



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 716**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03785912 .1**

96 Fecha de presentación : **22.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1576187**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Procedimiento para determinar la cantidad de ADN circulante en plasma y la detección de cáncer.**

30 Prioridad: **23.12.2002 IT MI02A2743**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.02.2010**

73 Titular/es: **ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO  
E LA CURA DEI TUMORI**  
**Via Venezian, 1**  
**I-20133 Milano, IT**

72 Inventor/es: **Sozzi, Gabriella**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 332 716 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar la cantidad de ADN circulante en plasma y la detección de cáncer.

5 La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico precoz, pronóstico y monitorización de cáncer o para la determinación del riesgo de desarrollar cáncer. El procedimiento de la invención se basa en la cuantificación de ADN en una muestra de plasma mediante amplificación con PCR.

### 10 Técnica anterior

Un número de publicaciones científicas o de patente describe procedimientos para detectar cáncer basado en la identificación de alteraciones genéticas específicas de ADN o ARN circulante.

15 El documento US 5 496 699 desvela un procedimiento para detectar mutaciones en secuencias de ácido nucleico, en particular la secuencia del gen K-ras, en fluidos biológicos tales como sangre, suero o plasma.

20 El documento US 5 068 175 desvela un procedimiento para detectar la presencia de neoplasias malignas relacionadas con el oncogen ras en las que dicho gen se cuantifica en muestras de suero o plasma.

El documento WO01/42504 desvela la determinación de ácido nucleico extracelular, por ejemplo ADN de los genes K-ras y APC, en muestras de suero o plasma, para la evaluación del factor de riesgo relacionado con una serie de enfermedades neoplásicas.

25 El documento WO02/18652 desvela un procedimiento de detección cualitativa/cuantitativa de ARN telomerasa humana y ARN telomerasa transcriptasa inversa en plasma o suero para el diagnóstico, monitorización, tratamiento o evaluación de una serie de enfermedades neoplásicas.

30 En principio, los procedimientos para la caracterización molecular de alteraciones génicas tienen baja sensibilidad y requieren el análisis de un gran panel de marcadores génicos para obtener un nivel de información aceptable.

35 Recientemente se ha notificado un procedimiento para la cuantificación de ADN desnudo circulante en plasma en pacientes de cáncer de pulmón, basado en un ensayo colorimétrico capaz de discriminar entre pacientes y sujetos sanos, y de detectar la recidiva de la enfermedad durante el seguimiento (Sozzi, G. y col., Cancer Research 61, 4675-4678, Junio 15, 2001). No obstante, las técnicas colorimétricas (p. ej., tira reactiva para ADN) para la evaluación cuantitativa de ADN circulante están limitadas por una estrecha linealidad en el intervalo de 0,1-10 ng/ml y por una sensibilidad reducida a valores menores. Además, la lectura de la prueba depende de una evaluación subjetiva.

40 En un artículo más reciente (Hsueh-Wei Chang y col., Journal of the National Cancer Institute, Vol. 94, No. 22, 20 de noviembre de 2002) se ha sugerido en la análisis de la concentración de ADN en muestras de plasma y el análisis de SNP para la detección de una enfermedad neoplásica, en particular cáncer de ovario. La cuantificación del ADN se ha llevado a cabo mediante el análisis de la intensidad de la fluorescencia generada por el pigmento PicoGreen® unido a ADN bicatenario. Los resultados muestran que, al contrario que el análisis SNP, el procedimiento usado para medir la concentración de ADN en plasma es poco sensible y específico y, por tanto, no es adecuado para la detección selectiva de enfermedades neoplásicas en la población.

### Sumario de la invención

50 La presente invención proporciona un procedimiento para la determinación cuantitativa de ADN circulante total en una muestra de plasma de un paciente de cáncer, un sujeto susceptible de cáncer familiar o en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende:

55 1) extraer el ADN de la muestra;

60 2) añadir a la preparación de ADN: a) una mezcla de cebadores oligonucleotídicos adecuados para la amplificación por PCR de un fragmento del gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), y b) una sonda oligonucleotídica, que tiene al menos un inactivador y un fluoróforo indicador en los extremos 3' y 5', hibridando con una secuencia dentro de la región delimitada por los cebadores, en condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción de PCR,

65 3) añadir una ADN polimerasa termoestable con actividad exonucleasa 5'-3' y amplificar el fragmento del gen hTERT;

4) medir la fluorescencia producida.

## ES 2 332 716 T3

La cantidad relativa de ADN presente en la muestra analizada puede obtenerse con facilidad mediante los valores de fluorescencia detectados mediante interpolación de una curva de calibración obtenida con cantidades conocidas de ADN.

5 De acuerdo con una forma de realización preferida, se diseñan cebadores y sondas para amplificar el fragmento 13059-13156 del gen hTERT (nº de acceso en GenBank AF128893).

El procedimiento descrito, conocido como PCR en tiempo real, puede realizarse automáticamente usando el aparato GeneAmp 5700 Detection System (Applied Biosystem), que proporciona una amplificación cuantitativa precisa de ADN mediante monitorización óptica continua de la reacción de PCR fluorogénica y puede cuantificar hasta un equivalente a 1 genoma, correspondiente a 6 pg de ADN genómico.

El procedimiento de cuantificación de ADN circulante de acuerdo con la invención se puede aplicar al diagnóstico precoz, pronóstico o monitorización clínica de pacientes con diferentes tipos de cáncer, incluidos los cánceres de colon-recto, cabeza-cuello, hígado y páncreas, particularmente cáncer de pulmón. El procedimiento de la invención también se puede usar para la determinación del riesgo o la probabilidad de desarrollar cáncer en sujetos sanos expuestos a factores de riesgo ambiental o del estilo de vida, tal como, en el caso del cáncer de pulmón, el tabaquismo. Un incremento en el ADN en plasma de estos sujetos es predictor de un aumento del riesgo y, por tanto, debería urgir a repetir la prueba con una muestra de plasma independiente, o a realizar investigaciones clínicas exhaustivas y específicas.

### Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado un procedimiento *in vitro* sencillo y preciso para la determinación de la presencia de una enfermedad neoplásica o para la evaluación del riesgo relacionado con el desarrollo de cáncer, mediante cuantificación de ADN en plasma usando la técnica de PCR en tiempo real. Más precisamente, la invención proporciona un procedimiento para la cuantificación de ADN circulante mediante monitorización óptica continua de una reacción de PCR fluorogénica llevada a cabo en una muestra de plasma, usando como cebadoras y sondas oligonucleótidos que se acoplan con el gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). El índice de amplificación del hTERT se usa como una indicación de la cantidad total de ADN en la muestra analizada.

El procedimiento se ha validado en un estudio de casos y controles de tamaño grande (200 sujetos) con pacientes con cáncer de pulmón en estadio precoz, en los que se determinaron los niveles de ADN en plasma durante el seguimiento tras una resección del cáncer, y fumadores sanos de grandes cantidades con edad, sexo y hábitos de tabaquismo equivalentes. Los resultados del estudio muestran que 1) el procedimiento de la invención tiene elevadas especificidad y sensibilidad, como pone de manifiesto las curvas AUC y ROC (valor global: 0,94, intervalo 0,907-0,973) en pacientes, incluidos los que padecen cáncer en un estadio muy precoz (estadio IA), los valores de ADN circulante en plasma son aproximadamente 8 veces mayores que los encontrados en sujetos sanos, 3) en pacientes monitorizados durante el seguimiento de la resección del cáncer, los niveles de ADN disminuyen rápidamente hasta un valor similar al observado en sujetos sanos; en contraste con esto, se ha encontrado un incremento de hasta 20 veces en individuos con cáncer recurrente o metástasis.

Aunque la suma más elevada de la sensibilidad (90%), la especificidad (86%), valor predictor positivo (VPP-90%) y valor predictor negativo (PVN-90%) se obtuvo con un valor de concentración de ADN de 9 ng/ml, los intervalos de confianza (IC) alrededor de estos indicadores diagnósticos se superponen con los de las concentraciones adyacentes. Por tanto, la selección del punto de corte óptimo tendrá que tener en cuenta esta variabilidad. El valor de 25 ng/ml es el único punto de corte mostrado con sensibilidad que no se solapa con la de otros puntos de corte, aunque muestra una sensibilidad baja (46%, IC 95%, 36%, 56%).

La magnitud de OR (relaciones adversas) demuestra la fuerte asociación entre la concentración de ADN en plasma y el riesgo CPCNP, a pesar de los amplios límites de confianza. Nunca antes se habían notificado valores de CR similares para ningún marcador biológico y podrían ser de un beneficio considerable en la práctica clínica. En muestras de cualquier estadio y tamaño de tumor se observaron mayores cantidades de ADN circulante en plasma. Esto es particularmente relevante para lesiones pequeñas, cuya detección sistemática podría ayudar a reducir la morbilidad y mortalidad por cáncer de pulmón.

Un aspecto importante del análisis cuantitativo proporcionado por la invención es la posibilidad de seguir los cambios longitudinales tras la resección del cáncer. Los datos disponibles con 35 pacientes de cáncer mostraron una rápida disminución de los valores de ADN circulante tras resección pulmonar. Por el contrario, ningún nivel decreciente o creciente de ADN en plasma identificó sujetos con recurrencia de su enfermedad (24,7 ng/ml frente a 7,1 ng/ml en pacientes sin cáncer,  $p=0,002$ ), lo que sugiere que la cuantificación de ADN en plasma podría representar un nuevo enfoque para monitorizar los pacientes quirúrgicos o evaluar la eficacia del tratamiento tras quimiorradioterapia.

Para explorar la posible modulación de la liberación de ADN libre por exposición a tabaco se analizaron 20 sujetos que nunca habían sido fumadores mayores de 55 años de edad: la mediana de su valor de ADN fue de 0,61 ng/ml. El mismo análisis, llevado a cabo en el grupo de alto riesgo del estudio de casos y controles (fumadores de gran cantidad mayores de 50 años de edad, con exposición a tabaco > 20 paquetes/año) mostró un valor medio de 4,6 ng/ml. Estos resultados indican cantidades muy pequeñas de ADN circulante libre en personas no expuestas.

Los resultados de los estudios clínicos muestran la eficacia del procedimiento para la cuantificación de ADN circulante de la invención en el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón en sujetos de alto riesgo, en particular fumadores de grandes cantidades.

## 5 Descripción de las figuras

Figura 1. Gráficos de amplificación de la PCR cuantitativa en tiempo real para el hTERT en ADN en plasma de pacientes CPCNP (A) y muestras control (B). La cantidad relativa de ADN en plasma es muy superior en muestras de pacientes (gráficos de la izquierda) en comparación con los controles (gráficos de la derecha).

El cálculo de las cantidades de ADN en plasma se basa en el número de ciclo, en el que la fluorescencia de cada reacción pasa el umbral (TC), que se ha establecido en la fase geométrica de la amplificación por encima del fondo. El eje X indica el número de ciclo de una reacción de PCR cuantitativa. El eje Y indica el log de la intensidad de la fluorescencia por encima del fondo ( $\Delta Rn$ ).

Figura 2. Gráficos en caja de la concentración de ADN en plasma en casos CPCNP y controles equivalentes. La caja está unida por debajo y por encima por los percentiles del 25% y 75%, la mediana es la línea continua en la caja, las barras de error inferior y superior indican el 90% de los valores. Mini= valor mínimo detectado, máx= valor máximo detectado, de= desviación estándar.

Figura 3. Curvas ROC para el diagnóstico de CPCNP usando valores de ADN en plasma. La curva y el área bajo la curva (AUC) estimadas usando el procedimiento logístico en SAS (Cary, NC).

### *Materiales y procedimientos*

#### *Series de casos y controles*

Se evaluaron cien casos consecutivos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), 81 varones y 19 mujeres, no tratados previamente con quimioterapia e incluidos en el banco de tejidos del Instituto europeo de Oncología (IEO) desde el año 2000 al año 2001. Para cada caso se seleccionó un control, de sexo, edad y hábitos de tabaquismo equivalentes.

La media de edad  $\pm$  ds fue  $65,1 \pm 8,9$  años en los casos y  $64,1 \pm 8,2$  en los controles, la duración media del tabaquismo fue  $40,5 \pm 10,9$  años en los casos y  $41,7 \pm 9,5$  en los controles. La población incluyó 7 pares casos-controles de sujetos que nunca habían fumado. Los 93 controles grandes fumadores se seleccionaron entre los participantes en el programa de detección precoz del IEO, cuya TC espiral de tórax había sido negativa. Los controles no fumadores se reclutaron de donantes de sangre sanos en la unidad de inmunohematología del Instituto. El número de fumadores anteriores difirió ligeramente entre los casos y los controles (28 casos y 11 controles).

Un caso de fumador leve y ocasional (< 5 cigarrillos al día) se correspondió con uno que nunca había fumado antes. Una diferencia media dentro del par de 1 año en la edad fue estadísticamente significativa ( $p < 0,02$ ), lo que sugiere la necesidad de ajustar según la edad en el análisis del ADN en plasma como factor de riesgo.

#### *Recolección de muestras y aislamiento de ADN*

Una muestra de 7,5 ml de sangre periférica se recogió en EDTA de pacientes antes de la cirugía y de controles en el momento de la exploración mediante TC espiral y se almacenó a  $-140^\circ$ . La separación de plasma y la extracción de ADN se realizaron como se ha indicado anteriormente (25). El ADN purificado de 1 ml de plasma se eluyó en un volumen final de  $50 \mu\text{l}$  de agua. El análisis del ADN en plasma se realizó sin conocer el estado de los casos/controles.

#### *Cuantificación de ADN en plasma*

Para cuantificar el ADN circulante en plasma, los inventores usaron un enfoque de PCR cuantitativo en tiempo real basada en el método del nucleótido en 5'. Esta metodología se basa en la monitorización continua de una PCR fluorogénica progresiva mediante un sistema óptico (28,29). El sistema de PCR usa dos cebadores de amplificación y una sonda de hibridación adicional fluorogénica y específica de amplicón cuya secuencia diana se localiza dentro del amplicón.

La sonda está marcada con dos pigmentos fluorescentes. Una sirve como indicador en el extremo 5' (pigmento VIC<sup>TM</sup>). Su espectro de emisión se inactiva con un segundo pigmento fluorescente en el extremo 3' (TAMRA). Si se produce amplificación, la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa AmpliTaq<sup>©</sup> escinde el indicador de la sonda durante la fase de extensión, lo que lo libera del inactivador (30). El incremento resultante en la emisión fluorescente del pigmento indicador se monitoriza durante el procedimiento de PCR.

Los cebadores y las sondas se diseñaron para amplificar específicamente el gen ubicuo de interés, el gen de copia única de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) mapeado en 5p15.33. El tamaño del amplicón del gen hTERT fue de 98 pb (posición 13059-13156) de GenBank con el n° de registro AF128893). Las secuencias de los

## ES 2 332 716 T3

cebadores y de la sonda fueron las siguientes: cebador directo: 5'-GGC ACA CGT GGC TTT TCG-3'; cebador inverso: 5'-GGT GAA CCT CGT AAG TTT ATG CAA-3'; sonda VIC5'- TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG-3' TAMRA.

5 Las PCR fluorogénicas se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l en un sistema de detección GeneAmp<sup>®</sup> 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA). Las sondas y cebadores fluorogénicos fueron sintetizados a medida por Applied Biosystems. Cada mezcla de reacción de PCR constó de: 25  $\mu$ l de TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix Applied Biosystem; 0,67  $\mu$ l de la sonda [15 mM\*]; 0,45  $\mu$ l de cebador directo [10 mM]; 0,45  $\mu$ l de cebador inverso [10 mM]; 18,43  $\mu$ l de agua estéril. En cada reacción de PCR en tiempo real se usaron  
10 5  $\mu$ l de solución de ADN. El ciclado térmico se inició con una primera etapa de desnaturalización de 50°C durante 2 minutos y después a 95°C durante 10 minutos. El perfil térmico para la PCR fue de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Se analizaron los datos obtenidos durante 50 ciclos de amplificación.

15 Las amplificaciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en un sistema GeneAmp<sup>®</sup> 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Cada placa estaba compuesta por muestras de pacientes por triplicado y múltiples blancos con agua como control negativo. Para la construcción de la curva de calibración en cada placa, los inventores usaron un patrón de ADN genómico humano control TaqMan a 10 ng/ $\mu$ l (Applied Biosystem) con las diluciones en serie adecuadas a 50 ng, 5 ng, 2,5 ng, 0,5 ng, 250 pg, 50 pg y 10 pg. En cada experimento se obtuvo una amplificación lineal descendente hasta el punto de la última dilución que representa 10 pg del ADN diana (coeficiente de correlación  
20 0,999-0,995, pendiente 3,25-3,35).

Todos los datos se analizaron usando el software del sistema de detección Sequence Detection System de Applied Biosystem para interpolar la curva de amplificación estándar de ADN a una cantidad conocida con TC de amplificación de la muestra diana desconocida, de modo que se obtiene la cantidad relativa de ADN en la muestra experimental.

25 Para el estudio de seguimiento, se analizaron simultáneamente todas las muestras consecutivas de plasma para cada paciente en el experimento de PCR en tiempo real para permitir la cuantificación comparativa de las muestras durante el tiempo de observación.

### 30 *Procedimientos patológicos e inmunohistoquímicos*

Se disponía de datos clínico-patológicos de todos los casos. Había 58 adenocarcinomas, 34 carcinomas de células escamosas, 3 carcinomas de células grandes, 3 carcinomas pleomórficos y 2 carcinomas adenoescamosos. De acuerdo con la clasificación de la OMS del adenocarcinoma de pulmón (31), 19 mostraron un patrón de crecimiento acinal (32,6%), 19 papilar, 17 (29,3%) sólido y 3 (5,2%) bronquioalveolar. De acuerdo con el sistema revisado de estadiaje del cáncer de pulmón (32), el estadio del tumor fue pT1 en el 18%, pT2 en el 55%, pT3 en el 21% y pT4 en el 6%; el cuarenta y siete por ciento de los pacientes era pN0, el 20% pN1 y el 33% pN2 o N3. El estadio 3 representó un 34%, IIB un 25%, IIIA un 33% y IIIB/IVB un 8%. En tres casos el análisis se realizó únicamente en metástasis en ganglios mediastínicos.

40 En todos los casos, la aparición de necrosis tumoral o infiltrado linfocítico se evaluó de forma semi-cuantitativa en una escala desde ausente a 2+ (1+ si  $\leq$  50% y 2+ si  $>$  50% del tumor entero). Para el análisis inmunohistoquímica, en muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina obtenidas en la cirugía se investigaron marcadores relacionados con la apoptosis celular (p53) y del crecimiento tumoral (CD-177, Ki-67, y la densidad de los microvasos), de acuerdo  
45 con procedimientos previamente perfeccionados (33). Todos los casos se evaluaron de forma enmascarada sin conocimiento de la identidad de los pacientes, el diagnóstico patológico, el resultado clínico o el estado de ADN en plasma. El porcentaje de células tumorales inmunorreactivas con p-53, EGFR, CD117 y Ki-67 se evaluó mediante la puntuación de un mínimo de 1.000 células tumorales en campos representativos de inmunotinción. La neoangiogénesis tumoral se dedujo mediante inmunotinción con CD34 de las células endoteliales, tal como se ha descrito previamente  
50 (34).

### *Procedimientos estadísticos*

55 La distribución de los valores de ADN reveló una desviación de la normalidad que se mitigó usando una transformación logarítmica - El log de la concentración se usó con la finalidad de analizar, no obstante los valores no transformados se usaron para comunicar resultados.

Las relaciones adversas (OR) y los correspondientes intervalos de confianza del 95% se calcularon usando regresión logística condicional en SAS (Cary, NC, USA) para evaluar el ADN en plasma como factor de riesgo para CPCNP. Se generó una curva característica de receptor-operador (ROC) para evaluar el rendimiento diagnóstico de las concentraciones de ADN en plasma. Cada valor de ADN único se usó como punto de corte para calcular los valores de sensibilidad y especificidad que definen la curva y el área bajo la curva (AUC). Los errores estándar se estimaron por separado, tal y como se describe en van der Schouw (35) con el fin de proporcionar un intervalo de confianza del 95% para el área.

65 En los casos, la posible asociación de la concentración de ADN con parámetros clínicos y patológicos continuos se exploró calculando los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, en función de la distribución de los parámetros (es decir, la edad y la distribución del marcador EGFR respectivamente). La comparación de la mediana

de las concentraciones de ADN en plasma en pacientes con datos de seguimiento se realizó usando la prueba de Kruskal-Wallis.

### Resultados

#### 5 *Análisis cuantitativo de ADN circulante en plasma en pacientes con cáncer y controles*

La figura 1 muestra gráficos de amplificación de la intensidad de la fluorescencia frente al ciclo de PCR para muestras de plasma de pacientes con cáncer y controles equivalentes. Cada gráfico corresponde a la cantidad inicial de ADN diana presente en la muestra. Las curvas de amplificación se desplazaron hacia la derecha, lo que representa una reducción de la cantidad de ADN diana, que claramente distingue los controles de los pacientes de cáncer. La distribución de la concentración de ADN en plasma en los casos y en los controles equivalentes describe dos poblaciones de valores distintas, a pesar de algún solapamiento (Figura 2). La mediana de la concentración en los casos (24,3 ng/ml) fue casi ocho veces el valor detectado en los controles (3,1 ng/ml). Se observaron concentraciones muy elevadas sólo en los casos, mientras que en el otro extremo de la distribución se observaron algunos casos con concentraciones muy bajas de ADN (es decir, 0,5 ng/ml). Se observó una mayor variabilidad de ADN circulante en los casos que en los controles (véase la figura 2).

#### 20 *Concentración de ADN en plasma como factor de riesgo para CPCNP*

Una concentración elevada de ADN circulante en plasma se asoció con un mayor riesgo de CPCNP. La estratificación por terciles mostró que el riesgo aumentaba exponencialmente a la hora de comparar sujetos con concentraciones en plasma en el segundo y tercer tercil con aquéllos en el primer tercil usando regresión logística condicional (hasta 85 veces, Tabla 1). Cuando se analizaron como continuas, el incremento en una unidad del ADN en plasma (ng/ml) se asoció con un incremento del 21% en el riesgo de CPCNP (CR= 1,21, IC 95%= 1,11-1,31). La concentración de ADN circulante se asoció con la edad en los casos (coeficiente por edad en la regresión log de la concentración en plasma= 0,029, error estándar= 0,013, p= 0,026). No se observó ninguna asociación entre los niveles de ADN en plasma y la intensidad o la duración del tabaquismo.

#### 30 *Rendimiento diagnóstico del ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real*

El área bajo la curva ROC mostrada en la figura 3 fue de 0,94 (intervalo de confianza del 95% 0,907-0,973), lo que sugiere una fuerte potencia de discriminación del ensayo molecular. En la tabla 2 se muestran algunos de los puntos de corte de la concentración de ADN usados para generar la curva con su sensibilidad, especificidad, valor predictor positivo y valor predictor negativo. Los intervalos de confianza del 95% alrededor de las estimaciones de la sensibilidad se solapaban entre las sucesivas concentraciones mostradas en la tabla 2, a excepción de las últimas dos concentraciones (20 y 25 ng/ml).

#### 40 *Correlación de los niveles de ADN en plasma con las características clínico-patológicas*

Entre los marcadores morfológicos e inmunohistoquímicos analizados se observó una asociación significativa con la expresión de EGFR así como con la densidad de los microvasos (tabla 3). El marcador de proliferación Ki-67 aumentó con la concentración creciente de ADN en plasma, aunque la correlación no fue estadísticamente significativa (p= 0,15).

La edad fue el único parámetro clínico que se asoció significativamente con la liberación de ADN en plasma. No se observó ninguna asociación entre los niveles de ADN en plasma y la necrosis, la infiltración linfóide ni los patrones de crecimiento.

#### 50 *Cambios en los niveles de ADN en plasma durante el seguimiento*

En 35 de los 100 pacientes de cáncer en los que se evaluaron las cantidades de ADN en plasma antes de la cirugía para los tumores en estadio I-II, se obtuvo una segunda muestra de plasma y se analizó para monitorizar los cambios en los niveles de ADN durante el seguimiento clínico, de 3 a 15 meses después de la cirugía (mediana del tiempo transcurrido 8 meses). La mediana de la concentración global del ADN en las muestras de plasma para seguimiento fue de 8,4 ng/ml, lo que muestra una clara tendencia frente a la reducción cuando se comparó con la mediana de los niveles basales de 24,5 ng/ml (p< 0,001). Al comparar estos pacientes de acuerdo con su estado clínico, la mediana de la concentración de ADN en el seguimiento fue significativamente menor en 30 sujetos sin enfermedad en comparación con 5 pacientes de cáncer que mostraban recaída (7,1 ng/ml frente a 24,7 ng/ml; p= 0,002):

## ES 2 332 716 T3

TABLA 1

*Concentración de ADN en plasma como factor de riesgo de CPCNP*

	Controles	Controles	Cociente de riesgos	de IC del 95%
	N= 100	N= 100	Condicional*	
	Distribución en terciles del ADN en ng/ml †			
	<=4	4	62	1‡
	4,1-20	27	36	5,5 (1,9-16,3)
	>20	69	2	85,5 (16,5-445)
	*Ajustado por edad			
	†Obtenido de la distribución combinada de los valores de ADN en plasma en los casos y en los controles.			
	‡ Grupo de referencia			

TABLA 2

*Rendimiento de la detección selectiva de la concentración de ADN en plasma*

Punto de corte (ng/ml)*	Sensibilidad	IC95%†	Especificidad	IC95%†	VPP	VPN
4	97	91,5-99,4	60	49,7-69,7	71	95
7	92	84,8-96,5	77	67,5-84,8	80	91
10	88	80,0-93,6	86	77,6-92,1	88	88
15	78	68,6-85,7	95	88,7-98,4	94	81
20	69	58,9-77,9	98	93,0-99,8	97	76
25	79	35,9-56,3	99	94,5-100	98	65
VPP= valor predictor positivo, VPV= valor predictor negativo						
*Concentraciones contrastantes inferiores al punto de corte vs concentraciones iguales o superiores al valor especificado						
†Las estimaciones de sensibilidad y especificidad se trataron como parámetros binomiales para calcular los intervalos de confianza del 95% usando Statxact (Cambridge, MA)						

# ES 2 332 716 T3

TABLA 3

*Correlación de los niveles de ADN en plasma con los parámetros clínico-patológicos*

Log (concentración de ADN)					
	Edad	Años de fumador	Log de MVD	Ki67	EGFR
Coefficiente*	0,22	0,04	0,25	0,15	0,2†
Valor P	0,026	0,71	0,016	0,15	0,044
N‡	100	93	97	97	97
*Coeficientes de correlación de Pearson					
†Coeficientes de correlación de Spearman					
‡El tamaño de la muestra se redujo a 93 controles de fumadores (actuales o anteriores) y 97 controles con muestras de cáncer primario					

**REIVINDICACIONES**

5 1. Un procedimiento para determinar la concentración de ADN circulante total en plasma en una muestra de plasma de un paciente de cáncer, un sujeto con susceptibilidad al cáncer o con riesgo de desarrollar cáncer, que comprende:

1) extraer el ADN de la muestra de plasma;

10 2) añadir a la reparación de ADN: a) una mezcla de cebadores oligonucleotídicos adecuados para la amplificación específica por PCR de un fragmento del gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), y b) una sonda oligonucleotídica, que tiene al menos un inactivador y un fluoróforo indicador en los extremos 3' y 5', capaz de hibridar con una secuencia dentro de la región delimitada por los cebadores, en condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción de PCR,

15 3) añadir una ADN polimerasa termoestable con actividad exonucleasa 5'-3' y amplificar el fragmento del gen hTERT;

4) medir la fluorescencia producida.

20 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de ADN en la muestra de prueba se determina mediante interpolación de una curva de calibración calculada con cantidades conocidas de ADN.

3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1-2, que además comprende comparar la concentración de ADN circulante con una concentración de referencia.

25 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la concentración de referencia es de 9 a 25 ng/ml.

30 5. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento del gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) es de nt 13059 a nt 13156 de la secuencia en GenBank con número de acceso AF128893.

35 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho fragmento del gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) se amplifica usando las SEC IN N° 1 y 2 como cebadores directo e inverso, respectivamente, y la SEC ID N° 3 como la sonda.

7. Un procedimiento según las reivindicaciones 1-3, para el diagnóstico precoz, pronóstico o monitorización clínica de los pacientes de cáncer.

40 8. Un procedimiento según las reivindicaciones 1-3, para la evaluación del riesgo de desarrollar cáncer en individuos sanos o individuos con susceptibilidad familiar al cáncer.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8, para la evaluación del riesgo de desarrollar cáncer en fumadores.

45 10. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer es cáncer de pulmón, de colon-recto, de cabeza y cuello, de hígado o de páncreas.

11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho cáncer es carcinoma de pulmón.

50

55

60

65

FIGURA 1

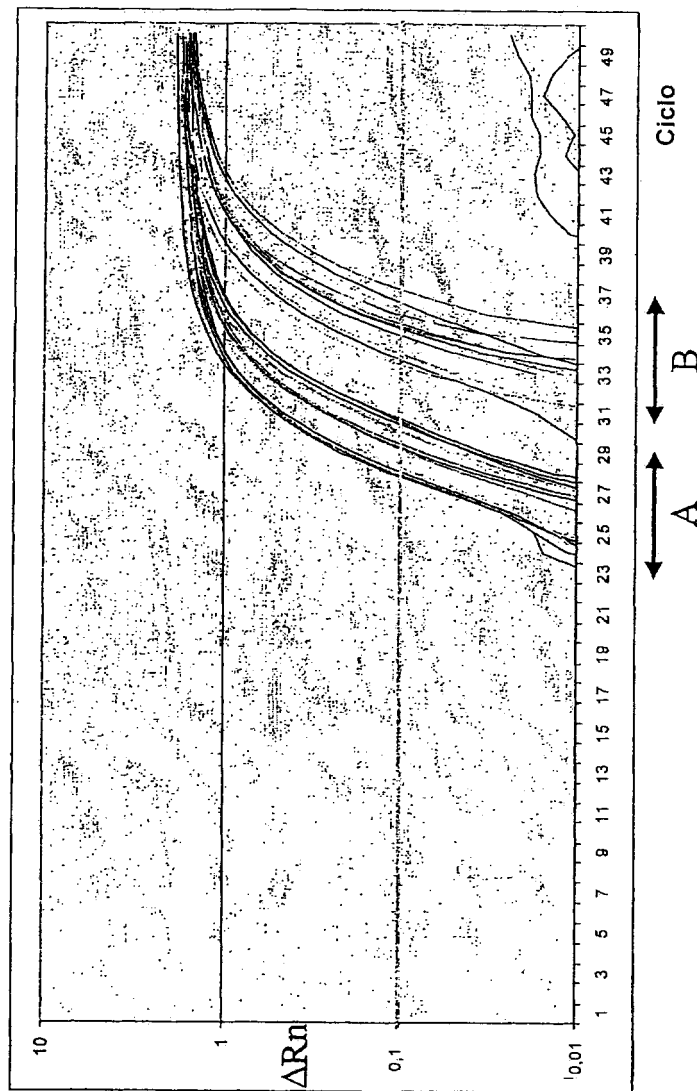
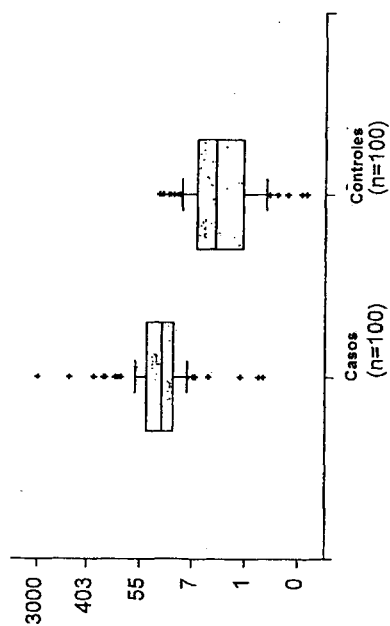


FIGURA 2

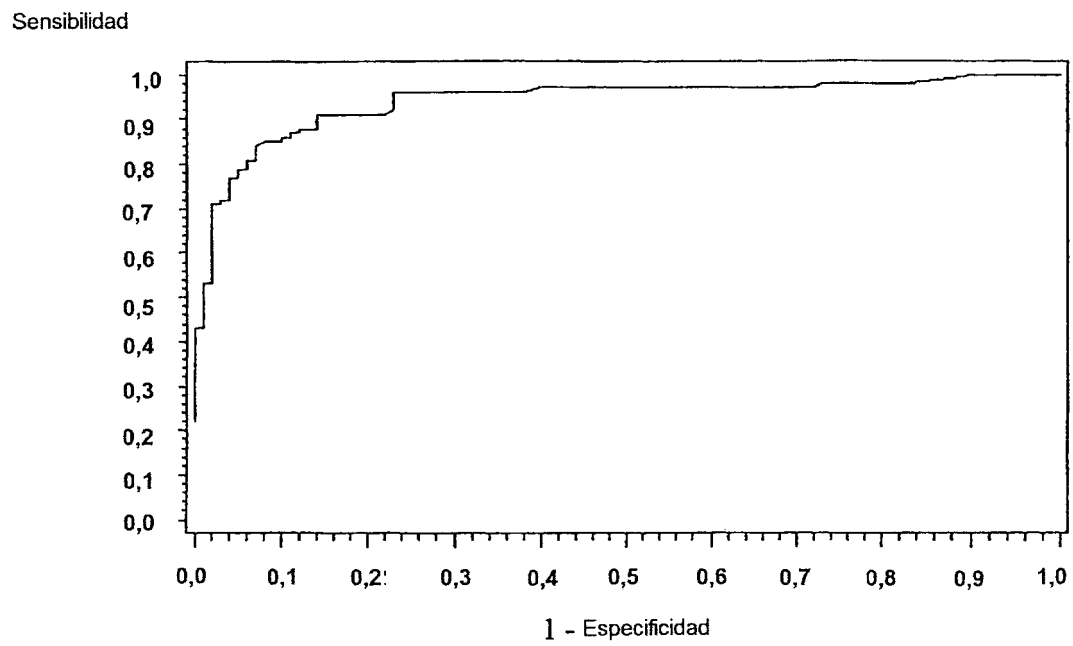


Distribución en percentiles de la concentración de ADN en plasma en ng/ml del estado de enfermedad

casos	10°	25°	75°	90°	max	media	sd
casos	9	15,6	24,3	43,7	65,9	75*	310*
controles	0,4	1,1	3,1	6,3	27	4,6	5
						37,4	45,7

\* valores excluidos 2 desviaciones (823 y 3010 ng/ml).

FIGURA 3



# ES 2 332 716 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE CÁNCER

<130> 6798MEUR

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.1

10 <210> 1

<211> 18

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

20 ggcacacgtg gcttttcg

18

<210> 2

<211> 24

25 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

30 ggtgaacctc gtaagtttat gcaa

24

<210> 3

35 <211> 24

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 3

tcaggacgtc gaggggacac ggtg

24

45

50

55

60

65