

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 745**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2009 E 09713301 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2252893**

54 Título: **Procedimiento para la determinación temprana de recidivas tras la terapia para el cáncer de próstata**

30 Prioridad:

**21.02.2008 US 30462 P**

**21.02.2008 US 66732 P**

**22.02.2008 US 30718 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.12.2013**

73 Titular/es:

**IRIS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)**

**9162 Eton Avenue**

**Chatsworth, CA 91311, US**

72 Inventor/es:

**SARNO, MARK, J.;**

**KLEM, ROBERT E.;**

**SAUNDERS, RUSS;**

**JABLONSKI, EDWARD y**

**ADAMS, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 433 745 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 la determinación temprana de recidivas tras la terapia para el cáncer de próstata

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a procedimientos útiles en la detección de recidivas bioquímicas en etapa temprana o de una enfermedad estable.

10 **Antecedentes e introducción a la invención**

En todo el mundo se producen aproximadamente 670.000 nuevos casos de cáncer de próstata al año. Las estadísticas de incidencia del cáncer de próstata en el Reino Unido, <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/prostate/incidence/> (último acceso el 23 de enero de 2009). En Europa en 2004 se diagnosticaron 237.800 casos nuevos y se produjeron 85.200 muertes debidas al cáncer de próstata. Boyle, P y col. Annals of Oncology 16: 481 - 488 (2005). Además de los factores clínicos de riesgo tales como los antecedentes familiares de cáncer, hábitos tabáquicos, edad y raza, la detección inicial del cáncer de próstata se basa generalmente en los hallazgos de un aumento en las concentraciones circulantes de una proteína denominada antígeno prostático específico (PSA), una proteasa de serina neutra producida por las células epiteliales prostáticas normales, benignas y malignas. El PSA producido por las células prostáticas está presente tanto en forma libre como complejada en el líquido seminal, el suero, el plasma y la orina, y puede ser medido en esos fluidos. La medición simultánea de la forma libre y complejada se denomina medición de "PSA total" y puede denominarse correctamente como "tPSA" o "PSA." La concentración del PSA en la sangre aumenta en varias enfermedades prostáticas, particularmente en el cáncer de próstata, y este aumento de la concentración está reflejado en las mediciones séricas del PSA. Valsanen y col., Prostate Cancer and Prostatic Disease 2: 91 - 97 (1999). Por lo tanto, durante las últimas dos décadas se han usado ensayos tales como inmunoensayos convencionales para el PSA sérico en la detección inicial del cáncer de próstata. Yu y col., J. Urology 157: 913 - 918 (1997).

Generalmente, si se observa un aumento en las concentraciones séricas de PSA en un paciente, se realiza una biopsia de próstata para confirmar la presencia del cáncer y para caracterizar la patología oncológica. Una vez confirmado el cáncer de próstata, aproximadamente dos tercios de los pacientes se tratan mediante una prostatectomía radical (RP, la extirpación quirúrgica completa de la próstata), o con radiación, terapia hormonal o mediante diversos procedimientos. Sin embargo, hasta el 40% de esos pacientes tratados pueden experimentar recidivas de la enfermedad. Véase Moul, J. Urology 163: 1632 - 1642 (2000). Las recidivas del cáncer de próstata están asociadas con un mal pronóstico de supervivencia. Sin embargo, el pronóstico puede mejorarse si se detecta la recidiva en una etapa temprana, de forma que puedan iniciarse unos procedimientos de tratamiento apropiado que incluyen tratamientos de rescate. Desafortunadamente, los procedimientos existentes para la evaluación de la probabilidad de recidivas son insuficientes para una detección temprana. Las observaciones clinicopatológicas tomadas antes o en el momento de la RP, tales como la etapa del cáncer, la puntuación de Gleason, la edad en el diagnóstico, la implicación del margen quirúrgico (presencia del cáncer en el margen quirúrgico), la invasión de tejidos locales por parte del cáncer, la invasión de la cápsula prostática por parte del cáncer, la invasión de la vesícula seminal por parte del cáncer, la invasión del cuello de la vejiga por parte del cáncer, la invasión de los nódulos linfáticos por parte del cáncer y el volumen tumoral total, son en cierto modo informativos en la valoración de la probabilidad de la recidiva de la enfermedad, pero no siempre son predictivos y no pueden usarse para identificar el momento exacto de una recidiva. Puede usarse una biopsia o procedimientos por imagen de diversos tipos para confirmar la recidiva de la enfermedad, pero estos procedimientos adolecen de una baja sensibilidad. Generalmente, en el momento en el que una biopsia o un estudio por imagen detecta nuevos tumores, la recidiva está en una etapa tardía, cuando el pronóstico es especialmente malo. Por lo tanto, estos procedimientos son insuficientes para una detección temprana y un tratamiento agresivo basado en la misma.

Para abordar las carencias de basar la recidiva de la enfermedad en los hallazgos clinicopatológicos y en los estudios de biopsia o por imagen, la recidiva de la enfermedad se basará principalmente en los hallazgos de un aumento en las concentraciones séricas del PSA en el paciente después del tratamiento. Por ejemplo, después de una prostatectomía radical en la que no queda ningún tejido prostático residual secretor de PSA y ha pasado un tiempo suficiente para el aclaramiento fisiológico de los niveles preparatorios del PSA, la concentración sérica de PSA cae hasta una cifra mínima. Si las concentraciones séricas del PSA volvieran aumentar después del punto de la cifra mínima, puede ser indicativo de una recidiva de la enfermedad. Este tipo de recidiva se denomina "recidiva bioquímica" (BCR) ya que la recidiva sólo se refleja como un aumento en los niveles circulantes del PSA en lugar de como nuevos hallazgos de tumores locales o distantes. La recidiva bioquímica del PSA se ha transformado en el estándar actual de asistencia en el tratamiento médico del cáncer de próstata después de un tratamiento tal como una RP.

Se han publicado diversos umbrales para establecer el punto en el que se cree que aparece una recidiva bioquímica. Cookson MS, y col. J Urology 177: 540 - 545 (2007). Típicamente se utiliza un valor de 200 pg / ml (0,2 ng / ml) tras las cifras mínimas de PSA para definir el punto de recidiva bioquímica. *Id.* Los ensayos convencionales del PSA tienen unos límites de detección en el intervalo de 100 pg / ml, con unas sensibilidades funcionales

posiblemente mayores. El tiempo medio de detección de una recidiva bioquímica mediante el uso de un ensayo convencional de PSA con un límite de detección de 100 pg / ml es superior a 38,4 meses. Vassilikos y col., *Clinical Biochemistry* 33 (2): 115 - 123 (2000). Witherspoon y Lapeyrolerie, *J. Urology* 157, 1322 - 1328 (1997); Seto y col., *Luminescence* 16, 285 - 290 (2001); Doherty y col., *Br. J. Cancer* 83, 1432 - 1436 (2000); Ellis y col., *Adult Urology* 50, 573 - 579 (1997); Klee y col., *Urology* 44, 76 - 82 (1994); Taylor y col., *BJU International* 98, 540 - 543 (2006); Prott y col., *Anticancer Research* 23, 979 - 982 (2003); Manetti y col., *J. Endocrinol. Invest.* 25, RC29 - RC31 (2002); el documento WO2004/042030, el documento WO2006/137932, el documento WO 02/068695 describen ensayos del PSA.

## 10 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para detectar si un paciente tiene una recidiva bioquímica en una etapa temprana (ES - BCR) o si tiene una enfermedad estable, que comprende

- 15 a) proporcionar dos o más muestras obtenidas a partir del paciente en los 18 meses posteriores a la terapia para el cáncer de próstata;
- b) medir el nivel del PSA en las muestras mediante el uso de un inmunoensayo en formato de sándwich heterogéneo para el PSA con un límite de detección al menos tan bajo como de 2,0 pg / ml, usando dicho inmunoensayo en formato de sándwich una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la generación de la
- 20 señal;
- c) usar el nivel del PSA de las muestras para determinar un valor del PSA;

donde la ES - BCR es detectada si el valor del PSA es de al menos, o excede, un indicador de PSA, y se detecta una enfermedad estable si el valor del PSA no excede el indicador de PSA,

- 25 donde el indicador de PSA es una velocidad de aumento de la [PSA] de aproximadamente 2,0 pg / ml / mes.

En una forma de realización adecuada, la invención proporciona un procedimiento donde el indicador de PSA es una velocidad de aumento de la [PSA] de aproximadamente 4,0 pg / ml / mes.

- 30 En otra forma de realización adecuada, la invención proporciona un procedimiento donde el indicador de PSA es una velocidad de aumento de la [PSA] de 6,58 pg / ml / mes.

Esta invención es útil para el control de los pacientes tratados por enfermedad prostática y para la detección del cáncer de próstata, y para la terapia de seguimiento de la recidiva del cáncer o de la enfermedad estable, o tras una

- 35 decisión de administrar una terapia tras la prostatectomía dependiendo de las observaciones clínicas y de los valores del PSA y de los indicadores de PSA de esta invención. La presente invención tiene ventajas sobre otros ensayos convencionales del PSA sérico para la identificación de la recidiva bioquímica del cáncer de próstata tras el tratamiento, al proporcionar nuevos ensayos con unos límites de detección y unas sensibilidades funcionales para el PSA superiores a los ensayos convencionales. Esta invención es por lo tanto útil para el control de los pacientes
- 40 tratados por enfermedad prostática y para la detección de la recidiva de cáncer por oposición a la enfermedad estable (ausencia de recidiva) tras una terapia primaria tal como una RP.

Los procedimientos descritos en este documento también son útiles, por ejemplo, en la detección de recidivas del

- 45 cáncer de próstata en etapa temprana o para realizar determinaciones tempranas sobre si un paciente es estable tras una prostatectomía radical por un cáncer de próstata. Los procedimientos de la presente invención permiten la detección temprana de recidivas, y en los casos apropiados, permiten un inicio temprano de las terapias de rescate para el cáncer con recidiva.

La terapia para el cáncer de próstata puede ser una prostatectomía radical, radioterapia, quimioterapia o un

- 50 tratamiento con antiandrógenos. La detección temprana de la enfermedad estable puede evitar terapias coadyuvantes innecesarias en pacientes relativamente jóvenes con pequeños márgenes y puntuaciones de Gleason, que de otro modo serían tratados si no se detectara una enfermedad estable. Por otro lado, los pacientes en los que se detecta una recidiva en etapa temprana mediante el uso de los procedimientos de esta invención pueden experimentar un tratamiento más temprano. Por lo tanto, la capacidad de detectar unos bajos niveles de
- 55 PSA permitiría reducir la terapia de algunos pacientes que actualmente están siendo tratados porque tienen una elevada probabilidad de recaída, porque así se sabría que no tienen una BR ya que su nivel de PSA es bajo. También, esta temprana detección de una BR daría lugar a una terapia temprana. Nilsson y col., *Acta Oncologica* Vol. 43, Nº 4, págs. 316 - 381, 2004.

- 60 En una forma de realización puede controlarse el nivel de las concentraciones del PSA total (tPSA o PSA) en un paciente después de una terapia, mediante la obtención de una o más muestras del paciente después de la terapia y la determinación de la cantidad de PSA en cada muestra mediante el uso de un ensayo de PSA con un límite de detección al menos tan bajo como de 1 pg / ml y una sensibilidad funcional menor de 10 pg / ml. En otra forma de
- 65 realización, se usa un ensayo de PSA con un límite de detección y una sensibilidad funcional de menos de 1 pg / ml para determinar la recidiva del cáncer de próstata en un paciente tras la terapia mediante la determinación de si el valor del PSA excede su correspondiente indicador límite de PSA. En una forma de realización más preferida, el

ensayo de PSA tiene un límite de detección al menos tan bajo como de 0,2 pg / ml y una sensibilidad funcional igual o inferior a 0,5 pg / ml.

5 Los ensayos de PSA con un límite de detección y una sensibilidad funcional mejorados usados en los procedimientos de esta invención permiten la detección de la recaída o la recidiva bioquímica en una etapa más temprana. Esta detección de la recidiva bioquímica en una etapa temprana podría permitir las terapias de rescate en una etapa más temprana, cuando hay menos células cancerosas, y dichas células pueden ser más sensibles al tratamiento. Los tratamientos de rescate pueden incluir radioterapia localizada, y pueden ser administrados con o sin una concomitante privación de andrógenos. Por ejemplo, se ha demostrado que la radioterapia de rescate tiene un efecto beneficioso cuando se usa en el tratamiento de hombres con unos tiempos de duplicación del PSA (el tiempo en días o en meses o en años para que se produzca la duplicación de la concentración sérica del PSA) de menos de 10 6 meses, cuando el tratamiento se administró < 2 años después de la determinación de la recidiva bioquímica mediante el uso de unos ensayos convencionales estándar. Trock y col., ASCO 2008 Urogenitary Cancers Symposium, Resumen N° 85. Además, la detección de la recidiva bioquímica en una etapa temprana puede eliminar la necesidad de realizar un costoso tratamiento adicional en pacientes que tienen enfermedad estable, o evitar la necesidad de innecesarias terapias coadyuvantes y de rescate en esos pacientes.

20 En otra forma de realización de esta invención se usan ensayos para el PSA con una sensibilidad funcional de al menos de menos de 1 pg / ml para detectar una recidiva bioquímica en una etapa temprana después de la terapia para el cáncer de próstata. Los indicadores basados en las mediciones del PSA se usan en la detección de la recidiva bioquímica en etapa temprana. Estos indicadores incluyen el nivel máximo observado de PSA durante el control, el nivel de la cifra mínima de PSA, un multiplicador del nivel de la cifra mínima de PSA, la proporción entre el nivel máximo observado de PSA y el nivel de la cifra mínima de PSA, o el número de duplicaciones. También pueden usarse los indicadores del índice de PSA, tales como la velocidad de duplicación del PSA, el aumento en la pendiente del Ln [PSA] frente al tiempo, el segundo aumento consecutivo (pg / ml / mes) y el tiempo de duplicación. 25 Cualquiera de estos indicadores puede usarse individualmente o en combinación para la determinación de si un paciente tiene una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR) o una enfermedad estable.

30 Los ensayos de PSA realizados en esta invención se usan para determinar si un paciente tiene un riesgo temprano de recidiva de cáncer de próstata, es decir, para detectar la recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR), o si es más probable que el paciente muestre en unas características de enfermedad estable, es decir, para detectar la enfermedad estable. Si el máximo observado de la [PSA] es igual o excede el indicador de la [PSA], se determina que el paciente tiene una ES - BCR, y si el máximo observado de la [PSA] es menor de un indicador de la [PSA], se determina que el paciente tiene una enfermedad estable.

35 Los ensayos del PSA pueden usarse para medir el nivel de concentración del PSA en muestras en serie obtenidas a partir de un paciente tras una prostatectomía radical para el cáncer de próstata. Las mediciones pueden usarse para determinar un valor del índice de PSA. Mediante la determinación de si el índice de aumento del valor de PSA es igual o excede el índice de PSA del indicador de aumento, es posible detectar si un paciente tiene una ES - BCR o una enfermedad estable. Si el índice de aumento en el PSA es igual o excede un indicador del índice, se determina que el paciente tiene una ES - BCR, y si el índice de aumento del PSA cae por debajo del umbral, se determina que el paciente tiene una enfermedad estable.

45 Los análisis adicionales basados en uno o más indicadores del PSA permiten la clasificación de los pacientes en subtipos adicionales, permitiendo a los médicos personalizar los tratamientos apropiados para ese subtipo y usar estas terapias en un momento más temprano al de la práctica clínica habitual. Un inicio temprano de la terapia de rescate puede mejorar la evolución de los pacientes.

50 La presente invención se describirá ahora más completamente con referencia a las figuras y a los ejemplos anexos, que deben ser leídos junto con este resumen, la descripción detallada y cualquier forma de realización preferida y/o particular analizada específicamente o desvelada de otro modo.

### Descripción de las figuras

55 La Figura 1 muestra los resultados de una forma de realización de esta invención, y específicamente muestra el gráfico del inmunoensayo de detección de ácidos nucleicos, la [PSA] (concentración de PSA) en pg / ml mediante NADIA®, frente a los días tras la prostatectomía radical para el paciente con recidiva número 11, con un ajuste exponencial. El ensayo de [PSA] de NADIA® era la [PSA] determinada en el estudio del ensayo de NADIA®, descrito en la descripción detallada.

60 La Figura 2 muestra el gráfico de la [PSA] según NADIA® en pg / ml frente a días tras la prostatectomía radical para el paciente con recidiva número 31.

65 La Figura 3 muestra el gráfico de la [PSA] según NADIA® en pg / ml frente a días tras la prostatectomía radical para el paciente con recidiva número 38.

- La Figura 4 muestra el gráfico de la [PSA] según NADIA® en pg / ml frente a días tras la prostatectomía radical para el paciente estable número 86.
- 5 La Figura 5 muestra el gráfico de la [PSA] según NADIA® en pg / ml frente a días tras la prostatectomía radical para el paciente estable número 120.
- La Figura 6 muestra el gráfico de la [PSA] según NADIA® en pg / ml frente a días tras la prostatectomía radical para el paciente estable número 126.
- 10 La Figura 7 muestra los gráficos en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para todos los 43 pacientes con recidiva se muestran en la Figura.
- La Figura 8 muestra un gráfico superpuesto de 43 pacientes con recidiva, de la [PSA] en pg / ml frente al tiempo tras una prostatectomía, con el intervalo del nivel de PSA restringido a 1.000 pg / ml.
- 15 La Figura 9 muestra un gráfico de la primera [PSA] total tras la prostatectomía frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)).
- La Figura 10 muestra un gráfico de la cifra mínima de [PSA] total frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)).
- 20 La Figura 11 muestra un gráfico del nivel máximo observado de [PSA] (pg / ml) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)).
- 25 La Figura 12 muestra un gráfico del nivel máximo observado de la [PSA]/nivel de cifra mínima de la [PSA] frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)).
- La Figura 13 muestra un gráfico del segundo aumento consecutivo en el nivel de la [PSA] (pg / ml / mes) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)).
- 30 La Figura 14 muestra un gráfico de los datos del tiempo de duplicación (días) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)).
- Las Figuras 15A-C muestran los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva con unos tiempos de duplicación < 150 días, de 150 - 400 días, o > 400 días, respectivamente.
- 35 La Figura 15A muestra los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía con unos tiempos de duplicación de < 150 con el intervalo restringido a 1.000 pg / ml
- 40 La Figura 15B muestra los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía con unos tiempos de duplicación de 150 - 400 con el intervalo restringido a 1.000 pg / ml
- La Figura 15C muestra los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía con unos tiempos de duplicación de > 400 con el intervalo restringido a 1.000 pg / ml
- 45 Las Figuras 16A-D muestran los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva según el tiempo de duplicación, con los intervalos restringidos a 1.000 pg / ml, respectivamente. Los pacientes con recidiva con unos tiempos de duplicación de > 400 días han sido adicionalmente subdivididos si el máximo observado de PSA está por encima o por debajo de 200 pg / ml.
- 50 La Figura 16A muestra los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva con un tiempo de duplicación < 150 días de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía.
- La Figura 16B muestra los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva con un tiempo de duplicación < 150 - 400 días de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía.
- 55 La Figura 16C muestra los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva con un tiempo de duplicación > 400 días, [PSA] máxima > 200 pg / ml frente a los días tras la cirugía.
- 60 La Figura 16D muestra los gráficos superpuestos para pacientes con recidiva de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía.
- La Figura 17 muestra los gráficos superpuestos de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía que, con pocas excepciones, los pacientes con enfermedad estable generalmente tienen unos máximos de PSA que no exceden los 15 pg / ml.
- 65

La Figura 18 muestra un gráfico en mosaico de los datos que muestran el número de duplicaciones durante el control de la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)).

5 La Figura 19 muestra un gráfico en mosaico de los datos que muestran el número de duplicaciones consecutivas frente a la subpoblación de pacientes con recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0).

10 Las Figuras 20A y 20B muestran la curva de rendimiento diagnóstico multivariada en comparación con la curva de rendimiento diagnóstico univariada para el nivel máximo observado de la [PSA] mediante NADIA®. La Figura 20A muestra la curva de rendimiento diagnóstico multivariada. La Figura 20B muestra la curva de rendimiento diagnóstico univariada para el nivel máximo observado de la [PSA] mediante NADIA® (línea negra) frente a la curva de rendimiento diagnóstico multivariada (línea punteada).

15 Las Figuras 21 A y 21B muestran la curva de rendimiento diagnóstico multivariada en comparación con la curva de rendimiento diagnóstico univariada para los niveles máximos totales de la [PSA] / cifra mínima de la [PSA] mediante NADIA®. La Figura 21A muestra la curva de rendimiento diagnóstico multivariada. La Figura 21B muestra la curva de rendimiento diagnóstico univariada para los niveles máximos totales de la [PSA] / cifra mínima de la [PSA] mediante NADIA® (línea negra) frente a la curva de rendimiento diagnóstico multivariada (línea punteada).

20 Las Figuras 22A y 22B muestran la curva de rendimiento diagnóstico multivariada en comparación con la curva de rendimiento diagnóstico univariada para el segundo aumento en la [PSA] (pg / ml / mes). La Figura 22B muestra la curva de rendimiento diagnóstico multivariada. La Figura 22A muestra la curva de rendimiento diagnóstico univariada para el segundo aumento en la [PSA] (pg / ml / mes) mediante NADIA® (línea negra) frente a la curva de rendimiento diagnóstico multivariada (línea punteada). La Tabla 22 muestra los resultados de la regresión logística y los cálculos de rendimiento diagnóstico.

25 Las Figuras 23A-C muestran el análisis univariado para la [PSA] total máxima, los indicadores del segundo aumento (pg / ml / mes) y la [PSA] total máxima/cifra mínima total de la [PSA].

30 La Figura 24 muestra un ajuste lineal de la curva para un paciente estable para el nivel de la [PSA] (pg / ml) frente al tiempo (meses) durante un periodo de tiempo de aproximadamente ocho años.

La Figura 25 muestra un ajuste lineal de la curva para un paciente con recidiva para el nivel de la [PSA] (pg / ml) frente al tiempo (meses) durante un periodo de tiempo de aproximadamente cinco años.

### 35 **Descripción detallada de la invención**

40 Según esta invención, los ensayos para el PSA sérico total (el PSA sérico total es la medición simultánea de ambas formas libre y complejada del PSA en suero) con un límite de detección al menos tan bajo como de 1 pg / ml y una sensibilidad funcional de al menos 10 pg / ml, pueden usarse para controlar pacientes después de una terapia para el cáncer de próstata, y pueden usarse para detectar recidivas bioquímicas en etapa temprana tras la terapia, por oposición a una enfermedad estable postquirúrgica.

45 Existe una limitación incluso en el uso de la recidiva bioquímica como indicador de la recidiva del cáncer de próstata cuando se usan ensayos convencionales del PSA. Los menores valores de PSA sérico tras una prostatectomía radical están a menudo por debajo de los límites de detección cuando se usan ensayos convencionales para medir el PSA. Véase Junker y col., Anticancer Research 19: 2625 - 2658 (1999). Por lo tanto, los valores de PSA sérico tras una RP pueden resultar ser de cero nanogramos/mililitro (ng / ml) con los ensayos convencionales cuando el PSA no está realmente ausente en la circulación. Véase Stamey, Clin. Chem. 42 (6): 849 - 852. Incluso si el valor del PSA está por encima del límite de detección de un ensayo convencional, la concentración puede estar bastante por debajo de la "sensibilidad funcional" del ensayo, la capacidad para cuantificar concentraciones séricas de PSA a 50 bajos niveles con exactitud y precisión. Esto significa que la verdadera cifra mínima de concentración del PSA sérico puede no ser detectada o puede no ser registrada con exactitud y precisión por los ensayos convencionales. Esto es desafortunado dado que la propia cifra mínima de concentración puede ser un pronóstico de la recidiva, estando 55 unas menores cifras mínimas de concentración asociadas con una menor probabilidad de recidiva. Adicionalmente, si el nivel sérico de PSA comenzara a aumentar, puede no ser detectable por los ensayos convencionales hasta un momento en el que la recidiva está en una etapa en la que el pronóstico puede ser de nuevo malo.

60 Los cánceres agresivos pueden recidivar bastante más rápidamente, pero los ensayos convencionales no serían capaces de detectar estas recidivas debido a sus límites de detección y a su insuficiente sensibilidad funcional. Incluso los cánceres no agresivos pueden comenzar a mostrar un aumento en el PSA sérico que no es detectable por los ensayos convencionales. Por lo tanto, los ensayos convencionales del PSA sérico no son capaces de ayudar a los médicos en la detección temprana de recidivas en el cáncer de próstata.

65 La mayoría de los ensayos convencionales actuales para el PSA aprobados por la FDA miden desde aproximadamente 100 pg / ml, y ese límite de detección está reflejado en la definición de recidiva bioquímica recomendada recientemente por el American Urological Association Prostate Cancer Guideline Panel ([PSA] en más

de 0,2 ng / ml (200 pg / ml), con un segundo nivel de confirmación del PSA mayor de 0,2 ng / ml). Véase Cookson, y col., J. Urology 177: 540 - 545 (2007). Debido a las limitaciones en la sensibilidad funcional, los ensayos convencionales del PSA indican la ausencia del PSA en muestras con una [PSA] por debajo de la sensibilidad funcional de los ensayos. Por ejemplo, Stamey (1996); Vassilikos y col., Clinical Biochemistry 33 (2): 115 - 123 (2000).

Para la detección de la recidiva en etapa temprana después de la terapia, es de importancia clínica conocer si el PSA en las muestras posteriores a la terapia está dentro de la sensibilidad funcional de un ensayo. De otro modo, los médicos y los pacientes no pueden saber si un resultado negativo refleja la "ausencia" del PSA o los límites de detección del ensayo, a pesar de la presencia de células productoras de PSA.

En los procedimientos de esta invención, se han usado ensayos con un límite de sensibilidad funcional bajo, según se describe en este documento, para medir los niveles de PSA por debajo del intervalo de 0,2 - 0,5 pg / ml en muestras séricas procedentes de mujeres. La sensibilidad funcional de 0,5 pg / ml del ensayo ha permitido la determinación de que los niveles de PSA en los sueros de las mujeres estaban en el intervalo de 0,5 a 3 pg / ml en lugar de cero, como se asume habitualmente. Se espera que tras una prostatectomía radical, los hombres tengan un nivel de PSA igual a, al menos, los niveles encontrados en mujeres. Por lo tanto, los ensayos con una sensibilidad funcional por debajo de 0,5 pg / ml son capaces de medir los menores niveles de PSA que se esperaría encontrar en hombres después de una prostatectomía radical.

La medición de los niveles de PSA mediante el uso de los ensayos de PSA con una sensibilidad funcional de menos de 0,5 pg / ml permitió una medición precisa de los bajos niveles de PSA en la terapia posterior de los pacientes con cáncer de próstata. La medición de la [PSA] mediante el uso del inmunoensayo de detección de ácidos nucleicos (prueba NADIA®) demostró que después de una prostatectomía radical, muchos pacientes tenían unos bajos niveles estables de PSA, lo que indica que esos pacientes tienen unos cánceres de crecimiento muy lento o están curados. Para los pacientes que muestran un aumento con el tiempo en los niveles séricos de PSA, los niveles de PSA eran exactos. Los niveles séricos del PSA de los pacientes eran lo suficientemente exactos como para determinar las curvas del aumento en el PSA, y para generar unos datos reproducibles para las muestras que contienen unos niveles de PSA previamente por debajo de la sensibilidad funcional de los ensayos actuales. La medición del nivel de PSA se refiere a la medición del nivel de PSA total, o tPSA.

El uso de los ensayos de PSA más sensibles estableció que los niveles de PSA aumentan exponencialmente tras la cifra mínima post-RP. Los resultados del ensayo de NADIA® del PSA indicaron que las células cancerosas están presentes y que crecían exponencialmente bastante después de que el nivel de la [PSA] alcanzara los 200 pg / ml. Los resultados de un análisis retrospectivo de un conjunto de datos muestran que las células de cáncer de próstata están presentes y crecen durante un periodo de tiempo considerable antes de que el nivel sérico alcance el actual punto de recidiva bioquímica de 200 pg / ml.

En la presente invención puede usarse un ensayo de PSA con una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 0,5 pg / ml y/o un límite de detección de 0,2 pg / ml para determinar la recidiva del cáncer de próstata en una etapa temprana. También disminuye el tiempo necesario para detectar la recidiva en la etapa temprana, en hasta, por ejemplo, 30 meses antes que con los ensayos convencionales. Las mediciones precisas del PSA en el intervalo entre 0,5 y 100 pg / ml mediante el uso de estos ensayos de PSA también permiten el reconocimiento de la recidiva bioquímica de etapa temprana y el inicio del tratamiento mucho antes que basándose en la práctica clínica actual.

La detección temprana de la necesidad de un tratamiento de rescate para un cáncer de próstata con recidiva en etapa temprana disminuye el tiempo necesario para comenzar el seguimiento del tratamiento de los pacientes, que generalmente tiene lugar actualmente sólo después de que los niveles de PSA excedan los 200 pg / ml. Según se describe en este documento, el uso de los ensayos de PSA con una sensibilidad funcional de 0,5 pg / ml para controlar a los pacientes podría dar lugar a unas evaluaciones para la terapia adicional al menos tanto como 30 meses pronto que mediante el uso de las mediciones actuales de la recidiva bioquímica. Esto ayudará a proporcionar un tratamiento más temprano cuando las células están potencialmente más localizadas y/o son susceptibles a la terapia.

Los procedimientos de esta invención permiten una identificación más temprana y más exacta de los hombres con riesgo de progresión de la enfermedad y de los pacientes con un fracaso temprano en el tratamiento. Los procedimientos de esta invención también pueden usarse para determinar tempranamente si el paciente no está teniendo una recidiva. La disponibilidad de unos ensayos de PSA más sensibles reduce por lo tanto los costes del sistema y la ansiedad del paciente, permitiendo una clasificación más temprana de los pacientes como estable o con una recidiva bioquímica en etapa temprana.

Los procedimientos de detección temprana altamente sensibles de esta invención pueden usarse en la evaluación de las opciones de tratamiento tras una prostatectomía radical. Esta invención puede usarse para detectar si los pacientes tienen una enfermedad estable, y si debería controlarse, y con qué frecuencia, la recidiva, controlados y si deberían administrarse, y cuando, tratamientos de rescate tales como un tratamiento antiandrogénos, radioterapia o quimioterapia.

- Los tratamientos posteriores a una prostatectomía se han determinado ampliamente basándose en las observaciones clínicas tales como la escala de Gleason, la edad en el diagnóstico, los márgenes quirúrgicos, la etapa T, la invasión tisular, la invasión capsular, la invasión de la vesícula seminal, la invasión del cuello de la vejiga, la invasión de los nódulos linfáticos y el volumen tumoral. Los parámetros clínicos con valor predictivo para la
- 5 recidiva incluyen una elevada puntuación de Gleason, un elevado PSA mediante el uso de los ensayos actuales (por encima de 200 ng / ml medido con los ensayos actuales), la enfermedad pT3, unos márgenes quirúrgicos positivos y una invasión de la vesícula seminal. Véase Nilsson en la pág. 346.
- Un elevado porcentaje de los pacientes con cáncer de próstata no son curados mediante una RP, y el 27 - 53%
- 10 mostrará una [PSA] elevada en 10 años. Nilsson y col., "A systematic overview of radiation therapy effects en prostate cancer", Acta Oncologica, 43 (4): 316 - 381 (2004). Sin embargo, entre el 30% y el 70% de los pacientes actualmente tratados con una terapia coadyuvante no sufrirán recidivas. Por lo tanto, la administración de una terapia coadyuvante a pacientes tras una prostatectomía únicamente sobre la base de observaciones sistémicas
- 15 tales como la edad, la puntuación de Gleason y los márgenes quirúrgicos, puede exponer a un porcentaje significativo de pacientes que tienen una enfermedad estable a unos innecesarios y costosos tratamientos y a potenciales complicaciones.
- Como ejemplo, pueden administrarse tratamientos coadyuvantes a pacientes que muestran pocos signos clínicos. Estos pacientes incluyen pacientes relativamente jóvenes con unos bajos márgenes y puntuaciones de Gleason. Por
- 20 ejemplo, los pacientes de unos 50 años con bajos márgenes y unas puntuaciones de Gleason > 7, habitualmente realizarán una terapia tal como radioterapia externa (RT). El tratamiento posterior a la prostatectomía con radioterapia externa por haz en pacientes con una enfermedad en la etapa pT3 prolonga la supervivencia bioquímica sin enfermedad, y la probabilidad de alcanzar una enfermedad estable en los pacientes que no son curados por una RP es mayor cuando el tratamiento se administra más tempranamente, en lugar de una terapia de rescate
- 25 retardada. Véase Nilsson y col., en 316.
- Sin embargo, el uso de los ensayos altamente sensibles y de los valores e indicadores de la [PSA] de esta invención pueden usarse solos o junto con las observaciones clínicas para proporcionar una detección temprana de la enfermedad estable, y pueden evitar las innecesarias terapias coadyuvantes que se están administrando
- 30 actualmente. Por ejemplo, la detección temprana de una enfermedad estable en pacientes relativamente jóvenes que de otro modo serían tratados puede evitar la necesidad de tratamientos innecesarios y del consecuente riesgo de efectos secundarios. Los efectos secundarios de la terapia posterior a la prostatectomía pueden incluir incontinencia, frecuencia urinaria, nicturia, cistitis, diarrea, sangrado rectal, disminución de la libido y/o impotencia. La detección temprana de la enfermedad estable mediante el uso de los procedimientos de detección de esta
- 35 invención puede evitar unas innecesarias terapias coadyuvantes en pacientes que actualmente reciben de forma rutinaria terapias coadyuvantes basadas en las observaciones clínicas. Por otro lado, el retraso en el tratamiento de rescate hasta que la [PSA] obtenida mediante el uso de los procedimientos convencionales alcance los 200 pg. ml disminuye la probabilidad de conseguir una enfermedad estable. Véase Nilsson en 345.
- Por lo tanto, en algunos aspectos, los valores del PSA y los indicadores de PSA de esta invención pueden usarse
- 40 junto con las observaciones clínicas para determinar si debería administrarse una terapia coadyuvante y/o de rescate. Por ejemplo, si normalmente se administraría una terapia coadyuvante y/o de rescate a un paciente basándose en las observaciones clínicas, pero uno o más valores del PSA no excede el indicador de PSA, y se detecta una enfermedad estable, entonces puede evitarse el innecesario tratamiento. Los valores y los indicadores de PSA que pueden usarse en estos procedimientos se describen en toda su extensión. Como un ejemplo, cuando
- 45 la [PSA] es menor de 15 pg / ml, y la pendiente del Ln [PSA] frente al tiempo es menor que la pendiente del Ln [PSA] frente al indicador de tiempo, entonces incluso si un paciente relativamente joven tiene unos márgenes bajos y una puntuación de Gleason >7, puede evitarse el tratamiento coadyuvante, y el paciente puede ser controlado hasta que uno o más valores de [PSA] excedan el indicador de [PSA].
- 50 En otros aspectos, cuando los procedimientos de esta invención se usan junto con las observaciones clínicas para detectar una recidiva en etapa temprana, los pacientes con ES - BCR pueden experimentar un tratamiento más temprano, que da lugar a una mejora en el pronóstico. Puede realizarse radiación y quimioterapia según los procedimientos en los protocolos conocidos por los expertos en la técnica. El tratamiento antiandrógenos puede
- 55 realizarse mediante el uso de fármacos y composiciones farmacológicas biológicas, combinaciones, formas de dosificación y dosis conocidas por el experto habitual en la técnica para la terapia coadyuvante o de rescate en el tratamiento de pacientes tras una prostatectomía.
- Un ejemplo de un ensayo de PSA con una sensibilidad funcional de aproximadamente 0,5 pg / ml y un límite de
- 60 detección de 0,2 pg / ml según esta invención es un inmunoensayo en formato de sándwich que usa una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la generación de la señal. Un ejemplo de dicho ensayo útil en la detección del PSA en muestras de suero o de plasma en los procedimientos de esta invención se describe a continuación. Los formatos de inmuno PCR para los ensayos de proteínas se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.665.539.
- 65 Como se discute con más detalle a continuación, los valores del PSA tales como el tiempo de duplicación y/o la concentración máxima observada de PSA pueden usarse para clasificar adicionalmente a los pacientes con



recidivas en etapa temprana en múltiples grupos. Estas clasificaciones podrían usarse potencialmente para recomendar diferentes terapias para pacientes de los diferentes subgrupos. Por lo tanto, el uso de los procedimientos de esta invención proporcionará a los médicos y a los pacientes una indicación exacta del fracaso del tratamiento o de una recidiva bioquímica en etapa temprana, y permitirá una selección más oportuna y apropiada de las terapias para controlar la enfermedad. Además, una terapia de tratamiento más temprana como resultado de una detección temprana puede mejorar los resultados de los pacientes y evitar la necesidad de un cuidado más costoso de los pacientes con una enfermedad estable.

El ensayo del PSA puede usarse para determinar el nivel de PSA en muestras tomadas de un paciente tras un tratamiento para el cáncer de próstata. El nivel de PSA puede incluir la cantidad o la concentración de PSA en la muestra. La muestra puede ser una muestra de plasma o de suero. Las mediciones de los niveles de PSA pueden usarse para controlar y evaluar si la terapia del cáncer de próstata ha tratado eficazmente el trastorno. Preferiblemente, el ensayo del PSA tiene una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 0,5 pg / ml y un límite de detección tan bajo como de 0,2 pg / ml.

El "valor de PSA" es un parámetro que es función del nivel observado de PSA. El valor de PSA puede incluir, por ejemplo, el nivel observado de PSA medido después del nivel de cifra mínima de PSA, la proporción entre el nivel observado de PSA o el nivel máximo observado de PSA y el nivel de cifra mínima de PSA, la pendiente del Ln [PSA] frente al tiempo, la velocidad de aumento del nivel de PSA, el tiempo de duplicación para el nivel de PSA, o el segundo aumento consecutivo en el nivel de PSA. El nivel observado de PSA puede ser una concentración o una cantidad.

Un "indicador de PSA" es un límite, un umbral o una cifra predeterminada que discrimina con significación estadística entre subpoblaciones de pacientes con enfermedad estable y pacientes que tienen o tendrán una recidiva bioquímica y/o una recidiva de la enfermedad.

Una "recidiva bioquímica en etapa temprana" se detecta cuando uno o más valores seleccionados de PSA obtenidos mediante el uso de un ensayo de PSA con una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 1 pg / ml exceden los correspondientes indicadores de PSA. Los valores y los correspondientes indicadores pueden usarse individualmente o en combinación en la determinación de si un paciente tiene una ES - BCR o una enfermedad estable.

La recidiva de la enfermedad puede ser determinada bioquímicamente o basándose en las observaciones clínicas tales como imágenes o biopsias, aunque estos métodos adolecen de una baja sensibilidad para las recidivas. También pueden usarse uno o más de los valores de PSA y los indicadores de PSA obtenidos mediante el uso de los procedimientos de esta invención junto con las observaciones clínicas para facilitar o determinar las opciones de tratamiento para los pacientes. Por ejemplo, la detección de una ES - BCR mediante el uso de los procedimientos de esta invención puede dar como resultado una terapia adicional, incluyendo radioterapia, quimioterapia o terapia antiandrógenos. En algunos casos, la terapia adicional puede garantizarse si existe un rápido incremento temprano en un valor de la [PSA], y/o si un índice de temprano medido de PSA excede un indicador del índice de PSA. Como otro ejemplo, un aumento temprano del índice menos rápido de [PSA] puede dar o no como resultado una terapia adicional, dependiendo de otros parámetros del paciente, incluyendo las observaciones clínicas. Las observaciones clínicas pueden incluir la puntuación de Gleason, la edad en el diagnóstico, los márgenes quirúrgicos, la etapa T, la invasión tisular, la invasión capsular, la invasión de la vesícula seminal, la invasión del cuello de la vejiga, la invasión de los nódulos linfáticos, una biopsia o el volumen tumoral. En algunas formas de realización, los parámetros que apoyan una terapia adicional incluyen una edad menor de la edad límite, una puntuación de Gleason que excede la puntuación límite de Gleason, un elevado PSA mediante el uso de los procedimientos de esta invención, unos márgenes quirúrgicos positivos y una invasión de la vesícula seminal. La edad límite puede ser, por ejemplo, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ó 60, 65, 70, 75 u 80. La puntuación límite de Gleason puede ser, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Como otro ejemplo, un aumento lento en un valor de índice de la [PSA] puede no dar como resultado una terapia adicional si también hay presentes unas observaciones clínicas indicativas de una ausencia de recidiva, tales como una baja puntuación de Gleason o una edad avanzada (tal como superior a 70 u 80). Además, si los procedimientos de esta invención detectan una enfermedad estable no se administrará una terapia adicional. En cualquier caso, cuando no se administre una terapia adicional, puede ser deseable controlar adicionalmente uno o más valores del PSA mediante el uso de los procedimientos de esta invención, ya sea solos o junto con las observaciones clínicas, para determinar si la terapia adicional debería ser administrada en un momento posterior.

Un indicador de PSA es un límite predeterminado o umbral para el máximo nivel observado de PSA, específicamente, la velocidad de aumento en la [PSA]. Los indicadores de PSA se determinan mediante el uso de procedimientos estadísticos estándar tales como los descritos en este documento. El nivel indicador de PSA puede usarse solo o junto con otros indicadores del PSA o indicadores clínicos para determinar los pacientes con una enfermedad estable o con una ES - BCR.

65

Por "cifra mínima de PSA" se entiende la mínima cantidad medida de PSA en una muestra de un paciente tras una terapia tal como una prostatectomía radical. La cifra mínima de PSA surge del aclaramiento del PSA producido por el tejido prostático en proliferación extraído o destruido durante el tratamiento. El PSA tiene una semivida de entre 2,2 días y 3,5 días, y puede tardar entre 3 y 4 semanas o hasta 6 - 8 en ser eliminado del torrente sanguíneo. Ellis y col., *Adult Urology*, 50 (4), 573 - 579, (1997). Después de un tratamiento tal como una prostatectomía radical, el nivel sérico de PSA disminuye hasta una cifra mínima posterior al tratamiento que elimina o destruye las células prostáticas en proliferación. En pacientes con una enfermedad estable, los niveles de PSA pueden permanecer estables después de alcanzar un punto bajo. La muestra puede ser una de un conjunto en serie de muestras de suero sanguíneo en las que se mide el nivel de PSA. Un conjunto en serie de muestras de suero sanguíneo es dos o más muestras tomadas en diferentes puntos temporales del mismo paciente tras una terapia, tal como una prostatectomía radical o un tratamiento de rescate.

Terapia se refiere a uno o más tratamientos en el cuidado clínico de la enfermedad prostática. Un tratamiento para una enfermedad prostática es preferiblemente un tratamiento para el cáncer de próstata. Un tratamiento para el cáncer de próstata es preferiblemente una prostatectomía radical. Un tratamiento para el cáncer de próstata también puede incluir radioterapia, incluyendo radioterapia de rescate, así como terapia hormonal o quimioterapia.

Un ensayo del PSA total tiene preferiblemente un límite de detección de al menos tan bajo como 2,0 pg / ml. Un ensayo del PSA puede tener preferiblemente una sensibilidad funcional al menos tan baja como de aproximadamente 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6 ó 0,5 pg / ml. Un ensayo del PSA puede tener preferiblemente un límite de detección tan bajo como de 0,2 pg / ml y/o una sensibilidad funcional de aproximadamente 0,5 pg / ml. El límite de detección se denomina alternativamente en este documento límite de detección funcional o límite de detección. El límite de detección (LOD) es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada con unas tasas de error de tipo I y II establecidas en el 5%

En algunas formas de realización, el límite de detección puede ser al menos tan bajo como de 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5 ó 0,2 pg / ml. El ensayo del PSA también puede tener un límite de detección tan bajo como de 0,5 pg / ml, con una sensibilidad funcional tan baja como de 1 ó 2 pg / ml. En algunas formas de realización, el ensayo de PSA tiene un límite de detección funcional de 0,2 pg / ml y una sensibilidad funcional de 0,5 pg / ml, y comprende adicionalmente poner en contacto la muestra con un conjugado que comprende una entidad de unión al PSA que no es un ácido nucleico y un marcador de ácido nucleico que puede usarse para generar una señal de PCR.

La definición más común de recidiva bioquímica recientemente es una [PSA] de más de 0,2 ng / ml (200 pg / ml), aunque se han usado niveles que varían entre 100 y 2.000 pg / ml. Doherty y col., *J. Cancer* 83 (11): 1432 - 1436 (2000). Con un ensayo de PSA con una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 1,0 pg / ml, es posible determinar si se ha producido o no una recidiva bioquímica en etapa temprana. La detección de la recidiva bioquímica en etapa temprana tiene lugar antes que la detección de una recidiva bioquímica definida convencionalmente mediante el uso de los ensayos convencionales del PSA.

En un aspecto de la invención, puede detectarse una ES - BCR basada en el nivel de PSA mediante la comparación del nivel máximo observado de PSA con un indicador del nivel de PSA.

En otra forma de realización de esta invención, pueden usarse los ensayos del PSA para determinar el PSA en muestras en serie tomadas de un paciente después de la terapia. Las mediciones del PSA de las muestras en serie tomadas con el tiempo pueden usarse para calcular los valores del índice de PSA que incluyen la velocidad del cambio en la [PSA], la pendiente del Ln [PSA] frente al tiempo o el tiempo de duplicación para el aumento del PSA. La comparación de la velocidad de aumento en la [PSA] y opcionalmente más de estos valores de índices del PSA con su correspondiente índice de indicador permite la determinación de si se ha producido una ES - BCR.

En esta forma de realización, la invención puede comprender, por ejemplo, procedimientos para la determinación de si un paciente tiene una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR), que comprenden:

- a) obtener muestras en serie del paciente;
- b) determinar el nivel de PSA en cada muestra mediante el uso de un ensayo de PSA con una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 1 pg / ml;
- c) determinar si el valor del índice de PSA excede un indicador del índice de PSA, detectando así una ES - BCR;

determinar que el valor del índice de PSA no excede el indicador del índice, detectando así que la enfermedad es estable.

La primera muestra para su uso en la determinación de un valor de PSA puede tomarse en cualquier momento después de la terapia, y durante o después del aclaramiento de los niveles del PSA previos a la terapia y a las cifras mínimas de PSA. Generalmente, la primera muestra se tomará en cualquier momento entre las 2 semanas y las 8 semanas después del tratamiento. Las muestras pueden tomarse en cualquier conjunto de intervalos usados en el control clínico de la enfermedad prostática. Preferiblemente la primera muestra se tomará 30 ó 45 días después del

tratamiento, tomándose las subsiguientes muestras preferiblemente a intervalos de 3 meses. Este curso temporal puede modificarse si el valor del PSA de una muestra indica que se ha producido una ES - BCR o indica un fracaso del tratamiento.

- 5 El índice de aumento en el nivel del PSA debe ser medido desde el punto de la cifra mínima de PSA. Los pacientes cuya velocidad de aumento del PSA aumenta por encima de un nivel indicador pueden caracterizarse por estar experimentando una recidiva bioquímica en etapa temprana. Los indicadores del índice pueden obtenerse, evaluarse o determinarse mediante el uso de análisis estadísticos que incluyan una regresión logística univariada y un análisis de la característica operativa del receptor (ROC), un análisis bivariado o un análisis multivariado, u otros procedimientos estadísticos apropiados para obtener unos valores indicadores que proporcionen una buena discriminación entre subpoblaciones de pacientes con una enfermedad estable y con una ES - BCR.

15 Como se analizará adicionalmente a continuación, el índice de aumento en los niveles del PSA con el tiempo es un buen indicador de si el paciente tiene una ES - BCR o una enfermedad estable. Además, un indicador del índice, tal como el segundo aumento consecutivo, puede usarse como indicador de si el paciente tiene una ES - BCR o una enfermedad estable. La velocidad de cambio en el indicador de la [PSA] o el indicador de segundo aumento consecutivo puede ser de 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, o 4,0 pg / ml/es, y más preferiblemente de 2,0 pg / ml por mes, o de aproximadamente cualquiera de esas cantidades. Como otro ejemplo, el indicador de la pendiente del Ln [PSA] frente al tiempo puede estar aproximadamente por encima de cualquier nivel entre 0,015 y 0,0425, preferiblemente de 0,015, 0,0175, 0,020, 0,0225, 0,025, 0,0275, 0,030, 0,0325, 0,035, 0,0375, 0,040, 0,0425, o 0,045, y más preferiblemente de 0,03.

25 Además, en una forma de realización, un indicador del tiempo de duplicación de si un paciente tiene una ES - BCR puede ser cualquier número de días entre 400 - 800 días, más preferiblemente de 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775 u 800 días, y muy preferiblemente de 550 días. Cuando el valor del índice del PSA no excede el indicador del índice del PSA, se realiza la determinación de que la enfermedad es estable; si el valor del índice del PSA es igual o superior al indicador del índice del PSA, se detecta una ES - BCR. En el caso de un indicador de tiempo de duplicación, se determinará una ES - BCR si el tiempo de duplicación del PSA en días es igual o menor al indicador del tiempo de duplicación. Para el valor y el indicador del tiempo de duplicación, se determinará que el valor del tiempo de duplicación excede el indicador del tiempo de duplicación si el valor del tiempo de duplicación es menor que el indicador del tiempo de duplicación.

35 En otras formas de realización, se usan el indicador máximo observado del PSA y el indicador de la pendiente del Ln [PSA] frente al tiempo en combinación para determinar si un paciente tiene una enfermedad estable o una ES - BCR. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender adicionalmente c) determinar si el nivel de PSA está por encima de un indicador del PSA de 15 pg / ml y si el valor de la pendiente del Ln [PSA] frente al tiempo está por encima del indicador de la pendiente de Ln [PSA] frente al tiempo en aproximadamente 0,03, con objeto de detectar una ES - BCR. Por otro lado, si el nivel del PSA es menor de 15 pg / ml o si el índice de aumento del nivel del PSA está por debajo de aproximadamente 0,03, se detecta una enfermedad estable. En este ejemplo, la ES - BCR se determina si ambos índices de aumento en el nivel de PSA son iguales o exceden el indicador del índice, y el valor observado del PSA es igual o excede el indicador máximo observado del PSA.

45 En este documento también se describe un procedimiento para detectar si un paciente tiene una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR) rápida, intermedia o lenta, que comprende

- 50 a) obtener un conjunto de series de muestras de suero sanguíneo de un paciente después de una terapia para el cáncer de próstata;  
 b) medir el nivel del PSA en cada muestra mediante el uso de un ensayo del PSA con una sensibilidad funcional de aproximadamente 0,5 pg / ml;  
 c) determinar un valor del índice de PSA;  
 d) determinar si el valor del índice de PSA es igual o inferior a un indicador del índice de PSA, detectando así una ES - BCR; y  
 e) clasificar la ES - BCR como rápida, intermedia o lenta basándose en el indicador del índice de PSA.

55 Los pacientes cuyo valor del tiempo de duplicación del PSA sea igual o exceda el umbral límite pueden clasificarse por tener una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR) rápida, intermedia o lenta basándose en el tiempo de duplicación. Como un ejemplo, en algunas formas de realización, un tiempo de duplicación igual o inferior a aproximadamente diez meses indica una recidiva rápida; un tiempo de duplicación de más de aproximadamente diez meses hasta igual o aproximadamente 24 meses indica una ES - BCR intermedia, y un tiempo de duplicación de más de aproximadamente 24 meses indica una recidiva baja.

60 En este documento también se describe un procedimiento para detectar si un paciente tiene una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR) rápida, intermedia o lenta, que comprende

- 65 a) obtener un conjunto de series de muestras de suero sanguíneo de un paciente después de una terapia para el cáncer de próstata;

- b) medir el nivel del PSA en cada muestra mediante el uso de un ensayo PSA con una sensibilidad funcional de aproximadamente 0,5 pg / ml;
- c) determinar el valor del tiempo de duplicación y el valor máximo observado de PSA;
- d) determinar si el tiempo de duplicación es igual o inferior al indicador del tiempo de duplicación, detectando así una ES - BCR; y
- e) clasificar la ES - BCR como rápida, intermedia o lenta basándose en el indicador del tiempo de duplicación y el máximo observado de PSA.

Los pacientes cuyo valor del tiempo de duplicación del PSA sea igual o exceda el umbral límite del tiempo de duplicación pueden clasificarse en cuatro subclases de ES - BCR basándose en el tiempo de duplicación y/o en el máximo observado de PSA. Los pacientes con recidiva de tipo 1 tienen un tiempo de duplicación de menos de 150 días. Los pacientes con recidiva de tipo 2 tienen unos tiempos de duplicación de entre 150 - 400 días. Los pacientes con recidiva de tipo 3 y los pacientes con recidiva de tipo 4 tienen unos tiempos de duplicación del PSA mayores de 400 días. Para los pacientes de tipo 3, el máximo observado de PSA excede los 200 pg / ml, mientras que los pacientes de tipo 4 tienen unos valores máximos observados de PSA que no exceden los 200 pg / ml para un periodo prolongado de más de 400 días.

En este documento también se describe un procedimiento para detectar si un paciente tiene una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR) tras una terapia de rescate para el cáncer de próstata, que comprende

- a) obtener unas muestras de un paciente después de una terapia de rescate;
- b) medir el nivel del PSA en la muestra mediante el uso de un ensayo de PSA con una sensibilidad funcional de aproximadamente 0,5 pg / ml;
- c) usar el nivel del PSA de una o más muestras para determinar un valor del PSA;

donde se detecta una ES - BCR si el valor del PSA excede un indicador de PSA, y se detecta una enfermedad estable si el valor del PSA no excede el indicador del PSA.

En este documento también se describe un kit que comprende un conjugado de ácido nucleico-anti-PSA que es adecuado para realizar un inmunoensayo en sándwich para el PSA usando la detección de la señal de la PCR, donde el ensayo tiene un límite de detección al menos tan bajo como de 0,2 pg / ml y una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 0,5 pg / ml. El kit puede comprender adicionalmente un programa informático para la determinación de uno o más valores del PSA.

En este documento también se describe una etiqueta que comprende una descripción de un procedimiento para detectar si un paciente tiene una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR), que comprende

- a) obtener una muestra de un paciente después de una terapia para el cáncer de próstata;
- b) medir el nivel de PSA en la muestra mediante el uso de un ensayo de PSA con una sensibilidad funcional menor de 1 pg / ml;
- c) usar el nivel de PSA de una o más muestras para determinar un valor de PSA;

donde se detecta una ES - BCR si el valor del PSA es igual o excede un indicador de PSA, y se detecta una enfermedad estable si el valor del PSA no excede el indicador de PSA.

## Ejemplos

Los estudios clínicos que usan un ensayo con una sensibilidad mayor para el PSA total (tPSA) demostraron que la recidiva bioquímica puede ser detectada más tempranamente mediante el control de los cambios en el PSA sérico mediante el uso de ensayos con una sensibilidad mayor. Por el contrario, la sensibilidad funcional de los ensayos convencionales referidos previamente está limitada y no puede proporcionar unos niveles fiables del PSA menores de alrededor de 0,01 ng / ml (10 pg / ml). Por lo tanto, el uso de ensayos de alta sensibilidad para la [PSA] proporciona una elección más fiable y más temprana de la BCR.

### **Ejemplo 1: inmunoensayo de detección de ácidos nucleicos (ensayo NADIA®) para la detección de unos niveles muy bajos de antígeno específico prostático (PSA)**

Se midió el PSA total (tPSA) en muestras séricas mediante el uso de un inmunoensayo de detección de ácidos nucleicos (ensayo NADIA®) con una sensibilidad funcional de 0,5 pg / ml. Véase Clin Chem 53(6) Supl., 2007, #C-15. El ensayo NADIA® se realiza en un formato de inmunoensayo en sándwich.

Se emplearon dos anticuerpos dirigidos a diferentes epítomos del PSA en un ensayo diseñado para detectar niveles de pg / ml de PSA en muestras de pacientes procedentes de hombres que se han sometido a una prostatectomía radical.

**Ejemplo 1A: producción del conjugado de señalización de ácido nucleico-anti-PSA**

5 El primer anticuerpo está conjugado (unido químicamente) a un oligonucleótido de 60 bases según describen Jablonski y Adams en IVD Technology, noviembre de 2006. Este anticuerpo indicador se diluye después hasta una concentración de aproximadamente 10 - 30 picomolar (pM) en un diluyente tamponado que contiene albúmina sérica bovina (BSA) y un tensioactivo para disminuir la unión no específica a un intervalo de pH de 7,0 - 7,5.

**Ejemplo 1B: producción del conjugado de captura de ácido nucleico-anti-PSA**

10 El segundo anticuerpo está inmovilizado sobre una partícula paramagnética de aproximadamente 1 micrómetro de diámetro. El anticuerpo de captura tiene biotina unida químicamente mediante el uso de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina (hexanoato de sulfosuccinimidil-6-(biotinamido), número de catálogo 21335 suministrado por Pierce mediante el uso de los procedimientos descritos en su catálogo, y subsiguientemente se une a la partícula paramagnética a través de un conector de estreptavidina que ha sido unido a la partícula magnética por el fabricante, Seradyn  
15 (número de catálogo 3015- 2104).

**Ejemplo 1C: condiciones para los ensayos NADIA®**

20 Se dejaron reaccionar 75 microlitros (µl) de anticuerpo indicador con 20 µl de muestra sérica del paciente durante dos horas a temperatura ambiente. En un formato heterogéneo, el anticuerpo de captura, inmovilizado sobre las partículas paramagnéticas, es añadido después al anticuerpo indicador y la disolución de la muestra. Esta mezcla se deja reaccionar durante 30 minutos con una agitación suave para mantener las partículas paramagnéticas en suspensión.

25 Al final de esta incubación las partículas se separan magnéticamente de la disolución remanente, que es cuidadosamente extraída, dejando las partículas magnéticas en la pared del pocillo. Después las partículas magnéticas se lavan 3 - 5 veces para eliminar el anticuerpo indicador no unido. Esta disolución se tampona a pH neutro que contiene un tensioactivo, tal como Tween 20. El resultado es una partícula lavada que sólo contiene PSA, si está presente, atrapado entre un anticuerpo de captura y un anticuerpo indicador marcado con ADN.

30 Después se añaden el reactivo de la PCR que contiene los cebadores complementarios del ADN y la polimerasa Taq a las partículas paramagnéticas lavadas y se realiza una PCR en tiempo real. Esta etapa de amplificación de la PCR usa unos reactivos estándar disponibles comercialmente. En presencia de un inmunocomplejo, que contiene ADN unido al anticuerpo indicador, se produce la amplificación del molde de ADN.

35 Entonces la muestra desconocida se lee a partir de una curva estándar generada con calibradores con una concentración conocida de tPSA, de 5, 25 y 100 pg / ml. Adicionalmente, cada placa de 96 pocillos contiene controles con 0,0, 10,0 y 80,0 pg / ml de PSA que aseguran adicionalmente que la etapa de amplificación mediante PCR está apropiadamente controlada para el análisis de cada placa.

40 Según describen Jablonski y Adams en IVD Technology, noviembre de 2006, dichos ensayos también pueden realizarse en un formato homogéneo. Por ejemplo, se marcó un primer anticuerpo monoclonal anti-PSA con una secuencia de oligonucleótidos (a), y el segundo anticuerpo se conjugó con la secuencia de oligonucleótidos (b) o (c). La secuencia de oligonucleótidos (a) era complementaria de las secuencias (b) y (c), para las últimas 9 y 15 bases, respectivamente, en los extremos 3'. El par conjugado se diluyó hasta 10 - 100 pmol en Tris 10 mmol (pH 8,0) que contiene un 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA) y se combinó en presencia de PSA durante 2 horas. La disolución se diluyó después con Tris/BSA para reducir el exceso de concentración del conjugado por debajo de 1 pmol y se mantuvo a 52°C durante 1 minuto para fundir completamente el conjugado no unido. Se añadió la mezcla de reactivos de la PCR, que contiene polimerasa Taq y cebadores secuencia abajo, y la reacción se cerró herméticamente. La temperatura se redujo hasta 23°C para hibridar completamente las hebras de ADN asociadas al inmunocomplejo y para iniciar la primera extensión de cadena. El MAb-ADN libre no puede hibridar en la misma magnitud en el marco de tiempo de la primera extensión en disolución diluida, y no puede participar en la subsiguiente amplificación exponencial. Los marcadores de ADN solapantes que estaban asociados con el inmunocomplejo del PSA fueron ampliados durante 5 minutos, y se completó aumentando la temperatura hasta 85°C durante 3 minutos. La amplificación mediante PCR en tiempo real del molde formado comenzó inmediatamente, destruyendo el inmunocomplejo, que ya no era necesario. Se determinó que la sensibilidad del ensayo era de aproximadamente 100 fg/ml.

60 Para demostrar el rendimiento del ensayo NADIA® para el PSA, IMD obtuvo muestras de pacientes del Lab of Eleftherios Diamandis M.D. Ph. D. (University Health Network and Toronto Medical Laboratories, Toronto, ON, Canadá). Estas muestras incluían 42 pacientes que habían sido previamente caracterizados por el Dr. Diamandis como estables y 43 pacientes con unos valores del PSA en aumento que fueron clasificados como en recidiva bioquímica. Las muestras se obtuvieron tras la prostatectomía y fueron incluidas si sus valores de PSA tras la cirugía caían por debajo de 100 pg / ml. Se definió una recidiva bioquímica mediante el uso de diversos criterios y se basaron en los valores de los puntos temporales obtenidos en el transcurso del estudio. Véase Yu, He; Diamandis, Eleftherios, P.Wong, Pui-Yuen; Nam, Robert; Trachtenberg, John "Detection of Prostate Cancer Relapse con

Prostate Specific Antigen Monitoring at Levels of .001 to 0.1 ug/L" J. Urology 157: 913 - 18 (1997).

El ensayo NADIA® para el PSA era lo suficientemente sensible como para distinguir de forma precisa los valores de tPSA en todas las muestras femeninas, y los menores valores observados en las muestras de la población masculina en el estudio clínico retrospectivo a partir de los valores previos.

### **Ejemplo 2: estudio retrospectivo para evaluar los indicadores de la evolución de la enfermedad**

Se usaron ensayos NADIA® para medir los niveles de tPSA en muestras séricas en serie procedentes de pacientes con cáncer de próstata tras una prostatectomía radical. Los resultados se compararon con las anteriores mediciones de los niveles de PSA en las muestras séricas mediante el uso de un ensayo de investigación basado en un ensayo inmunofluorimétrico (IFM). Vassilikos y col., Clin. Biochem. 33: 115 - 123 (2000). Entonces se analizaron los resultados del ensayo NADIA® para determinar la concordancia con la evolución clínica de los pacientes.

#### **Muestras**

En este estudio se usaron las muestras séricas (N = 435) almacenadas después de un estudio publicado previamente (J Urol 157: 913 - 8, 1997). Las muestras se recogieron en 1993 y 1994, los niveles de PSA se midieron mediante el uso del ensayo de Abbott Laboratories IMx, y las muestras se almacenaron congeladas a -40°C. Las muestras también se usaron en el estudio de Vassilikos y col., donde se usó un ensayo de IFM para determinar los niveles de tPSA. El ensayo de IFM se describe adicionalmente en Clin Chem 39: 2108 - 14, 1993. Las muestras séricas usadas en el estudio de Vassilikos y col. se obtuvieron de 85 pacientes que tenían un tPSA en la línea basal < 100 pg / ml después de una RP (medido mediante el uso del ensayo IMx), y de los que cada uno tenía más de 3 muestras en serie tomadas después de una RP (media de 5,0, mediana de 5, intervalo de 3 - 6). La edad media (intervalo) era de 63 años (49 - 73), el tPSA pre-RP era de 7,1 ng / ml (0,1 - 49,0), la puntuación de Gleason era de 7 (5 - 9) y el porcentaje de implicación tumoral era del 25% (1 - 90%). Las etapas clínicas eran T1a-c (16), T2a-b (35) y desconocida (33). 4 pacientes recibieron una terapia previa a la RP (hormonas = 1; radioterapia = 2). En el estudio del Journal of Urology, las muestras séricas para las que se determinaron originalmente los valores de tPSA mediante el ensayo Abbott IMx se volvieron analizar mediante el procedimiento de IFM y no mostraron unas diferencias significativas en comparación con los valores originales. El artículo del Journal of Urology definió la BCR como  $\geq 2$  aumentos sucesivos del tPSA que alcanzan los  $\geq 100$  pg / ml, con una fecha retroactiva de la recaída en el primer aumento del tPSA.

En el estudio del PSA mediante el ensayo NADIA® se incluyeron las muestras séricas de pacientes posteriores a una prostatectomía radical (RP) si sus niveles de PSA después de una RP estaban por debajo del límite detectable mediante el uso de los ensayos para PSA convencionales aprobados actualmente por la FDA. Muchos de los ensayos convencionales indican que un paciente tiene un valor de cero o  $< 0,1$  ng / ml ( $< 100$  pg / ml) tras la cirugía. El ensayo del PSA mediante NADIA® puede detectar un nivel aproximadamente 200 veces menor de PSA que los ensayos de PSA aprobados por la FDA. Por lo tanto, el uso de un ensayo de PSA con una mayor sensibilidad permitió por primera vez la medición del nivel real del PSA en pacientes después de una prostatectomía. La medición más sensible y precisa de los niveles de PSA permitió la ubicación de los pacientes en dos grupos - enfermedad estable y recidiva bioquímica en etapa temprana.

#### **Estadística descriptiva de los pacientes del estudio**

De este análisis se excluyeron prospectivamente siete pacientes debido a que no había disponibles datos del ensayo NADIA® ni datos de la cirugía. El número final de pacientes incluidos en este estudio era de ochenta y cinco (85). Las mediciones de la [PSA] (pg / ml) obtenidas en el momento de la toma de muestras de cada paciente incluido en el estudio se muestran en la Tabla 1, a continuación.

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
11	1	970	4,23
	1	1285	42,37
	1	1517	1255,62
	1	1708	2680,00
28	1	229	30,79
	1	550	109,86
	1	915	350,69
	1	1364	319,66
	1	1721	502,86

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
31	1	452	88,02
	1	660	159,86
	1	807	156,12
	1	2067	1859,00
	1	2431	2008,00
38	1	112	5,43
	1	224	17,10
	1	329	58,69
	1	763	189,08
	1	1444	883,84
	1	1666	1322,65
41	1	375	6,35
	1	508	10,41
	1	882	15,08
	1	1069	20,68
	1	1264	23,65
	1	1701	73,83
60	1	891	9,38
	1	1031	5,76
	1	1459	11,21
	1	1859	18,17
	1	2202	21,62
	1		
64	1	460	44,30
	1	845	102,10
	1	1036	132,20
	1	2224	278,80
65	1	644	18,38
	1	806	25,68
	1	1565	114,02
	1	2011	216,38
	1	2150	278,46
	1	2312	388,57
79	1	938	147,10
	1	1281	155,80
	1	1366	193,70
	1	1557	197,80
	1	1731	271,80
	1	1974	2357,00
87	1	583	10,50
	1	751	9,69
	1	1081	17,63
	1	1458	35,58
	1	2192	105,97

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
89	1	424	97,80
	1	772	143,25
	1	857	221,32
	1	998	330,06
	1		752,68
92	1	155	41,87
	1	301	54,52
	1	429	119,80
	1	513	153,72
	1	1785	1406,41
97	1	557	75,88
	1	698	455,62
	1	1264	542,54
	1	1672	726,70
103	1	716	29,12
	1	1243	6,45
	1	1621	65,48
	1	1781	164,06
105	1	655	10,52
	1	879	23,36
	1	1863	295,16
	1	2226	399,07
108	1	385	56,15
	1	887	306,78
	1	1224	378,35
	1	1586	661,77
113	1	540	4,57
	1	928	8,66
	1	1320	18,69
	1	1730	49,04
	1	2258	78,79
124	1	275	167,90
	1	631	331,40
	1	716	636,40
	1	1974	1782,00
136	1	81	9,70
	1	340	72,74
	1	515	184,14
	1	1757	647,86
151	1	188	39,13
	1	432	62,72
	1	830	169,00
	1	1061	382,34



ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
160	1	248	10,84
	1	346	6,63
	1	528	24,15
	1	794	67,76
	1	976	122,64
	1	1354	228,00
177	1	1196	0,39
	1	1375	20,17
	1	1674	1,60
	1	2193	52,22
	1	2204	1,37
179	1	863	8,87
	1	1236	16,11
	1	1635	35,70
	1	2006	40,80
	1	2335	57,90
183	1	15	13,51
	1	218	77,75
	1	1041	255,50
	1	1375	520,09
184	1	281	6,59
	1	960	43,05
	1	1131	61,97
	1	1302	93,32
	1	1711	1722,20
197	1	490	42,80
	1	905	129,10
	1	1329	446,10
	1	1476	357,10
	1	1813	1585,30
214	1	184	20,66
	1	310	53,05
	1	1257	108,69
	1	1677	178,18
	1	2039	248,77
230	1	48	8,13
	1	138	10,36
	1	230	9,61
	1	671	38,85
	1	1588	201,80
242	1	128	8,69
	1	285	12,78
	1	582	82,14
	1	1163	178,67
	1	1541	277,47

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
261	1	47	13,21
	1	608	2227,87
	1	720	3267,70
	1	1026	60,10
	1	1132	241,10
	1	1385	2920,06
262	1	722	22,47
	1	1114	77,27
	1	1488	612,22
	1	1688	217,07
	1	1849	171,23
282	1	147	31,72
	1	793	171,80
	1	1165	299,61
	1	1362	678,51
300	1	48	4,70
	1	192	34,70
	1	350	108,80
	1	445	222,98
	1	592	267,07
	1	864	578,09
301	1	112	1,60
	1	265	3,12
	1	623	14,22
	1	833	27,30
302	1	54	6,48
	1	122	41,39
	1	410	528,84
	1	577	805,97
	1	748	941,12
	1	921	1302,18
303	1	86	3,45
	1	385	5,30
	1	545	14,10
	1	748	13,99
	1	1031	43,80
	1	1437	78,12
308	1	87	4,60
	1	177	19,93
	1	545	93,62
	1	744	196,28
	1	1028	295,98
	1	1210	484,54
309	1	60	1,27
	1	346	1,84
	1	756	2,02
	1	1188	81,39

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
312	1	188	35,89
	1	261	26,73
	1	391	258,85
	1	572	9338,12
	1	678	13316,08
322	1	155	4,41
	1	597	43,57
	1	839	87,82
	1	1128	180,12
	1	1241	255,53
	1	1601	315,70
325	1	101	1,36
	1	224	1,65
	1	686	5,59
	1	866	9,33
	1	1112	15,13
	1	1474	30,93
337	1	110	3,52
	1	482	1,31
	1	580	14,20
	1	671	69,91
	1	881	230,07
	1	1255	348,08
340	1	52	58,17
	1	71	79,29
	1	113	149,15
	1	393	476,20
	1	505	568,08
	1	1149	11857,37
29	0	108	5,15
	0	276	3,59
	0	473	7,85
	0	646	3,68
	0	1718	1,65
37	0	947	2,43
	0	1107	1,37
	0	1275	3,28
	0	1808	2,42
	0	2494	3,93
81	0	368	3,68
	0	712	2,49
	0	1084	4,37
	0	1516	2,03
	0	1716	3,38

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
82	0	755	9,47
	0	958	4,29
	0	1128	3,99
	0	1394	2,98
	0	2185	1,91
86	0	492	2,73
	0	667	2,22
	0	858	3,41
	0	1031	2,60
	0	1545	2,91
100	0	1288	1,42
	0	1652	3,35
	0	2030	1,99
	0	2770	1,20
	0	3133	1,38
120	0	638	2,48
	0	806	2,18
	0	977	0,82
	0	1150	3,52
	0	1536	1,65
126	0	585	6,34
	0	892	1,34
	0	1477	0,79
	0	1896	3,39
	0	2166	3,89
	0	2273	1,03
128	0	212	8,11
	0	331	3,56
	0	513	1,60
	0	605	2,67
	0	1788	2,31
137	0	202	4,19
	0	356	1,44
	0	541	1,09
	0	723	1,88
	0	1078	1,46
	0	1416	0,87
144	0	203	3,13
	0	359	1,94
	0	532	5,09
	0	994	3,89
	0	1392	5,47
	0	1815	1,73

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
154	0	842	1,79
	0	1444	0,85
	0	1528	2,23
	0	1808	2,03
	0	2235	1,51
	0	2403	
164	0	315	5,77
	0	539	4,97
	0	1316	6,00
	0	1703	4,10
	0	1983	6,01
167	0	877	17,35
	0	1231	22,01
	0	1926	24,20
	0	2226	127,05
178	0	181	0,19
	0	251	0,15
	0	469	0,21
	0	1007	3,62
	0	1387	4,68
	0	1578	0,12
191	0	61	2,19
	0	256	1,36
	0	727	1,19
	0	987	6,27
	0	1385	1,17
	0	1687	2,72
193	0	61	5,56
	0	152	3,09
	0	277	6,43
	0	999	10,37
	0	1196	7,27
196	0	33	4,31
	0	537	1,97
	0	922	2,25
	0	1289	3,33
	0	1634	4,29
219	0	257	1,34
	0	700	7,71
	0	852	1,95
	0	1444	1,38
227	0	49	4,40
	0	235	4,13
	0	353	8,60
	0	446	25,08
	0	616	6,80
	0	790	8,00

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
231	0	1243	5,28
	0	1564	10,53
	0	1923	14,46
	0	2292	14,79
	0	2657	13,99
235	0	57	1,93
	0	87	4,76
	0	196	4,33
	0	415	6,34
	0	570	4,49
	0	967	4,05
244	0	299	2,10
	0	516	2,55
	0	760	3,27
	0	969	5,26
	0	1146	2,03
	0		3,17
246	0	104	4,48
	0	229	11,95
	0	391	8,40
	0	761	4,13
	0	1104	3,64
	0	1498	5,24
254	0	118	1,23
	0	166	1,59
	0	811	3,11
	0	1154	2,58
255	0	1321	3,60
	0	1477	3,17
	0	1607	3,93
	0	1883	4,32
	0	2175	2,50
	0	2525	9,68
259	0	75	1,60
	0	173	2,44
	0	393	2,74
	0	581	2,14
	0	1042	1,90
	0	1526	2,89
265	0	175	5,01
	0	742	1,18
	0	1115	0,87
	0	1615	0,80

ES 2 433 745 T3

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
266	0	55	3,78
	0	191	3,90
	0	321	6,76
	0	697	5,05
	0	1035	4,87
	0	1480	14,39
280	0	428	2,08
	0	616	2,37
	0	990	0,71
	0	1401	1,02
	0	1813	2,20
285	0	220	1,01
	0	591	3,06
	0	955	0,98
	0	1147	1,27
	0	1343	0,81
	0	1493	3,47
290	0	91	1,38
	0	210	2,54
	0	478	3,73
	0	842	3,81
	0	1037	2,75
	0	1420	5,25
296	0	131	4,28
	0	552	3,06
	0	798	1,83
	0	976	3,34
	0	1178	1,01
	0	1464	1,23
305	0	55	2,39
	0	328	1,74
	0	738	2,66
	0	951	2,18
	0	1140	1,69
	0	1418	2,19
313	0	37	4,46
	0	95	3,86
	0	199	6,51
	0	472	7,71
	0	815	6,17
	0	1144	6,00
317	0	719	3,09
	0	930	0,76
	0	1094	1,01
	0	1315	0,89
	0	1749	1,18
	0	2543	3,58

ID del paciente	Recidiva (1 = Si, 0 = No)	Días después de la cirugía	pg / ml de PSA mediante NADiA
321	0	91	0,92
	0	242	0,74
	0	641	0,70
	0	1005	1,13
	0	1440	1,77
326	0	24	2,40
	0	252	1,47
	0	426	1,49
	0	860	0,75
	0	1180	3,86
	0	1298	4,62
330	0	69	5,06
	0	524	5,64
	0	624	5,16
	0	820	6,80
	0	1016	7,71
	0	1234	6,56
336	0	75	1,66
	0	256	1,64
	0	599	2,45
	0	788	1,13
	0	958	1,07
	0	1313	1,61
341	0	58	19,33
	0	165	7,84
	0	382	4,49
	0	697	4,77
	0	1137	3,97
	0	1270	2,86
347	0	785	1,96
	0	1179	4,29
	0	1366	2,81
	0	1555	2,90
	0	1793	3,64
	0		

5 Cuarenta y tres (43) se clasificaron como con recidivas, y cuarenta y dos (42) se clasificaron como con una enfermedad estable basándose en el ensayo de investigación de Diamandis. Yu, y col., J. Urology 157: 913 - 18 (1997). Se obtuvieron las estadísticas descriptivas de la variable clinicopatológica para las poblaciones de pacientes. La significación de las diferencias en la distribución de las variables clínicas entre los pacientes con la clasificación de con recidiva y con enfermedad estable se resumen en la Tabla 2, a continuación ( $p < 0,05$  indicaba una diferencia significativa en la distribución de la variable entre la población con recidiva y la población con enfermedad estable).

10 TABLA 2: variables clinicopatológicas - significación de las diferencias en la distribución de las variables clínicas entre pacientes con recidiva y con enfermedad estable

Variable	N	p
Edad en el diagnóstico	68	0,6117 *
Etapa	51	0,3324 **
Puntuación de Gleason	66	<b>0,0276 **</b>



Variable	N	p
Quimioterapia preoperatoria	55	0,1611 **
Tipo de tratamiento	51	0,4216 **
Implicación de los márgenes	61	<b>0,0006</b> **
Invasión del tejido periprostático	51	<b>0,0006</b> **
Invasión capsular	62	<b>0,0181</b> **
Invasión de la vesícula seminal	62	0,6216 **
Invasión del cuello de la vejiga	51	0,7037 **
Implicación de nódulos linfáticos	60	n/a
Volumen del tumor	56	<b>0,0008</b> *

\* prueba del orden con signo de Wilcoxon

\*\*  $\chi^2$

5 En el estudio actual, ochenta y cuatro (98,8%) de los pacientes eran susceptibles de la evaluación bioquímica mediante el uso de los ensayos NADIA® para medir el tPSA, y el 60 - 70% de ellos eran susceptibles de ser evaluables clinicopatológicamente. La medición del tPSA mediante el uso de NADIA® mostró que la mediana (intervalo) de la cifra mínima o el primer valor de tPSA después de la RP era de 4,1 pg / ml (0,2 - 167,9 pg / ml).

10 Además, según se muestra en la tabla anterior de la significación de las diferencias en la distribución de las variables clínicas entre las clasificaciones de con recidiva y de enfermedad estable: Gleason, márgenes quirúrgicos, invasión periprostática, invasión capsular y volumen del tumor, todos muestran unas diferencias significativas entre las subpoblaciones y pueden ser pronósticos de evolución.

### **Ejemplo 3: evaluación de las mediciones basadas en la [PSA] como indicador(es) de la evolución de la enfermedad**

15 El análisis de los datos recogidos para el conjunto de muestras permitió la evaluación de las hipótesis de que varios indicadores de medición del PSA eran predictivos de la evolución de la enfermedad, y serían útiles en el control de los pacientes después de la terapia del cáncer de próstata. Estos indicadores incluyen los siguientes valores basados en las mediciones mediante el ensayo NADIA® del tPSA en muestras en serie procedentes de pacientes:  
 20 tiempo de duplicación del tPSA (calculado únicamente a partir de pacientes para los que los valores de PSA mediante el ensayo NADIA® eran susceptibles de un ajuste exponencial); primer nivel posterior a la prostatectomía (el valor de la cifra mínima no es siempre igual al primer valor posterior a la prostatectomía); nivel máximo de tPSA conservado después de la cifra mínima (puede ser en cualquier momento del control); proporción entre el nivel máximo de tPSA y la cifra mínima (requiere al menos un valor mayor que el nivel de la cifra mínima aparente en  
 25 algún punto posterior al de la cifra mínima para indicar una posible recidiva); segundo aumento consecutivo en pg / ml / mes; índice de aumento; número de duplicaciones durante el periodo de control; número de duplicaciones consecutivas durante el control.

30 Para cada paciente analizado en este estudio se representó el tPSA (pg / ml) medido mediante el uso de ensayos NADIA® en función de los días tras la cirugía. Por ejemplo, la Figura 1 muestra el gráfico de la t[PSA] mediante NADIA® en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para el paciente con recidiva número 11, con un ajuste exponencial. La Figura 2 muestra el gráfico de la t[PSA] mediante NADIA® en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para el paciente con recidiva número 31, con un ajuste exponencial. La Figura 3 muestra el gráfico de la t[PSA] mediante NADIA® en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para el paciente con  
 35 recidiva número 38, con un ajuste exponencial. La Figura 4 muestra el gráfico de la t[PSA] mediante NADIA® en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para el paciente con recidiva número 86, con un ajuste exponencial. La Figura 5 muestra el gráfico de la t[PSA] mediante NADIA® en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para el paciente con recidiva número 120, con un ajuste exponencial. La Figura 6 muestra el gráfico de la t[PSA] mediante NADIA® en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para el paciente con  
 40 recidiva número 126, con un ajuste exponencial.

45 Los gráficos de todos los pacientes se clasificaron según si los pacientes estaban en la categoría Con Recidiva o en la categoría de Enfermedad Estable. La Figura 7 muestra el gráfico de la t[PSA] mediante NADIA® en pg / ml frente a los días tras la prostatectomía radical para los 43 pacientes con recidiva. La Figura 8 muestra una gráfica superpuesta de la t[PSA] mediante NADIA® para 43 pacientes con recidiva frente al tiempo posterior a la prostatectomía, con el intervalo restringido a 1.000 pg / ml, sin puntos.

En el análisis del tiempo de duplicación, el estudio excluyó los pacientes con enfermedad estable cuyos puntos no podían ser ajustados exponencialmente. Diez de los 42 pacientes con enfermedad estable fueron incluidos en el

análisis del tiempo de duplicación. Para todos los demás análisis (nivel máximo observado de PSA, primer nivel posterior a la prostatectomía de PSA, nivel de cifra mínima de PSA, proporción entre el nivel máximo observado de PSA/nivel de cifra mínima, número de duplicaciones, número de duplicaciones sucesivas y 2º aumento en pg / ml / mes) se usaron los datos de los 43 pacientes con recidiva y de los 42 con enfermedad estable, es decir, no se realizaron exclusiones.

**Ejemplo 4: análisis de los potenciales indicadores de la evolución de la enfermedad**

Se realizó un análisis de cada posible indicador de PSA (primer nivel posterior a la prostatectomía de PSA, nivel de cifra mínima de PSA, nivel máximo observado de PSA, proporción entre el nivel máximo observado de PSA/nivel de cifra mínima, número de duplicaciones, número de duplicaciones sucesivas, 2º aumento en pg / ml / mes, tiempo de duplicación (en los que fueron posibles los ajustes exponenciales)) frente a la enfermedad con recidiva o estable, para evaluar la utilidad relativa de cada evolución como pronóstico de una recidiva. La clasificación clínica de los pacientes como con enfermedad estable o con recidiva se usó como evolución de referencia. Las pruebas estadísticas usadas fueron la prueba del orden con signo de Wilcoxon para las variables continuas, y la prueba de  $\chi^2$  de Pearson para las variables cualitativas.

Los análisis demostraron que todos los parámetros calculados de la [PSA] eran pronósticos significativos (prueba del orden con signo de Wilcoxon o  $\chi^2$  de Pearson  $p < 0,05$ ) de la evolución clínica (recidiva o enfermedad estable). El nivel máximo observado de tPSA, de segundo aumento consecutivo en pg / ml / mes y del tiempo de duplicación eran los mejores para discriminar las subpoblaciones de pacientes. La proporción entre el nivel máximo de PSA y el nivel de cifra mínima y el número de duplicaciones también demostró una discriminación razonable.

El análisis de cada uno de los indicadores de la [PSA] se analiza a continuación.

**Ejemplo 4A: análisis del 1º nivel posterior a la prostatectomía frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable)**

**TABLA 4: cuantiles**

Nivel	Mínimo	10%	25%	Mediana	75%	90%	Máximo
0	1,2	2,2	3,15	4,5	7,7	14,15	127
1	21,6	54,48	164	484,5	1406,4	2550,8	13316

**TABLA 5: medias y desviaciones estándar**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar	Media menor del 95%	Superior al 95%
0	40	8,96	19,67	3,11	2,67	15,3
1	43	1296,86	2648,59	403,91	481,75	2112,0

En la Figura 9A se muestra un gráfico del primer nivel de tPSA posterior a la prostatectomía frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)). Los cuantiles del grupo con enfermedad estable (0) y del grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 4. Las medias y las desviaciones estándar para el grupo con enfermedad estable (0) y el grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 5. Según el análisis de los datos del gráfico del nivel de tPSA posterior a la prostatectomía frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable), este parámetro diferencia significativamente las dos poblaciones, y es por lo tanto un pronóstico de la evolución. La media +/- el error estándar de la media (EEM) de la [PSA] para el grupo estable era de 4,1 pg / ml +/- 0,58, mientras que la media +/- el error estándar de la media (EEM) de la [PSA] para el grupo con recidiva era de 28,2 +/- 5,72. El p era < 0,0001. Sin embargo, la población estable se superpone con la población con recidiva hasta y más allá del valor de la mediana.

**Ejemplo 4B: análisis del nivel de cifra mínima de tPSA frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable):**

**TABLA 6: cuantiles**

Nivel	Mínimo	10%	25%	Mediana	75%	90%	Máximo
0	0,2	0,8	0,975	1,7	2,95	4,38	17,4
1	0,4	1,48	4,7	9,7	39,1	83,16	167,9

**TABLA 7: medias y desviaciones estándar**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar	Media menor del 95%	Superior al 95%
0	42	2,3976	2,7038	0,4172	1,555	3,240
1	43	27,1605	37,7972	5,7640	15,528	38,793

En la Figura 10 se muestra un gráfico del nivel de cifra mínima de la t[PSA] (pg / ml) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)). Los cuantiles del grupo con enfermedad estable (0) y del grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 6. Las medias y las desviaciones estándar para el grupo con enfermedad estable (0) y el grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 7. Según el análisis de los datos del nivel de cifra mínima de la [PSA], este parámetro diferencia significativamente las dos poblaciones, y es por lo tanto un pronóstico de la evolución. La media +/- el error estándar de la media (EEM) del nivel de cifra mínima de la t[PSA] para el grupo estable era de 2,4 pg / ml +/- 0,42, mientras que la media +/- el error estándar de la media (EEM) del nivel de cifra mínima de la t[PSA] para el grupo con recidiva era de 27,2 +/- 5,8. El p era < 0,0001. Sin embargo, la población estable se superpone con la población con recidiva hasta y más allá del valor de la mediana.

**Ejemplo 4C: análisis del nivel máximo observado de tPSA frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable):**

**TABLA 8: cuantiles**

Nivel	Mínimo	10%	25%	Mediana	75%	90%	Máximo
0	1,2	2,2	3,15	4,5	7,7	14,15	127
1	21,6	54,48	164	484,5	1406,4	2550,8	13316

**TABLA 9: medias y desviaciones estándar**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar	Media menor del 95%	Superior al 95%
0	40	8,96	19,67	3,11	2,67	15,3
1	43	1296,86	2648,59	403,91	481,75	2112,0

En la Figura 11 se muestra un gráfico del nivel máximo observado de tPSA frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)). Los cuantiles del grupo con enfermedad estable (0) y del grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 8. Las medias y las desviaciones estándar para el grupo con enfermedad estable (0) y el grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 9. El análisis del nivel máximo observado de la [PSA] frente a la subpoblación de pacientes demostró que el nivel máximo de tPSA diferenciaba significativamente las dos poblaciones de pacientes estables y con recidiva, y por lo tanto era un pronóstico de la evolución. La media +/- el error estándar de la media (EEM) de la [PSA] para el grupo estable era de 9,0 pg / ml +/- 3,11, mientras que la media +/- el error estándar de la media (EEM) de la [PSA] para el grupo con recidiva era de 1295,9 +/- 403,91. El p era < 0,0001. La población estable sólo se superpone con la población con recidiva en algún sitio entre el 10 y el 25% y por lo tanto estaba bien discriminada. En este estudio sólo había un paciente con enfermedad estable con un nivel observado de PSA por encima de 15 pg / ml.

**Ejemplo 4D: análisis del nivel máximo de tPSA/nivel de cifra mínima frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable):**

**TABLA 10: cuantiles**

Nivel	Mínimo	10%	25%	Mediana	75%	90%	Máximo
0	1,2	1,5	1,8	2,6	4,4	5,9	23,5
1	3,4	7,74	12	27,2	123	254,54	638,1

**TABLA 11: medias y desviaciones estándar**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar	Media menor del 95%	Superior al 95%
0	39	3,6154	3,602	0,577	2,448	4,78
1	43	87,5372	133,004	20,283	46,605	128,47

En la Figura 12 se muestra un gráfico del nivel máximo de la [PSA] (pg / ml)/nivel de cifra mínima de la [PSA] (pg / ml) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)). Los cuantiles del grupo con enfermedad estable (0) y del grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 10. Las medias y las desviaciones estándar para el grupo con enfermedad estable (0) y el grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 11. El análisis del nivel máximo de PSA/nivel de cifra mínima de PSA frente a la subpoblación de pacientes demostró que la proporción entre el nivel máximo de PSA y la cifra mínima de la [PSA] diferencia significativamente las dos poblaciones y por lo tanto es un pronóstico de la evolución. El p era < 0,001. La media +/- EEM de la población estable era de 3,6 +/-0,6, mientras que la media +/- EEM para la población con recidiva era de 87,5 +/- 20,3. Sin embargo, la población estable se superpone con la población con recidiva cerca del valor de la mediana.

**Ejemplo 4E: análisis del 2º aumento consecutivo en pg / ml / mes frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable):**

**TABLA 12: cuantiles**

Nivel	Mínimo	10%	25%	Mediana	75%	90%	Máximo
0	-0,73	-0,195	-0,085	0,015	0,175	0,332	5,4
1	-140,7	1,64	4,7	7	20,1	117,36	1526,8

**TABLA 13: medias y desviaciones estándar**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar	Media menor del 95%	Superior al 95%
0	42	0,1490	0,861	0,133	-0,12	0,42
1	43	63,4930	241,163	36,777	-10,73	137,71

En la Figura 13 se muestra un gráfico del nivel del segundo aumento consecutivo de la [PSA] (pg / ml / mes) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)). Los cuantiles del grupo con enfermedad estable (0) y del grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 12. Las medias y las desviaciones estándar para el grupo con enfermedad estable (0) y el grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 13. El análisis del segundo aumento consecutivo (pg / ml / mes) demostró que este parámetro diferencia significativamente las dos poblaciones y por lo tanto es un pronóstico de la evolución. La media +/- EEM del segundo aumento consecutivo para el grupo estable era de 0,15 pg / ml / mes +/- 0,13, mientras que la media +/- EEM para el grupo con recidiva era de 63,5 +/- 36,78. El p era < 0,0001. La población estable se superpone con la población con recidiva aproximadamente un 25% y por lo tanto indica un buen poder discriminatorio.

**Ejemplo 4F: análisis del tiempo de duplicación (días) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable):**

**TABLA 14: cuantiles**

Nivel	Mínimo	10%	25%	Mediana	75%	90%	Máximo
0	577,6	611,04	970,65	1127,7	1356,325	2127,22	2166,1
1	49,2	127,26	203,9	291,9	407,7	544,54	796,7

**TABLA 15: medias y desviaciones estándar**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Error estándar	Media menor del 95%	Superior al 95%
0	10	1207,99	451,736	142,85	884,84	1531,1
1	40	318,55	164,681	26,04	265,88	371,2

En la Figura 14 se muestra un gráfico de los datos del tiempo de duplicación (días) frente a la subpoblación de pacientes (recidiva del cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0)). Los cuantiles del grupo con enfermedad estable (0) y del grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 14. Las medias y las desviaciones estándar para el grupo con enfermedad estable (0) y el grupo con recidiva (1) se muestran en la Tabla 15. El análisis de los datos demostró que el tiempo de duplicación (días) diferencia significativamente las dos poblaciones y por lo tanto es un pronóstico de la evolución. El p era < 0,0001. La media para la población estable era de 1208 +/-142,9, mientras que la media para la población con recidiva era de 318,6 +/- 26,04. La población estable sólo se superpone con la población con recidiva entre el 10 y el 25% y por lo tanto estaba bien discriminada.

**Clasificación adicional de los pacientes basada en el tiempo de duplicación observado mediante el uso de un ensayo del PSA**

- 5 Se realizaron análisis adicionales para determinar si el tiempo de duplicación podría usarse para discriminar entre subclases adicionales de la población de pacientes con recidiva. El análisis del tiempo de duplicación del PSA permitió distribuir adicionalmente los pacientes en tres grupos, clasificados en < 150 días (recidivas rápidas), 150 - 400 días (recidivas intermedias), y > 400 días (recidivas lentas). Se esperaba que el índice reflejara el índice de crecimiento exponencial, y por lo tanto reflejara la agresividad del crecimiento del cáncer.
- 10 Las Figuras 15A-C muestra las gráficas superpuestas de los pacientes con recidiva con unos tiempos de duplicación < 150 días, de 150 - 400 días, ó > 400 días, respectivamente. La Figura 15A muestra las gráficas superpuestas de los pacientes con recidiva, de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía, con unos tiempos de duplicación < 150 con el intervalo restringido a 1.000 pg / ml
- 15 La Figura 15B muestra las gráficas superpuestas de los pacientes con recidiva, de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía, con unos tiempos de duplicación de 150 - 400 con el intervalo restringido a 1.000 pg / ml
- 20 La Figura 15C muestra las gráficas superpuestas de los pacientes con recidiva, de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía, con unos tiempos de duplicación de > 400 con el intervalo restringido a 1.000 pg / ml
- 25 Los pacientes con recidiva pueden dividirse en cuatro clases, Grupo 1, tiempo de duplicación menor de 150 días, Grupo 2, con unos tiempos de duplicación entre 150 - 400 días, Grupos 3 y 4, que tienen ambos unos tiempos de duplicación mayores de 400 días. En el Grupo 3, el máximo observado de PSA excedía los 200 pg / ml, mientras que en el Grupo 4 el máximo observado de PSA no excedía los 200 pg / ml.
- 30 Las Figuras 16A-D muestran las gráficas superpuestas para las subclases de pacientes con recidiva según el tiempo de duplicación, con unos intervalos restringidos a 1.000 pg / ml, respectivamente. Los pacientes con recidiva con unos tiempos de duplicación > 400 días se han subdividido adicionalmente según si el máximo observado de PSA está por encima o por debajo de 200 pg / ml.
- 35 La Figura 16A muestra las gráficas superpuestas de los pacientes con recidiva con un tiempo de duplicación < 150 días de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía.
- La Figura 16B muestra las gráficas superpuestas de los pacientes con recidiva con un tiempo de duplicación < 150 - 400 días de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía.
- La Figura 16C muestra las gráficas superpuestas de los pacientes con recidiva con un tiempo de duplicación > 400 días, una [PSA] máxima > 200 pg / ml, frente a los días tras la cirugía.
- 40 La Figura 16D muestra las gráficas superpuestas de la [PSA] en pg / ml de los pacientes con recidiva frente a los días tras la cirugía.
- 45 La Figura 17 muestra las gráficas superpuestas de la [PSA] en pg / ml frente a los días tras la cirugía que, con pocas excepciones, los pacientes con enfermedad estable tienen generalmente unos máximos de PSA que no exceden los 15 pg / ml.

**Ejemplo 4G: análisis univariado del número de duplicaciones frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable):**

		Nº de duplicaciones durante el control					
		0	1	2	3	4	
(1 = Si, 0 = No)	Recuento						
	Total %						
	Column. %						
	Filas %						
	0	15	23	4	0	0	42
		17,65	27,06	4,71	0,00	0,00	49,41
		100,00	71,88	17,39	0,00	0,00	
		35,71	54,76	9,52	0,00	0,00	

1	0	9	19	12	3	43
	0,00	10,59	22,35	14,12	3,53	50,59
	0,00	28,13	82,61	100,00	100,00	
	0,00	20,93	44,19	27,91	6,98	
	15	32	23	12	3	85
	17,65	37,65	27,06	14,12	3,53	

La Tabla 16 anterior demuestra que el número de duplicaciones está aumentado para los 43 pacientes con recidiva de cáncer de próstata frente a los 42 pacientes con enfermedad estable. La diferencia era significativa a un  $p < 0,0001$  ( $\chi^2$ ). Hay una cierta superposición entre las subpoblaciones de las áreas de 1 y 2 duplicaciones. El grado de superposición es de aproximadamente el 60% de la población global, pero es de interés que (a) se observa siempre una duplicación para la recidiva, y (b) no hay pacientes con 3 ó 4 duplicaciones con enfermedad estable. En la Figura 18A se muestra un gráfico de mosaico de los datos que muestran el número de duplicaciones durante el control frente a la subpoblación de pacientes con recidiva de cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0).

5

10

**Ejemplo 4H: análisis univariado del número de duplicaciones frente a la subpoblación de pacientes (recidiva o enfermedad estable):**

**TABLA 17: tabla de contingencia**

Recidiva (1= si, 0 = no)	Nº de duplicaciones sucesivas						
	Recuento	0	1	2	3	4	
	Total %						
	Colum. %						
Filas %							
0	40	0	2	0	0	42	
	47,06	0,00	2,35	0,00	0,00	49,41	
	74,07	0,00	10,00	0,00	0,00		
	95,24	0,00	4,76	0,00	0,00		
1	14	4	18	6	1	43	
	16,47	4,71	21,18	7,06	1,18	50,59	
	25,93	100,00	90,00	100,00	100,00		
	32,56	9,30	41,86	13,95	2,33		
	54	4	20	6	1	85	
	63,53	4,71	23,53	7,06	1,18		

La Tabla 17 anterior demuestra que el número de duplicaciones consecutivas está aumentado en los 43 pacientes con recidiva de cáncer de próstata frente a los 42 pacientes con enfermedad estable. La diferencia era significativa a un  $p < 0,0001$  ( $\chi^2$ ). El grado de superposición es de aproximadamente el 80% de la población global. En la Figura 19 se muestra un gráfico de mosaico de los datos que muestran el número de duplicaciones consecutivas frente a la subpoblación de pacientes con recidiva de cáncer de próstata (1) o con enfermedad estable (0).

15

20

**Ejemplo 5: evaluación del indicador mediante el uso de una regresión logística univariada y de un análisis de la característica operativa del receptor (ROC):**

Se usaron las curvas de los análisis de regresión logística univariada y de la característica operativa del receptor (ROC) en la evaluación de si los diversos indicadores basados en las mediciones del PSA (primer nivel del PSA tras la prostatectomía, nivel de cifra mínima del PSA, nivel máximo observado del PSA, número de duplicaciones, número de duplicaciones sucesivas, 2º aumento en pg / ml / mes) eran predictivos de la evolución de la enfermedad. Como referencia se usó la clasificación clínica de los pacientes como con enfermedad estable o con recidiva. Adicionalmente, para el cálculo del tiempo de duplicación, el análisis estadístico demostró que los ajustes exponenciales y de otros tipos eran adecuados para 40 de los 43 pacientes con recidiva y para 10 de los 42 pacientes con enfermedad estable. Se tomaron los parámetros exponenciales para los cálculos de los tiempos de duplicación si R2 era de al menos ~0,5, incluso si otros ajustes daban un mejor ajuste. Además, los valores del tPSA deben haber estado aumentando con el tiempo para el cálculo del tiempo de duplicación.

25

30

Para evaluar la capacidad de los indicadores candidatos del ensayo NADIA® para predecir la recidiva bioquímica del cáncer de próstata, se emplearon una regresión logística y un análisis de la ROC. Se usaron modelos de regresión

35

logística que tomaban cada indicador candidato por separado (en su propio modelo), incluyendo el valor máximo observado, el tiempo de duplicación, la proporción entre el nivel máximo observado de PSA/nivel de cifra mínima, 2° en pg / ml / mes y el número de duplicaciones, para generar los Cocientes de Posibilidades (una medida del efecto del tratamiento que compara la probabilidad de un tipo de evolución en el grupo en tratamiento con la evolución de un grupo de control; se desean cocientes de posibilidades que se desvíen significativamente de un valor de 1,0) y valores de p de la prueba de Wald. El análisis de la ROC proporcionó unos puntos estimados del área bajo la curva de la ROC (representada como sensibilidad frente a una especificidad de 100; es ideal un área de 1,0) y los intervalos de confianza al 95% asociados (95% de IC), el mejor valor indicador discriminatorio y la sensibilidad y la especificidad asociadas con el mejor valor indicador discriminatorio. Los resultados se resumen en las Tablas 18 y 19, a continuación.

**Resumen de los resultados de los análisis univariados**

**Tabla 18: resumen de los resultados de la regresión logística univariada y de la ROC:**

Parámetro	ABC	p de Wald
Valor máximo observado	0,994	0,0009
Tiempo de duplicación	0,992	
Máximo / cifra mínima	0,973	0,0002
pg / ml / mes	0,968	0,0444
Número de duplicaciones	0,902	

**TABLA 19:- resumen de los resultados de la regresión logística univariada y de la ROC**

Parámetro	Cocientes de Posibilidades	Valor de p de Wald	ROC - ABC	ABC al 95% de IC	Punto de corte de discriminación	Sensibilidad / Especificidad en el punto de corte
Tiempo de duplicación			0,992	0,914 - 1,000	545,8 días	93% / 100%
Valor máximo observado	1,0657	0,0009	0,994	0,994 - 0,996	25,1 pg / ml / mes	98% / 98%
Proporción Máximo / cifra mínima	1,4718	0,0002	0,973	0,911 - 0,996	6,1	95% / 95%
2° aumento en pg / ml / mes	1,0516	0,0444	0,968	0,905 - 0,994	0,6 pg / ml / mes	95% / 98%
Número de duplicaciones			0,902	0,818 - 0,956	1	79% / 90%

Las áreas bajo las curvas de la ROC estaban próximas al estado ideal de 1,0, y las combinaciones de sensibilidad y especificidad eran altas excepto para el indicador del número de duplicaciones. Los modelos de regresión logística para el tiempo de duplicación y para el número de duplicaciones no consiguieron converger debido a limitaciones en las observaciones. Por lo tanto, los indicadores más fuertes de las subpoblaciones (enfermedad estable y recidiva bioquímica en etapa temprana) eran el nivel máximo observado, proporción entre el nivel máximo de PSA / nivel de cifra mínima y el 2° aumento en pg / ml / mes en los niveles del PSA mediante el ensayo NADIA®. Todos estos indicadores eran pronósticos significativos de la recidiva bioquímica (todos los valores de p de Wald eran < 0,05).

**Ejemplo 6: evaluación del indicador mediante el uso de una regresión logística multivariada y una ROC**

Para evaluar adicionalmente los indicadores candidatos hallados como fuertes pronósticos en el análisis univariado (nivel máximo observado, proporción entre el nivel máximo / cifra mínima ratio y el 2° aumento en pg / ml / mes del PSA mediante el ensayo NADIA®), se realizaron análisis de regresión logística multivariada y de la ROC. La intención era determinar si los indicadores candidatos según el ensayo NADIA® eran capaces de mantener su capacidad predictiva incluso en presencia de indicadores pronósticos clinicopatológicos dentro de los modelos. Previamente se había demostrado que todos estos indicadores clinicopatológicos eran pronósticos significativos de la recidiva, e incluían: implicación de los márgenes quirúrgicos; invasión capsular del cáncer; e invasión del cáncer del tejido periprostático.

Para cada modelo se proporcionan los cocientes de posibilidades y el valor de p de Wald para el indicador según el ensayo NADIA® y para los indicadores clinicopatológicos. También se presentan el área total bajo la curva (ABC) de la ROC y su 95% de IC asociado. Adicionalmente, se determinó estadísticamente la significación de la diferencia entre el ABC para el modelo multivariado frente al ABC para el modelo univariado del indicador según el ensayo NADIA®. Si el valor de p para esta interpretación estadística era < 0,05, indicaría que el modelo multivariado mostraba un poder predictivo aumentado con respecto al indicador según el ensayo NADIA® por sí mismo, y por el contrario, unos valores de p > 0,05 indicarían que el indicador según el ensayo NADIA® es un pronóstico potente e independiente y que la adición de indicadores clinicopatológicos al modelo no mejora significativamente la capacidad predictiva para la detección de recidivas del cáncer de próstata.

Las siguientes figuras y tablas presentan las curvas de la ROC multivariada en comparación con las curvas de la ROC univariada, empleando únicamente el indicador del ensayo mediante NADIA®, y los resultados de la regresión logística y de los cálculos de la ROC.

**Ejemplo 6A: resultados multivariados - máximo observado del PSA:**

TABLA 20:

Término	Cocientes de Posibilidades	Valor de p de Wald	ROC - ABC	ABC al 95% de CI	p frente a máx por sí misma
Máximo según NADIA	1,066	0,0497	0,996	0,918 - 1,000	0,797
Márgenes quirúrgicos (cualitativos)	236,3	0,0962			
Invasión tisular Peri-Prost (cualitativa)	19,5	0,7478			
Invasión capsular (cualitativa)	0,0042	0,5700			

Las Figuras 20A y 20B muestran la curva de la ROC multivariada en comparación con la curva de la ROC univariada para el nivel máximo observado de la [PSA] según NADIA®. La Figura 20A muestra la curva de la ROC multivariada. La Figura 20B muestra la curva de la de la ROC univariada para el nivel máximo observado de la [PSA] según NADIA® (línea negra) frente a la curva de la ROC multivariada (línea punteada). La Tabla 20 muestra los resultados de la regresión logística y los cálculos de la ROC. Se usó un modelo de regresión logística para el valor máximo observado de la [PSA] para generar los cocientes de posibilidades y los valores de p a partir de la prueba de Wald. También se presentan el análisis de la ROC que proporcionó los puntos estimados del área bajo la curva (ABC) y su 95% de IC asociado.

El nivel máximo observado del PSA según el NADIA® es un pronóstico significativo e independiente de la evolución (p = 0,0497), y el modelo multivariado no mejora significativamente el ABC (p = 0,797) en comparación con el uso del propio parámetro.

**Ejemplo 6B: resultados multivariados - proporción entre el máximo de tPSA / cifra mínima:**

TABLA 21:

Término	Coefficiente de regresión	EE	Cocientes de Posibilidades	Valor de p de Wald	ROC - ABC	ABC al 95% de CI	p frente a máx / cifra mínima por sí misma
Proporción máx / cifra mínima según NADIA	0,2764	0,098	1,3184	0,0051	0,963	0,866 - 0,995	0,191
Márgenes quirúrgicos (cualitativos)	1,7221	1,04	5,5964	0,0982			
Invasión tisular Peri-Prost (cualitativa)	1,0151	1,28	2,7597	0,4277			
Invasión capsular (cualitativa)	1,1495	2,03	3,1567	0,5711			



Las Figuras 21A y 21B muestran la curva de la ROC multivariada en comparación con la curva de la ROC univariada para los niveles máximo total de [PSA] / cifra mínima de [PSA] según NADIA®. La Figura 21A muestra la curva de la ROC multivariada. La Figura 21B muestra la curva de la de la ROC univariada para los niveles máximo total de [PSA] / cifra mínima de [PSA] según NADIA® (línea negra) frente a la curva de la ROC multivariada (línea punteada). La Tabla 21 muestra los resultados de la regresión logística y los cálculos de la ROC. Se usaron modelos de regresión logística para los niveles máximo total de [PSA] / cifra mínima de [PSA] para generar los cocientes de posibilidades y los valores de p a partir de la prueba de Wald. También se presentan el análisis de la ROC que proporcionó los puntos estimados del área bajo la curva (ABC) y su 95% de IC asociado.

La proporción entre el nivel máximo observado de PSA y el nivel de la cifra mínima de PSA es un pronóstico independiente de la evolución ( $p = 0,0051$ ) y el modelo multivariado no mejora significativamente el ABC ( $p = 0,191$ ) en comparación con el uso del propio máximo observado de PSA / cifra mínima.

**Ejemplo 6C : resultados multivariados - segundo aumento (pg / ml / mes)**

TABLA 22:

Término	Cociente de posibilidades	Valor de p de Wald	ROC - ABC	ABC al 95% de CI	p frente a pg / ml / mes por sí misma
NADIA en pg / ml / mes	4,4250	0,0023	0,991	0,924 - 0,995	0,701
Márgenes quirúrgicos (cualitativos)	16,1609	0,0553			

*El modelo no convergió cuando se incluyeron la invasión tisular peri-prost y la invasión capsular.*

Las Figuras 22A y 22B muestran la curva de la ROC multivariada en comparación con la curva de la ROC univariada para el segundo aumento en la [PSA] (pg / ml / mes). La Figura 22B muestra la curva de la ROC multivariada. La Figura 22A muestra la curva de la de la ROC univariada para el segundo aumento en la [PSA] (pg / ml / mes) según NADIA® (línea negra) frente a la curva de la ROC multivariada (línea punteada). La Tabla 22 muestra los resultados de la regresión logística y los cálculos de la ROC. Se usaron modelos de regresión logística para el segundo aumento en la [PSA] (pg / ml / mes) para generar los cocientes de posibilidades y los valores de p a partir de la prueba de Wald. También se presentan el análisis de la ROC que proporcionó los puntos estimados del área bajo la curva (ABC) y su 95% de IC asociado.

El segundo aumento (pg / ml / mes) es un pronóstico independiente de la evolución ( $p = 0,0023$ ) y el modelo multivariado no mejora significativamente el ABC ( $p = 0,701$ ) en comparación con el uso del propio segundo aumento.

**Ejemplo 7: evaluación de los indicadores de la [PSA] como representaciones cualitativas binarias**

También se realizaron análisis de regresión logística y de ROC para evaluar el uso del nivel máximo observado del PSA, de la proporción entre nivel máximo / nivel de cifra mínima y del segundo aumento (pg / ml / mes) como representaciones cualitativas binarias. Los resultados se muestran en la Tabla 23. Los límites de los indicadores para las representaciones cualitativas binarias eran de 25 pg / ml para el nivel máximo observado, de un valor de 0,6 pg / ml / mes para el segundo aumento y una proporción entre el nivel máximo observado de PSA / cifra mínima de 6. Cada paciente se clasificó en función de si excedía o no excedía estos límites.

**TABLA 23-- REPRESENTACIONES CUALITATIVAS BINARIAS**

**Regresión logística univariada para: valor máximo observado posterior a la prostatectomía (Binaria)**

Término	Coefficiente de regresión	SE	Cociente de posibilidades	Valor de p de Wald	ROC - ABC	ABC al 95% de CI
Máximo según NADIA	-6,6821	1,25	0,0013	< 0,0001	0,963	0,897 - 0,992

**Regresión logística univariada para: máximo / cifra mínima (Binaria)**

Término	Coefficiente de regresión	SE	Cociente de posibilidades	Valor de p de Wald	ROC - ABC	ABC al 95% de CI
Proporción entre máximo / cifra mínima según NADIA	-5,5053	0,94	0,0041	< 0,0001	0,938	0,862 - 0,979

**Regresión logística univariada para: pg / ml / mes (Binaria)**

Término	Coefficiente de regresión	SE	Cociente de posibilidades	Valor de p de Wald	ROC - ABC	ABC al 95% de CI
NADIA en pg / ml / mes	-6,734	1,24	0,0012	< 0,0001	0,965	0,900 - 0,992

Según se muestra en las Figuras 23A-C, el análisis univariado para cada indicador de la [PSA] demostró que las representaciones binarias de estos indicadores de la [PSA] eran todas muy poderosas, con unos valores de  $p < 0,0001$  y unos valores del ABC cercanos a 1,0.

5

**Conclusiones del estudio:**

El ensayo del tPSA mediante NADIA® con un límite de detección al menos tan bajo como de 0,2 pg / ml y una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 0,5 pg / ml puede medir de forma fiable una concentración de tPSA tan baja como de 0,5 pg / ml, proporcionando unos resultados precisos de la cifra mínima de PSA y unos cálculos del tiempo de duplicación del PSA. La medición del tPSA mediante el uso de un ensayo de PSA con una baja sensibilidad funcional, al menos tan baja como de 0,5 pg / ml, tal como los ensayos mediante NADIA®, demostró que el grupo de pacientes con enfermedad estable tenía un nivel bajo y constante de PSA con una media aproximada de 3,5 PG / ML (0,0035 ng / ml). La diferencia entre los pacientes con enfermedad estable y los

15

pacientes con una recidiva bioquímica es estadísticamente muy significativa.

Además, de promedio, los ensayos mediante NADIA® detectaron un aumento en el tPSA 34 meses antes de que el tPSA alcanzara el valor de 100 pg / ml (0,1 ng / ml).

El nivel máximo observado del PSA es un indicador muy potente de las subpoblaciones con enfermedad estable o con recidiva bioquímica. El nivel máximo observado de PSA obtenido mediante el uso de un ensayo del PSA con una sensibilidad funcional al menos tan baja como de 0,5 pg / ml puede usarse para detectar tempranamente una recaída bioquímica. El aumento en pg / ml / mes también es un indicador muy poderoso de las subpoblaciones con una enfermedad estable o de las subpoblaciones con una recidiva bioquímica. La proporción entre el nivel máximo observado de PSA y el nivel de cifra mínima también es un indicador muy poderoso de las subpoblaciones con una enfermedad estable o con recidiva bioquímica.

20

25

El estudio del ensayo NADIA® demostró que los parámetros del tPSA que servían como los indicadores más discriminativos de las subpoblaciones (enfermedad estable y recidiva bioquímica en etapa temprana) eran el nivel máximo observado, el índice de 2º aumento consecutivo en pg / ml / mes y el tiempo de duplicación.

30

**Ejemplo 8: cálculo de la significación de las diferencias para pacientes para quienes no había disponibles datos anteriores**

El cálculo del número de días requeridos para alcanzar la [PSA] de 10, 25, 100 y 200 pg / ml cuando el tPSA se medía mediante el uso de ensayos NADIA® sobre el conjunto de muestras se realizó basándose en el ajuste exponencial de 40 pacientes con recidiva y 10 con enfermedad estable. Este tipo de análisis permite una comparación de las poblaciones con recidiva y con enfermedad estable en puntos temporales muy tempranos después de una prostatectomía radical. En este estudio retrospectivo, la extrapolación basada en los datos disponibles ajustada exponencialmente dio lugar a un porcentaje de error mayor en la determinación de los valores pequeños asociados con el tiempo requerido para que los pacientes con recidiva alcanzaran los 10 pg / ml de PSA. Sin embargo, los resultados para el tiempo requerido para alcanzar los 25, 100 y 200 pg / ml mostraron un aumento en la confianza. Se usó la prueba del orden con signo de Wilcoxon para determinar la significación de las diferencias entre las dos subpoblaciones. Según se muestra en la Tabla 24, a continuación, los niveles especificados de la [PSA] se alcanzaron significativamente más temprano en la población con enfermedad por recidiva que en la población con enfermedad estable.

35

40

45

TABLA 24: días requeridos para alcanzar diversos niveles de PSA en pg / ml basándose en un ajuste exponencial

Población	Días hasta alcanzar 10 pg / ml, Media (DE)	Días hasta alcanzar 25 pg / ml, Media (DE)	Días hasta alcanzar 100 pg / ml, Media (DE)	Días hasta alcanzar 200 pg / ml, Media (DE)
Total (N = 50)	491,6 (1396,2)	1147,8 (1834,7)	2140,7 (2600,0)	2637,2 (3003,6)
Con recidiva (N = 40)	-26,7 (762,5)	394,4 (745,0)	1031,5 (833,7)	1350,0 (920,1)
Estable (N = 10)	2564,7 (1457,7)	4161,6 (1818,3)	6577,7 (2539,6)	7785,7 (2938,3)

Población	Días hasta alcanzar 10 pg / ml, Media (DE)	Días hasta alcanzar 25 pg / ml, Media (DE)	Días hasta alcanzar 100 pg / ml, Media (DE)	Días hasta alcanzar 200 pg / ml, Media (DE)
p, con recidiva frente a estable*	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

\* prueba del orden con signo de Wilcoxon

Los cálculos de los pg / ml de PSA mediante el ensayo NADIA® en diversos puntos temporales (3, 6, 9, 12 y 18 meses) se basaron en el ajuste exponencial de 40 pacientes con recidiva y 10 con enfermedad estable. Se usó la prueba del orden con signo de Wilcoxon para determinar la significación de las diferencias entre las dos subpoblaciones. Según se muestra en la Tabla 25, a continuación, todos los valores en un punto dado en el tiempo eran mayores en la subpoblación con recidiva que en la subpoblación estable. La significación de la diferencia aumenta con el tiempo, alcanzando finalmente un  $p < 0,001$  a los 18 meses. Esto indica que las poblaciones divergen uniformemente con el tiempo.

10 TABLA 25: pg / ml de PSA según NADiA en diversos puntos temporales calculados mediante ajuste exponencial

Población	pg / ml a los 3 meses, Media (DE)	pg / ml a los 6 meses, Media (DE)	pg / ml a los 9 meses, Media (DE)	pg / ml a los 12 meses, Media (DE)	pg / ml a los 18 meses, Media (DE)
Total (N = 50)	40,7 (153,1)	53,3 (208,3)	71,0 (284,0)	97,1 (387,6)	228,8 (833,9)
Con recidiva (N = 40)	50,2 (170,2)	65,9 (231,8)	87,9 (316,0)	120,4 (431,2)	285,0 (926,1)
Estable (N = 10)	3,0 (1,8)	3,2 (2,0)	3,4(2,1)	3,6 (2,3)	4,1 (2,8)
p, con recidiva frente a estable*	0,0035	0,0012	0,0006	0,0002	< 0,0001

\* prueba del orden con signo de Wilcoxon

#### **Ejemplo 9: uso de la velocidad como un indicador de la EC-BCR**

- 15 Se completó un estudio retrospectivo mediante la comparación de la representación lineal de la [PSA] tras una prostatectomía radical frente al tiempo para 16 pacientes estables y 13 pacientes con recidiva, durante un periodo de hasta ocho años. Este estudio usó el ensayo NADiA para medir la [PSA] total, según se describe en los ejemplos 1 - 6. Los pacientes estables se definieron como estables si el paciente no tenía ninguna indicación de recidiva del cáncer de próstata durante el periodo del estudio. Un paciente se definió como con recidiva si había tenido un escáner óseo positivo para la recidiva de cáncer de próstata y/o muerte debida al cáncer de próstata.
- 20 Se determinó el nivel de la [PSA] mediante el uso del ensayo NADiA durante un periodo de tiempo de aproximadamente ocho años. Se calculó un ajuste lineal de la curva para cada paciente. Se muestra un ejemplo del ajuste lineal de la curva para un paciente estable (#1002) (Figura 24) y para un paciente con recidiva (#2001) (Figura 25).
- 25 Se determinaron las pendientes para cada uno de los pacientes y están detalladas en la Tabla 26, a continuación:

**Tabla 26 La pendiente de la curva lineal de cada uno de los pacientes estable y con recidiva se incluye a continuación:**

	Paciente estable nº	Pendiente de la curva lineal (PSA en pg / ml por mes)	Paciente con recidiva nº	Pendiente de la curva lineal (PSA en pg / ml por mes)
1	1001	0,001	2001	6,723
2	1002	0,016	2002	26,604
3	1003	0,024	2003	13,035
4	1004	0,012	2004	16,290
5	1005	-0,086	2005	29,044
6	1006	0,106	2006	22,712
7	1007	0,003	2007	30,255
8	1008	0,049	2008	10,004
9	1009	0,020	2009	70,460
10	10010	0,472	20010	39,419
11	10011	0,022	20012	41,681

	Paciente estable nº	Pendiente de la curva lineal (PSA en pg / ml por mes)	Paciente con recidiva nº	Pendiente de la curva lineal (PSA en pg / ml por mes)	
	12	10012	0,005	20013	6,576
	13	10013	-0,075	20014	7,523
	14	10014	-0,006		
	15	10015	0,0001		
	16	10016	0,041		
		<b>Valor máximo</b>	<b>0,472</b>		<b>70,46</b>
		<b>Valor mínimo</b>	<b>-0,086</b>		<b>6,58</b>
		<b>Valor promedio</b>	<b>0,038</b>		<b>24,641</b>

5 El valor máximo de la pendiente para el grupo de pacientes estables (pg / ml - mes) es de 0,472, o más de 13 veces menor que el valor mínimo de la pendiente de 6,58 del grupo con recidiva. Los datos demuestran que el uso de este ensayo de alta sensibilidad proporciona una discriminación del 100% entre los pacientes estables y con recidiva para el cáncer de próstata, si se asume que un paciente no tiene una recidiva del cáncer de próstata tras una prostatectomía radical si la pendiente de la [PSA] frente al tiempo es menor de 1. Nótese que también había una diferencia significativa entre los valores promedio para cada grupo de pacientes.

10 **Ejemplo 10: administración de una terapia posterior a la prostatectomía basada en la determinación de una ES - BCR rápida, intermedia o lenta**

15 Se obtienen los valores de la [PSA] de los pacientes después de la prostatectomía, según se describió anteriormente. Se determina un valor del índice de PSA, tal como el tiempo de duplicación, con objeto de discriminar entre subclases de la subpoblación de pacientes con recidiva.

20 El análisis de los tiempos de duplicación del PSA permite una clasificación adicional de los pacientes en tres grupos, caracterizados por (1) un tiempo de duplicación igual o inferior a aproximadamente diez meses, que indica una recidiva rápida; (2) un tiempo de duplicación de desde más de aproximadamente diez meses hasta igual o aproximadamente 24 meses, que indica una ES - BCR intermedia, y (3) los caracterizados por un tiempo de duplicación de más de aproximadamente 24 meses, que indica una ES - BCR lenta.

A los pacientes que muestran una recidiva rápida se les administra una terapia posterior a la prostatectomía mediante el uso de una terapia de radiación externa.

25 Se obtienen las observaciones clínicas de las puntuaciones de Gleason, y los márgenes de las heridas para pacientes que muestran una recidiva intermedia o lenta. A los pacientes menores de 60 años de edad con una puntuación de Gleason > 7 y unos márgenes malos que muestran una recidiva intermedia o lenta se les administra una terapia posterior a la prostatectomía mediante el uso de una terapia de radiación externa.

30 Los pacientes mayores de ochenta años que mostraban una recidiva lenta no recibieron ninguna terapia adicional.

En otros pacientes se controlan las recidivas bioquímicas.

**REIVINDICACIONES**

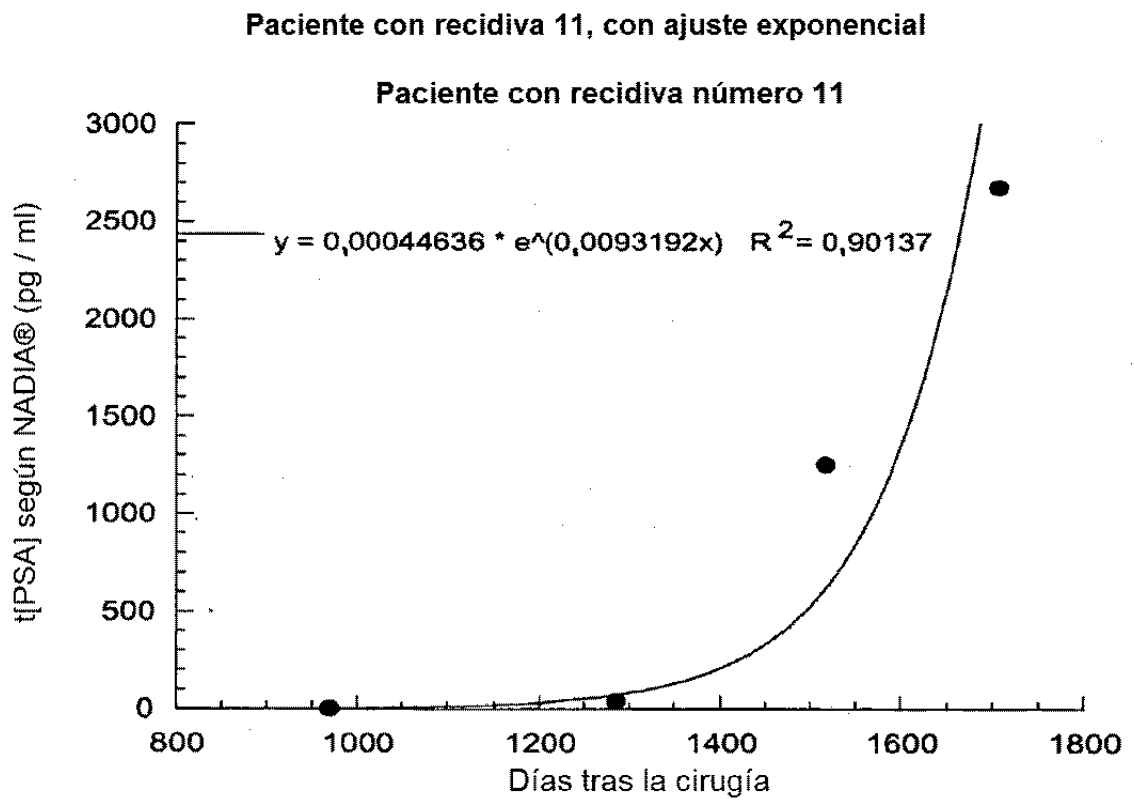
1. Un procedimiento para detectar si un paciente tiene una recidiva bioquímica en etapa temprana (ES - BCR) o tiene una enfermedad estable, que comprende

- 5
- a) proporcionar dos o más muestras obtenidas a partir del paciente en los 18 meses posteriores a la terapia para el cáncer de próstata;
  - b) medir el nivel del PSA en las muestras mediante el uso de un inmunoensayo en formato de sándwich heterogéneo para el PSA con un límite de detección al menos tan bajo como de 2,0 pg / ml, usando dicho
  - 10 inmunoensayo en formato de sándwich una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la generación de la señal;
  - c) usar el nivel del PSA de las muestras para determinar un valor del PSA;

15 donde la ES - BCR se detecta si el valor del PSA es de al menos, o excede, un indicador de PSA, y la enfermedad estable se detecta si el valor del PSA no excede el indicador de PSA, donde el indicador de PSA es una velocidad de aumento de la [PSA] de aproximadamente 2,0 pg / ml / mes.

20 2. El procedimiento de la reivindicación 1 donde el indicador de PSA es una velocidad de aumento de la [PSA] de aproximadamente 4,0 pg / ml / mes.

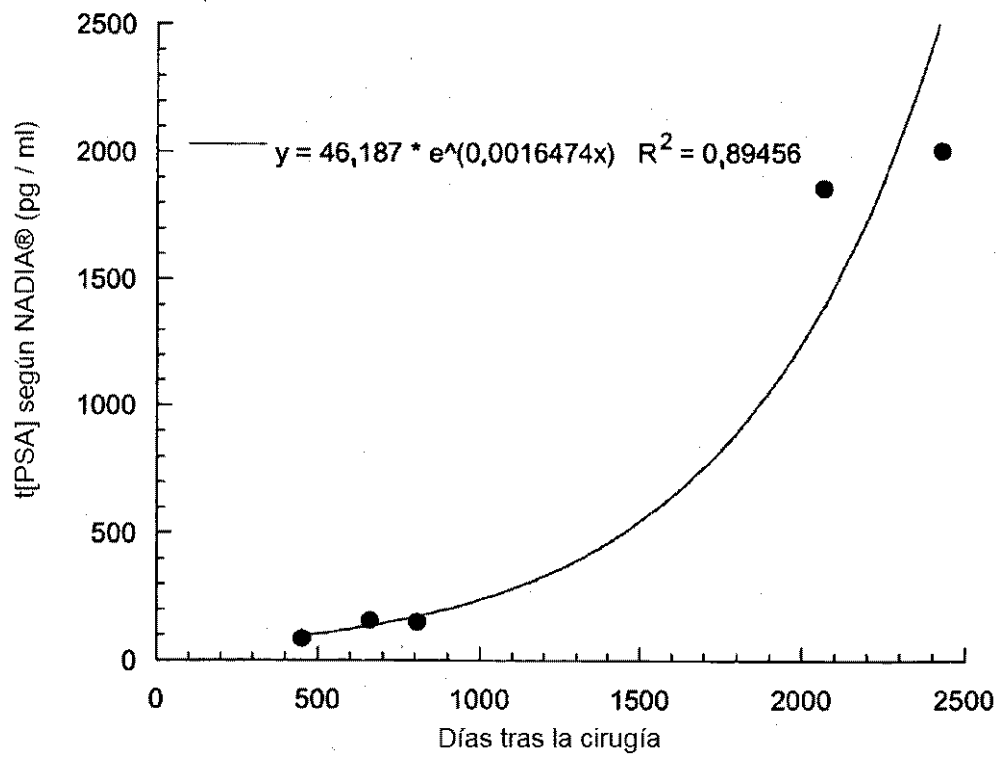
3. El procedimiento de la reivindicación 1 donde el indicador de PSA es una velocidad de aumento de la [PSA] de 6,58 pg / ml / mes.



**FIG. 1**

Paciente con recidiva 31, con ajuste exponencial

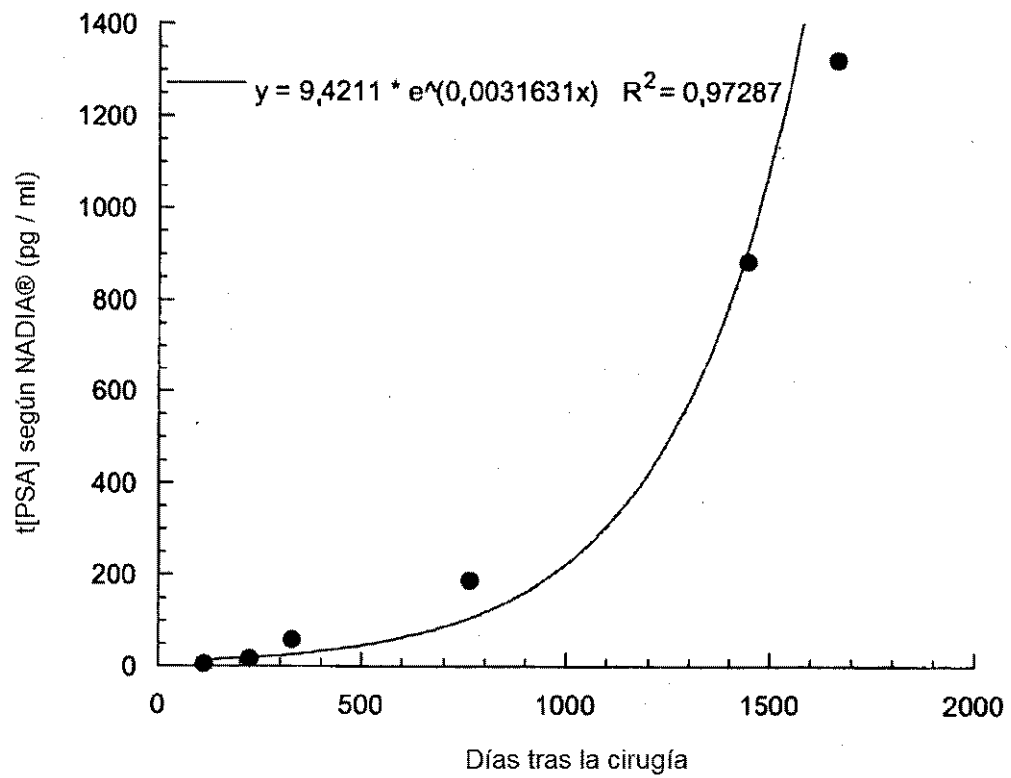
Paciente con recidiva número 31



**FIG. 2**

Paciente con recidiva 38, con ajuste exponencial

Paciente con recidiva número 38

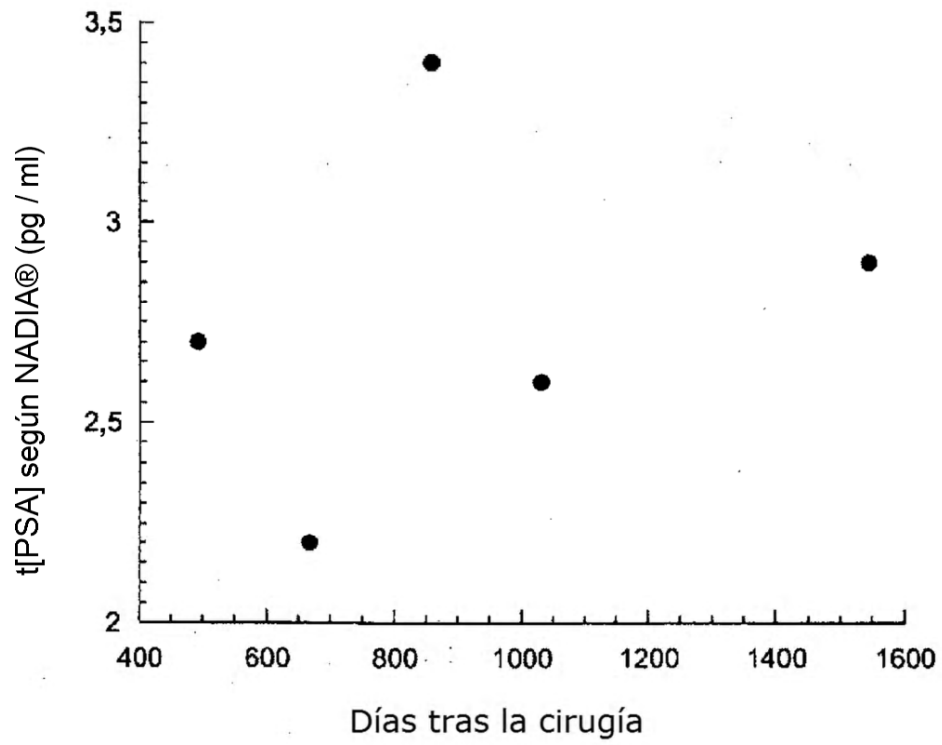


**FIG. 3**

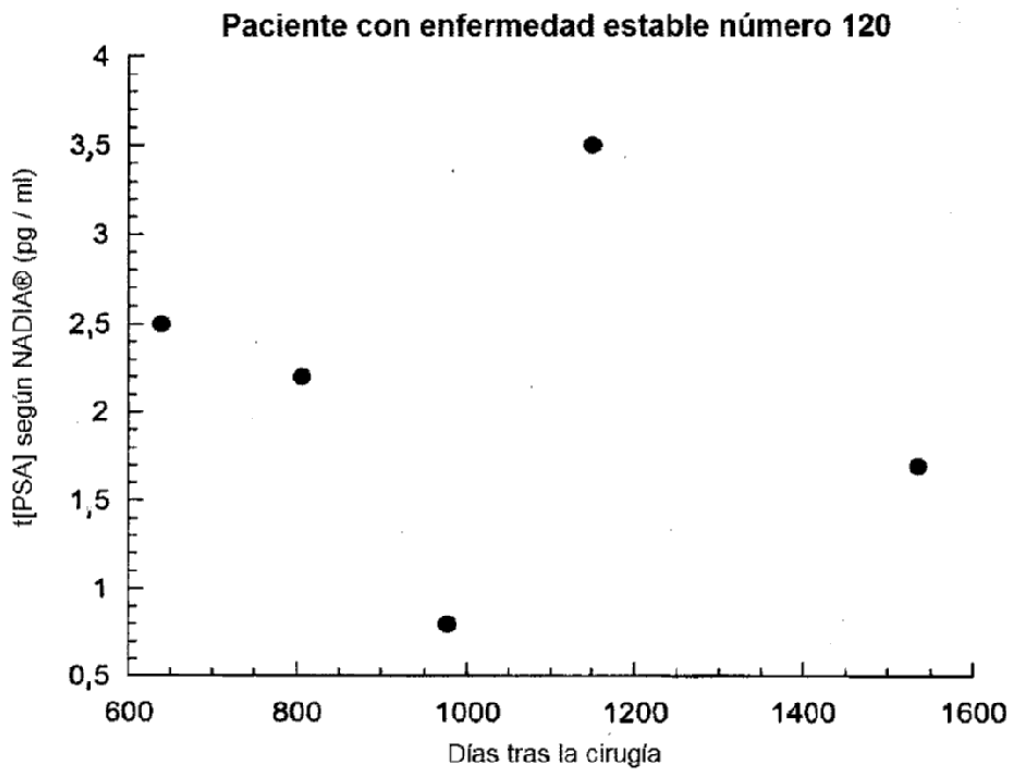


Paciente con enfermedad estable 86 (PSA frente al tiempo)

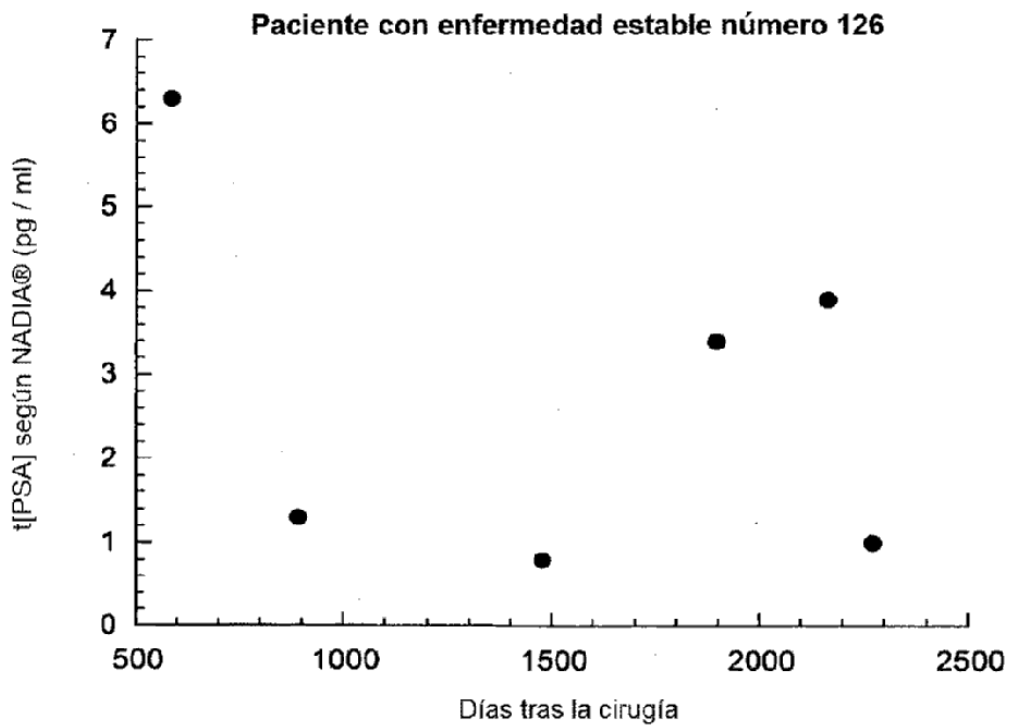
Paciente con enfermedad estable número 86



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**

Superposición de los 43 pacientes con recidiva a escala completa

Gráfico de superposición  
Y superpuestas

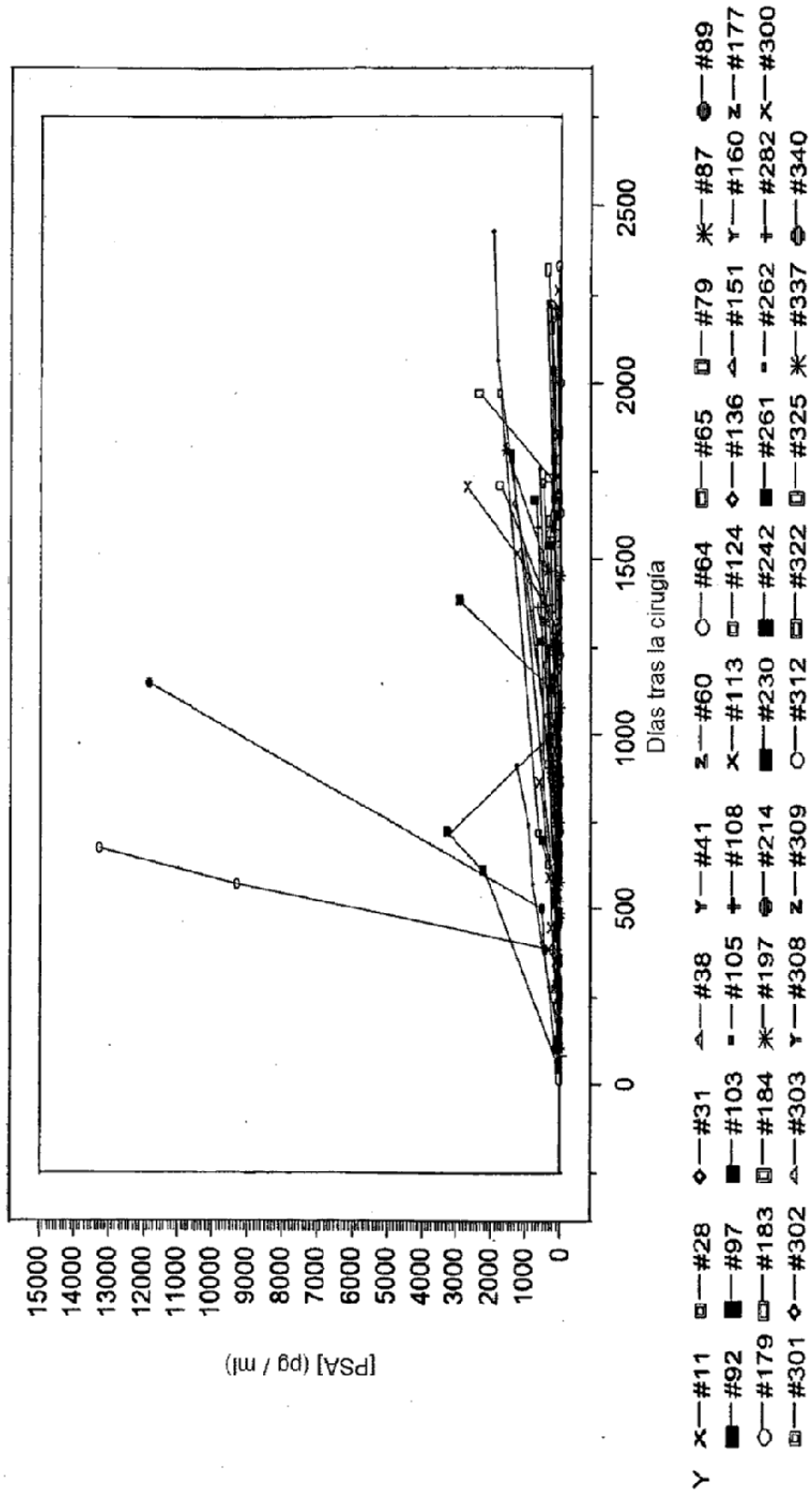


FIG. 7

Superposición de los 43 pacientes con recidiva - escala completa restringida a 1.000 pg / ml, sin puntos

Gráfico de superposición y superpuestas

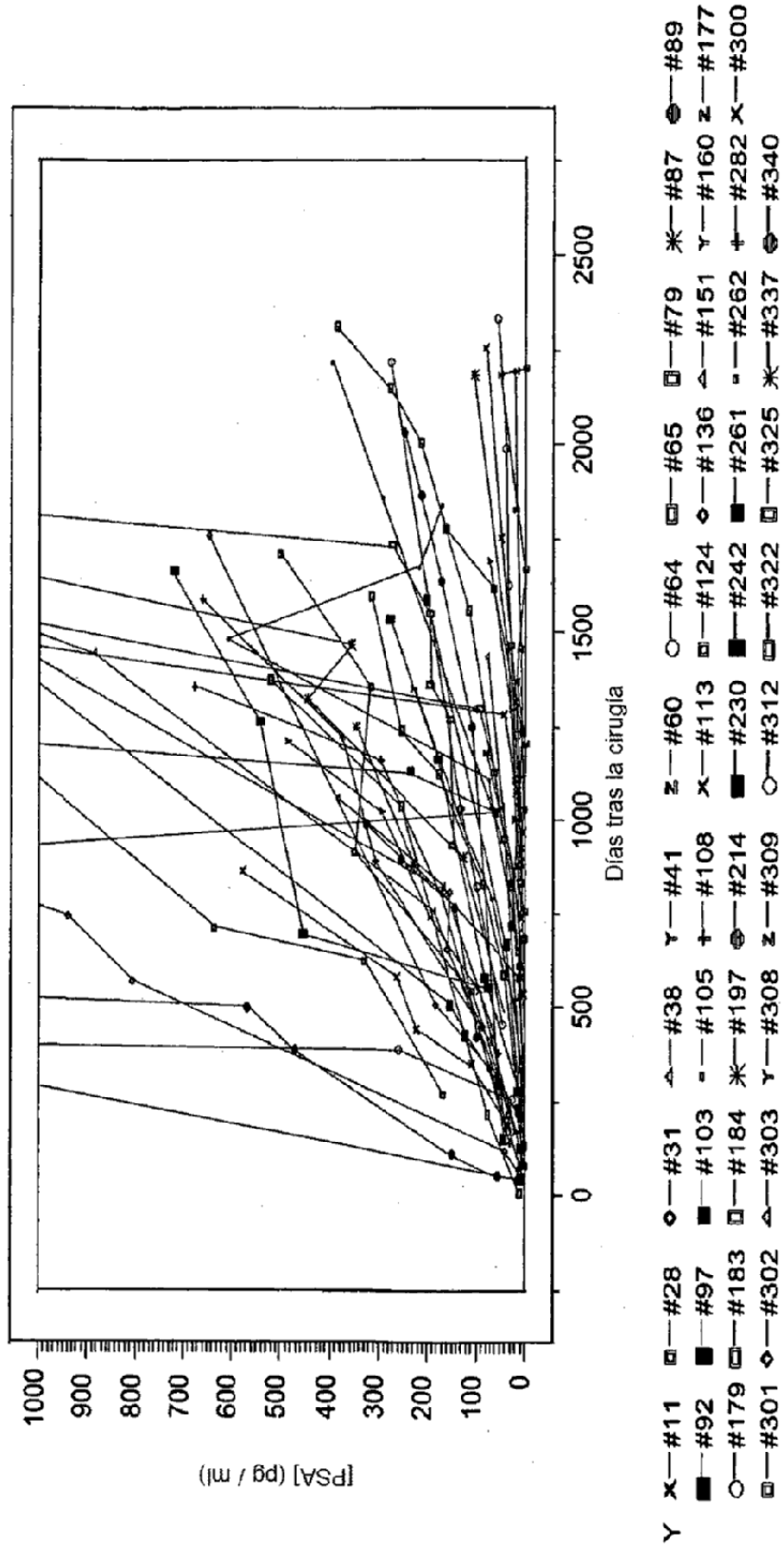
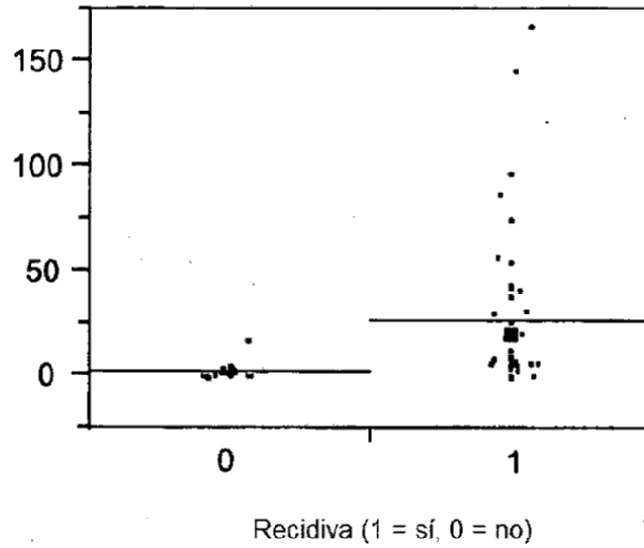


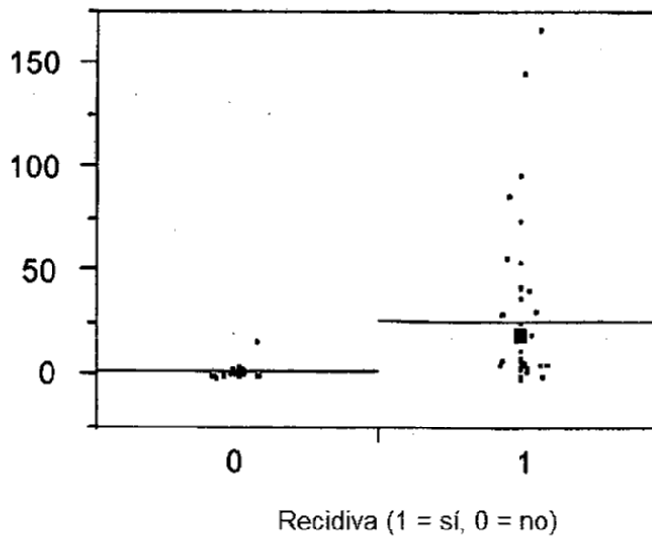
FIG. 8

Análisis unidireccional de la cifra mínima de la t[PSA] (pg / ml) según la recidiva (1 = sí, 0 = no)



**FIG. 9**

Análisis unidireccional de la cifra mínima de la t[PSA] (pg / ml) según la recidiva (1 = sí, 0 = no)



**FIG. 10**

Análisis unidireccional del máximo de la t[PSA] (pg / ml) según la recidiva  
(1 = sí, 0 = no)

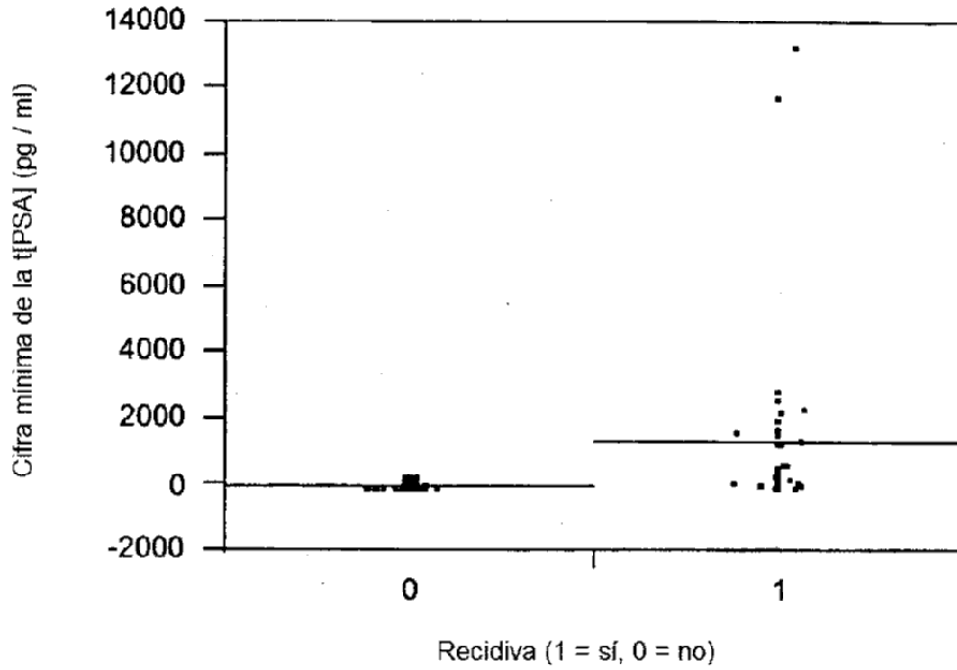


FIG. 11

Análisis unidireccional de aumento del máximo / cifra mínima según la recidiva  
(1 = sí, 0 = no)

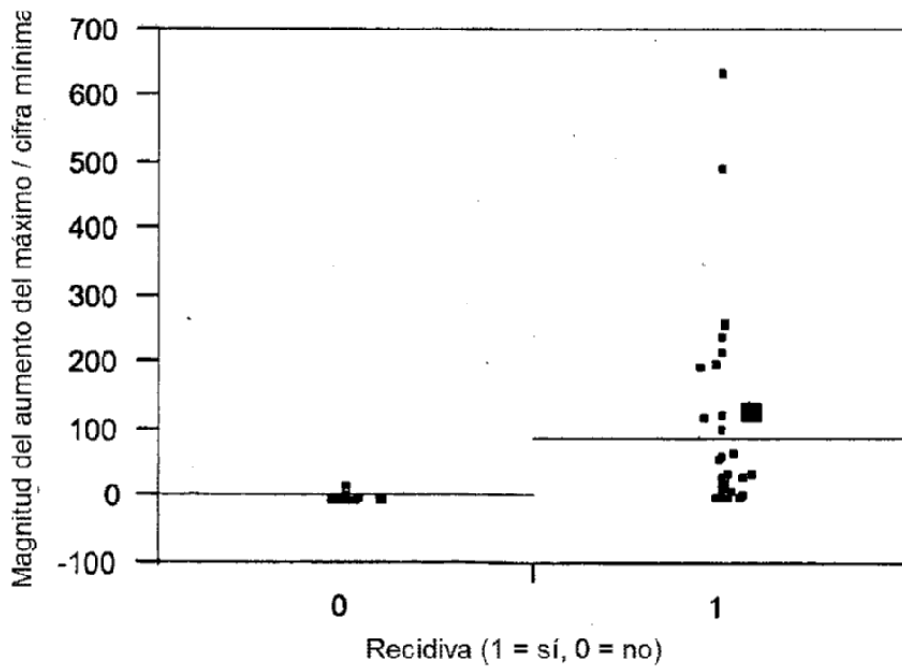




Gráfico superpuesto  
Y superpuestas

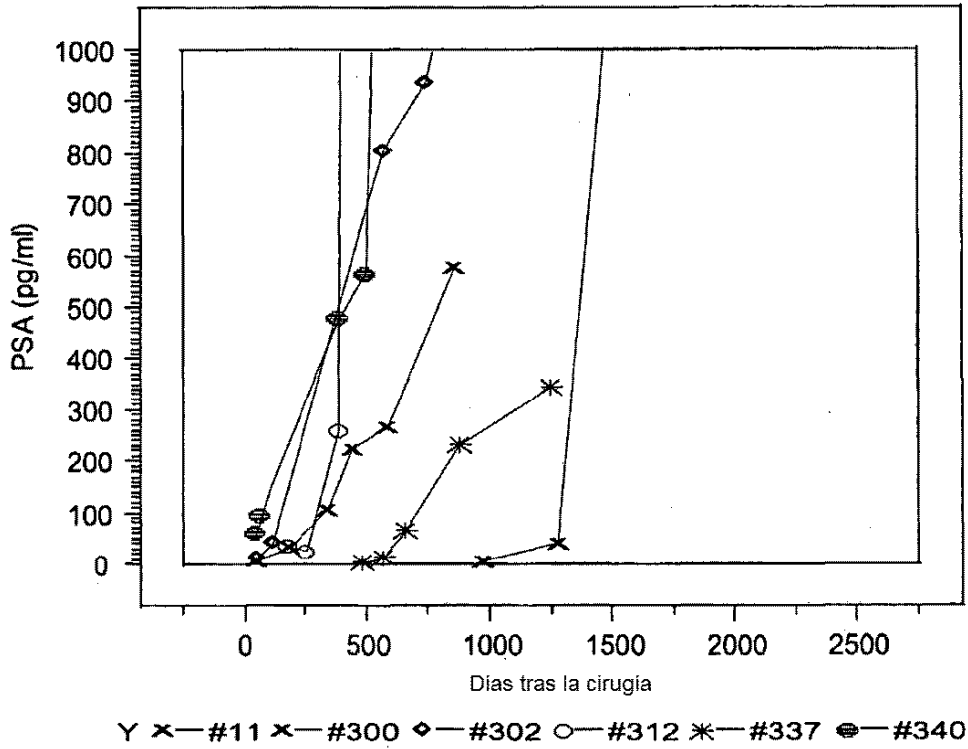


FIG. 15A



Gráfico superpuesto  
Y superpuestas

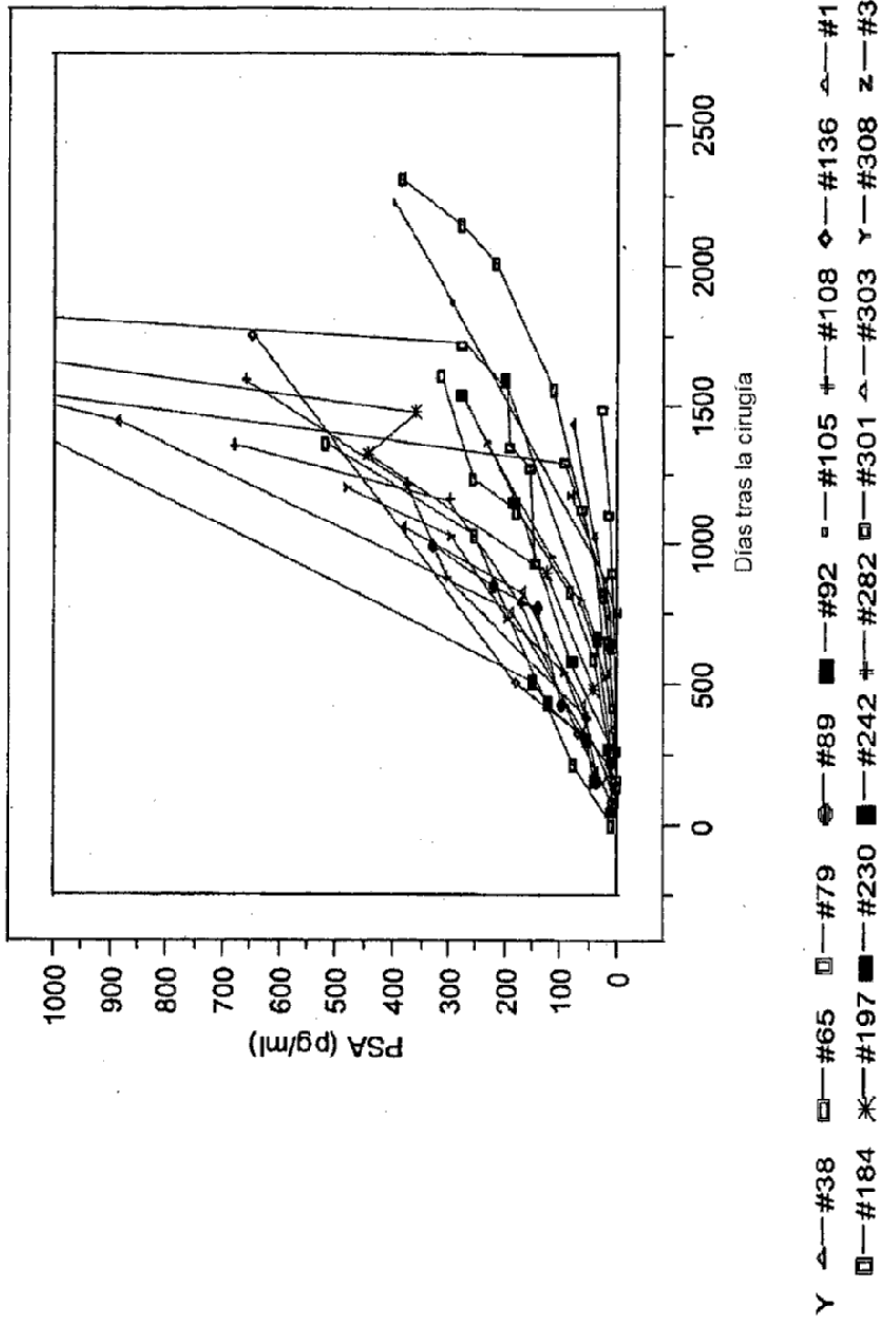
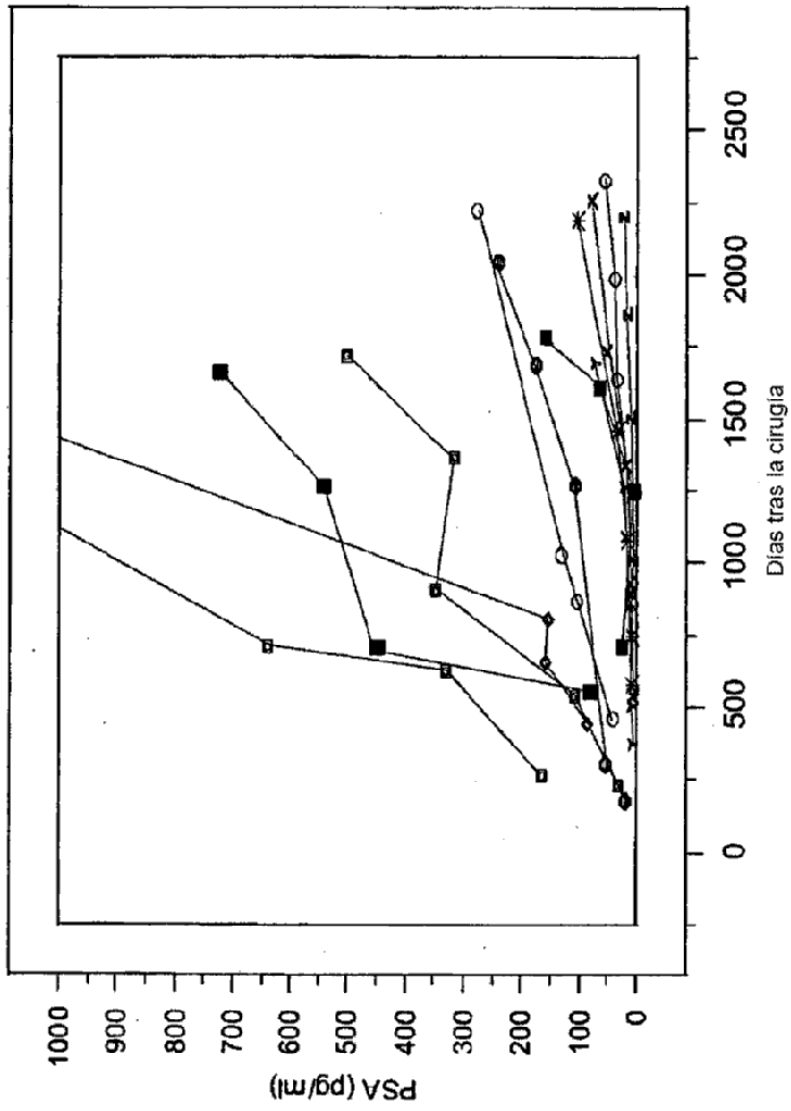


FIG. 15B

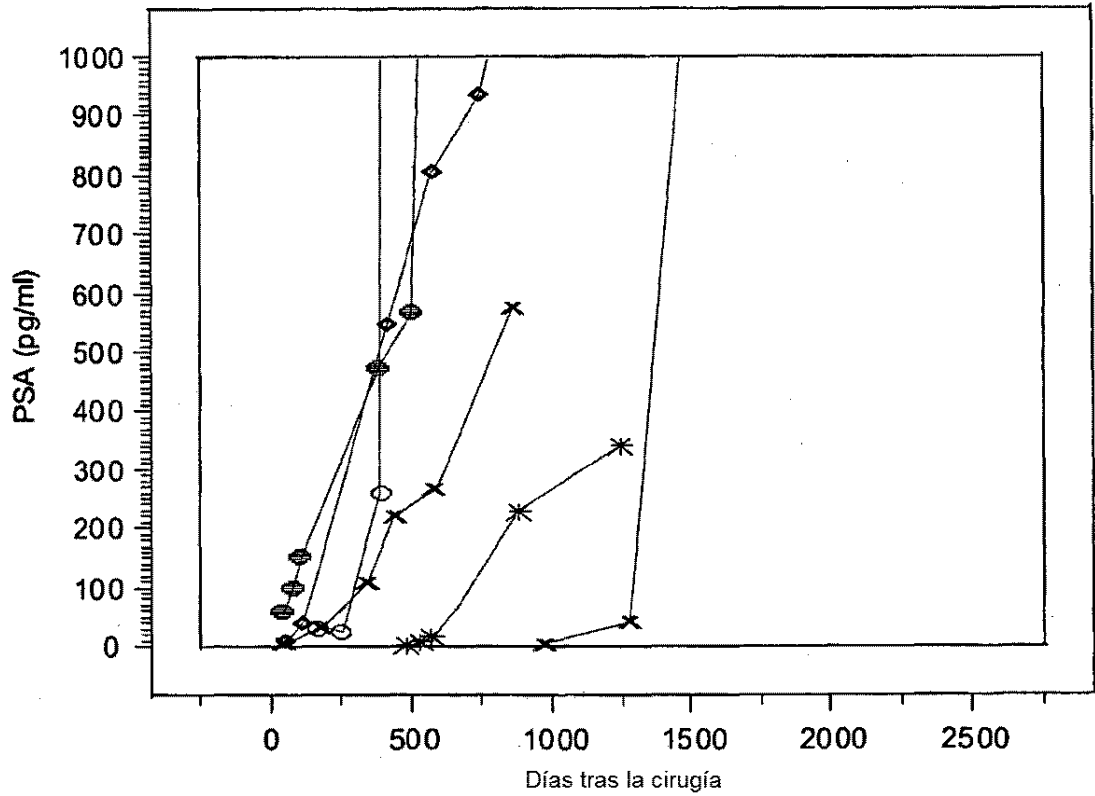
Gráfico superpuesto  
Y superpuestas



Y — #28    ◆ — #31    △ — #41    □ — #60    \* — #64    □ — #87    ■ — #87    ■ — #97    × — #103    □ — #113    □ — #124    ○ — #179  
● — #214

FIG. 15C

Gráfico superpuesto  
Y superpuestas



Y x—#11 x—#300 ◊—#302 ○—#312 \*—#337 ●—#340

**FIG. 16A**

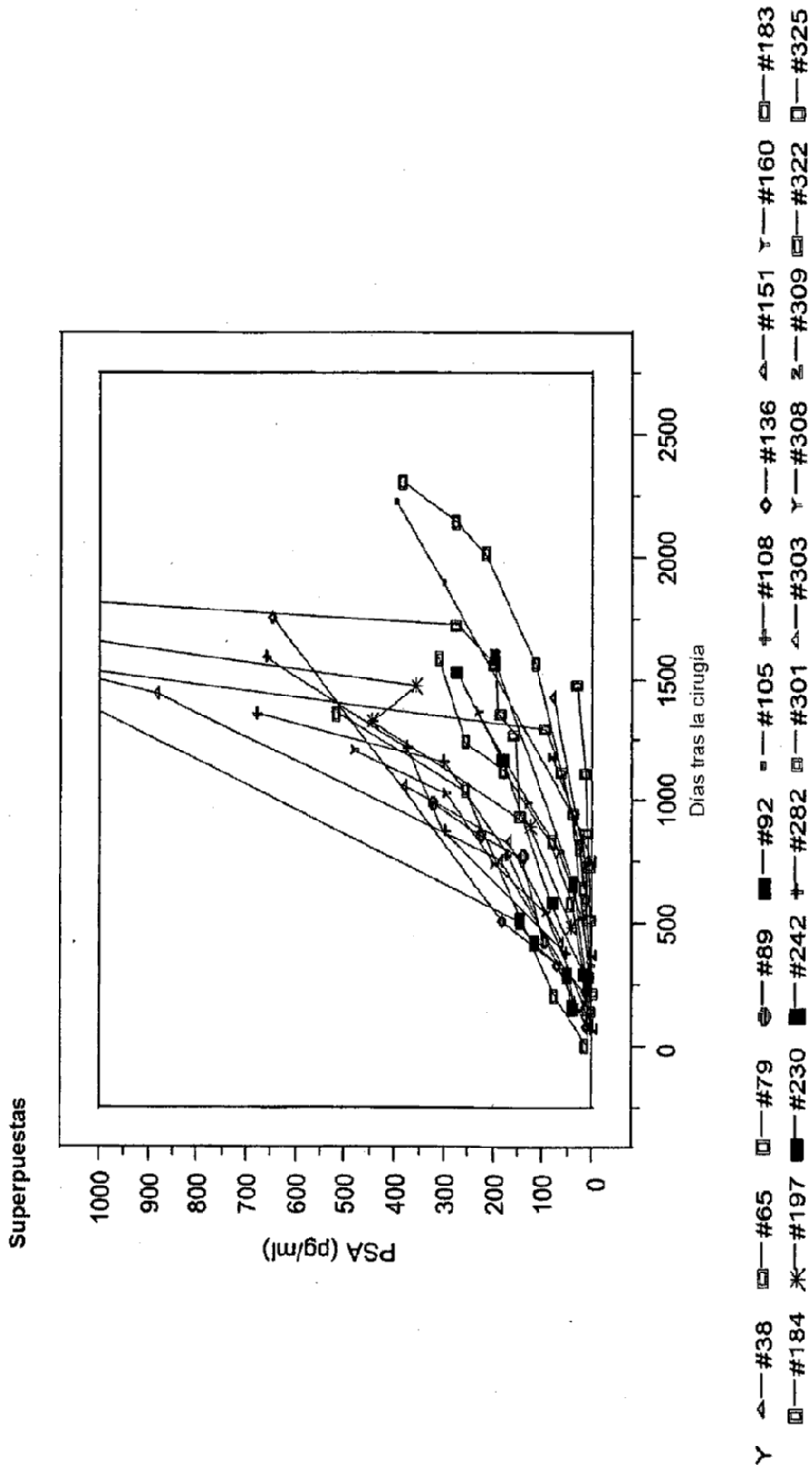


FIG. 16B

Gráfico superpuesto  
Y superpuestas

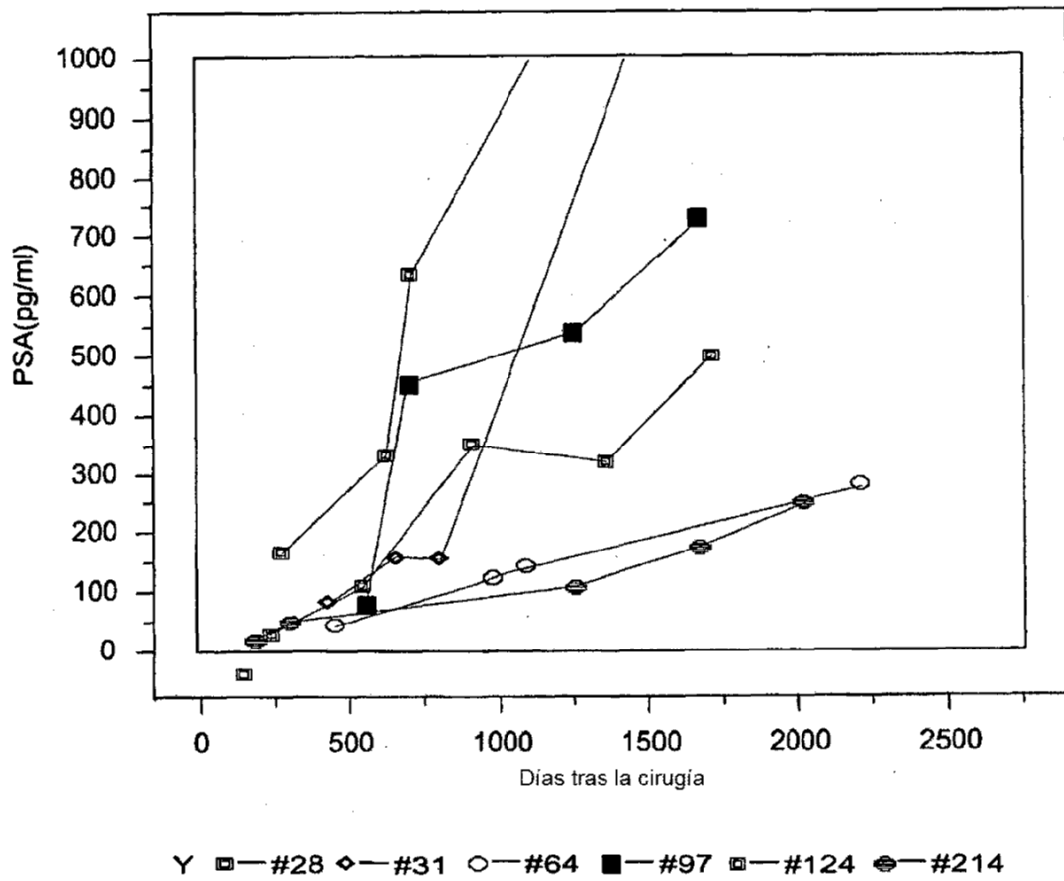
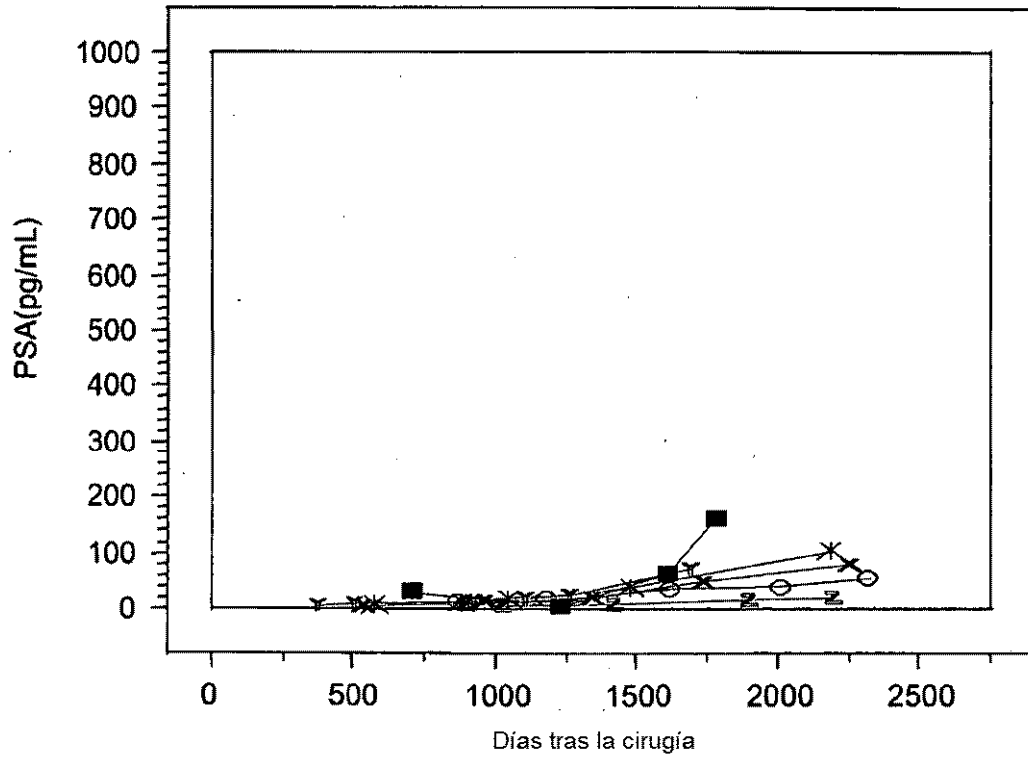


FIG. 16C

Gráfico superpuesto  
Y superpuestas



Y — #41    z — #60    \* — #87    ■ — #103    x — #113    ○ — #179

**FIG. 16D**

Gráfico superpuesto  
Y superpuestas

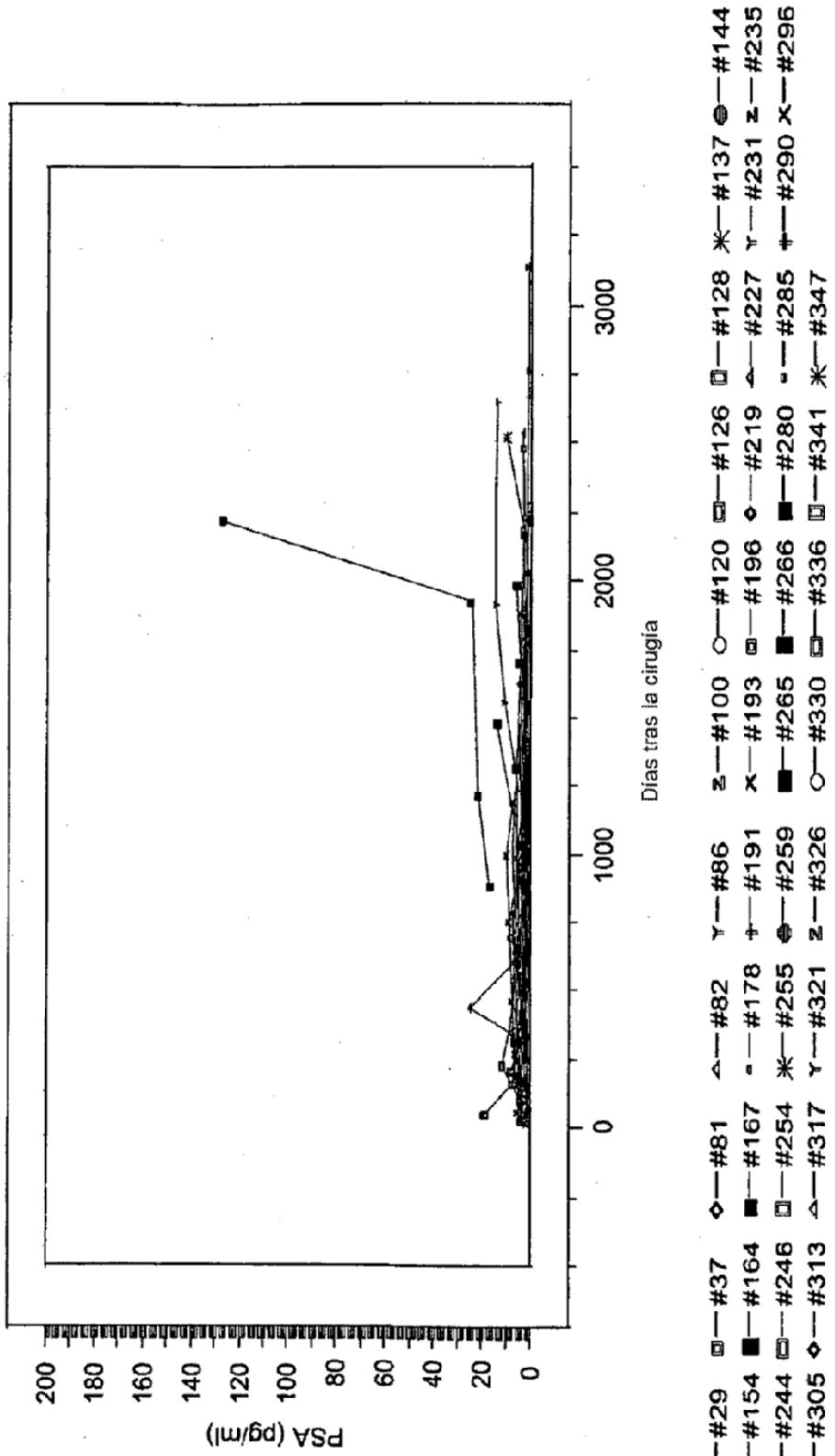


FIG. 17

Gráfico en mosaico

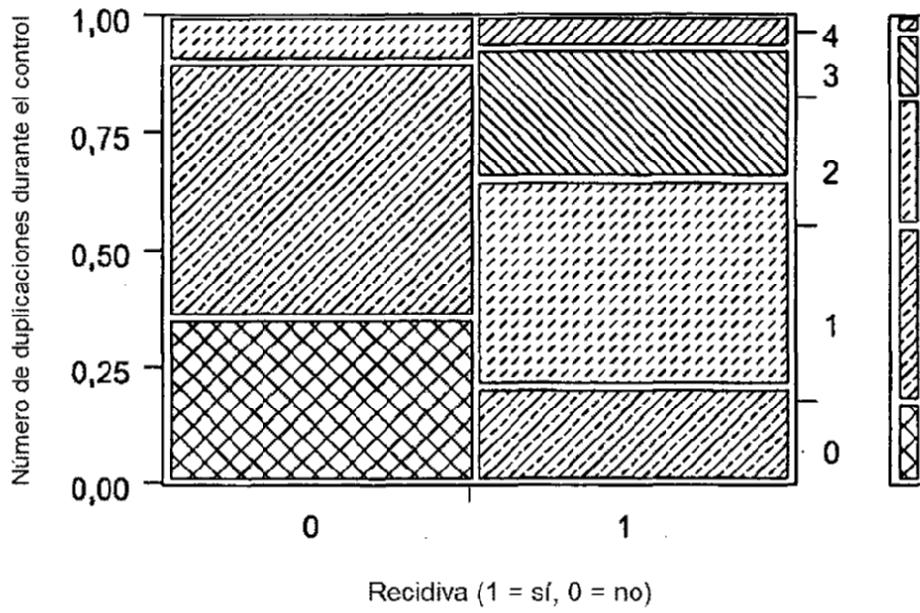


FIG. 18

Gráfico en mosaico

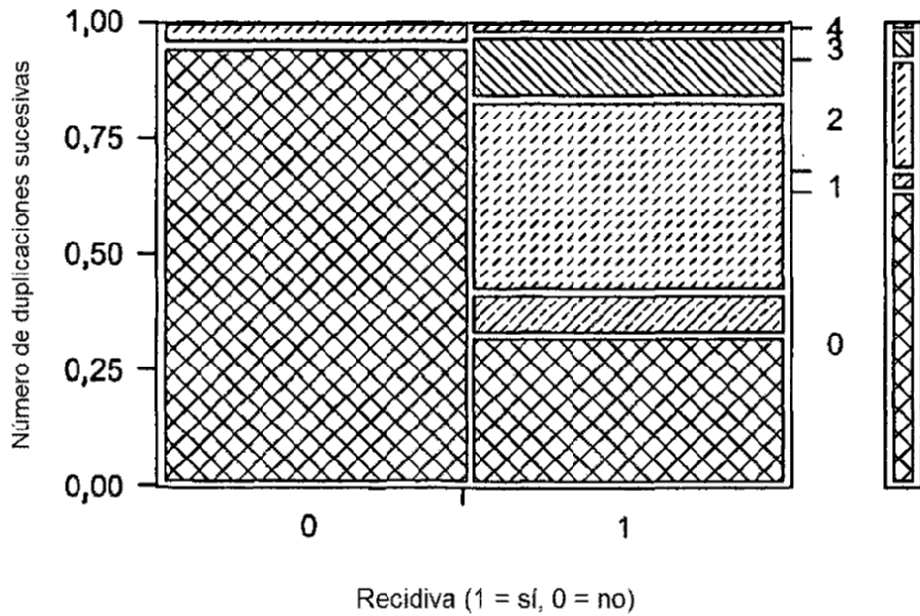
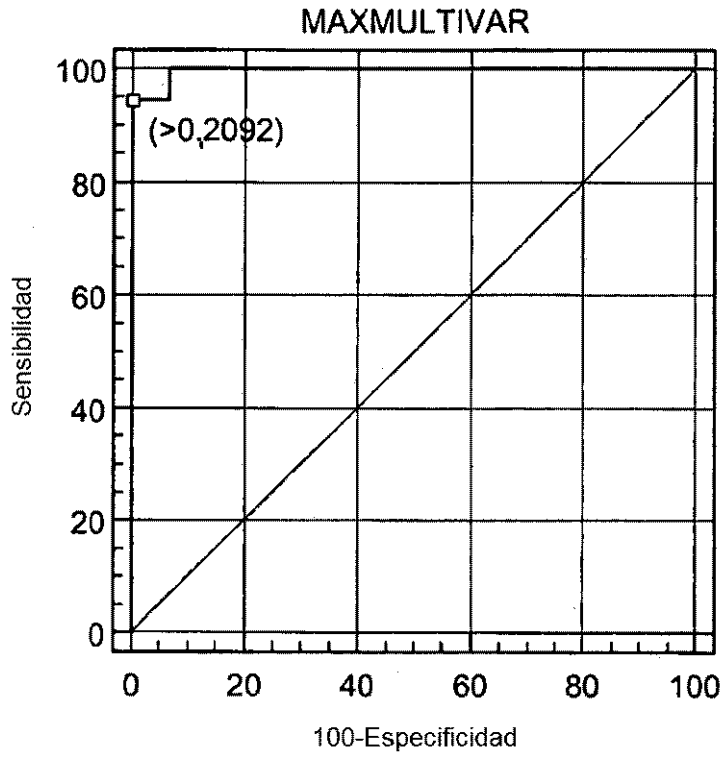
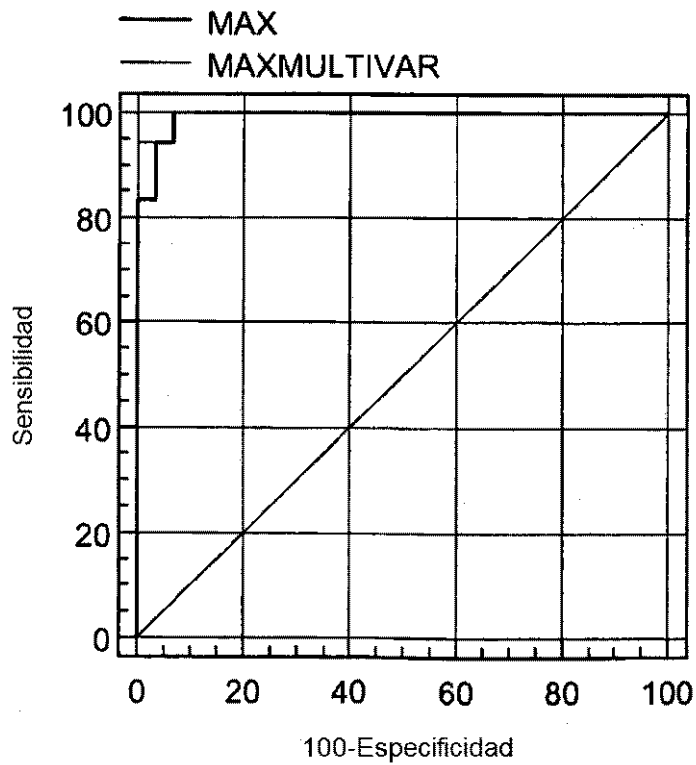


FIG. 19

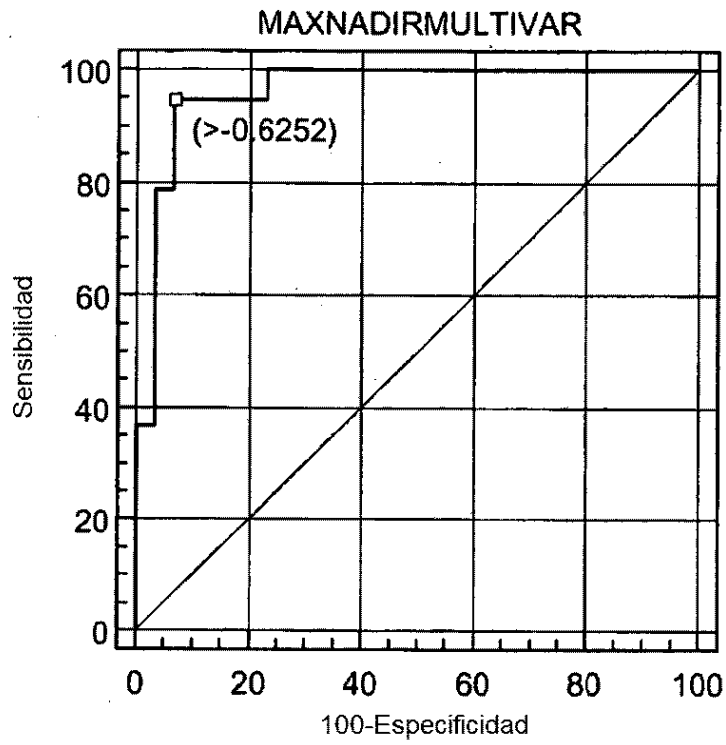




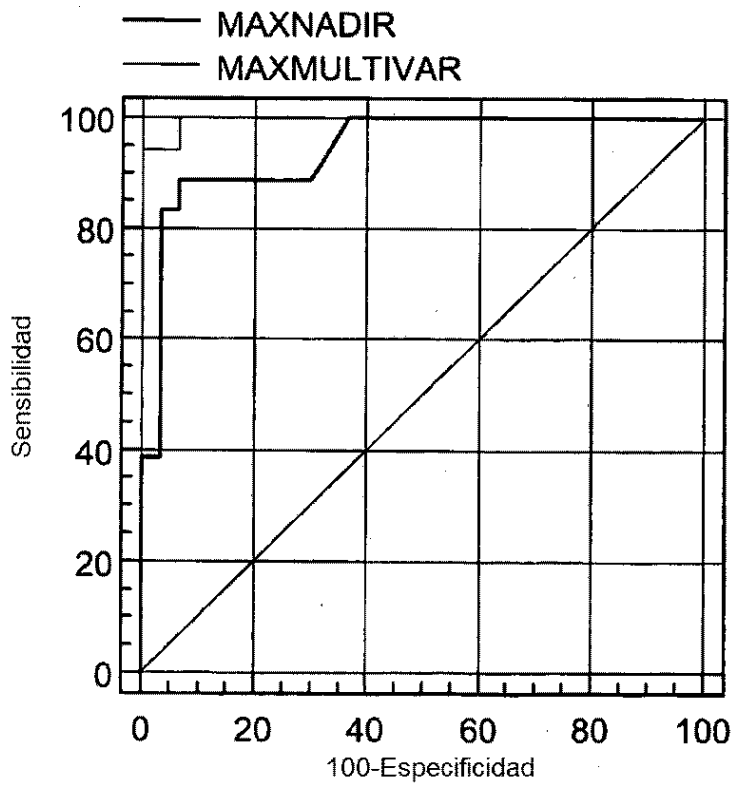
**FIG. 20A**



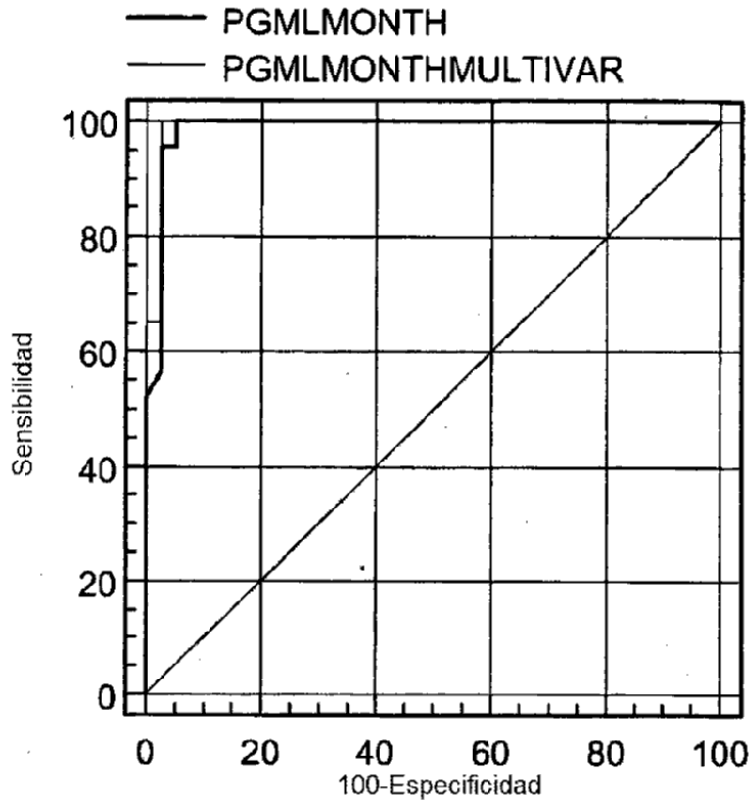
**FIG. 20B**



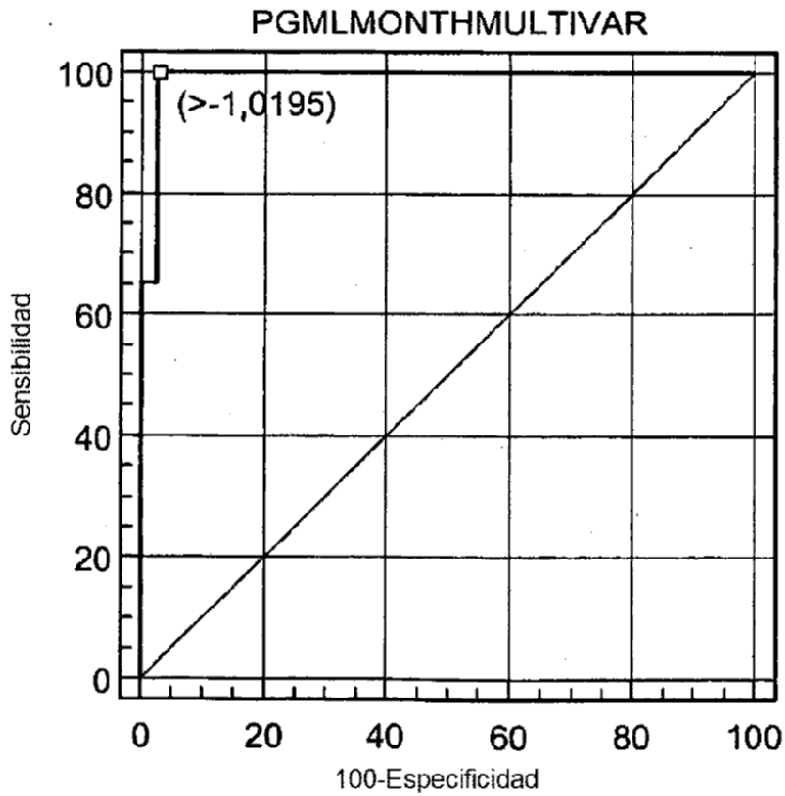
**FIG. 21A**



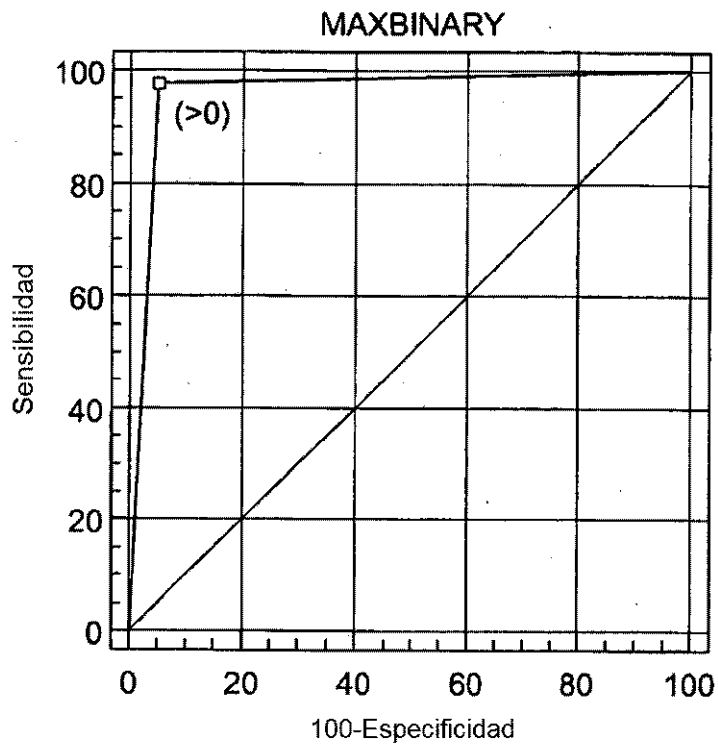
**FIG. 21B**



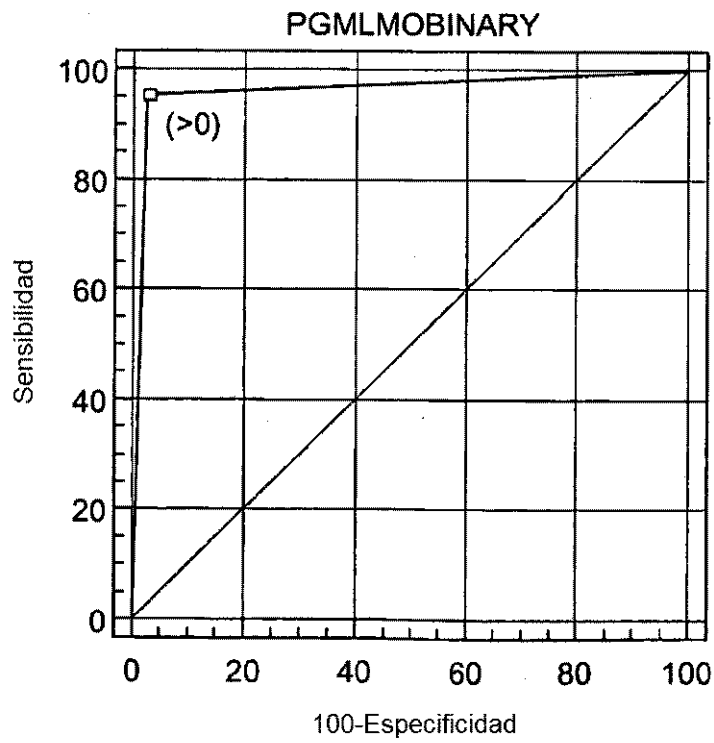
**FIG. 22A**



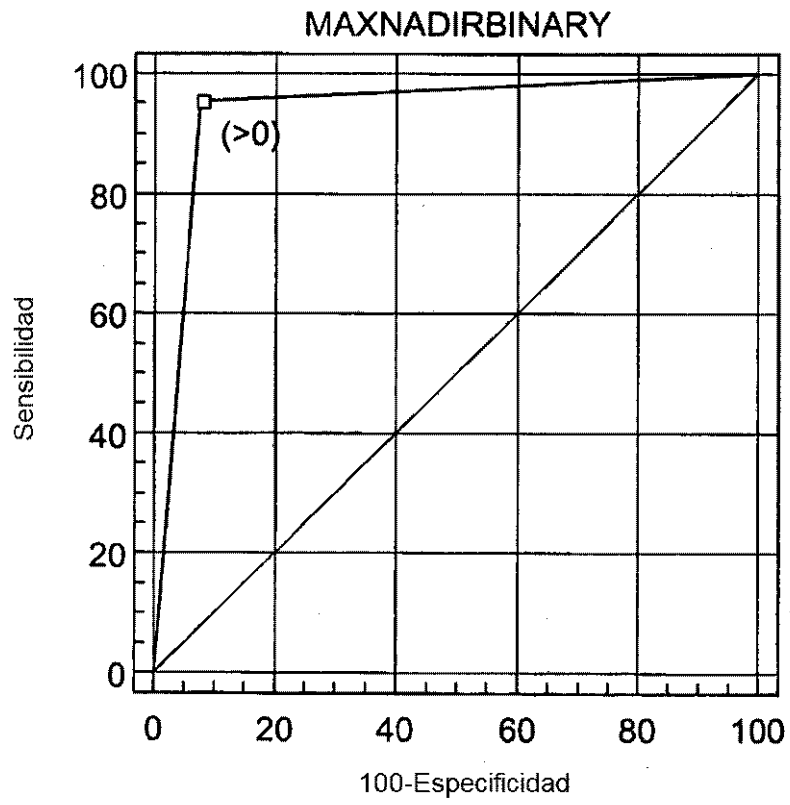
**FIG. 22B**



**FIG. 23A**



**FIG. 23B**



**FIG. 23C**

Gráfico del paciente estable número 1002 para la [PSA] frente a los meses

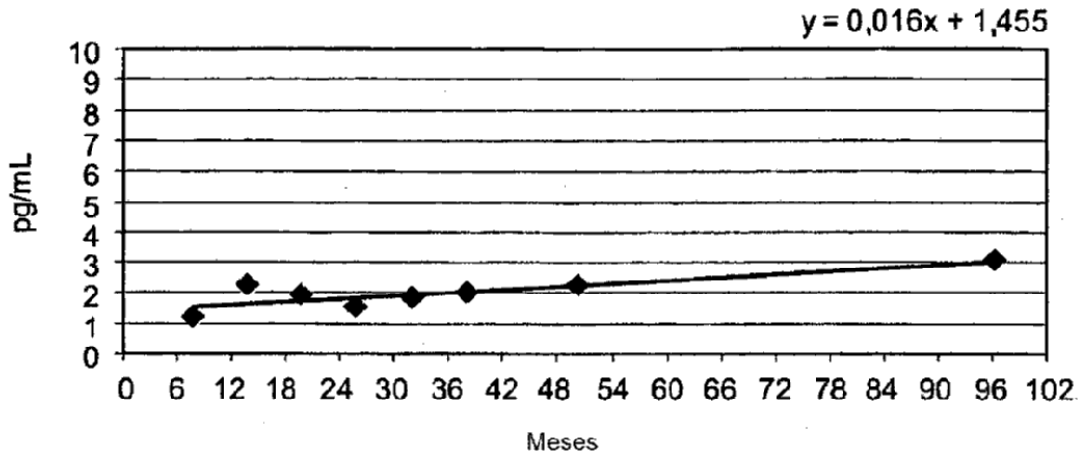


FIG. 24

Paciente con recidiva número 2001 para la [PSA] frente a los meses

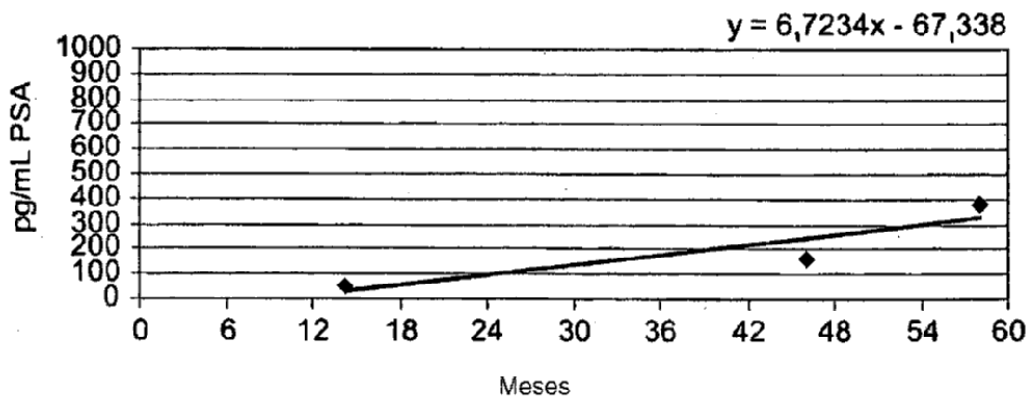


FIG. 25