{-iXi}}$$

Questo metodo, pur non escludendo altre forme di associazione e/o correlazione, permette di combinare matematicamente PSA-IgM con il PSA totale, il volume prostatico e l'età al fine di generare un indice e una
20 probabilità predittiva per il cancro alla prostata, definito come iXip, che ha un intervallo tra 0% e 100%, viene calcolato per ogni paziente e può essere utilizzato per diagnosticare la presenza di cancro alla prostata. Quindi, in funzione dell'indice iXip determinato, i pazienti possono essere suddivisi in base alla loro percentuale di rischio di tumore secondo la tabella 1, di
25 seguito riportata.

Tabella 1: correlazioni tra rischio di presenza del cancro alla prostata e indice iXip.

Rischio	iXip
Molto Basso	<20.0%
Basso	20.0% – 30.0%
Medio	30.0% – 50.0%
Alto	50.0% – 80.0%
Molto Alto	>80%

Costituisce quindi un terzo oggetto della presente invenzione l'esclusione dei pazienti dalla procedura bioptica nel caso in cui l'indice iXip sia minore del 20%.

5

Costituisce quindi un quarto oggetto della presente invenzione la certezza di biopsia positiva per la presenza di cancro alla prostata nel caso in cui l'indice iXip sia maggiore dell'80%.

Esempi

10 Esempio 1: Analisi sierica di pazienti con cancro alla prostata o patologie benigne e creazione di un profilo unico del paziente.

Materiali e metodi

Pazienti di sesso maschile con sospetto clinico di cancro alla prostata sono stati sottoposti ad ecografia trans-rettale (TRUS) guidata con uno schema di campionamento standardizzato.

15

Criteri popolazione

I criteri di inclusione sono stati i seguenti: livelli elevati di PSA totale (> 4,00 ng /ml o > 2,5 ng /ml per familiarità), alta cinetica del PSA (> 0,75 ng / ml / anno), esame digito-rettale sospetto, esame TRUS dubbio per neoplasia.

20

I criteri di esclusione sono stati i seguenti: neoplasie concomitanti, malattie autoimmuni, infezioni attive, terapia steroidea, terapia immunosoppressiva.

Determinazione dei parametri diagnostici

Gli esami digito rettali sono stati ritenuti positivi in caso di nodularità o indurimento della prostata o se l'esaminatore sospettava la presenza di cancro sulla base di altri criteri tra cui l'asimmetria (Friedman *et al.*, Lancet, 1991, 337(8756):1526-9).

5 Il volume della prostata (PV) di ogni paziente è stato valutato mediante l'esame TRUS. La stima del volume è stata calcolata considerando la prostata come un ellissoide e il volume (ml) è determinato dalla seguente formula: $0,523 \times \text{larghezza (cm)} \times \text{altezza (cm)} \times \text{lunghezza (cm)}$ (Terris *et al.*, J Urol., 1991, 145:984-7). Larghezza e altezza vengono misurate sui
10 piani assiali mentre la lunghezza cranio-caudale su piani sagittali al loro massimo diametro. Per tutti i pazienti, i campioni di siero sono stati raccolti poco prima della biopsia.

Saggi immunoenzimatici

15 Le concentrazioni di PSA-IgM sono state determinate con il kit Prostate-IC (XG007 – Xeptagen SpA). Le concentrazioni sono state rappresentate secondo una scala arbitraria definita nel kit (AU/ml)

Le concentrazioni di PSA totale e libero, rappresentante in ng/ml, sono state determinate per mezzo di saggi immunometrici chemiluminescenti (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

20 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software R versione 2.12.0 (Fondazione R per il calcolo statistico). Per tutti i confronti statistici, un valore di $p < 0,05$ è stato accettato come statisticamente significativo.

25 La correlazione tra variabili quali marcatori tumorali e parametri diagnostici è stata definita secondo il metodo di Pearson.

Livelli di marker tumorali e parametri diagnostici tra PCa e gruppi di pazienti con patologie benigne sono stati confrontati utilizzando il test Mann-Whitney.

5 Per ogni marcatore è stata costruita la curva ROC (receiver operating characteristic) che ha permesso di calcolare l'AUC (area sotto la curva ROC) (Bewick *et al.*, Crit Care, 2005, 9(1):112-8).

Le AUC hanno permesso di confrontare due marcatori (DeLong *et al.*, Biometrics, 1988, 44(3):837-45).

Risultati

10 La mancanza di correlazione lineare tra PSA-IgM e PSA totale, PSA libero, volume prostatico ed età si può evincere dalle figure 1, 2, 3 e 4. In tabella 2 viene riportato inoltre il valore p che stabilisce che nessun marcatore o parametro diagnostico è significativamente correlabile al PSA-IgM (p-value > 0.05). Questo dimostra che l'insieme di PSA-IgM, PSA totale, PSA libero,
15 volume prostatico ed età rappresenta un profilo unico del paziente e l'utilizzo combinato di tali parametri può permettere una più accurata diagnosi di cancro alla prostata rispetto ai metodi attualmente impiegati nella pratica clinica.

20 Le curve ROC e le analisi sono state effettuate su circa 400 campioni di siero con diagnosi di cancro o patologie benigne, con PSA totale maggiore di 4 ng/ml o 2.5 ng/ml in caso di familiarità nei quali è stata inoltre determinata la concentrazione di PSA-IgM e PSA libero.

Per ogni paziente sono stati inoltre misurati i seguenti parametri diagnostici: volume prostatico e DRE.

25 I valori di ciascun marcatore e parametro diagnostico sono stati inseriti nel

programma R al fine di generare un'analisi della curva ROC.

L'area sotto la curva ROC è il metodo più usato per valutare la prestazione (in termini di accuratezza diagnostica) di un marcatore come strumento di previsione del cancro. Più alto è il valore di AUC e migliore è l'accuratezza diagnostica del marcatore. L'intervallo della AUC va da 0,5 (incapacità di distinguere pazienti affetti da tumore dai controlli) a 1,0 (un test perfetto con un valore predittivo del 100%).

Nella maggior parte dei casi, l'obiettivo delle analisi dell'AUC è quello di massimizzare la capacità di discriminazione dei pazienti con il cancro al fine di ridurre al minimo le biopsie a coloro che non hanno il cancro (falsi positivi). Quando si analizzano campioni biologici come il PSA totale sierico per predire il cancro, c'è un equilibrio tra il rilevamento di veri positivi e falsi positivi. Per esempio, a seconda del risultato desiderato, può essere preferibile rilevare il 95% dei tumori, ma, a causa della scarsa capacità diagnostica dei marcatori attualmente utilizzati in pratica clinica questo intervallo è inevitabilmente accompagnato da un alto tasso di falsi positivi per i pazienti affetti da patologie benigne.

Gli esempi indicati di seguito hanno lo scopo di dimostrare il valore e l'efficacia del PSA-IgM in combinazione con il PSA totale, il PSA libero, il volume prostatico e l'età del paziente in un dato insieme di criteri, ma gli usi e i cut-off per questi parametri non si limitano a questi esempi. Inoltre, la rappresentazione del profilo del paziente e la loro combinazione con il PSA-IgM può essere integrata con tutti i marcatori e/o parametri diagnostici che non correlano significativamente quali, a titolo di esempio, PCA3, tutti i precursori del PSA e BPSA, ma non solo.

Tabella 2: correlazione tra PSA-IgM e PSA totale, PSA libero, Volume Prostatico ed età in circa 400 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne.

Marcatore	Marcatore	R di pearson	p-value
PSA-IgM	PSA totale	0.0311	0.505
PSA-IgM	PSA libero	0.0942	0.197
PSA-IgM	Volume Prostatico	0.0510	0.302
PSA-IgM	Età	0.0250	0.589

5

Esempio 2: Analisi sierica di uomini con cancro alla prostata e patologie benigne

Seguendo gli stessi criteri indicati nell'esempio 1, i parametri quali PSA-IgM, PSA totale, Volume prostatico ed età, sono stati determinati in una coorte di 197 pazienti.

10

La AUC del PSA totale è di 0.561 e non permette, in alcun punto della curva, di discriminare pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

La combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età, genera una AUC di 0.731 che è sufficientemente elevata da discriminare i pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

15

In figura 5 è possibile osservare che la curva ROC della suddetta combinazione è in tutti i punti nettamente superiore alla curva del PSA libero; inoltre, selezionando opportunamente il cut-off per mezzo della combinazione di PSA-IgM con gli altri parametri, è possibile identificare un certo numero di pazienti con patologie benigne senza escludere alcun paziente con cancro alla prostata.

20

Questo esempio dimostra come la combinazione di PSA-IgM con il PSA

totale, il volume prostatico e l'età permetta di identificare pazienti non affetti da cancro e il suo utilizzo nella pratica clinica, pur non essendo limitato a questa sola applicazione, possa essere utile nel ridurre il numero di biopsie con esito negativo del 7,1% (iXip < 20%) senza escludere alcuna biopsia positiva o del 19,8% (iXip < 30%) con una perdita di biopsie positive del 2,0%.

Esempio 3: Analisi sierica di uomini con cancro e patologie benigne aventi una concentrazione di PSA totale tra 4 e 10 ng/ml

10 Seguendo gli stessi criteri indicati nell'esempio 1, i parametri quali PSA-IgM, PSA totale, Volume prostatico ed età, sono stati determinati in una coorte di 120 pazienti.

La AUC del PSA totale è di 0.513 e non permette, in alcun punto della curva, di discriminare pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

15 La combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età, genera una AUC di 0.772 che è sufficientemente elevata da discriminare i pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

In figura 6 è possibile osservare che la curva ROC della suddetta combinazione è, in tutti i punti, nettamente superiore alla curva del PSA libero; inoltre, selezionando opportunamente il cut-off per mezzo della combinazione di PSA-IgM con gli altri parametri, è possibile identificare un certo numero di pazienti con patologie benigne senza escludere alcun paziente con cancro alla prostata.

20 Una limitazione importante del test del PSA totale sierico è la mancanza di
25 sensibilità e di specificità al cancro alla prostata soprattutto nella fascia tra 4

e 10 ng/ml.

Questo esempio mostra come la combinazione di PSA-IgM con il PSA totale, il volume prostatico e l'età permetta di identificare pazienti non affetti da cancro che hanno un valore di PSA compreso tra 4 e 10 ng/ml e il suo
5 utilizzo nella pratica clinica, pur non essendo limitato a questa sola applicazione, possa essere utile nel ridurre il numero di biopsie con esito negativo del 9,2% senza escludere alcuna biopsia positiva o del 21,7% con una perdita di biopsie positive dello 0,8%.

10 Esempio 4: Analisi sierica di uomini con cancro alla prostata e patologie benigne aventi una concentrazione di Total PSA maggiore di 10 ng/ml
Seguendo gli stessi criteri indicati nell'esempio 1, i parametri quali PSA-IgM, PSA totale, Volume prostatico ed età, sono stati determinati in una coorte di 42 pazienti.

15 La AUC del PSA totale è di 0.632 e non permette, in alcun punto della curva, di discriminare pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.
La combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età, genera una AUC di 0.810 che è sufficientemente elevata da discriminare i pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

20 In figura 7 è possibile osservare che la curva ROC della suddetta combinazione è in tutti i punti nettamente superiore alla curva del PSA libero; inoltre, selezionando opportunamente il cut-off per mezzo della combinazione di PSA-IgM con gli altri parametri, è possibile identificare un
25 certo numero di pazienti con patologie benigne senza escludere alcun paziente con cancro alla prostata.

Questo esempio mostra come la combinazione di PSA-IgM con il PSA totale, il volume prostatico e l'età permette di identificare pazienti non affetti da cancro e come il suo utilizzo nella pratica clinica, pur non essendo limitato a questa sola applicazione, possa essere utile nel ridurre il numero di biopsie con esito negativo del 9,5% senza escludere alcuna biopsia positiva.

Esempio 5: Analisi sierica di uomini con cancro alla prostata e patologie benigne che hanno un'età inferiore ai 60 anni

10 Seguendo gli stessi criteri indicati nell'esempio 1, i parametri quali PSA-IgM, PSA totale, Volume prostatico ed età, sono stati determinati in una coorte di 37 pazienti.

La AUC del PSA totale è di 0.586 e non permette, in alcun punto della curva, di discriminare pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

15 La combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età, genera una AUC di 0.836, sufficientemente elevata da discriminare i pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

In figura 8 è possibile osservare che la curva ROC della suddetta combinazione è, in tutti i punti, nettamente superiore alla curva del PSA libero; da ciò si evince che, selezionando opportunamente il cut-off per mezzo della combinazione di PSA-IgM con gli altri parametri, è possibile identificare un certo numero di pazienti con patologie benigne senza escludere alcun paziente con cancro alla prostata.

25 Un'applicazione molto importante nella diagnosi del cancro alla prostata è quella di identificare tale patologia in pazienti con un'aspettativa di vita

maggiore di 10 anni e in cui il tumore ha maggior aggressività e, pertanto, in soggetti con età generalmente inferiore a 60 anni.

5 Questo esempio mostra come la combinazione di PSA-IgM con il PSA totale, il volume prostatico e l'età permetta di identificare correttamente i pazienti non affetti da cancro e il suo utilizzo nella pratica clinica, pur non essendo limitato a questa sola applicazione, possa essere utile nel ridurre il numero di biopsie con esito negativo del 27,0% senza escludere alcuna biopsia positiva.

10 Esempio 6: Analisi sierica di uomini con cancro alla prostata e patologie con esame digito-rettale sospetto positivo.

Seguendo gli stessi criteri indicati nell'esempio 1, i parametri quali PSA-IgM, PSA totale, Volume prostatico ed età, sono stati determinati in una coorte di 75 pazienti.

15 La AUC del PSA totale è di 0.645 e non permette, in alcun punto della curva, di discriminare pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

La combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età, permette di avere una AUC di 0.753, sufficientemente elevata da discriminare i pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

20 In figura 9 è possibile osservare che la curva ROC della suddetta combinazione è, in tutti i punti, nettamente superiore alla curva del PSA libero; inoltre, selezionando opportunamente il cut-off per mezzo della combinazione di PSA-IgM con gli altri parametri, è possibile identificare un certo numero di pazienti con patologie benigne senza escludere alcun
25 paziente con cancro alla prostata.

Nella corrente pratica clinica tutti i pazienti con esame digito-rettale positivo e PSA totale maggiore di 4 ng/ml sono sottoposti a biopsia.

5 Questo esempio mostra come la combinazione di PSA-IgM con il PSA totale, il volume prostatico e l'età permetta di identificare pazienti non affetti da cancro e il suo utilizzo nella pratica clinica, pur non essendo limitato a questa sola applicazione, possa essere utile nel ridurre il numero di biopsie con esito negativo del 9,3% senza escludere alcuna biopsia positiva o del 13,3% con una perdita di biopsie positive del 1,3%.

10 Esempio 7: Analisi sierica di uomini con cancro alla prostata e patologie con un volume prostatico maggiore di 60 ml

Seguendo gli stessi criteri indicati nell'esempio 1, i parametri quali PSA-IgM, PSA totale, Volume prostatico ed età, sono stati determinati in una coorte di 55 pazienti.

15 La AUC del PSA totale è di 0.608 e non permette, in alcun punto della curva, di discriminare pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

La combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età, genera una AUC di 0.851 che è sufficientemente elevata da discriminare i pazienti con cancro da quelli con altre patologie benigne.

20 In figura 10 è possibile osservare che la curva ROC della suddetta combinazione è, in tutti i punti, nettamente superiore alla curva del PSA libero; inoltre, selezionando opportunamente il cut-off per mezzo della combinazione di PSA-IgM con gli altri parametri, è possibile identificare un certo numero di pazienti con patologie benigne senza escludere alcun
25 paziente con cancro alla prostata.

Studi pubblicati dimostrano che patologie benigne quali l'ipertrofia prostatica benigna causano un incremento del volume prostatico e, in aggiunta a ciò, è chiaro che volumi prostatici considerevoli possono far insorgere dubbi al momento della diagnosi di carcinoma.

5 Questo esempio mostra come la combinazione di PSA-IgM con il PSA totale, il volume prostatico e l'età permetta di identificare pazienti non affetti da cancro e il suo utilizzo nella pratica clinica, pur non essendo limitato a questa sola applicazione, possa essere utile nel ridurre il numero di biopsie con esito negativo del 25,5% senza escludere alcuna biopsia positiva.

10

Esempio 8: Analisi sierica di uomini con cancro alla prostata e patologie benigne

Seguendo gli stessi criteri indicati nell'esempio 1, i parametri quali PSA-IgM, PSA libero, Volume prostatico ed età, sono stati determinati in una

15 coorte di 151 pazienti.

La AUC del PSA totale è di 0.557 e non permette, in alcun punto della curva, di discriminare pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

La combinazione tra PSA-IgM, PSA libero, volume prostatico ed età, genera una AUC di 0.752, sufficientemente elevata da discriminare i

20 pazienti con cancro da quelli con patologie benigne.

In figura 11 è possibile osservare che la curva ROC della suddetta combinazione è, in tutti i punti, nettamente superiore alla curva del PSA libero; inoltre, selezionando opportunamente il cut-off per mezzo della combinazione di PSA-IgM con gli altri parametri, è possibile identificare un

25 certo numero di pazienti con patologie benigne senza escludere alcun

paziente con cancro alla prostata.

Questo esempio rivela un modalità di combinazione alternativa rispetto all'esempio 3 che permette ugualmente di identificare pazienti non affetti da cancro e il suo utilizzo nella pratica clinica, pur non essendo limitato a questa sola applicazione, possa essere utile nel ridurre il numero di biopsie con esito negativo del 18,5% con una perdita di biopsie positive del 1,3%.

5

Descrizione delle figure

Figura 1: correlazione tra PSA-IgM [AU/ml] e Volume Prostatico [ml] in circa 400 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne.

10

Figura 2: correlazione tra PSA-IgM [AU/ml] e PSA totale [ng/ml] in circa 400 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne.

Figura 3: correlazione tra PSA-IgM [AU/ml] e PSA libero [ng/ml] in circa 400 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne.

15

Figura 4: correlazione tra PSA-IgM [AU/ml] e Età in circa 400 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne.

Figura 5: curva ROC tra 197 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne di una possibile combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età (CB) e del PSA totale.

20

Figura 6: curva ROC tra 120 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne di una possibile combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età (CB) e del PSA totale.

Figura 7: curva ROC tra 42 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne di una possibile combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età (CB) e del PSA totale.

25

Figura 8: curva ROC tra 37 pazienti con cancro alla prostata e patologie

benigne di una possibile combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età (CB) e del PSA totale.

Figura 9: curva ROC tra 75 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne di una possibile combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età (CB) e del PSA totale.

5

Figura 10: curva ROC tra 55 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne di una possibile combinazione tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età (CB) e del PSA totale.

Figura 11: curva ROC tra 151 pazienti con cancro alla prostata e patologie benigne di una possibile combinazione tra PSA-IgM, PSA libero, volume prostatico ed età (CB) e del PSA totale.

10

Discussione

Questi esempi dimostrano che il PSA-IgM in combinazione con PSA totale, PSA libero, età e volume prostatico permette di incrementare l'accuratezza diagnostica rispetto al PSA totale.

15

Abbiamo precedentemente dimostrato che il PSA-IgM permette di rilevare con maggiore accuratezza la presenza del cancro in popolazioni di pazienti a rischio rispetto al PSA totale (European Application N° EP 10182565 e domanda divisionale PCT /IT04/583, Beneduce *et al.* Cancer Prevent Detect., 2007, 31: 402-407), il quale viene utilizzato come marcatore di riferimento nei pazienti a rischio.

20

Al fine di migliorare le capacità di identificazione del cancro alla prostata è stato sorprendentemente scoperto che la combinazione del PSA-IgM con marcatori ad esso non significativamente correlabili, che permettono quindi di delineare un profilo unico del paziente, garantisce un significativo

25

aumento dell'accuratezza diagnostica fornendo così una maggior performance nella discriminazione dei pazienti con cancro da quelli con altre patologie benigne.

5 Questa nuova e sorprendente scoperta suggerisce una complessa relazione tra PSA-IgM e vari marcatori e parametri diagnostici del paziente in esame; inoltre, l'accuratezza diagnostica del marcatore combinato può essere applicata a qualsiasi valore di PSA totale garantendo una vasta gamma di applicazioni cliniche.

10 Gli esempi forniti hanno il solo scopo di dimostrare l'applicabilità della combinazione di PSA-IgM con altri marcatori a patto che non siano significativamente correlabili, verso l'individuazione del cancro alla prostata, e di suggerire alcuni esempi rilevanti di applicazione, ma questi esempi non hanno lo scopo di limitare altre potenziali applicazioni.

15 Pertanto con riferimento alla descrizione che precede e alle tavole accluse si esprimono le seguenti rivendicazioni.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per distinguere il cancro alla prostata da patologie benigne della prostata in un soggetto qualunque, **caratterizzato dal fatto** di comprendere la combinazione di due o più parametri clinici del soggetto per
5 la determinazione del rischio di cancro alla prostata, dove uno di detti parametri clinici è la quantità di PSA-IgM presente in un campione biologico del soggetto, combinato con almeno un ulteriore parametro clinico non significativamente correlabile al PSA-IgM, tra cui la quantità di PSA totale e/o il volume prostatico dell'oggetto e/o l'età del paziente e/o un altro
10 parametro.
2. Metodo come da rivendicazione 1, **caratterizzato dal fatto** di comprendere le fasi di:
- a. Determinazione della quantità di PSA-IgM presente in un campione biologico del soggetto;
 - 15 b. Determinazione di almeno uno di detti parametri clinici del soggetto non significativamente correlabile al PSA-IgM;
 - c. Combinazione matematica di detto valore di PSA-IgM con uno o più di detti parametri clinici del soggetto, definendo un indice o valore predittivo;
 - 20 d. Correlazione tra detto indice o valore predittivo e un valore predeterminato e stabilito con campioni di pazienti con diagnosi di cancro alla prostata o patologia benigna conosciuta;
 - e. Determinazione del rischio di cancro alla prostata basato su detta correlazione.
- 25 3. Metodo, come da rivendicazioni 1, 2, caratterizzato dal fatto che

detti parametri clinici determinabili del soggetto comprendono un qualsiasi marcatore significativamente non correlabile al PSA-IgM, come PSA libero, PCA3, tutti i precursori del PSA, BPSA, eccetera.

5 **4.** Metodo, come da rivendicazioni 1, 2, 3, caratterizzato dal fatto che detta combinazione matematica determina un valore di probabilità predittiva per il cancro alla prostata secondo un indice denominato $iXip$,

10 **5.** Metodo, come da rivendicazione 4 dove per mezzo di detto indice $iXip$ è possibile identificare i soggetti che saranno negativi al prelievo biptico per la presenza di cancro alla prostata e/o i soggetti che saranno positivi al prelievo biptico per la presenza di cancro alla prostata.

6. Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione matematica è tra PSA-IgM e volume prostatico.

7. Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione matematica è tra PSA-IgM e PSA totale.

15 **8.** Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione matematica è tra PSA-IgM, PSA totale e volume prostatico.

9. Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione matematica è tra PSA-IgM, PSA totale, volume prostatico ed età.

20 **10.** Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione matematica è tra PSA-IgM, PSA totale e PSA libero.

11. Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione matematica è tra PSA-IgM, PSA totale, PSA libero e volume prostatico.

12. Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione matematica è tra PSA-IgM e un precursore del PSA.

25 **13.** Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui la combinazione

matematica è tra PSA-IgM, un precursore del PSA e il volume prostatico.

14. Metodo, come da rivendicazioni precedenti, in cui i criteri per includere il soggetto sono:

- il valore di PSA totale maggiore di 2.5 ng/ml; oppure
- 5 • il valore di PSA totale è maggiore di 4 ng/ml; oppure
- il valore di PSA totale è compreso tra 2.5 e 10 ng/ml; oppure
- il valore di PSA totale è compreso tra 4 e 10 ng/ml; oppure
- il valore di PSA totale è maggiore di 10 ng/ml; e/o
- il volume prostatico è maggiore di 60 ml; e/o
- 10 • l'età è minore di 60 anni; e/o
- l'esame digito-rettale è positivo per la presenza di cancro alla prostata; e/o
- il rapporto tra PSA libero e PSA totale è compreso tra 1 e 50%; oppure
- il rapporto tra PSA libero e PSA totale è superiore al 20%; oppure
- 15 • il rapporto tra PSA libero e PSA totale è superiore al 25%.

CLAIMS

1. Method for distinguishing prostate cancer from benign prostate disease in a subject whatever, **characterized in that** it comprises the combination of two or more clinical parameters of the subject to
5 determine the risk of prostate cancer, where one of these clinical parameters is the quantity of PSA-IgM occurring in a biological sample of the subject, combined with at least one additional clinical parameter that is not significantly correlated with PSA-IgM, including the quantity of total PSA and/or the prostate volume and/or age of the patient and/or
10 another parameter.
2. Method according to claim 1, characterized in that it comprises the steps of:
 - a. Determination of the quantity of PSA-IgM occurring in a biological sample of the subject;
 - 15 b. Determination of at least one of said clinical parameters of the subject that are not significantly correlated with PSA-IgM;
 - c. Mathematical combination of said value of PSA-IgM with one or more of said clinical parameters of the subject, defining an index or predictive value;
 - 20 d. Correlation between this index or predictive value and a predetermined and established value with samples from patients with diagnosis of prostate cancer or known benign disease;
 - e. Determination of the risk of prostate cancer based on said correlation.
- 25 3. Method, according to claims 1, 2, characterized in that said clinical

parameters determined from the subject include any marker not significantly correlated with PSA-IgM, as free PSA, PCA3, all precursors of the PSA, BPSA, and so on.

- 5 **4.** Method, according to claims 1, 2, 3, characterized in that said mathematical combination determines a predictive probability value for prostate cancer according to an index called iXip,
- 5.** Method, according to claim 4 where by using said index iXip is possible to identify subjects who will be negative at biopsy for the presence of prostate cancer and/or those subject who will be positive at biopsy for the presence of prostate cancer.
- 10 **6.** Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM and prostate volume.
- 7.** Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM and total PSA.
- 15 **8.** Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM, total PSA and prostate volume.
- 9.** Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM, total PSA, prostate volume and age.
- 10.** Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM, total PSA and free PSA.
- 20 **11.** Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM, total PSA, free PSA and prostate volume.
- 12.** Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM and a precursors of the PSA.
- 25

13. Method, according to previous claims, where the mathematical combination is between PSA-IgM, a precursors of the PSA and prostate volume.

14. Method, according to previous claims, where the criteria to include the subject are:

5

- the value of total PSA is greater than 2.5 ng/ml; or
- the value of total PSA is greater than 4 ng/ml; or
- the value of total PSA is between 2.5 and 10 ng/ml; or
- the value of total PSA is between 4 and 10 ng/ml; or

10

- the value of total PSA is greater than 10 ng/ml; and/or
- the prostate volume is greater than 60 ml; and/or
- the age is less than 60 years; and/or
- digital rectal examination is positive for the presence of prostate cancer; and/or

15

- the ratio of free PSA to total PSA is between 1 and 50%; or
- the ratio of free PSA to total PSA is greater than 20%; or
- the ratio of free PSA to total PSA is greater than 25%.

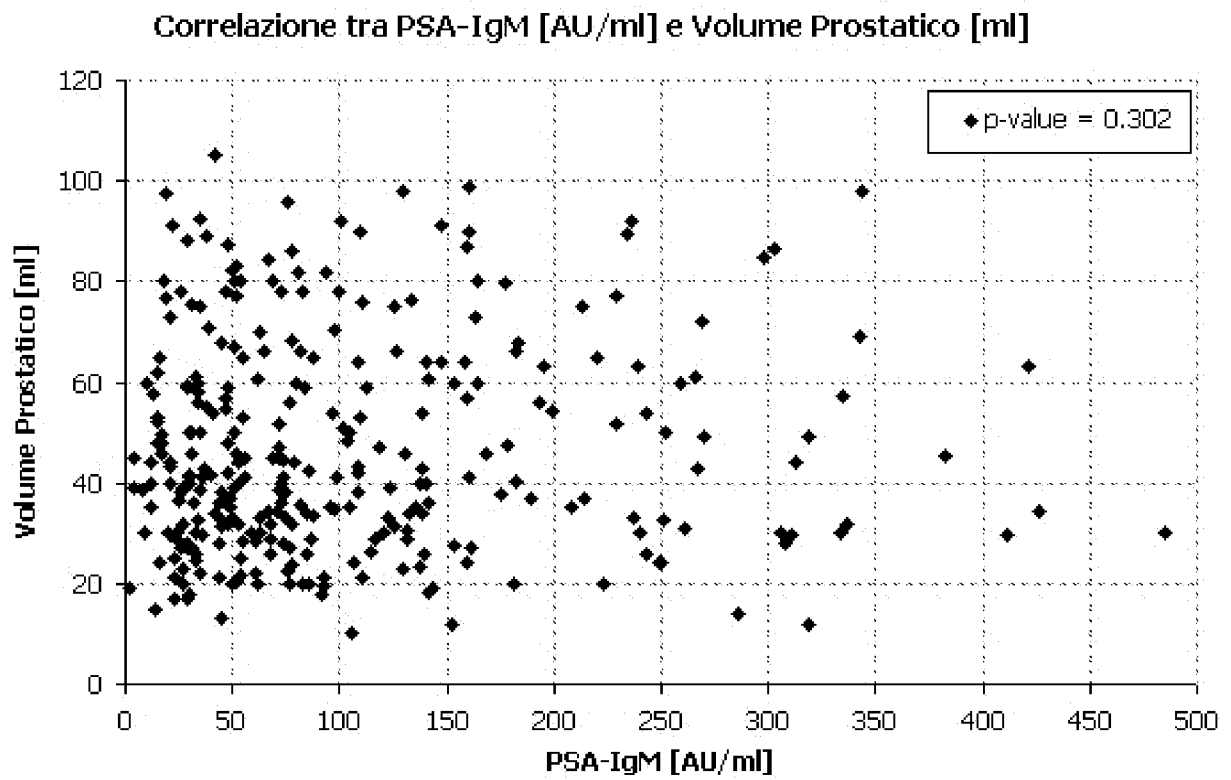


FIGURA 1

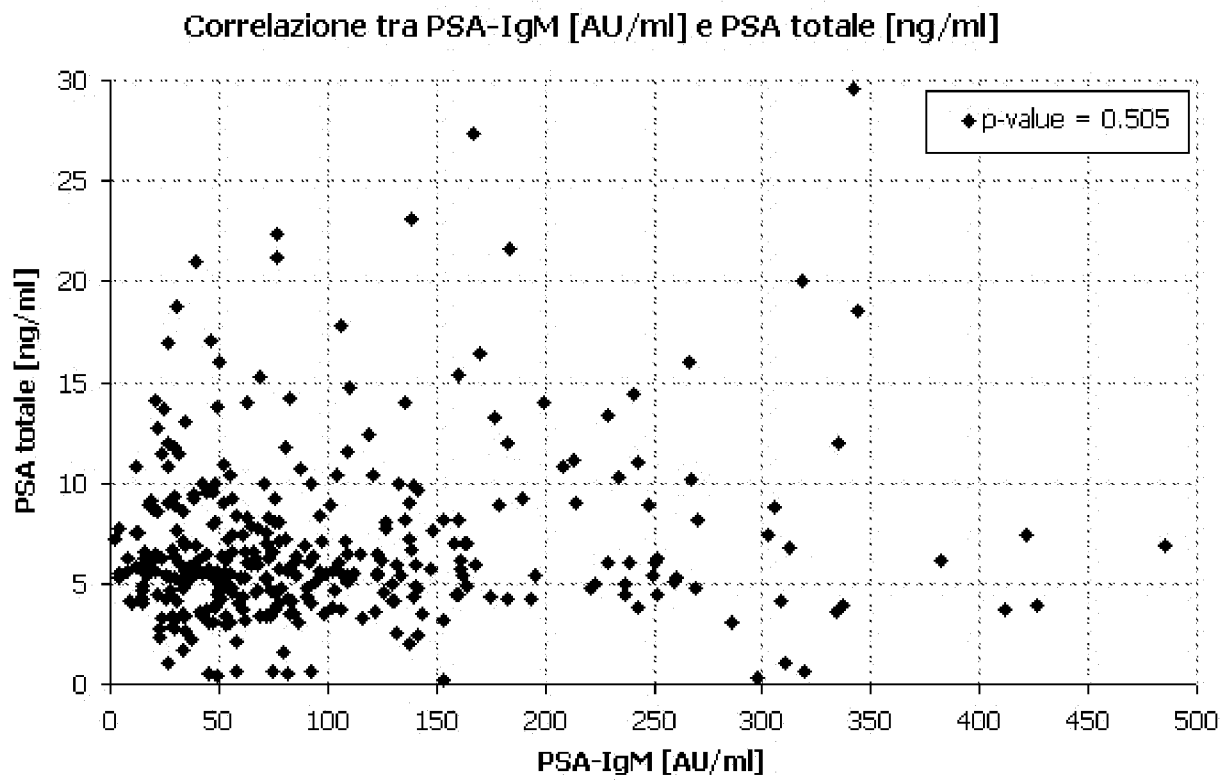


FIGURA 2

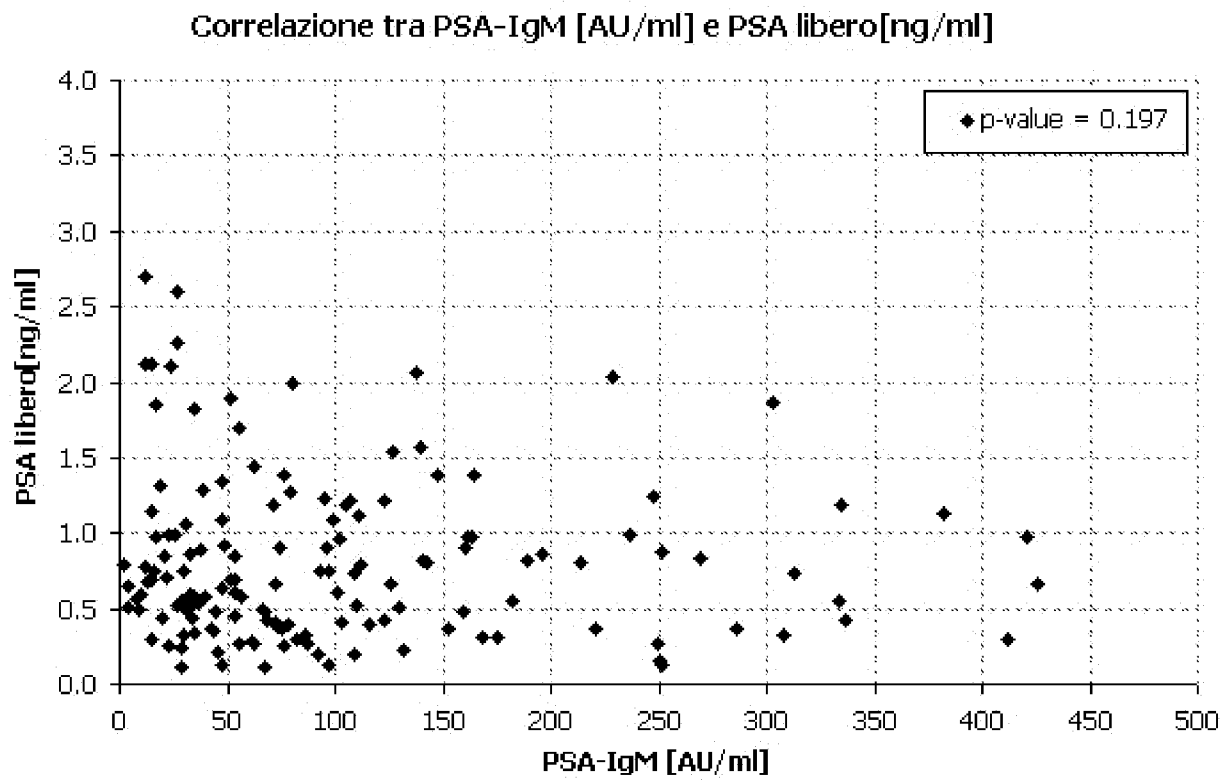


FIGURA 3

Correlazione tra PSA-IgM [AU/ml] e Età

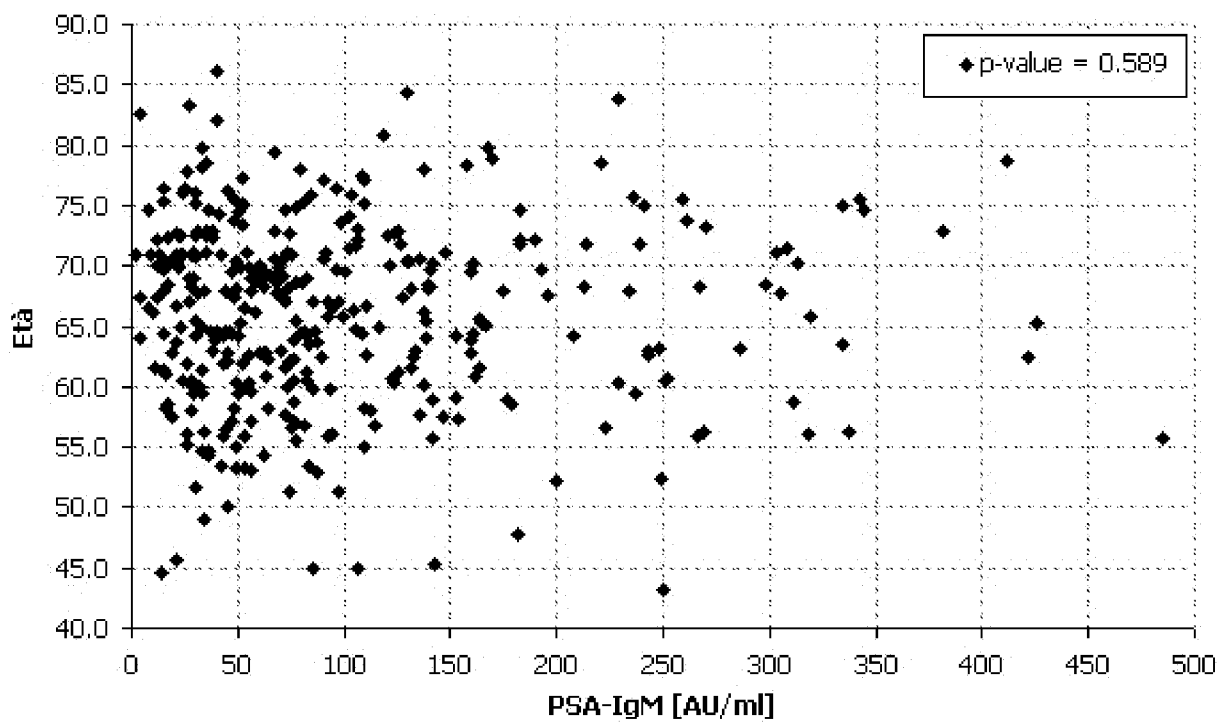


FIGURA 4

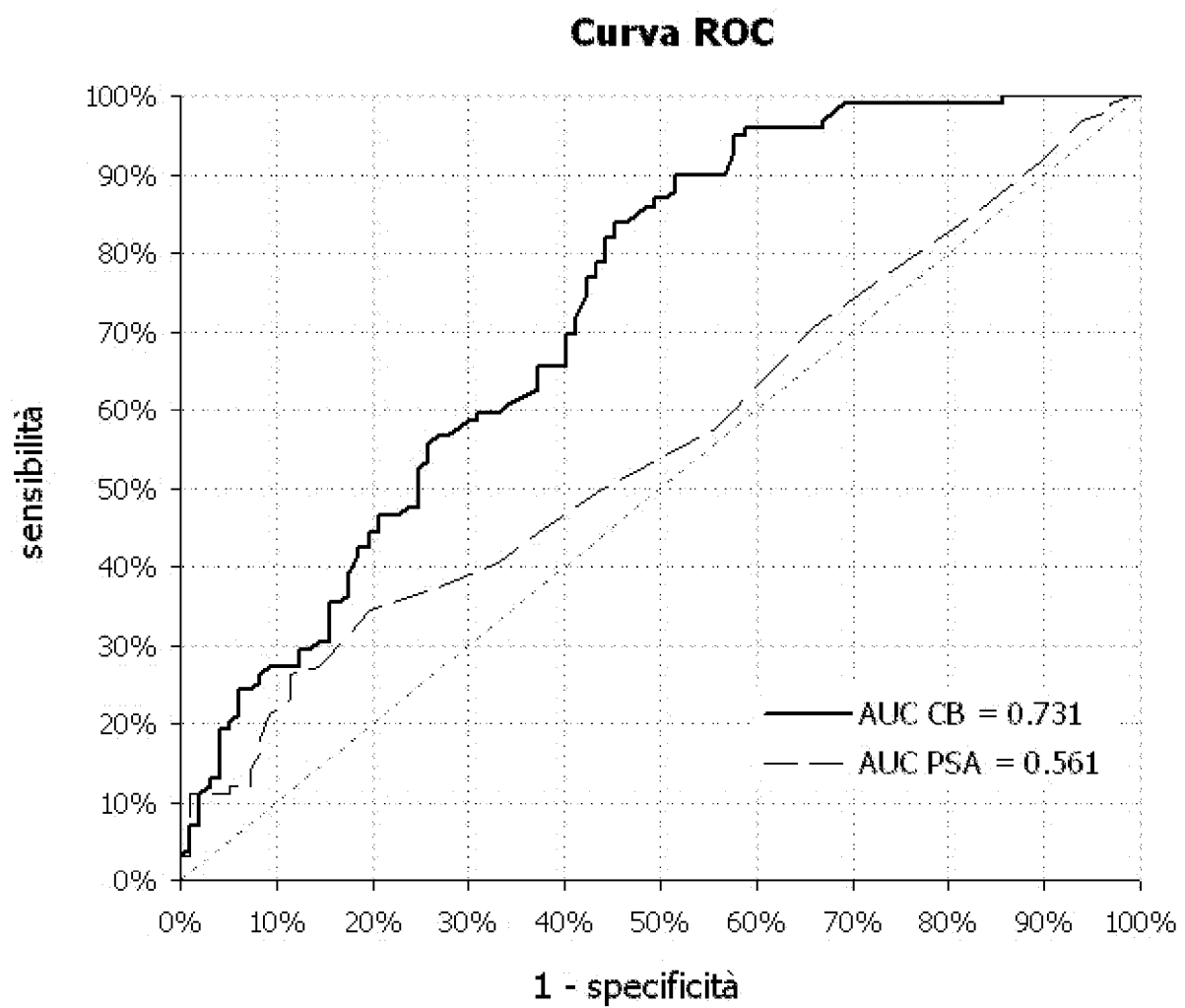


FIGURA 5

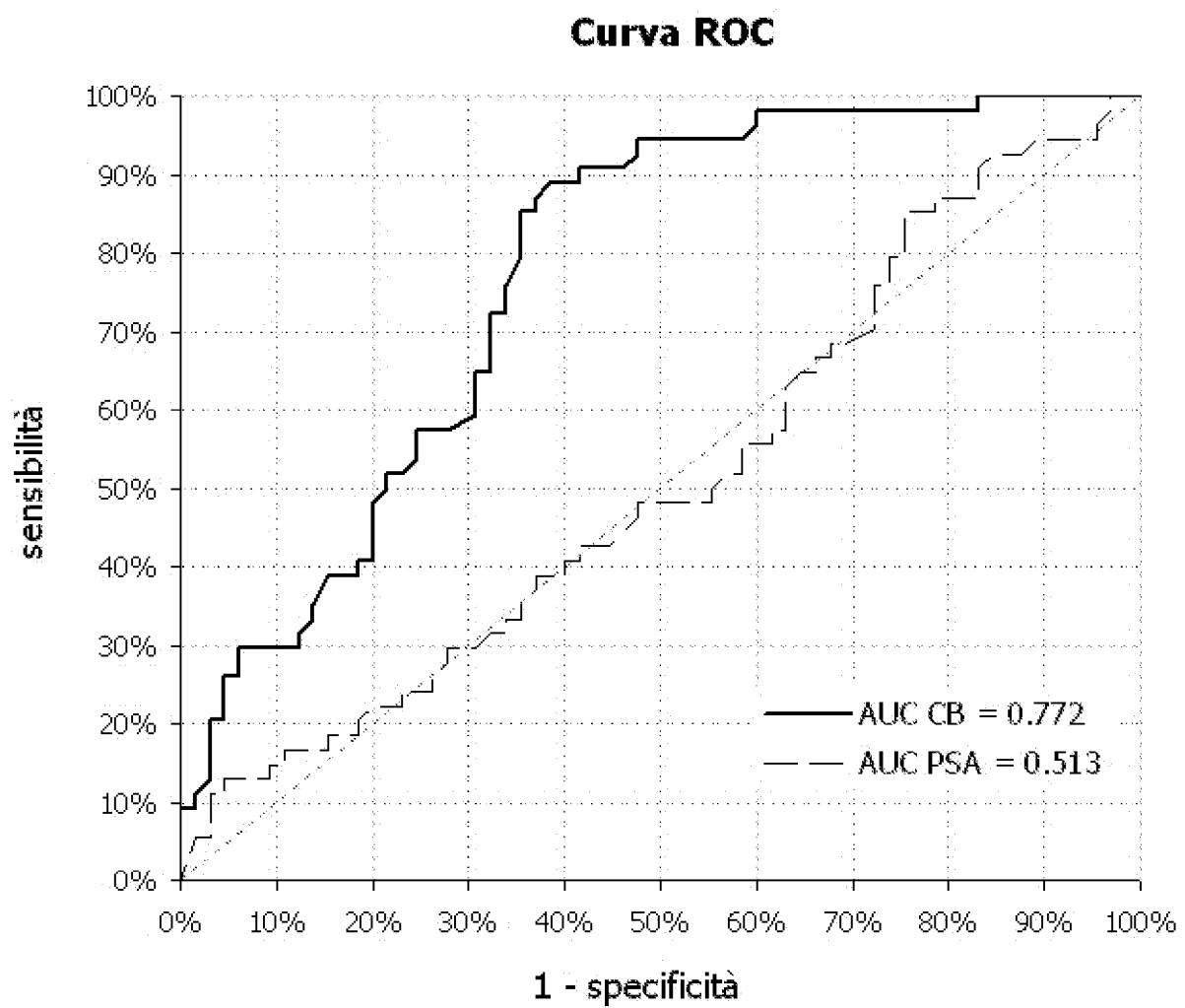


FIGURA 6

Curva ROC

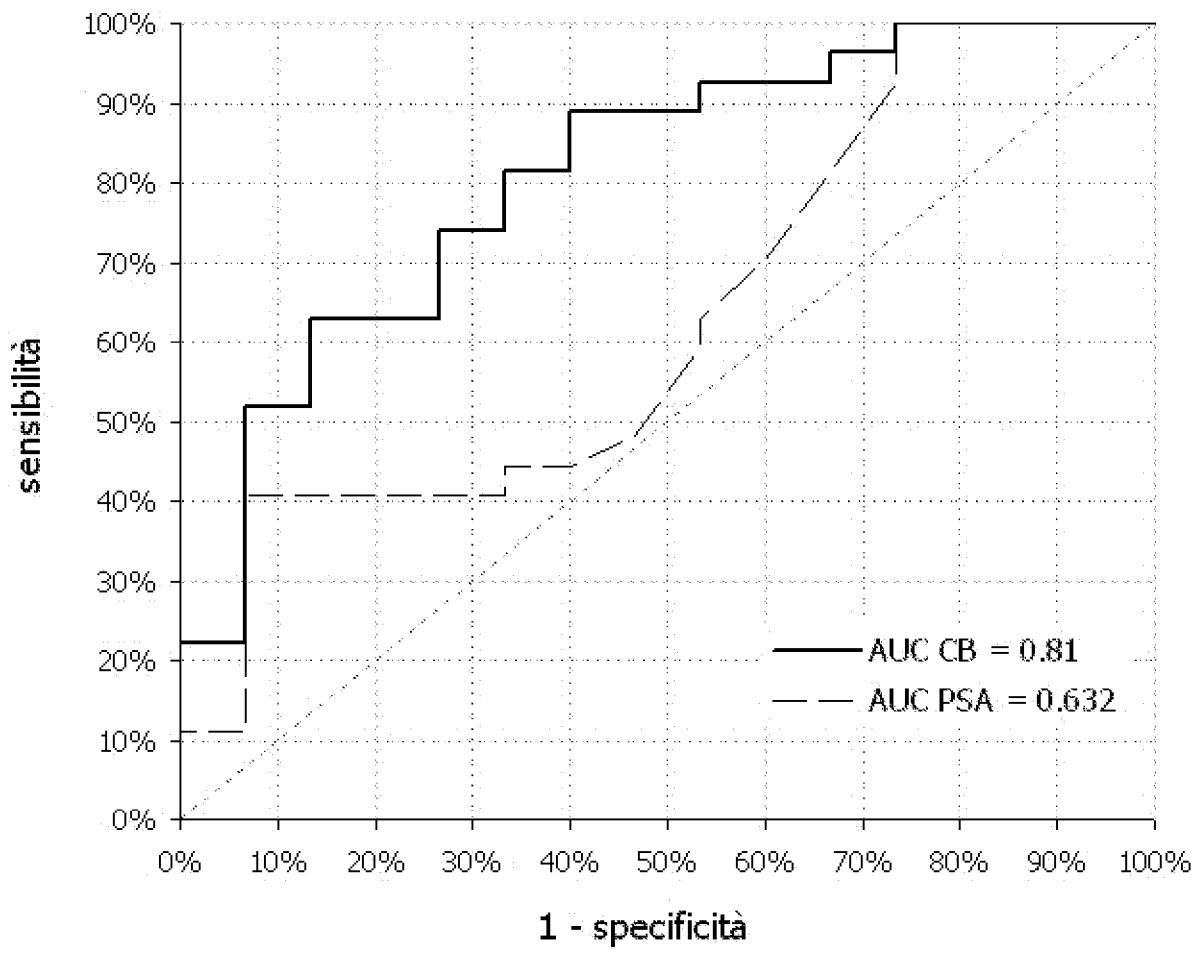


FIGURA 7

Curva ROC

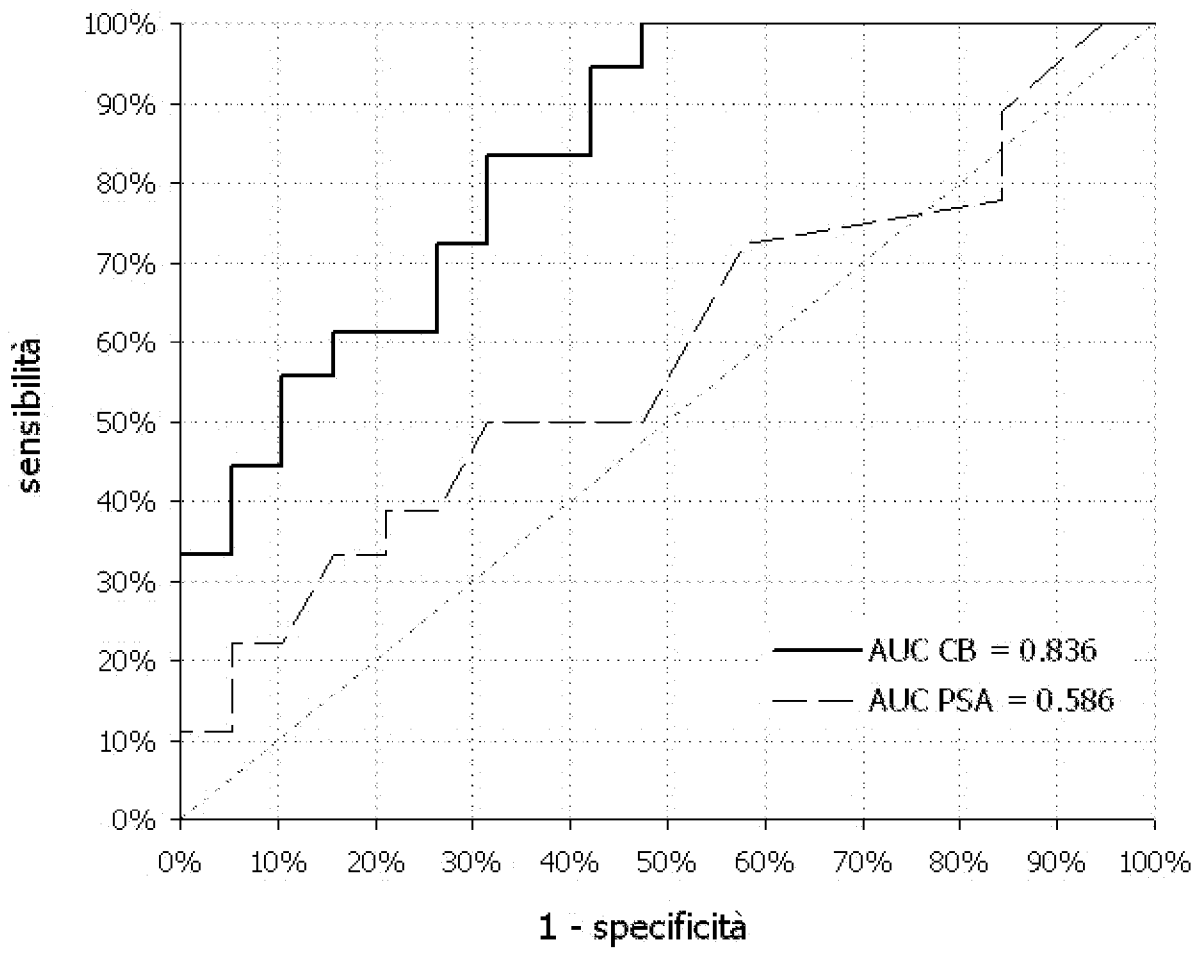


FIGURA 8

Curva ROC

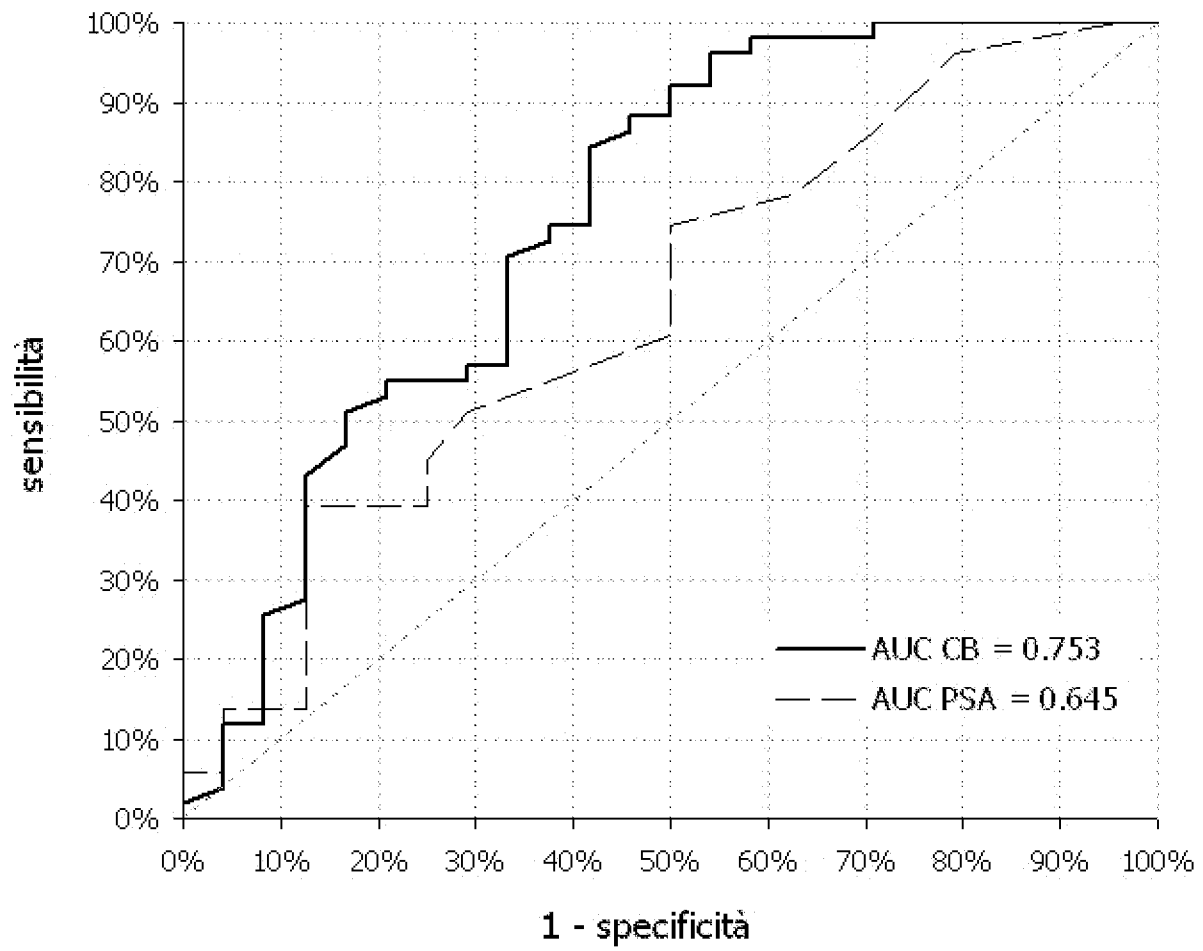


FIGURA 9

Curva ROC

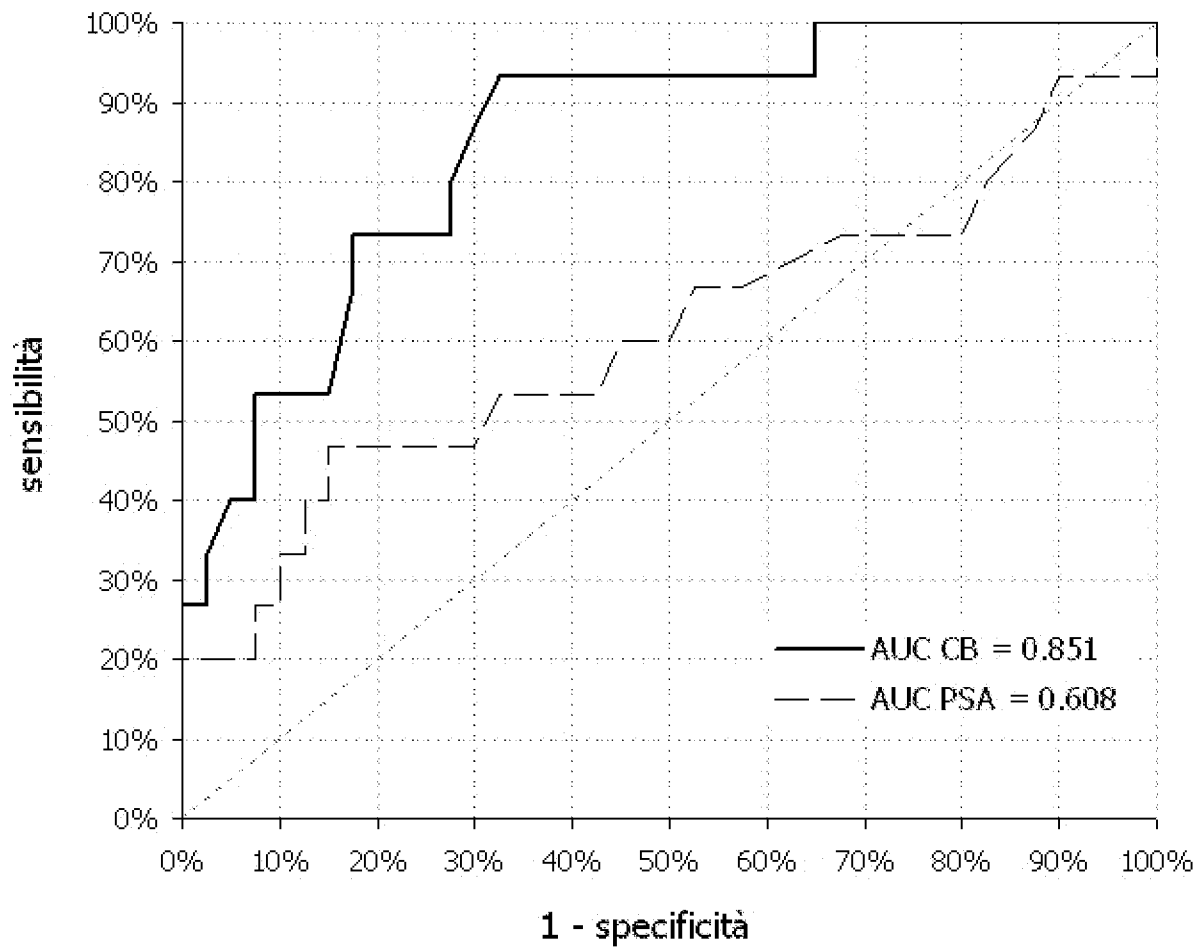


FIGURA 10

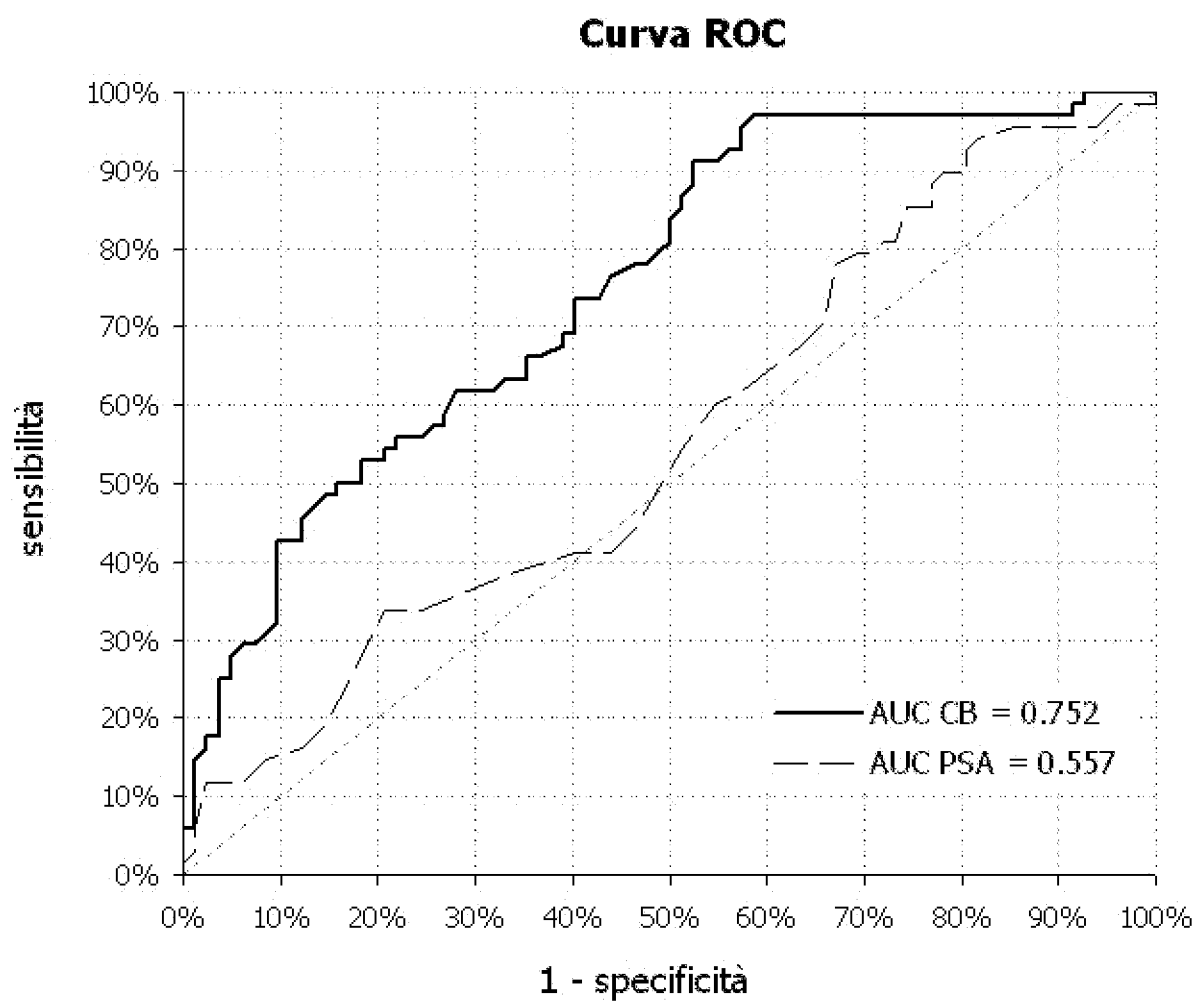


FIGURA 11