

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 552**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

C12Q 1/527 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2012 PCT/IB2012/054622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13035071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2012 E 12830701 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2753716**

54 Título: **Nuevos biomarcadores de riesgo para el cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

08.09.2011 US 201161532148 P

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

05.03.2018

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**LIVNEH, ZVI y
PAZ-ELIZUR, TAMAR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 552 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

Nuevos biomarcadores de riesgo para el cáncer de pulmón

La presente invención, se refiere a un método para determinar un riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón según la reivindicación 1, al uso de un kit de ensayo según la reivindicación 13, a un método para determinar la respuesta de un sujeto humano a un tratamiento de cáncer de pulmón por un agente que daña el ADN según la reivindicación 16, a un método para seleccionar una subpoblación de sujetos para un ensayo de diagnóstico de cáncer según la reivindicación 19.

El cáncer de pulmón es el segundo cáncer más prevalente tanto en hombres (después del cáncer de próstata) como en mujeres (después del cáncer de mama), representado aproximadamente el 15% de todos los casos nuevos al año, llegando a ser aproximadamente 250.000 nuevos casos, y más de 150.000 muertes al año, sólo en los Estados Unidos (American Cancer Society, 2010). Los tipos principales de cáncer de pulmón primario son el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, aproximadamente 17%) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, aproximadamente 80%). De los cánceres de pulmón de células no pequeñas, aproximadamente el 40% son adenocarcinoma, 40% carcinoma de pulmón de células escamosas, y el resto carcinoide o de origen no especificado. La causa más común de cáncer de pulmón es exposición a largo plazo a humo de tabaco, que comprende cerca del 90% de los casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los factores de riesgo adicionales incluyen fumador pasivo, historial familiar de cáncer de pulmón, exposición a radón y otros gases radiactivos, asbestos, arsénico y polución del aire (American Cancer Society, 2010).

El diagnóstico oportuno del cáncer de pulmón ha sido elusivo. Los síntomas de cáncer de pulmón no aparecen habitualmente hasta que la enfermedad ya está en un estadio avanzado, e incluso pueden confundirse con otras afecciones. Los ensayos de citología de esputo, rayos X del pecho y otras herramientas de diagnóstico se han mostrado ineficaces para procedimientos de cribado. Sin embargo, los estudios clínicos recientes a gran escala han indicado que CT de dosis baja (CT espiral, LDCT), que puede proporcionar una imagen más detallada de los pulmones, es una herramienta sensible y exacta para la detección temprana de cáncer de pulmón (ELCAP Investigators, N Engl J Med 2006;355: 1763-71; NLST team, N Engl J Med. 2011 Ago 4;365(5):395-409).

Debido al enorme coste y logística compleja del cribado con LDCT de poblaciones en riesgo, las directrices para la evaluación permanecen generalmente inalteradas: no recomendando la mayor parte de las organizaciones profesionales principales, incluyendo la American Cancer Society, el cribado rutinario de cáncer de pulmón, bien para todo el mundo o para aquellos con un riesgo incrementado. Sin embargo, con la evidencia creciente de la eficacia de LDCT (los estudios han indicado que el cribado con LDCT reduce la posibilidad de morir de cáncer de pulmón un 20% en fumadores), la demanda para la implementación de protocolos de cribado probablemente se incrementa.

Los biomarcadores para la evaluación del riesgo de cáncer son útiles para la detección temprana y la prevención del cáncer, y tienen el potencial de ser usados en protocolos de cribado a gran escala. Desafortunadamente, hasta la fecha, no se han descubierto marcadores exactos y sensibles para el cáncer de pulmón.

Las rutas de reparación del ADN proporcionan medios para rectificar el daño, faltas y omisiones en la replicación del material genético de las células, incluyendo roturas mono y bicatenarias, sitios abásicos y modificaciones en las bases nucleicas. La reparación de emparejamiento erróneo, reparación por escisión de nucleótidos y reparación por escisión de bases (BER) son ejemplos de los tres mecanismos principales de reparación del ADN.

La correlación de la capacidad de reparación del ADN con patologías, específicamente cánceres, se ha emprendido para numerosos componentes de las rutas de reparación. Las mutaciones autosómicas recesivas en las enzimas de reparación por escisión de nucleótidos resultan en la afección de hipersensibilidad a UV conocida como Xeroderma pigmentoso (XP), con el alto riesgo característico de cáncer de piel y otros cánceres. Otros defectos documentados de la reparación por escisión de nucleótidos son el síndrome de Cockayne y tricotiodistrofia.

Los defectos en la reparación de emparejamiento erróneo se han identificado en el síndrome de Lynch, con una alta incidencia de carcinoma colorrectal. Los genes BRCA1 y BRCA2, que son marcadores de cáncer de mama hereditario, están asociados con enzimas de las rutas de reparación de ADN con rotura bicatenaria y recombinación homóloga. Las anomalías en la reparación por escisión de bases se han identificado en poliposis asociada con MutYH (MAP), un síndrome de predisposición a cáncer de colon hereditario asociado con defectos en la enzima de reparación MUTYH.

Aunque algunos tipos de cáncer pueden rastrearse con marcadores genéticos específicos, y se han identificado mutaciones en los genes de reparación del ADN en cáncer de pulmón y células de tumor de riñón, la correlación de cáncer de pulmón con mutaciones en la reparación del ADN no ha rendido biomarcadores exactos y fiables adecuados para evaluar el riesgo (véase Vineis et al, J Natl Canc Inst 2009;101:24-36). Muchos estudios que han investigado la capacidad global de reparación del ADN a través de varios métodos (sensibilidad a mutágenos, ensayo de aductos de ADN inducidos por BPDE, perfilado de la expresión génica y ensayos de reactivación de la reparación de ADN de la célula huésped global) han indicado que la variabilidad individual en la capacidad de reparación del ADN de los seres humanos se correlaciona con la variación en la susceptibilidad al cáncer, estando

- correlacionada una baja capacidad de reparación global con un mayor riesgo de cáncer para determinados tipos de cáncer (véase Li et al, Int J Canc 2008; 124:999-1007, y Wang, et al., Clin Canc Res 2010;16:764-74). Sin embargo, la complejidad de las rutas de reparación del ADN y el requerimiento para la manipulación de las muestras de células para los ensayos han confundido frecuentemente la asignación de componentes específicos de las rutas como factores de riesgo. Recientemente, sin embargo, la actividad enzimática de la 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1), una enzima de reparación por escisión de bases del ADN responsable de la eliminación de guaninas oxidadas, cuando se mide en muestras de tejido no cancerosas, se mostró que era un factor de riesgo valioso para el cáncer de pulmón (Paz-Elizur et al. J Natl. Canc. Inst. 2003;95: 1312-19) y cáncer de cabeza y cuello (Paz-Elizur et al., Can. Res. 2006; 66: 11683-9).
- 5
- 10 La Patente U.S. No. 6.358.682 de Jaffee et al. enseña un método, kit y controles para detectar la amplificación del gen HER-2/neu como un predictor de la recurrencia del cáncer de mama y supervivencia de los pacientes.
- La Patente U.S. No. 7.097.977 de Takeda et al. enseña un método para medir la sensibilidad de una célula a la acción de daño al ADN mediante la evaluación de la actividad de reparación por recombinación homóloga del ADN.
- La Patente U.S. No. 6.773.897 de Herman et al. enseña un método para predecir la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos alquilantes mediante la determinación del estado de metilación del gen para MGMT, una enzima de reparación del ADN.
- 15
- La Patente U.S. No. 7.288.374 de Pincemail et al enseña la evaluación del estrés oxidativo mediante el ensayo de un panel de marcadores del estrés oxidativo en muestras de células sanguíneas, incluyendo los marcadores la expresión de enzimas de reparación del ADN.
- 20 La Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2007-0269824 de Albrecht et al. enseña la evaluación de daño en el ADN (aductos, roturas) y/o capacidad de reparación del ADN (expresión y actividad de enzimas de reparación, capacidad de reparación global, susceptibilidad a daño, etc) en una muestra biológica, en respuesta a estresantes, con el fin de determinar un riesgo de un sujeto para desarrollar cáncer. Se proporcionan resultados de línea base con una población normal pequeña.
- 25 La Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2004-0096863 de Livneh et al. enseña métodos y kits para determinar un riesgo de desarrollar cáncer, para evaluar una efectividad y dosificación de terapia del cáncer y para correlacionar entre una actividad de una enzima de reparación del ADN y un cáncer. Se descubrió la correlación entre la actividad catalítica disminuida de OGG1 en linfocitos sustitutos y riesgo de cáncer de pulmón y de cabeza y cuello.
- 30 Las Publicaciones de Solicitudes de Patente U.S. Nos. 2003-0104446 y 2006-0147929 de Sauvaigo S. enseñan el uso de matrices de "bio-chips", que comprenden sustratos de oligonucleótidos o ADN plasmídico que portan combinaciones de varias lesiones en el ADN y una variedad de secuencias de sustrato, para medir la capacidad de reparación del ADN global en una muestra. Se contempla la automatización de partes del ensayo o del ensayo completo.
- 35 La Publicaciones de Solicitud de Patente U.S. No. 20100285456 de Matta enseña la medición de la capacidad de reparación del ADN global en linfocitos, usando el ensayo de reactivación de huésped, para determinar el riesgo de cáncer de mama.
- MAREK RUSIN ET AL describe "Novel genetic polymorphisms in DNA repair genes: O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in lung cancer patients from Poland", HUMAN MUTATION, vol. 14, no. 3, 1 de septiembre 1999, páginas 269-270.
- 40
- EP2308994 se refiere a un método para determinar un riesgo de un sujeto de desarrollar cáncer, comprendiendo el método determinar un nivel de actividad catalítica de una enzima de reparación del ADN en una muestra biológica del sujeto, en el que dicha enzima de reparación del ADN se selecciona del grupo que consiste en 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1), AP endonucleasa 1 (APE1), metilpurina ADN glicosilasa (MFG), uracil ADN glicosilasa 1 (UNG1), uracil ADN glicosilasa 2 (UNG2), SMUG1, MBD4, timina/uracilo glicosilasa específica de emparejamiento erróneo (TDG), endonucleasa III (NTH1), ADN glicosilasa específica de emparejamiento erróneo de adenina (MYH), 8-oxo-GTPasa/8-oxodGTPasa (MTH1), dUTPasa (DUT), AP endonucleasa 2 (APE2), desoxirribosa fosfato liasa (POLB) y en el que un nivel de dicha actividad por debajo de un valor predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado del sujeto de desarrollar dicho cáncer.
- 45
- 50 [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)14:3<269::AID-HUMU13>3.0.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:3<269::AID-HUMU13>3.0.CO;2-6) describe nuevos polimorfismos genéticos en genes de reparación del ADN: O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) y N-metilpurina-ADN glicosilasa (MPG) en pacientes con cáncer de pulmón de Polonia.
- MIHI YANG ET AL se refiere a "Lack of association between Caucasian lung cancer risk and O6-methylguanine-DNA methyltransferase-codon 178 genetic polymorphism", LUNG CANCER, vol. 44, no. 3, 1 de junio de 2004, páginas 281-286.
- 55

Yen-Li lo et al se refiere a "a polymorphism in the APE1 gene promoter is associates with Lung cancer risk", cancer epidemiol biomarkers prev 2009, vol. 18, no. 1, 5 de enero de 2009, páginas 223-229.

Juan Lu et al se refiere a "functional characterization of a promoter polymorphism in APE1/Ref- that contributes to reduced lung cancer susceptibility", FASEB J., vol. 23, no. 10, 23 de octubre de 2009, páginas 3459-3469.

- 5 Laurent Gros et al describe "the major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway", nucleic acids research, vol. 32, no. 1, 2 de enero de 2004, páginas 73-81.

WO 2009/007677 se refiere al uso de un inhibidor de la reparación DSB en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de un cáncer en un individuo, en el que el cáncer comprende células que son/es deficiente en una ruta BER y/o SSBR.

10 **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un método para determinar un riesgo de un sujeto humano para desarrollar cáncer de pulmón, comprendiendo el método determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) en una muestra biológica del sujeto, y, según dicho nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de dicha actividad catalítica de MPG por encima de un primer valor predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado de dicho sujeto de desarrollar cáncer de pulmón.

Preferiblemente, el método comprende, además:

(a) determinar un nivel de actividad catalítica de

(i) endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) o

(ii) 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) o

- 20 (iii) tanto endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) como 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1)

en dicha muestra biológica, y;

según dicho nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de dicha actividad catalítica de MPG por encima de un primer valor predeterminado, y bien un nivel de dicha actividad catalítica de APE1 por debajo de un segundo valor predeterminado o un nivel de dicha actividad catalítica de OGG1 por debajo de un tercer valor predeterminado o tanto un nivel de dicha actividad catalítica de APE1 por debajo de dicho segundo valor predeterminado como un nivel de dicha actividad catalítica de OGG1 por debajo de dicho tercer valor predeterminado

- 25 es indicativo de un riesgo incrementado de dicho sujeto de desarrollar cáncer de pulmón.

Preferiblemente, el método comprende, además:

- 30 determinar el nivel de actividad catalítica de al menos una de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) y 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) en dicha muestra biológica del sujeto;

(b) determinar una puntuación de reparación de ADN integrada para dicho sujeto de dicho nivel de MPG y al menos una de OGG1 y APE1; y

- 35 (c) determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que una puntuación de reparación de ADN integrada por debajo de un valor predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado de dicho sujeto de desarrollar cáncer de pulmón.

Preferiblemente, dicha determinación de dicha actividad catalítica en (a) comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) y de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) en dicha muestra biológica del sujeto.

- 40 Preferiblemente, dicha determinación de dicha actividad catalítica en (a) comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) y 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) en dicha muestra biológica del sujeto.

Preferiblemente, dicha determinación de dicha actividad catalítica en (a) comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG), de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) y 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) en dicha muestra biológica del sujeto.

- 45 Preferiblemente, dicho riesgo o nivel de riesgo se expresa como una razón de probabilidades (OR) comparado con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón del de una población de referencia de individuos normales, aparentemente sanos que concuerdan con dicho sujeto o sujetos para al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en sexo, edad, etnicidad y estado de tabaquismo.

Preferiblemente, la razón de probabilidades para la actividad catalítica de MPG, cuando se determina por el ensayo MPG-Hx, es 1,8 para cada 10 unidades de actividad catalítica ó 1,8 para cada 1 SD por encima de dicho valor predeterminado.

5 Preferiblemente, la razón de probabilidades combinada para las actividades catalíticas de MPG y APE1, respecto a la de dicha población de referencia, es al menos 5, en el que la razón de probabilidades para APE1 se determina comparando la actividad catalítica de APE1 en el percentil 25 con la del percentil 75 de valores control y la razón de probabilidades para MPG se determina comparando la actividad catalítica de MPG en el percentil 75 con la del percentil 25 de los valores control.

10 Preferiblemente, la razón de probabilidades se calcula a partir de una puntuación de reparación de ADN integrada para la actividad catalítica combinada de MPG, OGG1 y APE1, en el que cuando dicha puntuación de reparación de ADN integrada está por debajo de la mediana de una población de referencia, dicha razón de probabilidades es al menos 3,0.

15 Preferiblemente, la determinación de dicha actividad catalítica de MPG se efectúa usando un sustrato oligonucleótido bicatenario que tiene una lesión hipoxantina (Hx) o usando un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión N6-etenoadenina (eA), en el que la determinación de dicha actividad catalítica de APE1 se efectúa usando un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión de sitio abásico furanilo (AP) y en el que la determinación de dicha actividad catalítica de OGG1 se efectúa usando un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión 8-oxoguanina.

20 Preferiblemente, dicho sustrato oligonucleótido bicatenario que tiene una lesión hipoxantina (Hx) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 2 y dicho sustrato oligonucleótido que tiene una lesión N6-etenoadenina (eA) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 3 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 4, en el que dicho sustrato oligonucleótido que tiene una lesión de sitio abásico furanilo (AP) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 9 y en el que dicho sustrato oligonucleótido que tiene una lesión 8-oxoguanina comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 5 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 6.

30 La presente invención también se refiere al uso de un kit de ensayo que comprende reactivos para la determinación de un nivel de actividad enzimática de MPG y al menos una de las actividades enzimáticas de APE1 y OGG1 en una muestra biológica de dicho sujeto para determinar un riesgo de cáncer de pulmón de dicho sujeto.

35 Preferiblemente, dicho reactivo para determinar la actividad enzimática de MPG comprende un sustrato oligonucleótido bicatenario que tiene una lesión hipoxantina (Hx) que comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 2 o un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión N6-etenoadenina (eA) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 3 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 4; en el que dicho reactivo para determinar la actividad enzimática de APE1 comprende un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión de sitio abásico furanilo (AP) que comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 9 y en el que dicho reactivo para determinar la actividad enzimática de OGG1 comprende un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión 8-oxoguanina que comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 5 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 6.

Preferiblemente, dicha muestra biológica comprende células mononucleares de sangre periférica aisladas.

45 La presente invención se refiere a un método para determinar la respuesta de un sujeto humano a un tratamiento de cáncer de pulmón por un agente dañino para el ADN, comprendiendo el método:

(a) determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) en una muestra biológica del sujeto, y, según dicho nivel,

50 (b) determinar el tratamiento y régimen de tratamiento apropiado para tratar a dicho sujeto, en el que un nivel de dicha actividad catalítica por encima de un valor predeterminado es indicativo de una respuesta incrementada de dicho sujeto a un tratamiento de cáncer de pulmón por un agente dañino para el ADN, y

(c) derivar a dicho sujeto para tratamiento según dicho régimen de tratamiento.

55 Preferiblemente, el método comprende además determinar un nivel de actividad catalítica de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) u 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) o tanto APE1 como OGG1 en dicha muestra biológica, en el que un nivel de dicha actividad catalítica de MPG en dicha muestra del sujeto por encima de un primer valor predeterminado, y un nivel de APE1 en dicha muestra del sujeto por debajo de un segundo valor predeterminado o un nivel de OGG1 en dicha muestra del sujeto por debajo de un tercer valor predeterminado o un

nivel tanto de APE1 por debajo de dicho segundo valor predeterminado como un nivel de OGG1 por debajo de dicho tercer valor predeterminado es indicativo de una capacidad de respuesta incrementada de dicho sujeto a un tratamiento de cáncer de pulmón con un agente dañino para el ADN.

Preferiblemente, dicho cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

5 La presente invención también se refiere a un método para seleccionar, de entre una población de sujetos, una subpoblación de sujetos para derivación a un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón, comprendiendo el método identificar una subpoblación de sujetos en dicha población que tiene un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón según los método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, identificando de esta manera la subpoblación de sujetos para derivación para un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón, y derivando a los miembros de dicha subpoblación para al menos un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón.

10 Preferiblemente, dicho ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón se selecciona del grupo que consiste en mediastinoscopia, broncoscopia, tomografía computerizada (CT), tomografía computerizada espiral (dosis baja) (LDCT), tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), rayos X, análisis de citología de células del esputo, biopsia de pulmón, perfilado genético y análisis de biomarcadores de cáncer de pulmón.

Descripción breve de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, sólo como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos con detalle, se enfatiza que los particulares mostrados son como ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción, tomada con los dibujos, pone de manifiesto para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

25 Las FIGs. 1A-1D son una ilustración esquemática del proceso de Reparación del ADN por Escisión de Bases. La base afectada (X) en el ADN dañado (FIG. 1A) es escindida por una ADN glicosilasa, generando un sitio abásico (FIG. 1B) (sitioapurínico/apirimidínico; sitio AP). El sitio abásico se corta entonces por la endonucleasa AP 1 (APE1; APEX) (FIG. 1C). El procesamiento adicional por ADN polimerasa β y ADN ligasa completa la reparación (FIG. 1D);

30 Las FIGs. 2A- 2E muestran la estructura química de lesiones del ADN reparadas por OGG1, MPG(AAG) y APE1. FIG. 2A, 8-oxoguanina (7, 8-dihidro-8-oxoguanina, 8-oxoG); FIG. 2B, hipoxantina (Hx); FIG. 2C, 1, N6-etenoadenina (eA); FIG. 2D, 3-metiladenina; FIG. 2E, izquierda: sitio abásico (también denominado sitioapurínico/apirimidínico; sitio AP); FIG. 2E derecha, sitio abásico furanilo;

35 Las FIGs. 3A-3F muestran un ensayo para actividad de MPG (AAG, ANPG) en ADN que contiene hipoxantina. FIG. 3A, Estructura de hipoxantina (Hx); FIG. 3B, Esquema del ensayo. X indica una hipoxantina específica de sitio en un oligonucleótido corto. Después de la incubación con un extracto de proteína, la presencia de actividad de MPG-Hx resulta en la escisión de Hx, dejando detrás un sitio abásico, que se escinde por la actividad de APE en el extracto y posterior tratamiento con álcali, convirtiendo el oligonucleótido de 34 bases radiomarcado en un oligonucleótido de 19 bases. Los productos de escisión se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea. Los asteriscos representan el extremo de ADN radiomarcado. FIG. 3C, Curso de tiempo de la actividad de MPG-Hx en un extracto de proteína preparado a partir de células mononucleares de sangre periférica. El sustrato que contiene la lesión Hx (carriles Hx) se escinde para rendir el 19-mer, mientras el ADN control (carriles A) sin el daño no se escinde. La FIG. 3D es un gráfico que representa la actividad enzimática. La cantidad de radiactividad en los fragmentos de 19 y 34 bases se cuantificó usando formación de imágenes con fósforo y se expresó como una función de la cantidad de ADN escindido (en femtomoles) frente al tiempo (en minutos). Los círculos llenos (●) indican ADN que contiene hipoxantina; Los círculos vacíos (○) indican ADN control que tiene una A en lugar de la lesión Hx (véase la FIG. 3D). La FIG. 3E es una fotoimagen de radiactividad en una PAGE desnaturalizante que muestra el incremento de actividad de MPG-Hx en cantidades crecientes de un extracto de proteína preparado a partir de células mononucleares de sangre periférica. El sustrato que contiene la lesión Hx (carriles Hx) se escinde para rendir el 19-mer, mientras el ADN control (carriles A) sin el daño no se escinde. La FIG. 3F es un gráfico que representa la actividad enzimática, usando formación de imágenes con fósforo, expresado como una función de la cantidad de ADN escindido (radiactividad) en los fragmentos de 19 y 34 bases (en femtomoles) frente a la concentración de proteína (en ng/ μ l) de la muestra. Los círculos llenos (●) indican ADN que contiene hipoxantina; Los círculos vacíos (○) indican ADN control que tiene una A en lugar de la lesión Hx (véase la FIG. 3F). Los resultados son de un experimento representativo. Obsérvese la linealidad del ensayo MPG-Hx hasta 120 minutos e intervalo de concentración de proteínas de 2,5 ng/ μ l a 40 ng/ μ l;

55 La FIG. 4 es un gráfico que ilustra la correlación de la actividad de reparación de ADN de MPG-Hx con el cáncer de pulmón. La actividad de MPG-Hx, ensayada en células mononucleares de sangre periférica como en las FIGs. 3A-3F, y expresada como Unidades/ μ g de proteína, en 100 pacientes con cáncer de pulmón (línea negra) y 100 sujetos control concordantes (línea gris). Obsérvese el desplazamiento a valores mayores de MPG-Hx entre los pacientes con cáncer de pulmón;

Las FIGs. 5A-5E muestran un ensayo para la actividad catalítica de MPG usando un sustrato de ADN que contiene una lesión 1, N6-etenoadenina. La FIG. 5A ilustra la estructura de 1, N6-etenoadenina (eA); La FIG. 5B es una indicación esquemática del ensayo. Un ADN sintético radiomarcado corto bicatenario que porta una eA específica de sitio (marcada con una X) se incubó con una muestra de extracto de proteína para la determinación de MPG. La actividad de MPG-eA libera la eA, resultando en un sitio abásico, que se escinde por APE presente en la muestra y posterior tratamiento con álcali, que a su vez convierte el oligonucleótido de 32 bases radiomarcado en un oligonucleótido de 15 bases. Los productos de escisión se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea. Los asteriscos representan el extremo de ADN radiomarcado. La FIG. 5C es un gel de poliacrilamida que muestra un curso de tiempo y titulación de proteína de actividad de MPG-eA en una muestra preparada a partir de células mononucleares de sangre periférica. El sustrato que contiene la lesión eA se escinde para rendir el 15-mer. La cantidad de radiactividad en los fragmentos de 15 y 32 bases se cuantificó usando formación de imágenes con fósforo y se expresó como una función de la cantidad de ADN escindido (en femtomoles) frente al tiempo (FIG. 5D) o concentración de proteína de la muestra (FIG. 5E). Obsérvese la correlación lineal. Se muestran los resultados de experimentos representativos;

La FIG. 6 es un gráfico que ilustra la correlación de actividad de reparación del ADN de MPG con cáncer de pulmón. La actividad de MPG, se evaluó en células mononucleares de sangre periférica como en las FIGs. 5A-5E, y se expresó en términos de densidad, en 100 pacientes con cáncer de pulmón (línea negra) y 100 sujetos control concordantes (línea gris). Obsérvese el desplazamiento a valores mayores de MPG entre los pacientes con cáncer de pulmón;

FIG. 7 es un gráfico que ilustra la correlación de actividad de reparación del ADN OGG-1 con cáncer de pulmón. La actividad de OGG-1, se evaluó por ensayo de un sustrato de ADN corto fluorescente (OGG-F) en células mononucleares de sangre periférica, y se expresó en términos de Unidades/ μ g de proteína, en 100 pacientes con cáncer de pulmón (línea negra) y 100 sujetos control concordantes (línea gris). Obsérvese el desplazamiento a valores menores de OGG-1 entre los pacientes con cáncer de pulmón;

Las FIGs. 8A-8E muestran el ensayo para actividad de reparación del ADN APE, usando un sustrato de ADN que contiene un sitio abásico furanilo. La FIG. 8A ilustra la estructura del sitio abásico furanilo; FIG. 8B: Indicación esquemática del ensayo. Un ADN sintético radiomarcado corto bicatenario que porta un sitio abásico furanilo específico de sitio (marcado con una X) se incubó con una muestra de extracto de proteína para la determinación de APE1. Los asteriscos representan el extremo de ADN radiomarcado. La actividad de APE mella el sustrato, resultando en la conversión del oligonucleótido de 30 bases radiomarcado en un oligonucleótido de 15 bases radiomarcado. La FIG. 8C es un gel de poliacrilamida que muestra una titulación de proteína de actividad de APE1 en un extracto de proteína preparado a partir de células mononucleares de sangre periférica, ensayado en cantidades crecientes de los extractos. El sustrato que contiene la lesión de sitio abásico furanilo se escinde para rendir el 15-mer. La cantidad de radiactividad en los fragmentos de 15 y 30 bases se cuantificó usando formación de imágenes con fósforo y se expresó como una función de la cantidad de ADN escindido (en femtomoles) frente al tiempo (FIG. 8D) o concentración de proteína de la muestra (FIG. 8E). Obsérvese la correlación lineal. Se muestran los resultados de experimentos representativos;

La FIG. 9 es un gráfico que ilustra la correlación de actividad de reparación del ADN APE con cáncer de pulmón. La actividad de APE-1, se ensayó en células mononucleares de sangre periférica como en las FIGs. 8A-8E, y se expresó como Unidades/ng de proteína, en 100 pacientes con cáncer de pulmón (línea negra) y 100 sujetos control concordantes (línea gris). Obsérvese el desplazamiento a valores menores de APE1 entre los pacientes con cáncer de pulmón;

La FIG. 10 es un gráfico que ilustra la correlación de puntuación de reparación del ADN integrada (OMA) con cáncer de pulmón. La actividad de OGG1, MPG y APE, ensayada en células mononucleares de sangre periférica de 100 pacientes con cáncer de pulmón (línea llena) y 100 sujetos control concordantes (línea discontinua) como se describe, se analizó y combinó para proporcionar la puntuación de reparación del ADN integrada (OMA). La distribución de las puntuaciones de reparación de ADN integrada (OMA) en las dos poblaciones (según frecuencia relativa en %) muestra claramente un desplazamiento a valores menores de puntuación de reparación del ADN integrada (OMA) entre los pacientes con cáncer de pulmón.

50 Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente descripción, en algunas realizaciones de ésta, se refiere a evaluación del riesgo del cáncer y, más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos, composiciones y kits usando marcadores bioquímicos para cribar sujetos para riesgo de cáncer. En algunas realizaciones, los individuos con un riesgo incrementado pueden derivarse a ensayos de diagnóstico de cáncer de pulmón adicionales. En otras realizaciones más, se realizan ensayos de diagnóstico adicionales de cáncer de pulmón en dichos individuos.

El cáncer de pulmón es la segunda forma de cáncer más común tanto para hombres como para mujeres, pero la ausencia de métodos sensibles y exactos para la evaluación del riesgo y detección temprana frustran el desarrollo efectivo y eficiente de métodos de diagnóstico sofisticados, tales como CT de dosis baja (CT espiral, LDCT), en poblaciones de alto riesgo. Sin embargo, la demanda para la implementación de protocolos de cribado para

diagnóstico por LDCT incrementará probablemente al ser cada vez más ampliamente reconocida la eficacia de LDCT en la detección temprana del cáncer de pulmón.

5 Los biomarcadores para la evaluación del riesgo de cáncer son útiles para la detección temprana y prevención del cáncer, y tienen el potencial para uso en protocolos de cribado a gran escala. Los presentes inventores han descubierto recientemente que la actividad enzimática reducida de la enzima de reparación del ADN 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1), medida en linfocitos, es un factor de riesgo valioso para cáncer de pulmón (Paz-Elizur et al. J Natl. Canc. Inst. 2003;95: 1312-19, Paz-Elizur et al., Can. Res. 2006; 66: 11683-9, US2004-0096863).

10 Los presentes inventores han descubierto que la actividad catalítica elevada, en lugar de disminuida, de otra enzima de reparación del ADN, N-metilguanina ADN glicosilasa (MPG) (N-metilpurina ADN glicosilasa, ADN 3-metil adeninaglicosilasa, MPG; EC 3.2.2.21), cuando se ensaya en una muestra biológica de un sujeto, es indicativa de riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón. La actividad de MPG en linfocitos de pacientes con cáncer de pulmón fue consistentemente mayor que la de los controles sanos concordantes para edad, sexo, área de residencia y etnicidad, y ajustado para estado de tabaquismo.

15 Así, según algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para determinar un riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón, comprendiendo el método determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) en una muestra biológica del sujeto, y, según el nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de la actividad catalítica por encima de un valor predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón.

20 Los presentes inventores también han descubierto que la actividad catalítica de enzimas de reparación del ADN adicionales están correlacionadas con riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón en un sujeto. Como se muestra en los Ejemplos IV y V en la presente memoria, los niveles reducidos de APE1 [endonucleasa de sitioapurínico-apirimidínico, APEX1, EC 4.2.99.18], cuando se ensaya en una muestra biológica de un sujeto, son indicativos de riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón. Aún además, los inventores han mostrado que valores elevados de actividad catalítica de MPG, combinados con actividad catalítica reducida de APE1, o OGG1 se correlacionaban con una indicación aún mayor de riesgo de cáncer de pulmón que cualquiera de los ensayos individuales (véase el Ejemplo V en la presente memoria). Los sujetos que tienen valores elevados de actividad catalítica de MPG, combinado con actividad catalítica reducida tanto de APE1 como OGG1 se correlacionaban con la mayor indicación de riesgo de cáncer de pulmón.

30 Así, según algunas realizaciones de la presente invención, la determinación del riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón, comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) y APE1 en una muestra biológica del sujeto, y, según el nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de la actividad catalítica de MPG por encima de un primer valor predeterminado y nivel de APE1 por debajo de un segundo nivel predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, la determinación del riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón, comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) y OGG1 en una muestra biológica del sujeto, y, según el nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de la actividad catalítica de MPG por encima de un primer valor predeterminado y nivel de OGG1 por debajo de un segundo nivel predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón. En una realización específica, la determinación del riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón, comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG), APE1 y OGG1 en una muestra biológica del sujeto, y, según el nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de la actividad catalítica de MPG por encima de un primer valor predeterminado, un nivel de la actividad catalítica de APE1 por debajo de un segundo valor predeterminado y nivel de OGG1 por debajo de un tercer nivel predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón. La determinación de actividad catalítica de MPG, APE1 y/o OGG1 se efectúa en muestras biológicas representativas del sujeto, y o controles, o puede efectuarse en alicuotas separadas de la misma muestra. Los métodos para ensayar la actividad catalítica de MPG, APE1 y OGG1 se detallan en la presente memoria más adelante.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "valor predeterminado" se refiere a un nivel de referencia de actividad catalítica por encima (como en el caso de MPG) o por debajo (como en el caso de OGG1 o APE1) del que puede inferirse estadísticamente un riesgo incrementado de cáncer de pulmón.

55 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "riesgo" se refiere a la probabilidad de aparición de una afección o enfermedad, o recurrencia de la enfermedad, síntomas, marcadores u otros indicadores de ésta. Así, en algunas realizaciones, el riesgo es un riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. En otras realizaciones, el riesgo es el riesgo de recurrencia de cáncer de pulmón diagnosticado previamente. En otras realizaciones más, el riesgo puede ser un riesgo de desarrollar un tipo específico de cáncer de pulmón. En otras realizaciones, el riesgo puede ser un riesgo de mortalidad de cáncer de pulmón, o la probabilidad de supervivencia del cáncer de pulmón. El riesgo según la presente invención puede expresarse en una de una pluralidad de maneras. En un ejemplo, el riesgo se expresa como veces de incremento del riesgo para desarrollar cáncer de pulmón, respecto al de una población normal, aparentemente sana, o un grupo control de referencia. En otras realizaciones más, el riesgo se expresa en unidades

de actividad enzimática específica. En otra realización, se genera una escala de riesgo lineal o logarítmica bien para "veces de incremento del riesgo" o las "unidades de actividad" y el riesgo se expresa como una magnitud de la escala. En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como una razón de probabilidades ajustada, respecto a un valor o intervalo de valores de referencia seleccionados de actividad enzimática, en el que una razón de probabilidades de 1,0 indica ausencia de diferencia en el riesgo del de la población de referencia, una razón de probabilidades de <1,0 indica un riesgo menor que el de la población de referencia, y una razón de probabilidades de >1,0 indica un riesgo mayor que el de la población de referencia. En otras realizaciones, el riesgo se expresa como una razón de probabilidades ajustada, respecto a la desviación estándar en el intervalo de valores de actividad enzimática de la población referenciada. En otra realización más, el riesgo se expresa como una razón de probabilidades ajustada, calculada a partir de una puntuación de reparación de ADN integrada de dos o más valores de actividad enzimática. En algunas realizaciones, un valor o intervalo de referencia predeterminado se deriva de individuos normales sanos. En otras realizaciones, el valor o intervalo de referencia se deriva de individuos que concuerdan con el sujeto o sujetos según uno cualquiera o más parámetros incluyendo, pero no limitado a, edad, sexo, etnicidad, religión, localización geográfica, estado de tabaquismo, historial familiar, historial sanitario, perfil genético, exposición a carcinógenos, ocupación, y semejantes. En determinadas realizaciones, el intervalo de referencia se ajusta según uno o más parámetros incluyendo, pero no limitado a, edad, sexo, etnicidad, religión, localización geográfica, estado de tabaquismo, historial familiar, historial sanitario, perfil genético, exposición a carcinógenos, ocupación, y semejantes.

El método de la presente invención puede usarse con el fin de determinar la capacidad de respuesta a un tratamiento de cáncer de pulmón dañino para el ADN, ya que el uso de agentes dañinos para el ADN en el tratamiento del cáncer está extendido y es común. Dichos agentes incluyen, pero no están limitados a, quimioterapia, radiación, terapia génica y semejantes.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "régimen de tratamiento" se refiere a un plan de tratamiento que especifica el tipo de tratamiento, dosificación, esquema y/o duración de un tratamiento proporcionado a un sujeto que lo necesita (por ejemplo, un sujeto diagnosticado con una patología). El régimen de tratamiento seleccionado puede ser uno agresivo que se espera que resulte en el mejor resultado clínico (por ejemplo, cura completa de la patología) o uno más moderado que puede aliviar los síntomas de la patología y resulta en la cura incompleta de la patología. Se apreciará que, en determinados casos, el régimen de tratamiento más agresivo puede estar asociado con alguna molestia para el sujeto o efectos secundarios adversos (por ejemplo, daño en células o tejidos sanos). El tipo de tratamiento puede incluir una intervención quirúrgica (por ejemplo, eliminación de la lesión, células, tejido u órgano enfermos), laparoscopia, una terapia de reemplazo celular, una administración de un fármaco terapéutico (por ejemplo, agonistas de receptores, antagonistas, anticuerpos, hormonas, agentes quimioterapéuticos) de un modo local o sistémico, una exposición a terapia de radiación usando una fuente externa (por ejemplo, haz externo) y/o una fuente interna (por ejemplo, braquiterapia) y/o cualquier combinación de éstos. La dosificación, esquema y duración del tratamiento puede variar, dependiendo de la gravedad de la patología y el tipo de tratamiento seleccionado, y los expertos en la técnica son capaces de ajustar el tipo de tratamiento con la dosificación, esquema y duración del tratamiento.

En aún otras realizaciones, el valor o intervalo de referencia predeterminado se deriva de un nivel previo o pluralidad de niveles de actividad enzimática medido en el sujeto, antes de un tratamiento o exposición a factor de riesgo (por ejemplo, carcinógenos). En todavía otra realización, el sujeto es un candidato para, o está sometido a un tratamiento de cáncer de pulmón (por ejemplo, quimioterapia, radiación, cirugía y semejantes), el valor o intervalo de referencia se deriva del nivel o niveles enzimáticos del sujeto antes del tratamiento, o a mitad del tratamiento.

En algunas realizaciones, el riesgo se asigna según la desviación de los niveles enzimáticos de los valores medianos de actividad enzimática, por ejemplo, mediana de los valores de la población control de referencia. En otras realizaciones, el riesgo se asigna según la desviación de los niveles enzimáticos de los de terciles, cuartiles, quintiles, sextiles, septiles, octilos, nonilos, decilos, percentiles de referencia o cualquier otra división de los valores de actividad enzimática referenciados. En aún otras realizaciones, el riesgo se asigna según los incrementos de actividad enzimática, por ejemplo, incremento del riesgo por 0,1, 0,5, 1,0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 o más unidades enzimáticas sobre el valor o intervalo de referencia. Así, en algunas realizaciones de los métodos de la presente invención, la razón de probabilidades para la actividad catalítica de MPG, cuando se determina por el ensayo de MPG-Hx, es 1,18 por cada 10 unidades de actividad catalítica por encima del valor de referencia predeterminado. En otras realizaciones de los métodos de la presente invención, el riesgo se asigna según la desviación estándar de la distribución de los valores de la actividad enzimática en la población referenciada, la razón de probabilidades para la actividad catalítica de MPG, cuando se determina por el ensayo de MPG-Hx, es 1,8 para cada desviación estándar.

Según algunas realizaciones, la "razón de probabilidades", o riesgo relativo de un individuo o población de individuos de desarrollar cáncer de pulmón se determina usando modelos de regresión logística condicional con el estado de tabaquismo como una variable de ajuste. En algunas realizaciones, el estado de tabaquismo se adjudica como bien fumadores o no fumadores. En otras realizaciones, el estado de tabaquismo puede incluir fumadores actuales, fumadores previos, y no fumadores. Adicionalmente y opcionalmente, el estado de tabaquismo puede incluir la cuantificación de la cantidad de tabaco (por ejemplo, número de cigarrillos, paquetes, puros, etc) fumados al día, al año, etc, edad de tabaquismo, tiempo desde el abandono, y semejantes.

5 En una realización, los riesgos relativos para valores enzimáticos individuales (por ejemplo, MPG, APE1, OGG) se calculan como una variable continua (asumiendo una relación lineal con el log de la razón de probabilidades), una variable binaria usando la mediana de los controles como el umbral, y se clasifican en tres grupos según los terciles de los controles. Cuando se clasifica según los terciles, se realiza un ensayo para una tendencia lineal en el log de "razón de probabilidades" usando puntuaciones de 1, 2 y 3 para los tres grupos de terciles.

10 Para combinaciones por pares, y de tres vías de los ensayos de MPG; ensayos de OGG y MPG; ensayos de APE y MPG; ensayos de OGG y APE y ensayos de MPG, APE y OGG, el riesgo relativo puede determinarse usando modelos de regresión logística condicional con el estado de tabaquismo como una variable de ajuste. En una realización, para los ensayos de OGG y APE, la "razón de probabilidades" se calcula entre una persona en el percentil 25% frente a una persona en el percentil 75% de la distribución de valores de ensayos entre los controles. En otra realización, por ejemplo, para los ensayos de MPG, la razón de probabilidades se calculó entre una persona en el percentil 75% frente a una persona en el percentil 25% de la distribución de valores de ensayos entre los controles.

15 En otra realización, la "razón de probabilidades" se calcula según el valor de una desviación estándar (SD) de la distribución de actividad catalítica observada de cada una de las enzimas (OGG, MPG, y APE1) en las muestras control.

20 Para combinaciones por pares, o de tres vías de los ensayos de MPG; ensayos de OGG y MPG; ensayos de APE y MPG; ensayos de OGG y APE y ensayos de MPG, APE y OGG, el riesgo relativo puede expresarse como una "puntuación combinada", teniendo en cuenta individuos para los que sólo uno o dos valores para las dos o tres enzimas están fuera del intervalo normal. En una realización, la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) (OGG, MPG, APE), formulada como la suma del log de la estimación de razón de probabilidades de regresión logística de (con el estado de tabaquismo en el modelo), multiplicado por el valor observado de la muestra, por ejemplo, puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) = (log estimación de razón de probabilidades para OGG X valor observado de OGG) + (log estimación de razón de probabilidades para MPG X valor observado de MPG) + (log estimación de razón de probabilidades para APE X valor observado de APE). Una puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) reducida, respecto a la población control, es indicativa de mayor riesgo relativo para la enfermedad.

30 Así, en algunas realizaciones, se proporciona un método para determinar un riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón, comprendiendo el método determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) y al menos una de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) y 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) en una muestra biológica del sujeto, determinar una puntuación de reparación de ADN integrada para el sujeto a partir de dicho nivel de MPG y al menos uno de OGG y APE1; y determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que una puntuación de reparación de ADN integrada por debajo de un valor predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el valor de reparación de ADN integrada predeterminado es un valor de reparación de ADN integrada para una población de referencia de individuos sanos concordantes para uno cualquiera o más de edad, sexo, estado de tabaquismo, localización, etnicidad y semejantes. También se proporcionan métodos para seleccionar sujetos candidatos para un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón basado en la puntuación de reparación de ADN integrada, que comprende determinar una puntuación de reparación de ADN integrada en una muestra biológica de un sujeto, y, cuando la puntuación de reparación de ADN integrada está por debajo de un valor predeterminado, derivar al sujeto candidato para al menos un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón. Además, la puntuación de reparación de ADN integrada puede usarse para seleccionar una subpoblación de sujetos para un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón mediante la recogida de una muestra biológica de cada una de una población de sujetos, determinar la puntuación de reparación de ADN integrada (a partir de los niveles de actividad enzimática de las enzimas de reparación de ADN seleccionadas) en la muestra biológica de cada uno de los sujetos, identificar una sub-población de los sujetos que tiene una puntuación de reparación de ADN integrada menor que un valor predeterminado, y derivar la sub-población para al menos un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón.

40 En algunas realizaciones, la razón de probabilidades combinada para la actividad catalítica de MPG y OGG1, respecto a la de la población de referencia, es al menos 1,5, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 7 o más. En algunas realizaciones, la razón de probabilidades combinada para la actividad catalítica de MPG y APE1, respecto a la de la población de referencia, es al menos 1,5, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 7, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20 o más. En algunas realizaciones, la razón de probabilidades combinada para la actividad catalítica de MPG y APE1 y OGG1, respecto a la de la población de referencia, es al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 2,1, al menos 2,2, al menos 2,3, al menos 2,4 al menos 2,5, al menos 2,6, al menos 2,7, al menos 2,8, al menos 2,9, al menos 3,0, al menos 3,1, al menos 3,2, al menos 3,3, al menos 3,4 al menos 3,5, al menos 3,6, al menos 3,7, al menos 3,8, al menos 3,9, al menos 4,0, al menos 4,25, al menos 4,75, al menos 5,0, al menos 5,5, al menos 6,0, al menos 6,5 al menos 7,0, al menos 8,0, al menos 9,0, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más.

60 En algunas realizaciones, la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) para la actividad catalítica de OGG1, MPG y APE, respecto a la de la población de referencia, es al menos 90%, al menos 87,5%, al menos 85%, al

menos 82,5%, al menos 80%, al menos 77,5%, al menos 75%, al menos 72,5%, al menos 70%, al menos 67,5%, al menos 65%, al menos 62,5%, al menos 60%, al menos 57,5%, al menos 55%, al menos 52,5%, al menos 50%, al menos 47,5%, al menos 45%, al menos 42,5%, al menos 40%, al menos 37,5%, al menos 35%, al menos 32,5%, al menos 30%, al menos 27,5%, al menos 25%, al menos 22,5%, al menos 20%, al menos 17,5%, al menos 15%, al menos 12,5%, al menos 10%, al menos 7,5% o menos de la de la población referenciada.

En algunas realizaciones específicas, la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) se calcula como $0,00425XAPE + 0,5419XOGG - 0,2541XMPG$. En algunas realizaciones, una puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) de al menos 2,8 o menor es indicativa de un riesgo incrementado de cualquier cáncer de pulmón. En otras realizaciones, una puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) de 2,5 o menos es indicativa de un riesgo incrementado de cáncer de pulmón de carcinoma de células escamosas. En aún otras realizaciones, una puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) de 2,9 o menos es indicativa de un riesgo incrementado adenocarcinoma de pulmón.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a cualquier ser humano sometido a ensayo por los métodos o kits de la presente invención. El sujeto puede ser un sujeto que está en riesgo de tener cáncer de pulmón [por ejemplo, un sujeto genéticamente predispuesto, un sujeto de edad avanzada, un sujeto con historial médico y/o familiar de cáncer, un sujeto que padece COPD, un sujeto que se ha expuesto a humo y/o otros carcinógenos, peligros ocupacionales, peligros medioambientales] y/o un sujeto que presenta signos clínicos sospechosos de cáncer de pulmón o cáncer en general [por ejemplo, tos persistente, hemoptisis, dolor de pecho, dificultad para respirar, efusión pleural, silbidos, ronquera, bronquitis o neumonía recurrente, dolor óseo, síndromes paraneoplásicos, dolor inexplicable, sudoración, fiebre inexplicable, pérdida de peso inexplicable hasta anorexia, anemia y/o debilidad general]. Adicionalmente o alternativamente, el sujeto puede ser un sujeto humano sano que se está sometiendo a un chequeo de salud rutinario o cribado rutinario de una población aleatoria o representativa. El sujeto también puede ser un paciente o sujeto que participa en una investigación o ensayo.

La detección temprana efectiva del cáncer de pulmón puede en gran medida aumentar su éxito y reducir la gravedad del tratamiento para el cáncer de pulmón. Recientemente, los métodos de diagnóstico sofisticados tal como LDCT se han mostrado efectivos para la detección temprana del cáncer de pulmón, pero presentan una alta incidencia de falsos positivos (96%), y tienen un coste prohibitivo y son complejos para el cribado de poblaciones. La presente invención puede usarse para seleccionar de manera efectiva individuos, o grupos de individuos, para derivación a ensayos de diagnóstico adicionales, mediante el ensayo de la actividad catalítica de MPG o APE1 sólo, o MPG y bien APE1 o OGG1 en combinación por pares, o las tres de MPG, APE1 y OGG1 en una combinación de ensayos de tres vías.

Así, según algunos aspectos de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para seleccionar sujetos candidatos para un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón, que comprende determinar un nivel de actividad catalítica de MPG, o APE1, o MPG y APE1, o todas de MPG y APE1 y OGG1 en una muestra biológica del sujeto. El sujeto o sujetos candidatos son derivados para al menos un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón si el nivel de actividad catalítica de MPG está por encima de un valor de referencia predeterminado, si el nivel de actividad catalítica de APE1 está por debajo de un valor de referencia predeterminado, o, en ensayos combinados, si el nivel de actividad catalítica de MPG está por encima de un valor de referencia predeterminado y el nivel de actividad catalítica de APE1 y/o OGG1 está por debajo de un valor de referencia predeterminado. En otras realizaciones, la selección se efectúa mediante la determinación de un nivel de actividad catalítica de MPG y al menos uno de OGG1 y APE1 en las muestras, determinación de una puntuación de reparación de ADN integrada para el sujeto, y derivación del sujeto para diagnóstico adicional si la puntuación de reparación de ADN integrada es menor de un valor predeterminado.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para seleccionar subpoblaciones candidatas de sujetos a partir de una población, para derivación a ensayo o ensayos de diagnóstico de cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, la población es una población aleatoria definida, por ejemplo, según proximidad geográfica (por ejemplo, presencia en o alrededor de un centro o instalación para el cribado de cáncer de pulmón), o una población muestra seleccionada aleatoriamente para el cribado a partir de una población de empleados, estudiantes, docentes universitarios, etc, o la población puede ser una población definida por parámetros específicos, incluyendo, pero no limitado a edad, sexo, etnicidad, y semejantes, u, opcionalmente o adicionalmente, incluyendo factores de riesgo de cáncer de pulmón, [por ejemplo, predisposición genética, edad avanzada, historial médico y/o familiar de cáncer, COPD, exposición a humo y/o otros carcinógenos, peligros ocupacionales, peligros medioambientales] y/o una población que comprende sujetos que presentan signos clínicos sospechosos de cáncer de pulmón o cáncer en general. Así, según algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para seleccionar una subpoblación de sujetos para un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón, que comprende determinar un nivel de actividad catalítica de MPG o APE1 o ambas, o MPG y OGG1 o todas de MPG y APE1 y OGG1 en una muestra biológica de cada uno de los sujetos, identificar una subpoblación de sujetos que tiene un nivel de actividad catalítica de MPG mayor que un valor predeterminado, y/o un nivel de APE1 o OGG1 menor que un valor predeterminado en las muestras, y derivar la subpoblación para al menos un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, el método incluye además recoger una muestra biológica de cada una de la población de sujetos. En otras realizaciones, la selección se efectúa mediante la determinación de un nivel de actividad catalítica de MPG y al menos una de OGG1 y APE1 en cada una de las muestras, determinación de una puntuación

de reparación de ADN integrada para cada uno de los sujetos, e identificación de una subpoblación que tiene una puntuación de reparación de ADN integrada menor que un valor predeterminado.

5 El sujeto o sujetos candidatos, o subpoblaciones candidatas pueden derivarse, por ejemplo, para repetir las mediciones de actividad catalítica según la presente invención en uno o más tiempos posteriores, o para ser sometidos a ensayos específicos adicionales tales como mediastinoscopia, broncoscopia, tomografía computerizada (CT), tomografía computerizada espiral (dosis baja) (LDCT), tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), rayos X, análisis de citología de células del esputo, biopsia de pulmón, perfilado genético y análisis de biomarcadores de cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, el ensayo de diagnóstico adicional para cáncer de pulmón es LDCT.

10 En determinadas realizaciones, se puede aconsejar a los sujetos o sub-poblaciones que tienen riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón, según se determina por los métodos que emplean el ensayo de enzimas de reparación del ADN de la presente invención, que alteren su estilo de vida y/o comportamiento para reducir la exposición a factores de riesgo de cáncer de pulmón, por ejemplo, reducción o cese de tabaquismo, reducción o eliminación de exposición a radiación, reducción o eliminación de exposición a polución particulada (talco, asbestos) y semejantes.

15 Un papel potencial del método de la presente invención en un entorno clínico en el que están disponibles técnicas altamente sensibles y específicas para la formación de imágenes de cáncer de pulmón, tales como barrido CT espiral (LDCT) es un complemento a dicho barrido. Brevemente, los pacientes con alto riesgo o elegidos aleatoriamente podrían cribarse potencialmente para cáncer de pulmón en un programa racional y rentable, como sigue: cribado primario de MPG, APE1, OGG1 o combinaciones de niveles de actividad de enzimas de reparación del ADN según los métodos de la presente invención (coste bajo); si los resultados son positivos, ir a un cribado secundario con barrido CT espiral del pecho (coste intermedio); si esto tiene un resultado positivo, ir a un ensayo final con broncoscopia y biopsia (coste alto). Por ejemplo, sería directo implementar un nivel de actividad de enzima de reparación del ADN según la presente invención como un programa de cribado para poblaciones en riesgo porque cada sitio sólo requeriría un aparato de recogida de sangre u otra muestra biológica. Las muestras pueden enviarse entonces a un laboratorio central para ensayo de actividad enzimática.

20 En una realización de algunos aspectos de la presente invención, el sujeto es un fumador actual, tiene un historial de tabaquismo (fumador previo), o no ha fumado nunca (no fumador), ha estado expuesto a (inhulado) humo pasivo, ha estado expuesto a (inhulado) asbestos, particulados transportados por el aire (por ejemplo, talco) o ha estado expuesto a (inhulado) carcinógenos. En otras realizaciones de la presente invención, el sujeto ha estado expuesto a radiación ionizante, radón u otro gas radiactivo, y semejantes.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cáncer de pulmón" se refiere a cualquier crecimiento canceroso en el pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), caracterizado por el tamaño de las células cuando se observa al microscopio. En otras realizaciones, NSCLC primario comprende mayormente adenocarcinoma (incluyendo carcinoma de células bronco alveolares), carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. Tal y como se usa en la presente memoria, el término cáncer de pulmón también incluye cánceres de pulmón de tipos celulares raros, tal como tumores carcinoides y linfoma. En algunas realizaciones, un paciente con cáncer de pulmón es un paciente diagnosticado con cáncer de pulmón sobre la base de formación de imágenes, biopsia, estadificación, etc.

30 Los presentes inventores han descubierto que la actividad catalítica de MPG incrementada se correlaciona con riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón. Así, según algunos aspectos de determinadas realizaciones de la presente invención, el método comprende determinar un nivel de actividad catalítica de MPG en una muestra biológica de un sujeto. Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra biológica" se refiere a, pero no está limitado a, una muestra de un tejido, una célula o células, fluido del sujeto y semejantes. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de células raspada, una muestra de sangre, o una muestra de biopsia. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de células sanguíneas o una muestra de suero. En aún otras realizaciones, la muestra es una muestra de células de sangre periférica. Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra de células de sangre periférica" se refiere a una muestra tomada de sangre circulante a diferencia de células sanguíneas en el sistema linfático, bazo, hígado, o médula ósea. La sangre periférica comprende eritrocitos, leucocitos y plaquetas. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende células sanguíneas aisladas, por ejemplo, células mononucleares aisladas. En algunas realizaciones, la muestra de sangre periférica es una muestra de células mononucleares de sangre periférica, preparada a partir de sangre periférica completa.

35 40 45 50 55 Las muestras de células de sangre periférica se extraen típicamente con una jeringa con una aguja, y/o con un contenedor al vacío (por ejemplo, Vacutainer®) y una aguja. Las muestras también pueden extraerse de bolsas de recogida de sangre.

Los métodos para procesar muestras de células de sangre periférica son conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la sección de Ejemplos de la presente memoria más adelante.

En algunas realizaciones de la presente invención, la actividad catalítica se determina a partir de una muestra biológica fresca. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fresca" se refiere a una muestra que no se ha conservado antes del ensayo de actividad catalítica. En algunas realizaciones, la muestra fresca se ensaya <1 hora desde su retirada del sujeto. En otra realización más, la muestra fresca se ensaya aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 12 aproximadamente 18, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días o más desde la retirada del sujeto. En otras realizaciones de la presente invención, la muestra es una muestra procesada. Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra procesada" se refiere a una muestra que se ha tratado, después de la retirada del sujeto, con el fin de aislar, purificar, alterar y/o conservar un componente o componentes de la muestra. Por ejemplo, en algunos aspectos de algunas realizaciones de la presente invención, la muestra es un extracto de células de sangre periférica. En más realizaciones adicionales, la actividad catalítica se determina en un extracto de células completas o extracto de proteína de las células de sangre periférica, por ejemplo, en un extracto de proteína de células mononucleares de sangre periférica, como se describe adicionalmente en la sección de Ejemplos de la presente memoria.

En algunos aspectos de realizaciones de la presente invención, la muestra es una muestra conservada, tal como, pero no limitado a, una muestra refrigerada o un extracto de proteína crioconservado de células mononucleares de sangre periférica. Los métodos para la conservación de muestras, sin deterioro significativo de su actividad enzimática son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe con detalle en la sección de Ejemplos de la presente memoria.

Según algunos aspectos de realizaciones de la presente invención, la actividad enzimática de las enzimas de reparación del ADN puede ensayarse usando uno cualquiera o más de sustratos de oligo o polinucleótido que portan una lesión reconocida por la enzima de reparación del ADN. En algunos aspectos de algunas realizaciones de la presente invención, la enzima es una ADN glicosilasa, que elimina una única base alterada del núcleo de azúcar, tal como metilpurina ADN glicosilasa (N-metilpurina ADN glicosilasa, ADN 3-metil adenina glicosilasa II, MPG; EC 3.2.2.21) u 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG 1; EC 3.2.2.-) y el sustrato es un oligonucleótido o polinucleótido con al menos una base alterada. Los sustratos ejemplares para MPG incluyen, pero no están limitados a, ADN bicatenario con al menos una cadena que porta una lesión hipoxantina (Hx, véase la Figura 2B, 3A), por ejemplo, SEQ ID NO: 1, o que porta una lesión 1, N6-eteno adenina (eA, véase la Figura 2C, 5A), por ejemplo, SEQ ID NO: 3. Los sustratos ejemplares para OGG1 incluyen, pero no están limitados a, ADN bicatenario con al menos una cadena que porta una lesión 8oxoguanina (8oxog, véase la Figura 2A), por ejemplo, SEQ ID NO: 11 (sustrato de OGG1).

En otros aspectos de algunas realizaciones de la presente invención, la enzima es una AP endonucleasa, que hidroliza el enlace fosfodiéster en el azúcar sin base, tal como APE1 [endonucleasa de sitioapurínico-apirimidínico (AP), APEX1, EC 4.2.99.18] y el sustrato es un oligonucleótido o polinucleótido con al menos un sitio abásico. Los sustratos ejemplares para APE1 incluyen, pero no están limitados a, ADN bicatenario con al menos una cadena que porta un sitio abásico nativo, o un sitio abásico modificado, tal como un sitio abásico furanilo (véanse las Figuras 2E y 8A), por ejemplo, SEQ ID NO: 8).

Los métodos para la preparación de sustratos oligonucleótidos para ensayar enzimas de reparación de ADN son muy conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos diseñados según las enseñanzas de la presente invención pueden generarse según cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica tal como síntesis enzimática o síntesis en fase sólida. El equipamiento y reactivos para ejecutar la síntesis en fase sólida están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Applied Biosystems. Cualquier otro medio para dicha síntesis también puede emplearse; la síntesis final de los oligonucleótidos está dentro de las capacidades de un experto en la técnica y puede conseguirse mediante metodologías establecidas como se detalla, por ejemplo, en "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988) y "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984) utilizando química de fase sólida, por ejemplo, cianoetil fosforamidita seguido de desprotección, desalación y purificación, por ejemplo, con un método con tritilo automatizado o HPLC.

El sustrato de ADN puede ser una sección corta de ADN bicatenario, que comprende aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 32, aproximadamente 35, aproximadamente 37, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100 o más pares de bases y al menos una de las lesiones reconocidas por la actividad enzimática que se va a ensayar. En una realización particular, los sustratos de ADN portan lesiones únicas y tienen una longitud de 30-40 pares de bases. Alternativamente, o adicionalmente, el sustrato de ADN puede ser una sección larga de ADN, tal como un plásmido, que comprende miles o más pares de bases y que porta la o las lesiones del sustrato. Los sustratos de ADN que portan múltiples lesiones incluyen, pero no están limitados a, sustratos que tienen múltiples lesiones de tipo idéntico (por ejemplo, Hx o eA o 8oxoG), o sustratos complejos que tienen una o más lesiones de al menos dos tipos diferentes (por ejemplo, Hx y eA, o Hx y 8oxoG, o eA y 8oxoG).

Un sustrato de la invención puede tener así al menos una lesión de al menos un tipo o al menos una lesión de al menos dos tipos (sustrato complejo), estando posicionadas las lesiones preferiblemente en sitio o sitios predeterminados en el sustrato de ADN. La o las lesiones para sustrato de MPG pueden ser de cualquier tipo, incluyendo, pero no limitado a, 3-metiladenina, 7-metiladenina, 3-metilguanina, 7-metilguanina, hipoxantina, 1, N6-etenoadenina y 1,N2-etanoguanina. Las lesiones para el ensayo de APE1 incluyen cualquier sitio abásico, incluyendo, pero no limitado a sitio abásico furanilo. Las lesiones para el ensayo de OGG1 incluyen, pero no están limitadas a 2,5-amino-5-formamidopirimidina y 7,8-dihidro-8-oxoguanina.

Una lesión puede introducirse en una localización (sitio) única y definida en una molécula de ADN usando síntesis de ADN en fase sólida, usando en secuencia los cuatro bloques de construcción de fosforamidita convencionales usados en la síntesis de oligodesoxinucleótidos y al menos un bloque de construcción fosforamidita modificado adicional, que cuando se introduce en el ADN, introduce una lesión en él, lesión que es reconocible por una enzima de reparación del ADN. En la alternativa, una molécula de ADN se expone a un agente mutagénico (por ejemplo, un agente oxidante o radiación UV) que forma una o más lesiones de uno o más tipos en él. Incluso cuando se usa este método, se puede seleccionar un presustrato que resultará en un producto (sustrato de la invención) en el que las lesiones no están distribuidas aleatoriamente, ya que el grado en el que se forma una lesión específica en el ADN depende frecuentemente de la secuencia del ADN.

También existen otras alternativas. Por ejemplo, se puede oxidar un ADN plasmídico con un agente oxidante. Esto formará varias lesiones en el ADN plasmídico. Se puede usar ahora este ADN plasmídico para ensayar una enzima de reparación que actúe en este ADN, sin conocer de manera precisa dónde están las lesiones. La enzima producirá una mella en el ADN, y esto convertirá el plásmido de la forma cerrada superenrollada a la forma mellada (circular abierta). Estas dos pueden distinguirse fácilmente por electroforesis en gel o centrifugación en gradiente. En otro ejemplo, una secuencia de ADN se sintetiza enzimáticamente en presencia de bloques de construcción lesionados. Se conocen otras alternativas, tal como desaminación química, etc.

La detección de actividad ADN glicosilasa o AP endonucleasa puede efectuarse, por ejemplo, por la monitorización de la creación de sitios abásicos, o por la monitorización de la sensibilidad del ADN abásico a rotura (por ejemplo, mellado por tratamiento con álcali), o por la monitorización de la actividad de mellado de las AP endonucleasas, que convierten los sustratos en productos de oligonucleótido más cortos. Como se detalla en la sección de Ejemplos más adelante, por ejemplo, la detección de la actividad de enzimas de reparación del ADN puede efectuarse empleando un sustrato de ADN con una longitud definida, que porta una lesión deseada en un sitio predeterminado (véanse las Figuras 3B, 5B y 8B), y la detección de la rotura por la monitorización de la aparición de productos de rotura (fragmentos) de la longitud esperada (véanse las Figuras 3C, 5C y 8C).

La detección de la actividad enzimática puede efectuarse por la detección de la presencia de productos de conversión, por ejemplo, fragmentos de longitud, secuencia, propiedades específicas y semejantes. En la técnica se conocen varios métodos y dispositivos para la detección de la actividad de enzimas de reparación del ADN, y se detallan, por ejemplo, en la Pub. de Solicitud de Pat. U.S. No. 2007-0269824 de Albrecht et al. y Pub. de Solicitudes de Pat. U.S. Nos. 2003-0104446 y 2006-0147929 de Sauvaigo S.

Según algunas realizaciones, el ADN sustrato se marca y la monitorización de la conversión de ADN sustrato a productos se efectúa por la detección del marcaje en fragmentos de ADN de tamaño específico. Los sustratos de oligonucleótido o polinucleótido usados por la presente invención pueden marcarse bien directamente o indirectamente usando una molécula de etiqueta o marcaje. Dichos marcajes pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes (por ejemplo, Amarillo Yakima, fluoresceína o Rojo Texas), molécula radiactiva (por ejemplo, ³²P-γ-ATP o ³²P-α-ATP) y sustratos cromogénicos [por ejemplo, Fast Red, BCIP/INT, disponible en (ABCAM, Cambridge, MA)]. El marcaje directo puede conseguirse mediante la conjugación covalente de una molécula de marcaje al sustrato (por ejemplo, usando síntesis de fase sólida) o por la incorporación mediante polimerización (por ejemplo, en una reacción de T4 polinucleótido quinasa, usando una reacción de síntesis de ADN *in vitro* o marcaje con cebado aleatorio). El marcaje indirecto puede conseguirse mediante la conjugación covalente o incorporación al sustrato de una molécula de etiqueta no marcada (por ejemplo, Digoxigenina o biotina) y posteriormente someterla a una molécula marcada (por ejemplo, anticuerpo anti-Digoxigenina o estreptavidina) capaz de reconocer específicamente la etiqueta no marcada.

Se apreciará que el resto marcador o de marcaje debería ser un marcador o marcaje que rinda una detección eficiente, específica y rentable, con niveles aceptables de seguridad en el manejo, pero también desprovisto de alteraciones que producen artefactos del sustrato. En los Ejemplos II- VI de la sección de Ejemplos más adelante, se mostró que los ensayos de enzimas de reparación del ADN usando sustratos etiquetados fluorescentes (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 10) (por ejemplo, Amarillo Yakima) eran ensayos exactos y reproducibles con sustratos de oligonucleótido marcados radiactivamente. Así, en una realización de la presente invención, la determinación de la actividad de reparación del ADN se efectúa usando un sustrato oligonucleótido radiomarcado y/o con etiqueta fluorescente. En realizaciones específicas, la actividad de las enzimas de reparación del ADN se determina usando los sustratos fluorescentes SEQ ID NO: 7 (MPG), SEQ ID NO: 10 (APE1) y SEQ ID NO: 5 (OGG1), o sustratos etiquetados con radiación SEQ ID NOs: 1 ó 3 (MPG) ó 8 (APE1).

Los productos de la reacción pueden detectarse usando una variedad de métodos de detección del ADN, tales como análisis de transferencia Southern, PCR, fluorometría, secuenciación y semejantes. En realizaciones específicas, la detección de productos de reacción de ADN radiactivos se efectúa después de la desnaturalización, por PAGE desnaturalizante (por ejemplo, urea) y visualización de los fragmentos desnaturalizados por formación de imágenes con fósforo, como en los Ejemplos II-V. En algunas realizaciones, la detección de los productos de la reacción fluorescentes se efectúa por la monitorización automatizada de la fluorescencia de los fragmentos desnaturalizados de la mezcla de reacción usando electroforesis en gel capilar, por ejemplo, en el analizador genético ABI3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Alternativamente y opcionalmente, la proteína enzimática de reparación del ADN puede cuantificarse en la muestra, o extracto de muestra. La cuantificación de la presencia de enzima de reparación del ADN en la muestra puede efectuarse mediante anticuerpos específicos (policlonales y/o monoclonales) usando técnicas inmunológicas tales como transferencia Western, ELISA, y semejantes.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit de ensayo para determinar un riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón, que comprende reactivos para determinar un nivel de al menos una de actividad de MPG y/o APE1 de una enzima de reparación/que previene el daño del ADN en una muestra biológica de un sujeto. En determinadas realizaciones, el kit incluye, un envase que incluye, contenido en contenedores sellable, un sustrato de ADN para MPG y/o APE1 que tiene al menos una lesión en él y un tampón de reacción seleccionado adecuado para soportar la actividad de reparación del ADN. Opcionalmente y adicionalmente, el kit comprende un sustrato de ADN para OGG1. En realizaciones específicas, los sustratos de ADN comprenden, por ejemplo, SEQ ID NOs: 1, 7 y 2, ó 3 y 4, para ensayar MPG, SEQ ID NOs: 8, 9 y 10 para ensayar APE1, y SEQ ID NOs. 5 y 6 para ensayar OGG1. En determinadas realizaciones, los sustratos de ADN son ADNds que comprende los sustratos mencionados anteriormente hibridados en pares, por ejemplo, SEQ ID NOs: 1+2, 3+4, 5 (u 11)+6, 7+2, 8+9 y 10+9.

En una realización específica, el kit también puede incluir contenedores para recoger muestras, por ejemplo, muestras de raspados de tejido, muestras de sangre, o biopsias, y puede contener además conservantes, por ejemplo, inhibidores de proteasas. El kit también puede incluir tubos de ensayo para separar células sanguíneas, por ejemplo, linfocitos, PBMC, etc. En algunas realizaciones, los tubos de ensayo están preenvasados con un anti-coagulante, tal como, pero no limitado a, heparina, ACD o CPDA-1. En algunas realizaciones, el kit incluye además un líquido que tiene una gravedad específica seleccionada efectiva para separar linfocitos de células sanguíneas rojas mediante centrifugación, por ejemplo, Ficoll contenido en tubos de aislamiento de linfocitos. En realizaciones específicas, el kit incluye una disolución que tiene una osmolaridad seleccionada efectiva para lisar células sanguíneas rojas.

En algunas realizaciones, el kit incluye instrucciones para uso en un método para determinar un riesgo de cáncer de pulmón en un sujeto. Dichas instrucciones pueden incluir, pero no están limitadas a, intervalos de valores de referencia para evaluar los resultados de los ensayos de actividad de enzima de reparación de ADN en las muestras, o tablas para asignar intervalos de valores de referencia específicos según categorías tales como sexo, edad, estado de tabaquismo y semejantes. Las instrucciones pueden incluir además protocolos para alertar a los médicos sobre los resultados, para derivar al sujeto, o sujetos, a ensayos de diagnóstico y/o tratamiento adicional, tal como, pero no limitado a, LDCT, biopsia, ensayos de citología de esputo y semejantes, y sugerencias para alterar el estilo de vida del sujeto y comportamiento para reducir la exposición a factores de riesgo de cáncer de pulmón, por ejemplo, reducción o cese de tabaquismo. Las instrucciones pueden proporcionarse en un formato de papel, o pueden ser accesibles por ordenador, por ejemplo, en CD-ROM y/o otros medios legibles por ordenador. Dichas instrucciones también pueden proporcionar acceso a bases de datos estadísticas relevantes.

El kit también puede estar acompañado de una nota asociada con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, nota que refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicha nota, por ejemplo, puede ser una etiqueta aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para ensayos de diagnóstico o un prospecto aprobado. Los contenedores que comprenden los reactivos para efectuar el método de la invención también pueden prepararse, y marcarse para el diagnóstico de riesgo de cáncer de pulmón, o selección de individuos para ensayos de diagnóstico de cáncer de pulmón adicionales, como se detalla adicionalmente anteriormente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no limitado a".

El término "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero sólo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura reivindicada.

Tal y como se usa en la presente memoria, la forma singular "un", "una" y "el" incluye referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de éstos.

5 De acuerdo con esto, la descripción de un intervalo debería considerarse que ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debería considerarse que ha descrito específicamente subintervalos tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales en ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

10 Siempre que en la presente memoria se indica un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier numeral citado (fraccionario o integral) en el intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en la presente memoria indistintamente y se pretende que incluyan el primer y segundo números indicados y todos los numerales fraccionarios e integrales entre ellos.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada incluyendo, pero no limitado a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos para, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos, por los expertos en las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tratar" incluye suprimir, inhibir sustancialmente, retardar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención como se indican anteriormente en la presente memoria y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante encuentran soporte experimental en los ejemplos siguientes.

Ejemplos de referencia

25 Se hace ahora referencia a los ejemplos siguientes, que conjuntamente con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una forma no limitativa.

30 Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se muestra en las Pat. U.S. Nos. 35 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos 40 disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, Pat. U.S. Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and 45 Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1, 2, 317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se mostraran completamente en la presente memoria. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Los procedimientos 50 en él se cree que son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para conveniencia del lector.

Materiales y métodos experimentales

55 Participantes en el estudio: Los pacientes se reclutaron de uno de los hospitales en un área definida del Norte de Israel. Los controles fueron asegurados de un HMO identificado de la misma área geográfica. Todos los participantes en el estudio (pacientes y controles) tenían planes de seguro sanitario básico y acceso a servicios sanitarios similares. Los controles se concordaron individualmente con los pacientes por sexo, año de nacimiento, residencia (definida por localización clínica primaria), y grupo étnico (Judío, Árabe). Los controles se seleccionaron de la lista de inscritos del HMO del que estaban disponibles múltiples candidatos concordantes y uno fue asignado aleatoriamente como un control. Los casos y controles se excluyeron sólo si tenían un diagnóstico anterior de cáncer

de pulmón. Los participantes proporcionaron un consentimiento informado escrito en el momento de la inclusión y se entrevistaron en persona para obtener información acerca de su historial personal y familiar de cáncer, historial de tabaquismo detallado activo y pasivo. Los diagnósticos de cáncer de pulmón se hicieron independientemente por los hospitales de diagnóstico e incluyeron información sobre el tipo histológico, estadificación TNM y grado tumoral.

5 Todos los procedimientos se revisaron y aprobaron por un panel de revisión institucional del hospital. Los casos y sus controles sanos concordantes se seleccionaron sobre la base de la disponibilidad de una muestra de sangre extraída antes del procedimiento operativo o cualquier intervención de tratamiento (quimioterapia o radioterapia) y se envió inmediatamente al laboratorio para procesamiento.

10 Aislamiento de linfocitos periféricos: Las muestras de sangre se procesaron 18-24 horas después de la recogida. Una alícuota de 100 μ l de cada muestra de sangre completa se analizó usando un contador de sangre Cobas Micros (Roche Diagnostic System). La muestra de sangre completa se centrifugó a 400xg durante 10 minutos a 20°C, y el plasma rico con plaquetas contaminantes se retiró. Se añadió PBS (disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Sigma) suplementado con 2 mM EDTA a la parte de sangre completa remanente hasta un volumen final de 30 ml (cuando se usan tubos de recogida de 10 ml con anticoagulante CPDA-1) ó 35 ml (cuando se usan tubos de recogida con vacío con anticoagulante ACD), y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad de la sangre completa diluida en un medio polisacarosa-

15 metrizoato de sodio en un tubo UNI-SEP (NOVAmed, Jerusalén, Israel) a 1.000 x g durante 30 minutos a 20°C.

20 Después de la centrifugación, la fracción de PBMC se lavó con tampón PBS + 2 mM EDTA. Las células sanguíneas rojas se eliminaron por lisis en 5 ml de 155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA durante 4 minutos a temperatura ambiente. Los linfocitos se lavaron con PBS + 2mM EDTA, y se suspendieron en 1 ml de PBS. El número de células sanguíneas blancas en esta suspensión se determinó usando un contador de células sanguíneas Cobas Micros (Roche Diagnostic System).

25 Las muestras que contenían 2,5-10 x 10⁶ células se precipitaron por centrifugación a 5.000 rpm, durante 4 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió entonces hasta una concentración de 50.000 células/ μ l en 50 mM Tris HCl (pH 7,1), 1 mM EDTA, 0,5 mM espermidina, 0,1 mM espermina, y una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma). Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos, después de lo cual se congelaron en nitrógeno líquido. Los linfocitos congelados se almacenaron a -80°C.

30 Preparación de un extracto de proteína: Los linfocitos congelados se descongelaron a 30°C, después de lo cual su contenido de proteínas se extrajo con 220 mM KCl, durante 30 minutos en hielo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se añadió glicerol al extracto de proteína hasta una concentración final de 10%, y el extracto se congeló en nitrógeno líquido. La determinación de la concentración de proteína se adaptó a una plataforma robótica usando el kit de ensayo BCA (Pierce) y γ -globulina bovina como un estándar. El manejo del líquido se realizó por un robot Freedom EVO 200 (Tecan) y la absorbancia a 562 nm se midió por un lector de placas Infinite M200 (Tecan).

35 Sustratos de ADN: Los sustratos de ADN se prepararon hibridando dos oligonucleótidos sintéticos complementarios como se detalla más adelante.

40 Sustratos de ADN radiactivos: El oligonucleótido que contiene la lesión específica de sitio se marcó en 5' con ³²P usando γ -³²P ATP y T4 polinucleótido quinasa, y se hibridó con el oligonucleótido complementario. El dúplex radiomarcado se purificó por electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) en un gel nativo al 10%. Su concentración se determinó por el Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

Sustratos de ADN fluorescentes: El oligonucleótido que contiene la lesión específica de sitio se marcó en 3' con un fluoróforo Amarillo Yakima (Glen 205921), y se hibridó con el oligonucleótido complementario. El dúplex fluorescente se purificó por PAGE en un gel nativo al 10%. Su concentración se determinó por el Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

45 Oligonucleótidos: Los oligonucleótidos se sintetizaron usando un Sintetizador de ADN Expedite 8909 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los bloques de construcción de la lesión especial se adquirieron en Glen Research (Sterling, VA). Los oligonucleótidos también se adquirieron de varias fuentes comerciales incluyendo Sigma, IDT (Coralville, Iowa), Proligo (Boulder, CO) y Metabion (Martinsried, GmBH). A continuación, están los oligonucleótidos usados para cada uno de los ensayos de reparación de ADN:

50 Ensayo de MPG-Hx: el oligonucleótido 34-mer que contenía hipoxantina (Figura 2B) tenía la secuencia 5'- GT CCG GTG CAT GAC ACT GTX ACC TAT CCT CAG CG -3' (SEQ ID NO: 1) (X = hipoxantina). El oligonucleótido complementario tenía la secuencia 5'-CG CTG AGG ATA GGT TAC AGT GTC ATG CAC CGG AC -3' (SEQ ID NO:2).

55 Ensayo de MPG-eA: el oligonucleótido 32-mer que contenía 1, N6-etenoadenina (eA) (Figura 2C) tenía la secuencia 5'- CCT ACC TAG CGA CCT XCG ACT GTC CCA CTG CT -3' (SEQ ID NO:3) (X = eA). El oligonucleótido complementario tenía la secuencia 5'- AGC AGT GGG ACA GTC GTA GGT CGC TAG GTA GG -3' (SEQ ID NO:4).

Ensayo de OGG-F: el oligonucleótido 32-mer que contenía 8-oxoguanina (Figura 2A) y etiqueta fluorescente de amarillo Yakima en 3' tenía la secuencia 5'- CCG GTG CAT GAC ACT GTX ACC TAT CCT CAG CG -3' (SEQ ID NO:5) (-YY) (X = 8-oxoguanina; YY = etiqueta amarillo Yakima). El oligonucleótido complementario tenía la secuencia 5'-CGC TGA GGA TAG GTC ACA GTG TCA TGC ACC GG -3' (SEQ ID NO: 6).

- 5 Ensayo de MPG-Hx-F: el oligonucleótido 34-mer que contenía hipoxantina (Figura 2B) y etiqueta fluorescente de amarillo Yakima en 3' tenía la secuencia 5'- GT CCG GTG CAT GAC ACT GTX ACC TAT CCT CAG CG (SEQ ID NO: 7) (-YY) -3' (X = hipoxantina; YY = etiqueta amarillo Yakima). El oligonucleótido complementario tenía la secuencia 5'-CG CTG AGG ATA GGT TAC AGT GTC ATG CAC CGG AC -3' (SEQ ID NO:2).

- 10 Ensayo de APE: el oligonucleótido 30-mer que contenía sitio abásico furanilo (Figura 2E) tenía la secuencia 5'- G GTG CAT GAC ACT GTX ACC TAT CCT CAG CG -3' (SEQ ID NO: 8) (X = sitio abásico furanilo). El oligonucleótido complementario tenía la secuencia 5'-CG CTG AGG ATA GGT CAC AGT GTC ATG CAC C -3' (SEQ ID NO:9).

- 15 Ensayo de APE-F: el oligonucleótido 30-mer que contenía sitio abásico furanilo (Figura 2E) y etiqueta fluorescente de amarillo Yakima en 3' tenía la secuencia 5'- G GTG CAT GAC ACT GTF ACC TAT CCT CAG CG (SEQ ID NO: 10)(-YY) -3' (F = sitio abásico furanilo; YY = etiqueta amarillo Yakima). El oligonucleótido complementario tenía la secuencia 5'-CG CTG AGG ATA GGT CAC AGT GTC ATG CAC C -3' (SEQ ID NO: 9).

También se proporcionó el sustrato oligonucleótido 32-mer de OGG1 que contenía 8-oxoguanina (Figura 2A) sin la etiqueta fluorescente de amarillo Yakima en 3', que tiene la secuencia 5'- CCG GTG CAT GAC ACT GTX ACC TAT CCT CAG CG -3' (SEQ ID NO: 11) (X = 8-oxoguanina).

- 20 Análisis robótico de actividades BER: Todos los ensayos se adaptaron a una plataforma robótica, en la que el manejo de líquido de las reacciones de mellado se realizó automáticamente por un robot Freedom EVO 200 (Tecan, Mannedorf, GmbH) y software Freedom EVOware (Tecan, GmbH). Los productos de ADN radiactivos desnaturalizados se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% que contenía 8M urea, en 89 mM Tris-borato, 2,5 mM EDTA pH 8,0, a 1.500 V durante 2 horas a 45-50°C. La separación de los productos de ADN radiomarcados se visualizó y cuantificó usando un formador de imágenes con fósforo Fuji BAS 2500 (Fuji, Valhalla, NY). Los productos de ADN fluorescentes desnaturalizados se analizaron por electroforesis en gel capilar, usando el analizador genético ABI3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA), software GeneMapper (Applied Biosystems) y software PeakAnalyzer (Robiotech). A continuación, están las descripciones de las condiciones de reacción para cada uno de los ensayos:

- 30 Ensayo de MPG-Hx: La mezcla de reacción (20 µl) contenía 50 mM PIPES (pH 6,7), 10 mM Tris (pH 7,1), 2 mM EDTA, 0,5 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 µg/µl de γ-globulina bovina, 0,1% polivinil alcohol (PVA), 7,5 nM sustrato y 15 ng/µl de extracto de proteína. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos, después de lo cual se paró por inactivación con calor a 95°C durante 2 minutos. Las proteínas se degradaron por incubación con proteinasa K (20 µg) durante 30 minutos a 37°C, después de lo cual se trataron con 100 mM NaOH durante 30 minutos a 37°C. Una unidad de actividad MPG-Hx se define en la presente memoria como la cantidad requerida para escindir 1 fmol de sustrato de ADN en 1 hora a 37°C, bajo las condiciones de reacción estándar descritas en la presente memoria. En lo siguiente, MPG-Hx se presenta como actividad específica, es decir, unidades de actividad/1 µg de extracto de proteína total.

- 40 Ensayo de MPG-eA: La mezcla de reacción (20 µl) contenía 50 mM PIPES (pH 6,7), 10 mM Tris (pH 7,1), 2 mM EDTA, 0,5 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 µg/µl de γ-globulina bovina, 0,1% PVA, 0,5 nM sustrato y 15 ng/µl de extracto de proteína. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos, después de lo cual se paró por inactivación con calor a 95°C durante 2 minutos. Las proteínas se degradaron por incubación con proteinasa K (20 µg) durante 30 minutos a 37°C, después de lo cual se trataron con 100 mM NaOH durante 30 minutos a 37°C. Una unidad de actividad MPG-eA se define en la presente memoria como la cantidad requerida para escindir 1 fmol de sustrato de ADN en 1 hora a 37°C, bajo las condiciones de reacción estándar descritas en la presente memoria. En lo siguiente, MPG-eA se presenta como actividad específica, es decir, unidades de actividad/1 µg de extracto de proteína total.

- 50 Ensayo de OGG-F: La mezcla de reacción (10 µl) contenía 50 mM Tris (pH 7,1), 1 mM EDTA, 115 mM KCl, 1 µg/µl de γ-globulina bovina, 100 nM PolidA-polidT, 12,5 nM sustrato y 0,2-0,5 µg /µl de extracto de proteína. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos, después de lo cual se paró por inactivación con calor a 95°C durante 2 minutos. Las reacciones se trataron con 100 mM NaOH durante 30 minutos a 37°C. Una unidad de actividad OGG-F se define en la presente memoria como la cantidad requerida para escindir 1 fmol de sustrato de ADN en 1 hora a 37°C, bajo las condiciones de reacción estándar descritas en la presente memoria. En lo siguiente, OGG-F se presenta como actividad específica, es decir, unidades de actividad/1 µg de extracto de proteína total.

- 55 Ensayo de MPG-Hx-F: La mezcla de reacción (20 µl) contenía 50 mM MOPS (pH 6,8), 30 mM Tris (pH 7,1), 2 mM EDTA, 0,5 mM MgCl₂, 36 mM KCl, 1 µg/µl de γ-globulina bovina, 0,3% PVA, 15 nM sustrato y 45 ng/µl de extracto de proteína. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos, después de lo cual se paró por inactivación con calor a 95°C durante 2 minutos. Las reacciones se trataron con 100 mM NaOH durante 30 minutos a 37°C. Una unidad de actividad MPG-Hx-F se define en la presente memoria como la cantidad requerida para escindir 1 fmol de sustrato de ADN en 1 hora a 37°C, bajo las condiciones de reacción estándar descritas en la presente memoria. En

lo siguiente, MPG-Hx-F se presenta como actividad específica, es decir, unidades de actividad/1 µg de extracto de proteína total.

5 Ensayo de APE1: La mezcla de reacción (20 µl) contenía 75 mM Tris (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 9 mM MgCl₂, 42,4 mM KCl, 0,25 µg/µl de γ-globulina bovina, 0,25% PVA, 0,25 mM Espermidina; 0,05 mM Espermina; 35 nM sustrato y 0,02 ng/µl de extracto de proteína. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos, después de lo cual se paró por inactivación con calor a 95°C durante 2 minutos. Las proteínas se degradaron por incubación con proteinasa K (20 µg) durante 30 minutos a 37°C. Una unidad de actividad APE se define en la presente memoria como la cantidad requerida para escindir 1 fmol de sustrato de ADN en 1 hora a 37°C, bajo las condiciones de reacción estándar descritas en la presente memoria. En lo siguiente, APE se presenta como actividad específica, es decir, unidades de actividad/1 ng de extracto de proteína total.

10 Ensayo de APE1-F: La mezcla de reacción (20 µl) contenía 75 mM Tris (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 9 mM MgCl₂, 42,4 mM KCl, 0,25 µg/µl de γ-globulina bovina, 0,25% PVA, 0,25 mM Espermidina; 0,05 mM Espermina; 35 nM sustrato y 0,015 ng/µl de extracto de proteína. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos, después de lo cual se paró por inactivación con calor a 95°C durante 2 minutos. Una unidad de actividad APE se define en la presente memoria como la cantidad requerida para escindir 1 fmol de sustrato de ADN en 1 hora a 37°C, bajo las condiciones de reacción estándar descritas en la presente memoria. En lo siguiente, APE se presenta como actividad específica, es decir, unidades de actividad/1 ng de extracto de proteína total.

Análisis estadístico:

20 El riesgo relativo de cáncer de pulmón se estimó para los ensayos de MPG-Hx y MPG eA usando modelos de regresión logística condicional con el estado de tabaquismo como una variable de ajuste.

25 Los riesgos relativos se estimaron para cada ensayo como una variable continua (asumiendo una relación lineal con el log de la razón de probabilidades), una variable binaria usando la mediana de los controles como el umbral, y se clasificaron en tres grupos según los terciles de los controles. En el último caso, un ensayo para una tendencia lineal del log de la razón de probabilidades se llevó a cabo usando puntuaciones de 1, 2 y 3 para los tres grupos de terciles. En algunos casos, los riesgos relativos se estimaron según la desviación estándar del intervalo de actividades enzimáticas de la población de referencia (por ejemplo, sana).

30 El riesgo relativo de cáncer de pulmón se estimó para combinaciones por pares de ensayos de MPG; ensayos de OGG y MPG; ensayos de APE y MPG y ensayos de OGG y APE usando modelos de regresión logística condicional con el estado de tabaquismo como una variable de ajuste. Para los ensayos de OGG y APE la razón de probabilidades se calculó entre una persona en el percentil 25% frente a una persona en el percentil 75% de la distribución de valores de ensayo entre los controles. Para los ensayos de MPG la razón de probabilidades se calculó entre una persona en el percentil 75% frente a una persona en el percentil 25% de la distribución de valores de ensayo entre los controles.

35 El riesgo relativo de cáncer de pulmón se estimó para combinaciones de tres ensayos de ensayos de MPG, APE y OGG usando modelos de regresión logística condicional con el estado de tabaquismo como una variable de ajuste. Para los ensayos de OGG y APE la razón de probabilidades se calculó entre una persona en el percentil 25% frente a una persona en el percentil 75% de la distribución de valores de ensayo entre los controles. Para los ensayos de MPG la razón de probabilidades se calculó entre una persona en el percentil 75% frente a una persona en el percentil 25% de la distribución de valores de ensayo entre los controles.

40 La puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) se obtuvo directamente del ajuste del modelo de regresión logística condicional incluyendo APE-F, OGG-F y MPG-Hx-F (con el estado de tabaquismo incluido en el modelo, véase la Tabla 8), y se definió, en este caso, como $0,00425 \times \text{APE-F} + 0,542 \times \text{OGG-F} - 0,0254 \times \text{MPG-Hx-F}$. La razón de probabilidades de cáncer de pulmón se estimó para la puntuación de reparación de ADN integrada usando modelos de regresión logística condicional ajustando para estado de tabaquismo. Las razones de probabilidades se estimaron para la variable continua (asumiendo una relación lineal con el log de razones de probabilidad), la variable dicotomizada, y se clasificaron en tres grupos según el tercil. Como los pesos para cada componente usados en la puntuación de reparación de ADN integrada se eligieron para optimizar la potencia de la asociación de la puntuación con el cáncer de pulmón para los datos observados, se aplicó un procedimiento de validación cruzada para las variables dicotomizada y de tres categorías. Se presentan las razones de probabilidades no ajustadas y ajustadas por validación cruzada.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa S-Plus (TIBCO Software Inc.) y/o software SAS (versión 9.2; SAS Institute Inc.).

Ejemplo I- Actividad catalítica de N-metilguanina ADN glicosilasa en células de sangre periférica

55 La actividad de reparación por escisión de bases de la N-metilguanina ADN glicosilasa (MPG) se evaluó en extractos de proteína de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre de pacientes con cáncer y controles sanos, con el fin de descubrir la correlación entre los niveles de actividad enzimática y la incidencia de la enfermedad.

Resultados

Ensayos de MPG: MPG puede iniciar la reparación del ADN por escisión de bases (Figura 1) de un número de lesiones en el ADN, incluyendo hipoxantina, bases alquiladas tales como 3-metiladenina y 7-metilguanina y lesiones oxidativas secundarias tales como 1,N6-etenoadenina (Figura 2A-2E). Usando un oligómero radiactivo con una lesión hipoxantina (Hx), o una lesión 1,N6 etenoadenina (eA) como sustrato, se determinaron las condiciones para la medida exacta de la actividad de MPG.

Como puede observarse en las Figuras 3A-3F, que muestran geles que ilustran los resultados de un ensayo de MPG Hx (Figuras 3C y 3E) y la expresión cuantitativa de estos resultados en un gráfico (Figuras 3D y 3F), el ensayo fue lineal con el tiempo (Figuras 3C y 3D) y concentración de proteína (Figuras 3E y 3F). No se observó escisión del oligonucleótido control, que tiene una adenina (A) en lugar de Hx (Figuras 3C y 3E). El ensayo se adaptó a una plataforma robótica, en la que el manejo de líquido y las reacciones de mellado se realizaron automáticamente en una plataforma robótica con robot Tecan ([el manejo de líquido de las reacciones de mellado se realizó automáticamente por un robot Freedom EVO 200 y software Freedom EVOware (Tecan, GmBH)]. El análisis se hizo manualmente mediante la separación de los productos de la reacción en un gel PAGE-urea desnaturalizante, seguido de secado de los geles, y cuantificación por formación de imágenes con fósforo. El ensayo fue robusto y reproducible con un coeficiente de varianza (CV) de aproximadamente 10%.

También se establecieron condiciones de ensayo exactas para un sustrato que tiene una lesión eA. El ensayo fue un ensayo de mellado similar al ensayo de MPG-Hx, excepto en que el oligonucleótido sustrato contenía 1, N6 etenoadenina (eA) (Figura 5A), un aducto de adenina exocíclico específico de sitio. Se encontró que la actividad de MPG de extractos de PBMC humanas usando el sustrato lesionado eA era lineal con el tiempo, sobre un intervalo de más de 2 horas (Figura 5D) y concentración de proteína, sobre un intervalo de 0-30 ng/μl de proteína (Figura 5E). Los valores de actividad específica absoluta para MPG-eA fueron aproximadamente un orden de magnitud menores que MPG-Hx, consistente con la mayor actividad reportada de MPG en sustratos que contienen Hx comparado con sustratos que contienen eA. El ensayo fue reproducible con un CV de 8-9%.

La actividad de MPG de PBMC está elevada en cáncer de pulmón

Se emprendió un estudio caso control para determinar la asociación entre riesgo de cáncer de pulmón y actividad de MPG en extractos de proteína de PBMC.

El estudio caso-control se basó en población, con pacientes caso y sujetos control viviendo en el Norte de Israel. Las PBMC se obtuvieron de 100 casos de cáncer de pulmón, y 100 sujetos control concordantes para edad (± 1 año), sexo y etnicidad. La Tabla 1 siguiente muestra las características demográficas de los pacientes con cáncer de pulmón y controles. La edad promedio media de los pacientes con cáncer y controles fue 67, con 60% de hombres y 40% de mujeres, 77% judíos y 23% no judíos. El grupo de pacientes con cáncer contenía 38% de fumadores actuales, 37% de fumadores previos y 25% de no fumadores de por vida. El grupo control contenía 22% de fumadores actuales, 28% de fumadores previos, y 50% de no fumadores de por vida. Se obtuvieron especímenes de sangre de los pacientes antes de cualquier tratamiento. Las PBMC se aislaron en 24 horas, se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C , como se describe en la presente memoria.

Tabla 1. Características demográficas de pacientes caso y sujetos control

Variable del estudio	Pacientes con cáncer			Controles			Valor P ²
	Media (95% IC) ¹	N	%	Media (95% IC) ¹	N	%	
Edad	67,0 (65,1-68,8)	100	100	67,0 (65,2-68,8)	100	100	0,9877
Sexo							1,00
Hombres		60	60		60	60	
Mujeres		40	40		40	40	
Religión							0,87
Judíos		77	77		77	77	
No judíos		23	23		23	23	
Estado de Tabaquismo							0,001
Actual		37	38		22	22	
Anterior		36	37		28	28	
Nunca		24	25		50	50	

Variable del estudio	Pacientes con cáncer			Controles			Valor P ²
	Media (95% IC) ¹	N	%	Media (95% IC) ¹	N	%	
Histología del Cáncer							
Adenocarcinoma		46	46				
SQCC		30	30				
BAC		14	14				
Otro		10	10				

¹95% IC, intervalo de confianza del 95%.

²Los resultados de los ensayos de la *t* de Student bilaterales entre los pacientes y sujetos control.

La Fig. 4 muestra las distribuciones de la actividad enzimática de MPG en el sustrato Hx (MPG-Hx) en extractos de proteína preparados a partir de PBMC obtenidas de 100 pares de pacientes y controles. Sorprendentemente, los valores de la actividad de MPG-Hx en extractos de proteína de pacientes con cáncer se desplazaron a valores mayores que los de los sujetos control (Fig. 4), la inversa de los resultados observados previamente para la actividad de OGG-1, otra enzima de reparación del ADN, cuando se mide en PBMC (Paz-Elizur et al., 2003, J Natl Can Inst;95: 1312-19). Consistentemente, la actividad específica promedio de MPG-Hx fue mayor en pacientes con cáncer de pulmón (174 unidades/μg de proteína, 95% IC 168-181) que en los sujetos control (161 unidades/μg de proteína, 95% IC 154-168; *P*=0,0032).

El análisis de regresión logística condicional se realizó para conjuntos concordantes ajustados para estado de tabaquismo para calcular el riesgo relativo estimado asociado con actividad incrementada de MPG-Hx. Como puede observarse en la Tabla 2 siguiente, los individuos en el tercil más alto de actividad de MPG-Hx tenían un riesgo incrementado de cáncer de pulmón comparado con los individuos en el tercil más bajo (OR = 3,4, 95% IC 1,3-8,5; *P*=0,009). Cuando la actividad de MPG-Hx se usó como una variable continua, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con un incremento de 10 unidades en la actividad de MPG-Hx se incrementó estadísticamente significativamente (OR = 1,18, 95% IC 1,05-1,33; *P*=0,006). De forma similar, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con un incremento de una unidad de desviación estándar (SD) en la actividad de MPG-Hx fue significativamente mayor de 1 (OR=1,8; 95% IC=1,2 a 2,6; *P*=0,006). La razón de probabilidades (OR) ajustada asociada. Para el sujeto con la mayor actividad de MPG-Hx en este estudio (271 unidades/μg de proteína) esto representa un riesgo relativo estimado incrementado de 12,7 veces, cuando se compara con el percentil 10% de sujetos sanos.

Tabla 2. Análisis de regresión logística condicional del valor de la actividad enzimática de MPG-Hx en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control*

Variable	Número de pacientes (%)	Número de sujetos control (%)	OR ajustada† (95% IC)
MPG-Hx (por incremento de 10 U)‡	94 (100,0)	94 (100,0)	1,18 (1,05 a 1,33) <i>P</i> =0,006
MPG-Hx (por incremento de 1 SD)‡	94 (100,0)	94 (100,0)	1,18 (1,2 a 2,6) <i>P</i> =0,006
MPG-Hx (por mediana)§			
≤ 159 U	26 (27,7)	47 (50,0)	1,0 (referente)
> 159 U	68 (72,3)	47 (50,0)	3,3 (1,5 a 7,2) <i>P</i> =0,002
MPG-Hx (por terciles)#			
≤ 146 U	16 (17,0)	32 (34,0)	1,0 (referente)
146-171 U	31 (33,0)	30 (31,9)	1,7 (0,8 a 4,0) <i>P</i> =0,19
> 171 U	47 (50,0)	32 (34,0)	3,4 (1,3 a 8,5) <i>P</i> =0,009 Ensayo de tendencia¶ <i>P</i> =0,009

Variable	Número de pacientes (%)	Número de sujetos control (%)	OR ajustada† (95% IC)
*OR = razón de probabilidades; IC = intervalo de confianza.			
†Regresión logística condicional para conjuntos concordantes ajustados para edad y estado de tabaquismo (fumador, no fumador).			
‡La actividad de MPG-Hx se midió como se describe en el texto y se ajustó en el modelo de regresión logística condicional como una variable continua. La razón de probabilidades para tabaquismo, obtenida con este modelo, fue: ex-fumador frente a no fumador: 3,6 (95% IC= 1,4 a 8,9); fumador actual frente a no fumador: 4,0 (1,7 a 9,5).			
§La actividad de MPG-Hx expresada en unidades de desviación estándar (SD) para permitir una comparación con sentido. 34 U representan 1 SD en el grupo control.			
§Mediana de los valores de los sujetos control.			
#Terciles de los valores de los sujetos control. El tercil inferior se eligió como el referente.			
¶Ajustado para la misma variable como se ha descrito anteriormente.			

La Figura 6 muestra las distribuciones de la actividad enzimática de MPG en el sustrato eA (MPG-eA) en los extractos de proteína preparados a partir de PBMC obtenidas de los mismos 100 pares de pacientes con cáncer de pulmón y controles. Como con el ensayo de MPG-Hx, los valores de la actividad de MPG-eA en los extractos de proteína de pacientes se desplazaron a valores mayores que los controles. Consistentemente, la actividad específica promedio fue mayor en pacientes (15,8 unidades/μg de proteína; 95% IC 15,3-16,3), que en controles (15,1 unidades/μg de proteína, 95% IC 14,6-15,6; $P=0,0051$ ensayo t emparejado).

El análisis de regresión logística condicional se realizó para conjuntos concordantes ajustados para estado de tabaquismo para calcular el riesgo relativo estimado asociado con actividad incrementada de MPG-eA. Los individuos en el tercil más alto de actividad de MPG-eA tenían un riesgo incrementado de cáncer de pulmón comparado con los individuos en el tercil más bajo (OR =2,2, 95% IC = 0,9-4,9; $P=0,07$) (Tabla 3). Cuando la actividad de MPG-eA se usó como una variable continua, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con un incremento de 1 unidad en la actividad de MPG-eA se incrementó estadísticamente significativamente (OR = 1,22, 95% IC = 1,04-1,42; $P=0,013$) (Tabla 3). De forma similar, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con un incremento de una unidad de desviación estándar (SD) en la actividad de MPG-eA fue significativamente mayor de 1 (OR=1,6; 95% IC=1,1 a 2,4; $P=0,013$). Para el individuo con la mayor actividad de MPG-eA en este estudio (21,9 unidades/μg de proteína) esto representa un riesgo relativo estimado incrementado de 7,6 veces, cuando se compara con el percentil 10% de sujetos sanos.

Tabla 3. Análisis de regresión logística condicional de valor de actividad enzimática de MPG-eA en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control*

Variable	Número de pacientes (%)	Número de sujetos control (%)	OR ajustada† (95% IC)
MPG-eA (por incremento de 1 U)‡	96 (100,0)	96 (100,0)	1,22 (1,04 a 1,42) $P=0,013$
MPG-eA (por incremento de 1 SD)§	96 (100,0)	96 (100,0)	1,6 (1,1 a 2,4) $P=0,013$
MPG-eA (por mediana)§	35 (36,5)	48 (50,0)	1,0 (referente)
≤ 15,1 U	61 (63,5)	48 (50,0)	1,9 (0,9 a 3,9) $P=0,08$
> 15,1 U			
MPG-eA (por terciles)#	24 (25,0)	32 (33,3)	1,0 (referente)
≤ 14,1 U	27 (28,1)	32 (33,3)	1,0 (0,5 a 2,3) $P=0,95$
14,1-16,1 U	45 (46,9)	32 (33,3)	2,2 (0,9 a 4,9) $P=0,07$
> 16,1 U			Ensayo de tendencia¶ $P=0,07$

Variable	Número de pacientes (%)	Número de sujetos control (%)	OR ajustada† (95% IC)
----------	-------------------------	-------------------------------	-----------------------

*OR = razón de probabilidades; IC = intervalo de confianza.
 †Regresión logística condicional para conjuntos concordantes ajustados para edad y estado de tabaquismo (fumador, no fumador).
 ‡La actividad de MPG-εA se midió como se describe en el texto y se ajustó en el modelo de regresión logística condicional como una variable continua. La razón de probabilidades para tabaquismo, obtenida con este modelo, fue: ex-fumador frente a no fumador: 3,5 (95% IC= 1,4 a 8,4); fumador actual frente a no fumador: 3,6 (1,5 a 8,2).
 §La actividad de MPG-εA expresada en unidades de desviación estándar (SD) para permitir una comparación con sentido. 2,48 U representan 1 SD en el grupo control.
 ¶Mediana de los valores de los sujetos control.
 #Terciles de los valores de los sujetos control. El tercil inferior se eligió como el referente.
 ¶Ajustado para la misma variable como se ha descrito anteriormente.

5 Se calculó la regresión logística condicional de estado de la enfermedad en una combinación por pares de los ensayos de MPG-Hx y MPG-eA ajustado para estado de tabaquismo, con el fin de examinar si una combinación de resultados de los ensayos de MPG-Hx y MPG-eA proporcionaría una asociación más fuerte con cáncer de pulmón. No se encontró que los ensayos se potenciaran entre sí (Tabla 4), lo que también es consistente con la observación de que están altamente correlacionados entre sí (correlación de 0,76).

Tabla 4. Regresión logística condicional del estado de la enfermedad en una combinación por pares de los ensayos de reparación de ADN de MPG-Hx y MPG-eA ajustados para estado de tabaquismo

Ensayo	OR (95% IC)	Valor P	OR conjunta (95% IC)	Valor P global	¿Significativamente mejor?
MPG-Hx	1,5 (0,8, 2,9)	0,24	2,1 (1,2, 3,5)	0,010	NO
MPG-eA	1,4 (0,6, 3,1)	0,44			

La razón de probabilidades se calcula entre una persona en el percentil 75% frente a una persona en el percentil 25% de la distribución de los valores del ensayo entre los controles.

10 Así, el ensayo de actividad de MPG en PBMC, usando bien sustratos Hx o eA, proporciona una correlación prácticamente idéntica con el riesgo de cáncer de pulmón. Tomados conjuntamente, estos resultados muestran que una actividad elevada de MPG es un factor de riesgo exacto y fácilmente evaluable para cáncer de pulmón.

Ejemplo II: Ensayo de enzimas de reparación de ADN por escisión de bases basado en fluorescencia

15 Los sustratos marcados con fluorescencia pueden ser más convenientes que los sustratos marcados con radiactividad. Sin embargo, un marcaje fluorescente, que es un resto extraño en la estructura real del ADN, podría ser identificado posiblemente como 'daño en el ADN' por las enzimas de reparación, afectando, por lo tanto, la actividad catalítica de una manera artificial no deseada.

20 La actividad catalítica disminuida de la 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG), medida en PBMC, se ha mostrado que se correlaciona con un mayor riesgo de cáncer de pulmón (véase, Paz-Elizur et al. J Natl. Canc. Inst. 2003;95: 1312-19). Los resultados mostrados en la presente memoria indican claramente que una alta actividad de MPG, medida en PBMC, es también un biomarcador de riesgo exacto para cáncer de pulmón. Con el fin de examinar si pueden usarse sustratos etiquetados con fluorescencia para ensayar éstas y otras actividades de enzimas de reparación del ADN en lugar de los sustratos radiactivos, se sintetizaron sustratos oligómeros de ADN marcados con fluorescencia para la actividad catalítica de OGG y MPG y se ensayaron con extracto de PBMC.

25 **Resultados**

Los sustratos de ADN marcados con fluorescencia son escindidos de forma exacta por enzimas de reparación del ADN:

30 La Figura 7 muestra la distribución de la actividad enzimática de OGG-F en extractos de proteína de PBMC de los mismos 100 pares de pacientes con cáncer y controles como se ha descrito en el Ejemplo I. Como con el ensayo basado en radiactividad de OGG descrito previamente (véase, Elizur-Paz, 2008), los valores de actividad de OGG-F en extractos de proteína de pacientes se desplazaron a valores menores que los controles (Figura 7). Consistentemente, la actividad específica promedio fue menor en casos (6,3 unidades/μg de proteína, 95% IC 6,1-6,6), cuando se compara con la de los controles (6,8 unidades/μg de proteína; 95% IC 6,6-7,0; P=0,0031 ensayo t emparejado).

La regresión logística condicional de estado de la enfermedad en el ensayo de reparación del ADN de OGG-F ajustado para estado de tabaquismo se realizó con 96 pares de pacientes caso y sujetos control. Los valores de la razón de probabilidades se calcularon entre una persona en el percentil 25% frente a una persona en el percentil 75% de la distribución de los valores de ensayo entre los controles, rindiendo un valor de OR=1,6 (95% IC 1,1-2,3), $P=0,011$. Así, una baja actividad de OGG en PBMC, cuando se ensaya con sustrato marcado con fluorescencia, es un biomarcador de riesgo exacto para cáncer de pulmón, igual que cuando se ensaya con un sustrato radiomarcado.

Ejemplo III: La combinación de dos actividades de enzimas de reparación del ADN puede proporcionar una evaluación del riesgo sinérgicamente aumentada

Las combinaciones por pares de los ensayos de las enzimas de reparación del ADN OGG-F, MPG-Hx y MPG-eA de los mismos especímenes se examinaron, usando regresión logística condicional ajustada para el estado de tabaquismo. Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran que la combinación de OGG-F y MPG-Hx proporcionó una OR de 3,7 (95% IC 1,8-7,7), con $P=0,0002$, significativamente mejor que cada ensayo solo. De forma similar, la combinación de OGG-F y MPG-eA proporcionó una OR conjunta de 6,7 (95% IC 2,4-16,7), $P=0,00002$, significativamente mejor que cada ensayo solo (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de regresión logística condicional de estado de la enfermedad en una combinación por pares de los ensayos de reparación del ADN de OGG y MPG ajustado para estado de tabaquismo

Ensayo	OR (95% IC)	Valor P	OR conjunta (95% IC)	Valor P global	¿Significativamente mejor que OR individual?
OGG-F	1,8 (1,2, 2,6)	0,007	3,7 (1,8, 7,7)	0,0002	SÍ
MPG-Hx	2,1 (1,3, 3,4)	0,002			
OGG-F	2,2 (1,4, 3,4)	0,0008	6,7 (2,4, 16,7)	0,00002	SÍ
MPG-eA	2,9 (1,6, 5,6)	0,0009			
OGG-F	1,9 (1,2, 2,8)	0,003	3,6 (1,5, 8,3)	0,002	SÍ
MPG-Hx-F	1,9 (1,1, 3,5)	0,033			

La razón de probabilidades para OGG se calculó entre una persona en el percentil 25% frente a una persona de referencia en el percentil 75% de la distribución de valores de ensayo entre los controles. La razón de probabilidades para MPG se calculó entre una persona en el percentil 75% frente a una persona de referencia en el percentil 25% de la distribución de valores de ensayo entre los controles.

En la Tabla 5 se incluyen los resultados de ensayos usando un sustrato de MPG-Hx fluorescente, preparado y ensayado como se describe en la sección de Materiales y Métodos de la sección de Ejemplos siguiente. La correlación del ensayo de MPG-Hx-F con el ensayo de MPG-Hx basado en ^{32}P fue 0,87, lo que sugiere que los dos se comportan de forma similar. La regresión logística condicional del par OGG-F y MPG-Hx-F rindió una OR conjunta de 3,6 (95% IC 1,5-8,3), $P=0,002$, significativamente mejor que cada ensayo solo (Tabla 5). Estos resultados son muy similares a los resultados obtenidos con el par [OGG-F, MPG-Hx], y muestran que cuando se emparejan, los ensayos de OGG y MPG son un biomarcador de riesgo significativamente más potente para cáncer de pulmón que cualquiera de los biomarcadores ensayados solos (Tabla 5).

Ejemplo IV- Actividad catalítica de la endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 en células de sangre periférica

La actividad de reparación por incisión del ADN abásico de la endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE-1, APE) es responsable del mellado del sitio de ADN abásico formado después de la escisión de bases por ADN glicosilasas tal como OGG y MPG (Figura 1). La actividad catalítica de APE 1 se evaluó en extractos de proteína de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre de pacientes con cáncer y controles sanos, con el fin de descubrir la correlación entre los niveles de actividad enzimática y la incidencia de la enfermedad.

Las condiciones del ensayo, la preparación de las muestras y los análisis estadísticos se realizaron como se detalla para OGG y MPG en la sección de Materiales y Métodos en la presente memoria más adelante.

Resultados

Previamente, se ha mostrado que los oligómeros de ADN que portan el sitio abásico sintético (sitio abásico furanilo; Figura 2E izquierda y 8A) son un buen sustrato para la actividad de APE1. El ensayo se optimizó para rendir resultados altamente reproducibles, rindiendo un CV de aproximadamente 15%.

Las Figuras 8A-8E muestran cinéticas y titulación de proteína de la actividad de APE1 en extractos de PBMC humanas. Se encontró que la actividad de mellado de APE1 en el sitio abásico del sustrato era lineal sobre al menos el intervalo de 0,005 a 0,020 ng/ μl de proteína por muestra, y 0-60 minutos de tiempo de incubación (FIG. 8D y 8E).

De alguna manera sorprendentemente, las PBMC humanas contienen una actividad enzimática de APE1 muy alta, aproximadamente 100.000 veces mayor que las actividades de OGG o MPG-eA.

La actividad de APE-1 en PBMC es un predictor fiable del riesgo de cáncer de pulmón

5 La Figura 9 muestra las distribuciones de la actividad enzimática de APE1 en los extractos de proteína de PBMC de los mismos 100 pares de pacientes y controles que se ensayaron previamente para OGG y MPG. La actividad de APE1 en los extractos de proteína de casos se desplazó a valores menores que los controles. Consistentemente, la actividad específica promedio fue menor en casos (692 unidades/ng de proteína; 95% IC 656-728), que en los controles (793 unidades/ng de proteína, 95% IC 751-835, $P < 0,0001$).

10 Tabla 6. Análisis de regresión logística condicional del valor de la actividad enzimática de APE1 en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control*

Variable	Número de pacientes (%)	Número de sujetos control (%)	OR ajustada† (95% IC)
APE (por disminución de 100 U)‡	96 (100,0)	96 (100,0)	1,4 (1,1 a 1,7) $P=0,002$
APE (por disminución de 1 SD)⌘	96 (100,0)	96 (100,0)	2,0 (1,3 a 3,1) $P=0,002$
APE (por mediana)§			
> 785 U	27 (28,1)	48 (50,0)	1,0 (referente)
≤ 785 U	69 (71,9)	48 (50,0)	2,6 (1,2 a 5,4) $P=0,01$
APE (por terciles)#			
> 847 U	19 (19,8)	32 (33,3)	1,0 (referente)
718-847 U	17 (17,7)	32 (33,3)	0,9 (0,3 a 2,2) $P=0,77$
≤ 718 U	60 (62,5)	32 (33,3)	3,3 (1,4 a 8,1) $P=0,008$
Ensayo de tendencia¶ $P=0,004$			

*OR = razón de probabilidades; IC = intervalo de confianza.

†Regresión logística condicional para conjuntos concordantes ajustados para estado de tabaquismo (fumador, ex-fumador, no fumador).

‡La actividad de APE se midió como se describe en la sección "Materiales y Métodos" y se ajustó en el modelo de regresión logística condicional como una variable continua. La razón de probabilidades para tabaquismo, obtenida con este modelo, fue: ex-fumador frente a no fumador: 3,4 (95% IC= 1,4 a 8,2); fumador actual frente a no fumador: 2,6 (1,1 a 6,1).

⌘ La actividad de APE expresada en unidades de desviación estándar (SD) para permitir una comparación con sentido. 211 U representan 1 SD en el grupo control.

§Mediana de los valores de los sujetos control.

#Terciles de los valores de los sujetos control. El tercil superior se eligió como el referente.

¶Ajustado para la misma variable como se ha descrito anteriormente.

Materiales y Métodos

15 El análisis de regresión logística condicional se realizó para conjuntos concordantes ajustado para estado de tabaquismo para calcular el riesgo relativo estimado asociado con actividad disminuida de APE1. Como puede observarse en la Tabla 6 anterior, los individuos en el tercil más bajo de actividad de APE1 tenían un riesgo incrementado de cáncer de pulmón comparado con individuos en el tercil más alto (OR = 3,3, 95% IC 1,4-8,1; $P=0,008$). Cuando la actividad de APE1 se usó como una variable continua, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con una disminución de 100 unidades en la actividad de APE1 se incrementó estadísticamente significativamente (OR = 1,4, 95% IC 1,1-1,7; $P=0,002$). De forma similar, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con una disminución de una unidad en la desviación estándar (SD) en la actividad de APE1 fue significativamente mayor de 1 (OR=2,0; 95% IC=1,3 a 3,1; $P=0,002$).
20 Para el sujeto con la actividad de APE1 más baja en este estudio (348 unidades/ng de proteína) esto representa un riesgo relativo estimado disminuido de 9,5 veces respecto al percentil 90% de los sujetos sanos. Estos resultados indican que la actividad de APE1 reducida es un biomarcador fiable para el riesgo de cáncer de pulmón. Así, hemos identificado 3 biomarcadores de riesgo para cáncer de pulmón: actividad reducida de OGG, actividad reducida de APE, y actividad incrementada de MPG.
25

Ejemplo V: Combinación de los valores de actividad de enzimas de reparación del ADN por escisión de bases e incisión abásica y evaluación del riesgo de cáncer

Se examinaron las combinaciones de los ensayos de enzimas de reparación del ADN por escisión de bases OGG-F, MPG-Hx y MPG-eA e incisión de ADN abásico APE1 de los mismos especímenes, usando regresión logística condicional ajustada para estado de tabaquismo, con el fin de descubrir combinaciones de actividad enzimática que puedan ensayarse conjuntamente, y que proporcionen una sensibilidad ventajosa (razón de probabilidades más alta) que la de los ensayos de enzimas individuales.

Las condiciones del ensayo, preparación de muestras y análisis estadísticos fueron realizados como se detalla para OGG, MPG y APE1 en los Ejemplos I-IV.

10 Resultados

Combinación MPG-APE1: La combinación de MPG y APE1 se examinó usando los resultados de los ensayos de reparación del ADN, por regresión logística condicional ajustada para estado de tabaquismo, para combinaciones en pares de APE y MPG. Como puede observarse en la Tabla 7, para el par [APE, MPG-Hx] la OR emparejada fue 10 (95% IC 3,2-33), con $P < 0,00001$, significativamente mejor que la de cada ensayo solo (Tabla 6). Se realizó un análisis similar para el par [APE, MPG-eA], rindiendo una OR emparejada de 5,6 (95% IC 1,9-16,7), con $P = 0,0002$, significativamente mejor que la de cada ensayo solo (Tabla 6).

Tabla 7. Resultados de regresión logística condicional de estado de la enfermedad en combinaciones por pares de ensayos de reparación del ADN de (APE, MPG) y (OGG, APE), ajustado para estado de tabaquismo

Ensayo	OR (95% IC)	Valor P	OR conjunta (95% IC)	Valor P global	¿Significativamente mejor?
Pares APE-MPG					
APE	3,7 (1,7, 7,1)	0,00004	10 (3,2, 33)	P<0,00001	SÍ
MPG-Hx	2,7 (1,5, 5,1)	0,002			
APE	2,9 (1,6, 5,3)	0,0003	5,6 (1,9, 16,7)	P=0,0002	SÍ
MPG-eA	1,9 (1,0, 3,4)	0,04			
APE-F	4,2 (2,0, 9,1)	0,0002	9,1 (2,5, 33)	P=0,0001	SÍ
MPG-Hx-F	2,2 (1,2, 4,1)	0,015			
Pares OGG-APE					
OGG-F	1,8 (1,1, 3,1)	0,029	2,8 (1,5, 5,0)	P=0,0002	NO
APE	1,5 (0,9, 2,6)	0,14			
OGG-F	1,9 (1,1, 3,2)	0,026	2,8 (1,5, 5,9)	P=0,0002	NO
APE-F	1,5 (0,8, 2,7)	0,17			

Las razones de probabilidades para OGG y APE se calcularon entre una persona en el percentil 25% frente a una persona de referencia en el percentil 75% de la distribución de valores de ensayo entre los controles. La razón de probabilidades para MPG se calculó entre una persona en el percentil 75% frente a una persona de referencia en el percentil 25% de la distribución de valores de ensayo entre los controles.

En la Tabla 7 se incluyen resultados de los ensayos usando sustrato de APE1 fluorescente (APE-F), preparado y ensayado como se describe en la presente memoria. La regresión logística condicional del par APE-F y MPG-Hx-F rindió una OR emparejada de 9,1 (95% IC 2,5-33), $P < 0,00001$, significativamente mejor que cada ensayo solo (Tabla 7). Estos resultados son muy similares a los resultados obtenidos con el par [APE, MPG-Hx], y muestran que el par combinado de ensayos de APE1 y MPG es un biomarcador del riesgo más potente para cáncer de pulmón que cada biomarcador solo.

Combinación OGG-F APE1: La combinación de los biomarcadores de riesgo OGG-F y APE1 también se evaluó para ventaja sobre la eficacia individual. La regresión logística condicional del par APE y OGG-F rindió una OR emparejada de 2,8 (95% IC 1,5-5,0), $P = 0,0002$, que fue claramente no significativamente mejor que la OR de cada ensayo solo (Tabla 7).

Se obtuvo un resultado similar para la combinación de los biomarcadores fluorescentes OGG-F y APE-F. La regresión logística condicional del par APE-F y OGG-F rindió una OR conjunta de 2,8 (95% IC 1,5-5,9), $P=0,0002$. Esto no fue significativamente mejor que cada ensayo solo (Tabla 6). Así, a diferencia de la combinación [APE, MPG], la combinación [APE, OGG] no es significativamente mejor que los ensayos de APE y OGG solos.

- 5 Combinación MPG-APE1-OGG: Se evaluó la combinación de los resultados usando tres enzimas de reparación del ADN, OGG, MPG y APE, para ver si podría proporcionar una mejor estimación del riesgo que los pares de biomarcadores, o cada biomarcador de riesgo solo. Esto se hizo usando los resultados de los ensayos de reparación del ADN, por regresión logística condicional ajustada para estado de tabaquismo, para combinaciones de tripletes de biomarcadores OGG, MPG y APE. Como puede observarse en la Tabla 8, los valores de OR combinados obtenidos
10 para las varias combinaciones de ensayo estuvieron entre 12,1 a 24,8, cada uno significativamente mejor que los ensayos únicos o combinaciones de dos ensayos. Debe indicarse que, por ejemplo, el panel de los 3 ensayos basados en fluorescencia (OGG-F, MPG-Hx-F, APE-F) rindió una OR conjunta=24,8, indicando que es un biomarcador de riesgo extremadamente potente para cáncer de pulmón, cuando se compara con ensayos únicos o combinaciones de dos ensayos.
- 15 Tabla 8. Resultados de regresión logística condicional de estado de la enfermedad en la combinación de tres ensayos de ensayos de reparación del ADN OGG-MPG-APE ajustado para estado de tabaquismo

Ensayo	OR (95% IC)	Valor P	OR conjunta (95% IC)	Valor P global	¿Significativamente mejor?
OGG-F	2,2 (1,2, 4,2)	0,013			
APE	2,5 (1,3, 5,0)	0,007	18,3	$P<0,0001$	SÍ
MPG-Hx	3,0 (1,6, 5,8)	$<0,001$			
OGG-F	2,3 (1,2, 4,3)	0,008			
APE	2,1 (1,1, 3,8)	0,02	12,1	$P<0,0001$	SÍ
MPG-eA	2,4 (1,2, 4,6)	0,011			
OGG-F	2,4 (1,3, 4,5)	0,006			
APE-F	3,1 (1,4, 7,1)	0,005	24,8	$P<0,0001$	SÍ
MPG-Hx-F	2,9 (1,4, 5,6)	0,004			
OGG-F	2,4 (1,3, 4,3)	0,006			
APE-F	2,4 (1,2, 5,0)	0,014	14,4	$P<0,0001$	SÍ
MPG-eA	2,6 (1,3, 5,2)	0,007			

Las razones de probabilidades para OGG y APE se calcularon entre una persona en el percentil 25% frente a una persona de referencia en el percentil 75% de la distribución de valores de ensayo entre los controles. La razón de probabilidades para MPG se calculó entre una persona en el percentil 75% frente a una persona de referencia en el percentil 25% de la distribución de valores de ensayo entre los controles.
20

Tomados conjuntamente, estos resultados muestran que la actividad catalítica de ambas enzimas de reparación del ADN MGP y APE1, aunque tienen diferentes papeles en la reparación del ADN, pueden ser un predictor exacto de riesgo de cáncer de pulmón. Sorprendentemente, mientras se ha mostrado que valores relativamente bajos de OGG y bajos de APE1 indican un riesgo incrementado de cáncer de pulmón, el riesgo incrementado de cáncer de pulmón se correlaciona con niveles elevados de actividad de MPG.
25

Aún además, los resultados combinados de los niveles de actividad de OGG, MPG y APE1 indicaron que algunas, pero no todas, las combinaciones proporcionan correlaciones estadísticamente potentes con riesgo para cáncer de pulmón, siendo la más potente un panel de todas las tres enzimas de reparación, medido con sustratos de oligonucleótidos de ADN marcados con fluorescencia que tienen lesiones específicas de sitio.

30 Ejemplo VI- La puntuación combinada para OGG, MPG y APE1 (OMA) está fuertemente asociada con riesgo de cáncer de pulmón

Cuando se miden las tres actividades de reparación del ADN en un individuo, es útil formar una puntuación de reparación de ADN integrada, que combina las tres medidas de reparación del ADN con los pesos apropiados. Dicha puntuación tiene también en cuenta individuos en los que sólo uno o dos de los ensayos de reparación del ADN son sub-óptimos, y es, por lo tanto, mejor aplicable para medir riesgo relativo estimado. Esta puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) se calculó para cada participante en el estudio como se describe en los Métodos de Análisis Estadísticos. La FIG. 10 muestra las distribuciones de la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA)
35

entre casos y controles. La distribución de las puntuaciones de reparación de ADN integrada (OMA) entre los casos (pacientes) está desplazada claramente a valores más bajos de puntuación de reparación del ADN (OMA), comparado con el intervalo de puntuación de reparación del ADN (OMA) de los controles sanos entre controles fue 1,40-10,42 unidades, mientras entre los casos fue 0,53-7,01). La puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) media entre los casos fue 2,8 (95 IC 2,6 a 3,0), significativamente menor que la media (3,6 (95 IC 3,4 a 3,8)) entre los controles ($P<0,0001$) (Tabla 9). Cuando se analizó adicionalmente para cánceres específicos, se encontró que la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) en casos de adenocarcinoma fue 2,9 (95 IC 2,7 a 3,2), mayor que la 2,5 observada en casos de carcinoma de células escamosas (SQCC) (95 IC 2,2 a 2,7), $P=0,04$. No hubo una diferencia apreciable en la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) entre hombres y mujeres, y entre sujetos de >65 y ≤ 65 años de edad. Además, no hubo una diferencia apreciable entre no fumadores, fumadores previos y actuales, y no se observó interacción entre la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) y el estado de tabaquismo.

Tabla 9. Distribución de características seleccionadas y puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control*

Variable	Participantes control (n=100)		Participantes caso (n=100)		P†
	No.	media de la puntuación OMA (95% IC)	No.	media de la puntuación OMA (95% IC)	
Todos~	99	3,6 (3,4, 3,8)	99	2,8 (2,6, 3,0)	<0,0001
SQCC			30	2,5 (2,2, 2,7)	
Adenocarcinoma			45	2,9 (2,7, 3,2)	
				§P=0,04	#P=0,35
Edad, años					#P=0,91
≤ 65	40	3,6 (3,3, 3,9)	40	2,8 (2,5, 3,1)	
> 65	59	3,6 (3,2, 3,9)	59	2,8 (2,5, 3,1)	
		^P=0,67			
Sexo					#P=0,62
Hombre	59	3,5 (3,3, 3,8)	59	2,7 (2,5, 3,0)	
Mujer	40	3,7 (3,3, 4,2)	40	2,9 (2,5, 3,2)	
		^P=0,33			
Estado de tabaquismo					#P=0,52
No fumador	50	3,7 (3,4, 4,1)	24	2,8 (2,4, 3,2)	
Fumador pasado	27	3,6 (3,2, 4,1)	36	2,8 (2,4, 3,1)	
Fumador actual	22	3,3 (2,9, 3,7)	36	2,8 (2,5, 3,1)	
		^P=0,39			

Variable	Participantes control (n=100)		Participantes caso (n=100)		P†
	No.	media de la puntuación OMA (95% IC)	No.	media de la puntuación OMA (95% IC)	
<p>* La puntuación OMA combinada se definió como: $0,00425 \times APE + 0,5419 \times OGG - 0,02541 \times MPG$.</p> <p>Un participante no tuvo valores de ensayo conocidos. Este participante y el control concordante se excluyeron del análisis.</p> <p>~ De los 100 casos de cáncer de pulmón, 30 tenían carcinoma de células escamosas (SQCC), 46 tenían adenocarcinoma, 14 BAC, 4 carcinoma adenoescamoso, 4 adenoBAC; 1 carcinoma de células pequeñas, y 1 histología desconocida.</p> <p>† Análisis de covarianza comparando casos con controles, con par concordante y estado de tabaquismo como covariable. Para los subgrupos de estado de tabaquismo, las covariables fueron edad (continua) y sexo.</p> <p>§ Análisis de covarianza comparando subconjuntos en casos o controles, con estado de tabaquismo, edad (continua) o sexo como covariables, según sea apropiado.</p> <p>^ Análisis de covarianza comparando subconjuntos estratificados por casos y controles, con estado de tabaquismo, edad (continua) o sexo como covariables, según sea apropiado.</p> <p># Ensayo para interacción entre estado de caso-control y la variable de interés.</p>					

La asociación entre la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) y la probabilidad de tener la enfermedad, ajustado para estado de tabaquismo, se calculó usando regresión logística condicional. Como puede observarse en la Tabla 10, una baja puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) estaba asociada con riesgo incrementado de cáncer de pulmón, como se indica por las razones de probabilidades estadísticamente significativas obtenidas usando tres modelos de regresión logística.

Cuando la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) se usó como una variable continua, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con una disminución de una unidad en la desviación estándar (SD) en la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) fue significativamente mayor de 1 (OR=3,2; 95% IC=1,7 a 5,7; $P<0,001$) (Tabla 10). Cuando las puntuaciones de reparación de ADN integrada (OMA) se dicotomizaron según la mediana de los sujetos control, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociada con una puntuación menor OMA fue 3,8 (95% IC = 1,7 a 8,5; $P=0,001$). Cuando las puntuaciones de reparación de ADN integrada (OMA) se dividieron en terciles usando los valores de los sujetos control, la razón de probabilidades ajustada para el tercil más bajo frente al más alto fue 9,7 (95% IC=3,1 a 29,8; $P<0,001$). La razón de probabilidades para el tercil medio fue 3,3 (95% IC 1,1 a 9,5; $P=0,03$) (Tabla 10).

Cuando se calculan los pesos para cada componente de la puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) (es decir, los coeficientes de regresión para regresión logística condicional con los valores de los tres ensayos de reparación del ADN, así como tabaquismo como variables explicativas), se estiman los pesos de manera que se proporciona la mejor discriminación entre casos y controles para los datos disponibles. La validación cruzada de las razones de probabilidades se empleó para obtener razones de probabilidades estimadas que reflejan el comportamiento probable de la puntuación en un nuevo conjunto de datos hipotético. Cuando se calcula usando validación cruzada, la razón de probabilidades ajustada para cáncer de pulmón asociado con baja puntuación de reparación de ADN integrada (OMA) en el modelo de mediana fue 3,0 (95% IC 1,4 a 6,4) y en el modelo de terciles 5,6 (2,1 a 15,1), menor que en el análisis original, pero todavía muy fuerte (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de regresión logística condicional de puntuación combinada basado en valores de OGG, APE y MPG en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos control*

Variable	No. de pacientes caso (%)	No. de sujetos control (%)	OR ajustada† (95% IC)
Puntuación (por 1,18U)‡	96 (100,0)	96 (100,0)	3,2 (1,7 a 5,7) $P<0,001$
Puntuación (por mediana)§			
>3,51	21 (21,9)	47 (49,0)	(referente)
≤ 3,51	75 (78,1)	49 (51,0)	3,8 (1,7 a 8,5) $P=0,001$
Validación cruzada			
Por encima de la mediana	22 (22,9)	45 (46,9)	(referente)
Por debajo de la mediana	74 (77,1)	51 (53,1)	3,0 (1,4 a 6,4)

Variable	No. de pacientes caso (%)	No. de sujetos control (%)	OR ajustada† (95% IC)
Puntuación (por terciles)#			
> 3,98	8 (8,3)	31 (32,3)	(referente)
3,15-3,98	23 (24,0)	32 (33,3)	3,3 (1,1 a 9,5) $P=0,03$
≤ 3,14	65 (67,7)	33 (34,4)	9,7 (3,1 a 29,8) $P<0,001$ Ensayo de tendencia $P<0,001$
Validación cruzada			
Tercil más alto	12 (12,5)	30 (31,2)	(referente)
Tercil medio	19 (19,8)	33 (34,4)	1,5 (0,6 a 3,7)
Tercil más bajo	65 (67,7)	33 (34,4)	5,6 (2,1 a 15,1)
<p>* OR = razón de probabilidades; IC = intervalo de confianza. † Regresión logística condicional para conjuntos concordantes ajustados para estado de tabaquismo (fumador, ex- fumador, no fumador). ‡ La puntuación se definió como $0,00425 \times \text{APE-F} + 0,542 \times \text{OGG-F} - 0,0254 \times \text{MPG-Hx-F}$ y se ajustó en el modelo de regresión logística condicional como una variable continua. El valor 1,18U es una desviación estándar en el grupo control. La razón de probabilidades para tabaquismo, obtenido con este modelo, fue: ex-fumador frente a no fumador: 2,6 (95% IC= 1,0 a 6,3); fumador actual frente a no fumador: 3,0 (1,1 a 8,2). § Mediana de los valores de los sujetos control. # Terciles de los valores de los sujetos control. El tercil superior se eligió como el referente.</p>			

Listado de secuencias

- <110> THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK
- <120> Aislamiento y enriquecimiento de ácidos nucleicos en microchip
- <130> 070050.4638
- 5 <150> US 61/538,774
<151> 23-09-2011
- <150> US 61/542,124
<151> 30-09-2011
- 10 <150> US 61/588,078
<151> 18-01-2012
- <150> US 61/588,079
<151> 18-01-2012
- <150> US 61/588,082
<151> 18-01-2012
- 15 <150> US 61/590,458
<151> 25-01-2012
- <150> US 61/674,187
<151> 20-07-2012
- 20 <150> US 61/674,191
<151> 20-07-2012
- <150> US 61/674,192
<151> 20-07-2012
- <150> US 61/683,977
<151> 16-08-2012
- 25 <160> 17

<170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> característica_nueva
 10 <222> (1)..(1)
 <223> Espaciador-FAM
 <400> 1
 gattcaatag gttgtatgca tggtt 25
 <210> 2
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (1)..(1)
 <223> Doble espaciador-biotina
 <400> 2
 25 ttcaggcaca caaactgat gggcg 25
 <210> 3
 <211> 181
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 3
 gattcaatag gttgtatgca tggttcatcc gaaccggatt tgagaaactg gaaatcgcca 60
 acccccaggt tcaactcaagg agcccggccg gatgaacacc cataagcatg cccgattgac 120
 cttcctacgt cgactcgaaa tgggccagca attgatcgcc catcaagttt gtgtgcctga 180
 a 181
 <210> 4
 35 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (21)..(60)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 4

	ctacctacga tctgactagc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60
	gcttactctc atgtagttcc	80
5	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<220> <221> característica_nueva <222> (1)..(1) <223> Espaciador-FAM	
	<400> 5	
	ctacctacga tctgactagc 20	
15	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<220> <221> característica_nueva <222> (1)..(1) <223> Espaciador-Biotina Dual	
	<400> 6	
25	ggaactacat gagagtaagc 20	
	<210> 7 <211> 97 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<220> <221> característica_nueva <222> (25)..(74)	
35	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 7	
	gcctgttggtg agcctcctgt cgaannnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60
	nnnnnnnnnn nnnnttgagc gtttattctt gtctccc	97
40	<210> 8 <211> 78 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	

	gcctgttgtg agcctcctgt cgaagcacgt ttatccgtcc ctctagtg cgtgcttgag	60
	cgtttattct tgtctccc	78
	<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 9	
	gcctgttgtg agcctcctgt cgaa	24
10	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 10	
15	gggagacaag aataaacgct caa	23
	<210> 11 <211> 87 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<220> <221> característica_nueva <222> (25)..(64) <223> n es a, c, g, o t <400> 11	
25	gcctgttgtg agcctcctgt cgaannnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60
	nnnnttgagc gtttattctt gtctccc	87
30	<210> 12 <211> 158 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 12	
35	cctcaccacc aacttcatcc acgttcacct tgccccacag ggcagtaacg gcagacttct	60
	ccacaggagt cagatgcacc atggtgtctg tttgaggttg ctagtgaaca cagttgtgtc	120
	agaagcaaat gtaagcaata gatggctctg ccctgact	158
40	<210> 13 <211> 158 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

ES 2 657 552 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 13
 cctcaccacc aacttcatcc acgttcacct tgccccacag ggcagtaacg gcagacttct 60
 cctcaggagt cagatgcacc atgggtgtctg tttgaggttg ctagtgaaca cagttgtgtc 120
 agaagcaaat gtaagcaata gatggctctg ccttgact 158

5 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (1)..(1)
 <223> biotina doble

15 <400> 14
 agtcaggga gagcatcta 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> característica_nueva
 25 <222> (1)..(1)
 <223> FAM
 <400> 15
 cctcaccacc aacttcatcc 20
 <210> 16
 30 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 16
 acggcagact tctcc 15
 <210> 17
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 17
 gataggactc atcacca 17

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer de pulmón, comprendiendo el método determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) en una muestra biológica del sujeto, y,
- 5 según dicho nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de dicha actividad catalítica de MPG por encima de un primer valor predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado de dicho sujeto de desarrollar cáncer de pulmón.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además
 - (a) determinar un nivel de actividad catalítica de
 - 10 (i) endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) o
 - (ii) 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) o
 - (iii) tanto endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) como 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1)
 en dicha muestra biológica, y;
 - 15 según dicho nivel, determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que un nivel de dicha actividad catalítica de MPG por encima de un primer valor predeterminado, y bien un nivel de dicha actividad catalítica de APE1 por debajo de un segundo valor predeterminado o un nivel de dicha actividad catalítica de OGG1 por debajo de un tercer valor predeterminado o tanto un nivel de dicha actividad catalítica de APE1 por debajo de dicho segundo valor predeterminado como un nivel de dicha actividad catalítica de OGG1 por debajo de dicho tercer valor predeterminado
 - 20 es indicativo de un riesgo incrementado de dicho sujeto de desarrollar cáncer de pulmón.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
 - determinar el nivel de actividad catalítica de al menos una de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) y 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) en dicha muestra biológica del sujeto;
 - 25 (b) determinar una puntuación de reparación de ADN integrada para dicho sujeto de dicho nivel de MPG y al menos una de OGG1 y APE1; y
 - (c) determinar el riesgo del sujeto de desarrollar cáncer de pulmón, en el que una puntuación de reparación de ADN integrada por debajo de un valor predeterminado es indicativo de un riesgo incrementado de dicho sujeto de desarrollar cáncer de pulmón.
- 30 4. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que dicha determinación de dicha actividad catalítica en (a) comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) y de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) en dicha muestra biológica del sujeto.
5. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que dicha determinación de dicha actividad catalítica en (a) comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) y 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) en dicha muestra biológica del sujeto.
- 35 6. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que dicha determinación de dicha actividad catalítica en (a) comprende determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG), de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) y de 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) en dicha muestra biológica del sujeto.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho riesgo o nivel de riesgo se expresa como una razón de probabilidades (OR) comparado con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón del de una población de referencia de individuos normales, aparentemente sanos que concuerdan con dicho sujeto o sujetos para al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en sexo, edad, etnicidad y estado de tabaquismo.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que la razón de probabilidades para la actividad catalítica de MPG, cuando se determina por el ensayo de MPG-Hx, es 1,8 para cada 10 unidades de actividad catalítica ó 1,8 para cada 1 SD por encima de dicho valor predeterminado.
- 45 9. El método de la reivindicación 7, en el que la razón de probabilidades combinada para las actividades catalíticas de MPG y APE1, respecto a la de dicha población de referencia, es al menos 5, en el que la razón de probabilidades para APE1 se determina comparando la actividad catalítica de APE1 en el percentil 25 con la del percentil 75 de valores control y la razón de probabilidades para MPG se determina comparando la actividad catalítica de MPG en el percentil 75 con la del percentil 25 de los valores control.

10. El método de la reivindicación 7, en el que la razón de probabilidades se calcula a partir de una puntuación de reparación de ADN integrada para la actividad catalítica combinada de MPG, OGG1 y APE1, en el que cuando dicha puntuación de reparación de ADN integrada está por debajo de la mediana de una población de referencia, dicha razón de probabilidades es al menos 3,0.
- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la determinación de dicha actividad catalítica de MPG se efectúa usando un sustrato oligonucleótido bicatenario que tiene una lesión hipoxantina (Hx) o usando un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión N6-etenoadenina (eA), en el que la determinación de dicha actividad catalítica de APE1 se efectúa usando un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión de sitio abásico furanilo (AP) y en el que la determinación de dicha actividad catalítica de OGG1 se efectúa usando un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión 8-oxoguanina.
- 10 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho sustrato oligonucleótido bicatenario que tiene una lesión hipoxantina (Hx) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 2 y dicho sustrato oligonucleótido que tiene una lesión N6-etenoadenina (eA) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 3 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 4, en el que dicho sustrato oligonucleótido que tiene una lesión de sitio abásico furanilo (AP) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 9 y en el que dicho sustrato oligonucleótido que tiene una lesión 8-oxoguanina comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 5 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 6.
- 15 20 13. El uso de un kit de ensayo que comprende reactivos para la determinación de un nivel de actividad enzimática de MPG y al menos una de las actividades enzimáticas de APE1 y OGG1 en una muestra biológica de dicho sujeto para determinar un riesgo de cáncer de pulmón de dicho sujeto.
- 25 14. El uso de la reivindicación 13, en el que dicho reactivo para determinar la actividad enzimática de MPG comprende un sustrato oligonucleótido bicatenario que tiene una lesión hipoxantina (Hx) que comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 2 o un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión N6-etenoadenina (eA) comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 3 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 4; en el que dicho reactivo para determinar la actividad enzimática de APE1 comprende un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión de sitio abásico furanilo (AP) que comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 9 y en el que dicho reactivo para determinar la actividad enzimática de OGG1 comprende un sustrato oligonucleótido que tiene una lesión 8-oxoguanina que comprende una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 5 hibridado con una secuencia de oligonucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 6.
- 30 35 15. El método o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que dicha muestra biológica comprende células mononucleares de sangre periférica aisladas.
16. Un método para determinar la respuesta de un sujeto humano a un tratamiento de cáncer de pulmón por un agente dañino para el ADN, comprendiendo el método:
- 40 (a) determinar un nivel de actividad catalítica de N-metilpurina ADN glicosilasa (MPG) en una muestra biológica del sujeto, y, según dicho nivel,
- (b) determinar el tratamiento y régimen de tratamiento apropiado para tratar a dicho sujeto, en el que un nivel de dicha actividad catalítica por encima de un valor predeterminado es indicativo de una respuesta incrementada de dicho sujeto a un tratamiento de cáncer de pulmón por el agente dañino para el ADN, y
- 45 (c) derivar a dicho sujeto para tratamiento según dicho régimen de tratamiento.
17. El método de la reivindicación 16, que comprende además determinar un nivel de actividad catalítica de endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) u 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1) o tanto APE1 como OGG1 en dicha muestra biológica, en el que un nivel de dicha actividad catalítica de MPG en dicha muestra del sujeto por encima de un primer valor predeterminado, y un nivel de APE1 en dicha muestra del sujeto por debajo de un segundo valor predeterminado o un nivel de OGG1 en dicha muestra del sujeto por debajo de un tercer valor predeterminado o un nivel tanto de APE1 por debajo de dicho segundo valor predeterminado como un nivel de OGG1 por debajo de dicho tercer valor predeterminado es indicativo de una capacidad de respuesta incrementada de dicho sujeto a un tratamiento de cáncer de pulmón con un agente dañino para el ADN
- 50 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y 15-17 o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que dicho cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 55

- 5 19. Un método para seleccionar, de entre una población de sujetos, una subpoblación de sujetos para derivación a un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón, comprendiendo el método identificar una subpoblación de sujetos en dicha población que tiene un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón según los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, identificando de esta manera la subpoblación de sujetos para derivación para un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón, derivando a los miembros de dicha subpoblación para al menos un ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón.
- 10 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19, en el que dicho ensayo de diagnóstico de cáncer de pulmón se selecciona del grupo que consiste en mediastinoscopia, broncoscopia, tomografía computerizada (CT), tomografía computerizada espiral (dosis baja) (LDCT), tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), rayos X, análisis de citología de células del esputo, biopsia de pulmón, perfilado genético y análisis de biomarcadores de cáncer de pulmón.

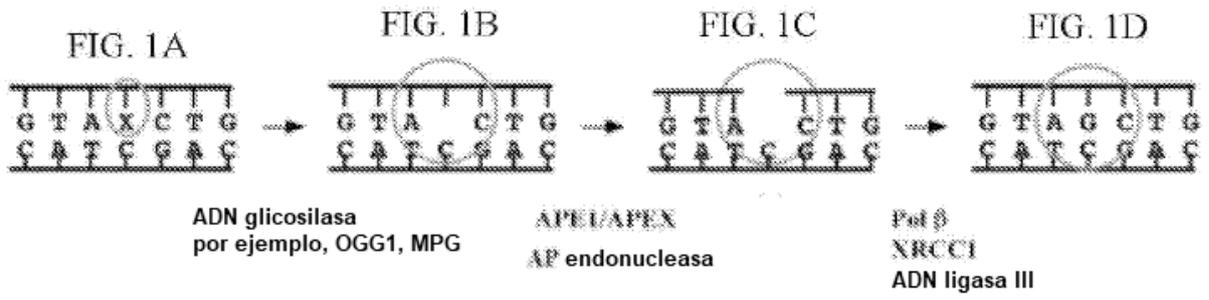


FIG. 2A

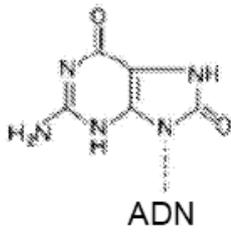


FIG. 2B

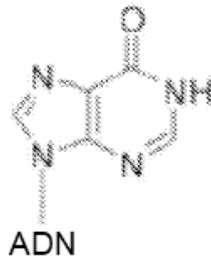


FIG. 2C

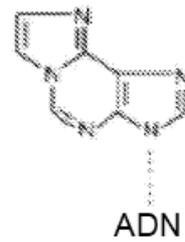


FIG. 2D

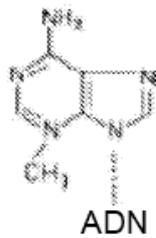


FIG. 2E

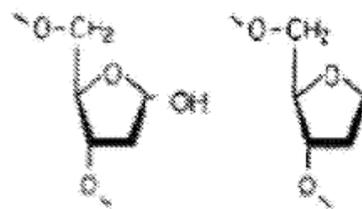


FIG. 3A

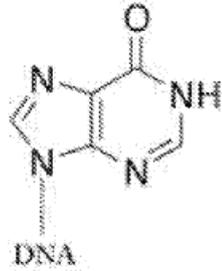


FIG. 3B

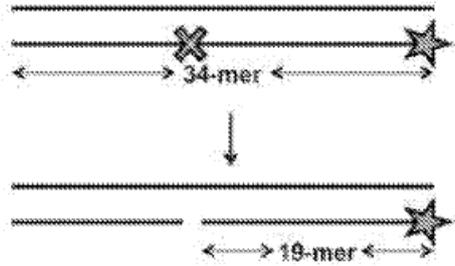


FIG. 3C

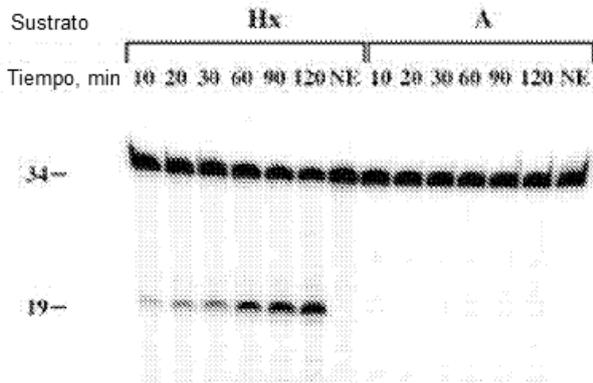


FIG. 3D

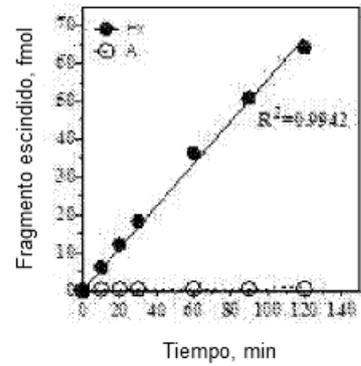


FIG. 3E

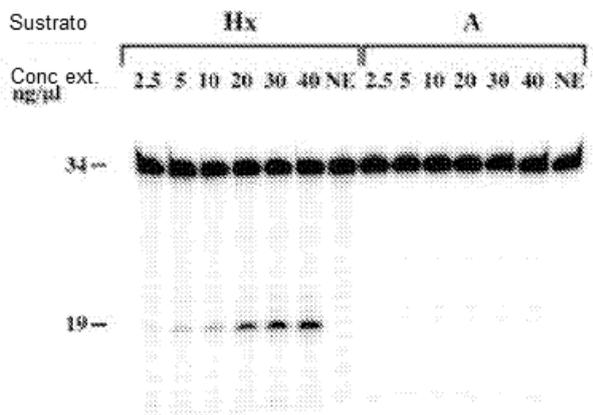


FIG. 3F

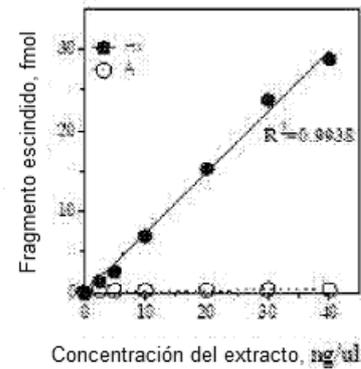


FIG. 4.

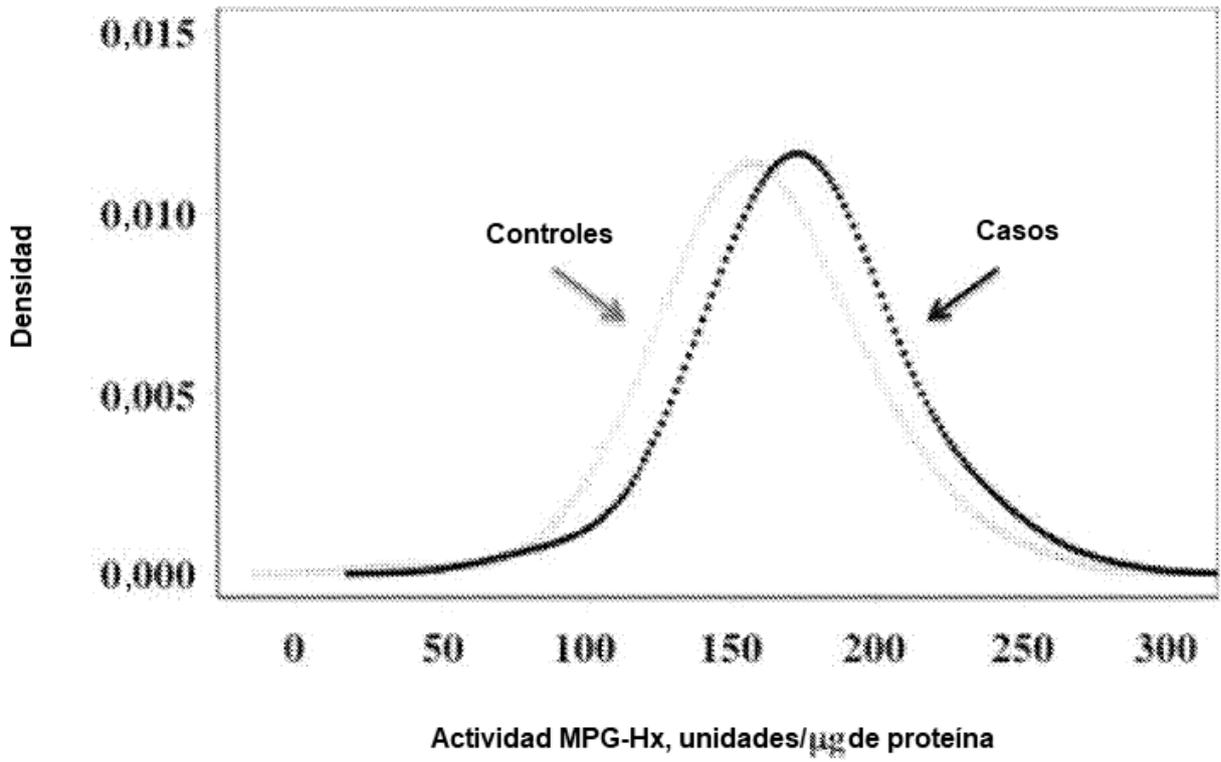


FIG. 5A.

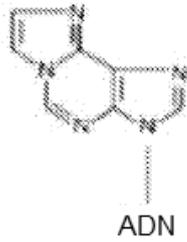


FIG. 5B

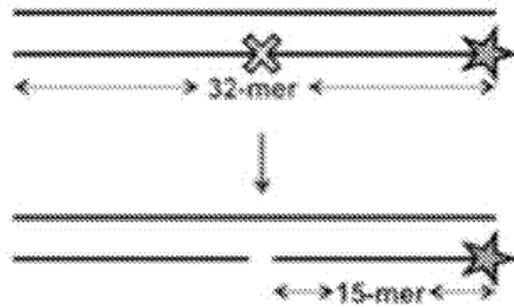


FIG. 5C

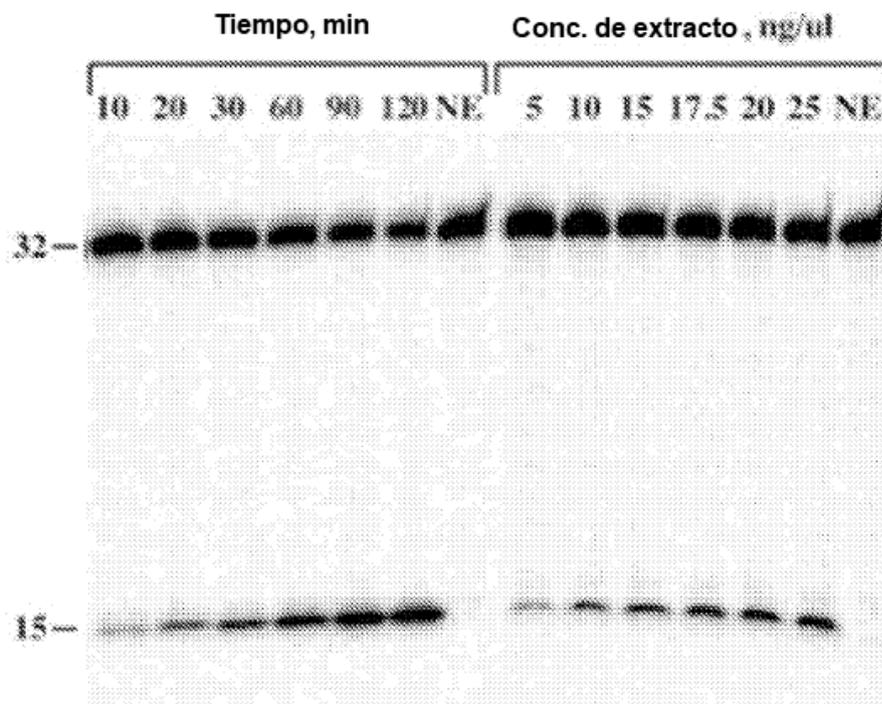


FIG. 5D

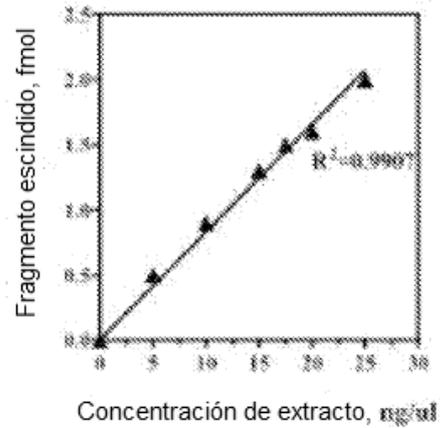
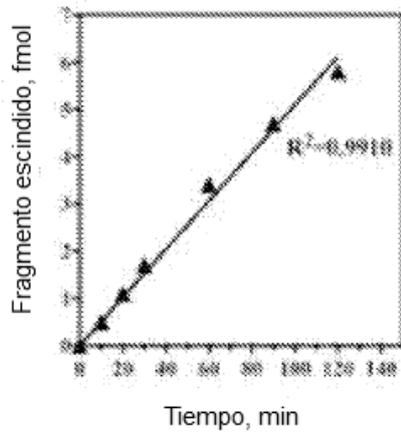


FIG. 5E

FIG. 6

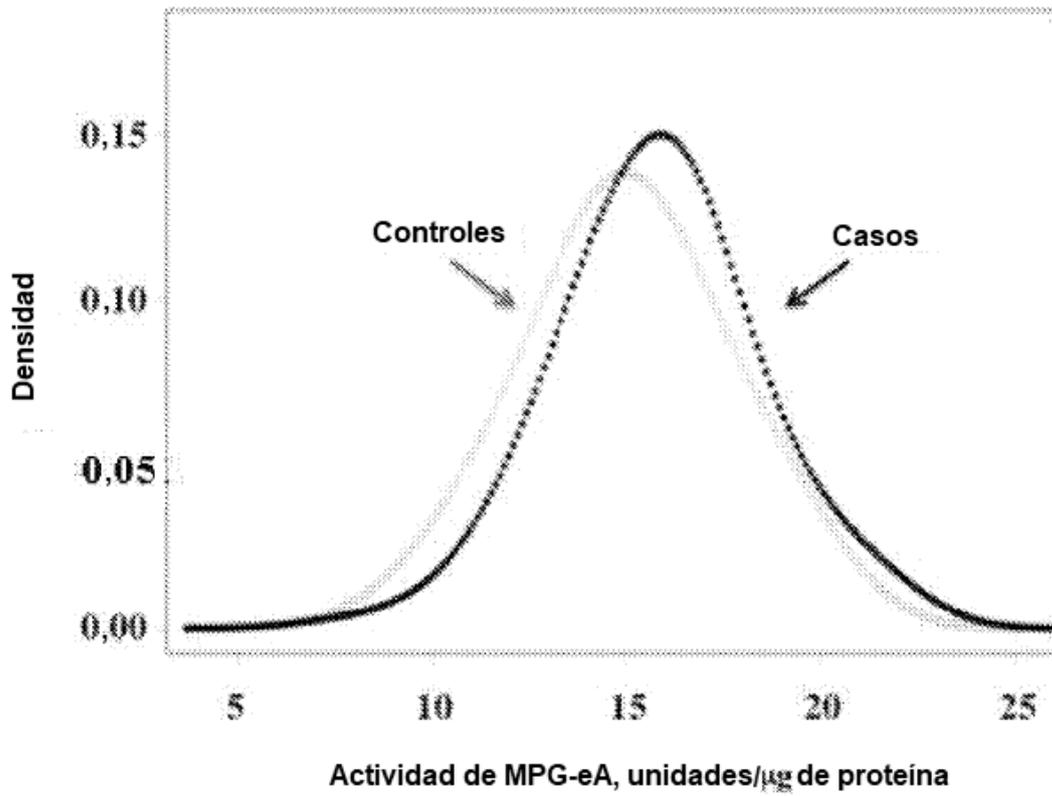


FIG. 7

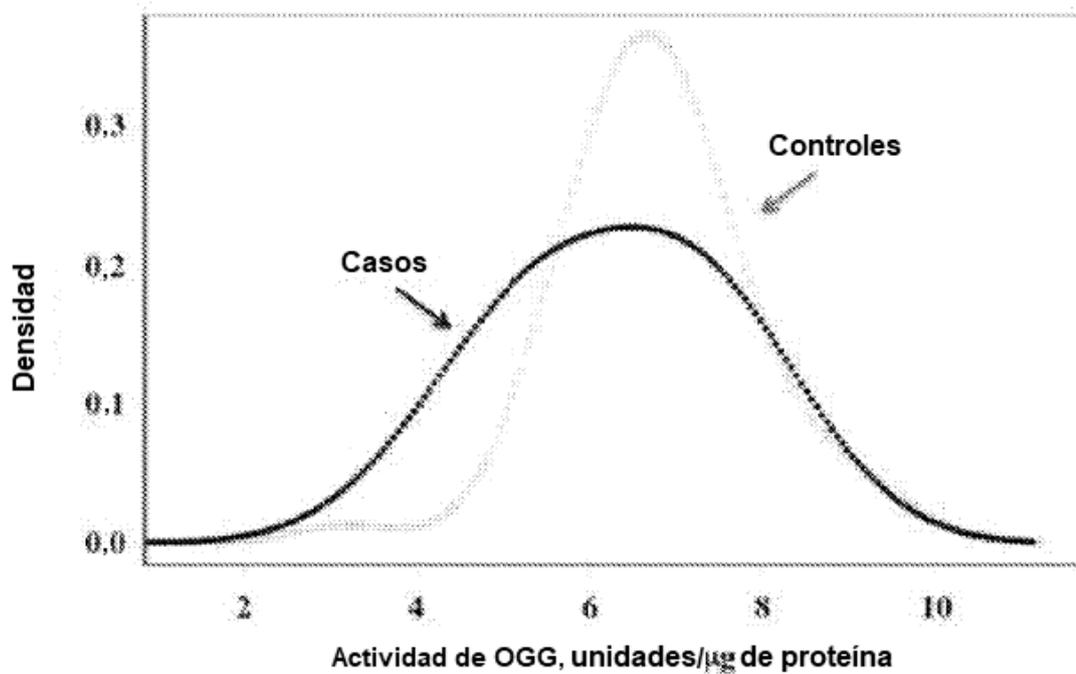


FIG. 8A

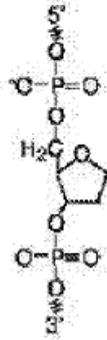


FIG. 8B

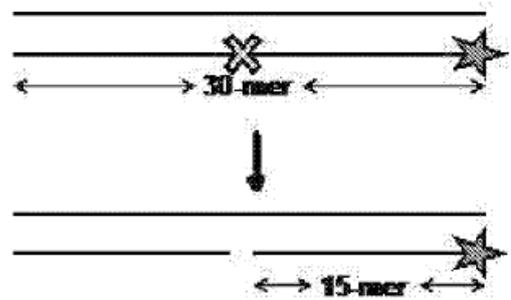


FIG. 8C

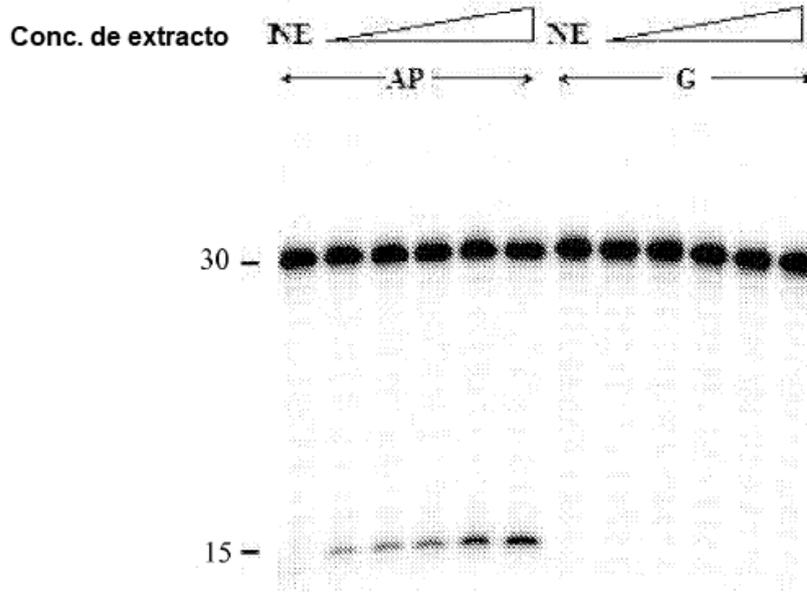


FIG. 8D

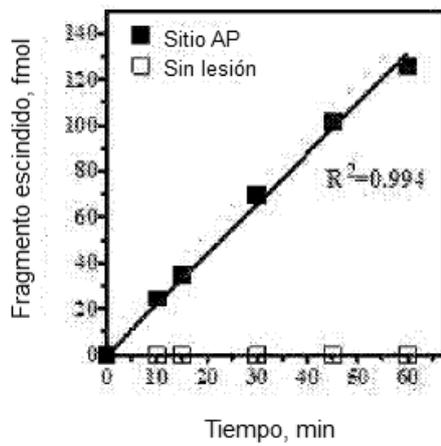


FIG. 8E

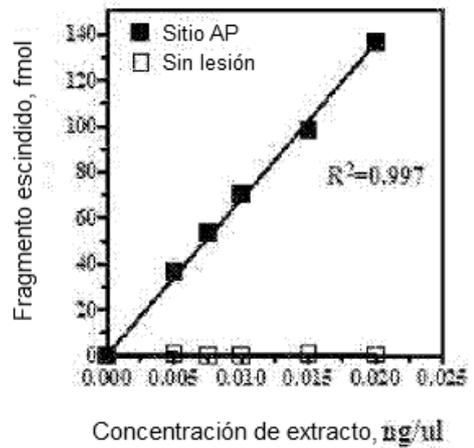


FIG. 9

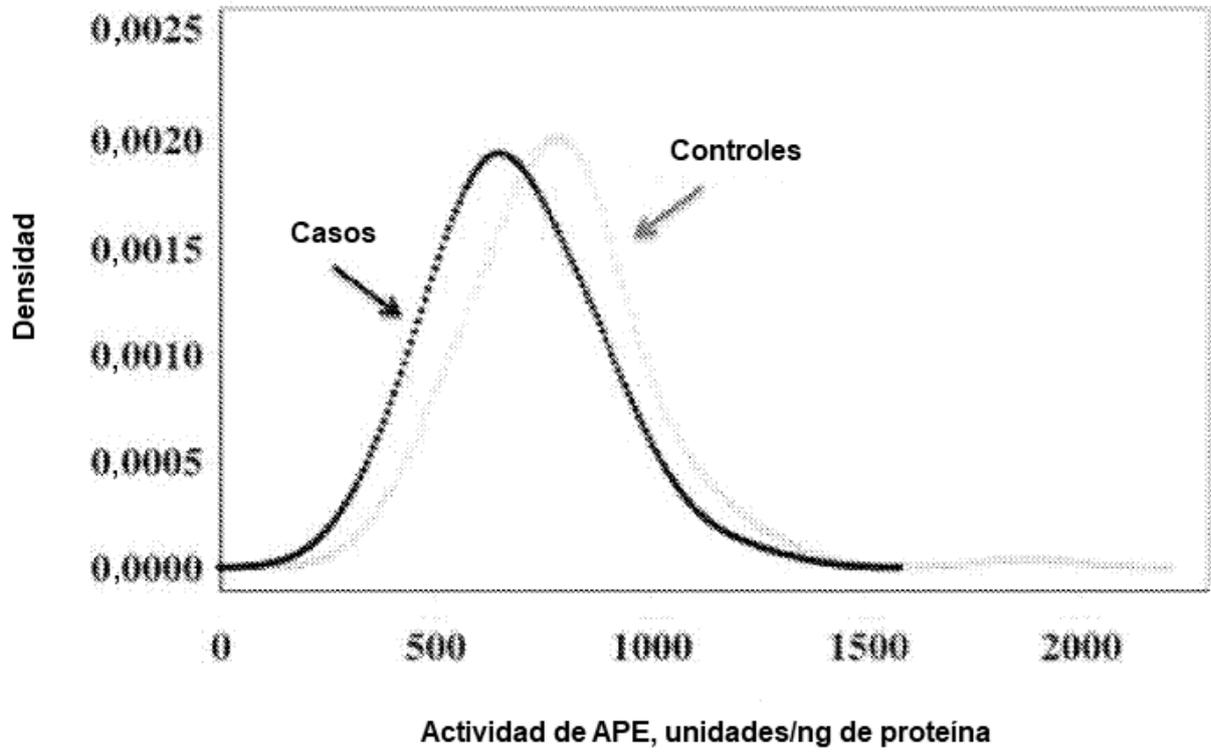


FIG. 10

