

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 393**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014 PCT/EP2014/058356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15161880**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14719023 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3134540**

54 Título: **Método de diagnóstico in vitro para cáncer por medio de ADN circulante libre de células**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.12.2018**

73 Titular/es:  
**EUROCLONE SPA (100.0%)  
Via Figino 20/22  
20016 Pero (Milano), IT**

72 Inventor/es:  
**SACCANI, ANDREA;  
AGOSTINI, MARCO y  
BEDIN, CHIARA**

74 Agente/Representante:  
**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 692 393 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**

Método de diagnóstico *in vitro* para cáncer por medio de ADN circulante libre de células

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de próstata.

Se sabe que pueden encontrarse secuencias de ADN y ADN libre en líquidos corporales como resultado del proceso de apoptosis. A diferencia de las secuencias liberadas por células normales, también pueden encontrarse secuencias alteradas que son indicativas de la presencia de células alteradas, es decir, tumorales.

10 La identificación y posiblemente la cuantificación de dichas secuencias, por tanto, representa un modo para identificar la presencia de un cáncer en un sujeto y por tanto una herramienta de diagnóstico potencialmente poderosa.

15 La publicación de Mariangela Zane *et al* ("Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAFV600E: A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer", Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 67, n.º 8, 1 de octubre de 2013, páginas 723-730) da a conocer la correlación de ADN libre de células que se corresponde con las secuencias ALU 244 y ALU 83 con el cáncer de tiroides.

20 La publicación de Feng Jiang *et al* ("Plasma cell-free DNA and its DNA integrity as biomarker to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate-specific antigen", International urology and nephrology, Akademiai, Budapest, HU, vol. 45, n.º 4, 19 de junio de 2013, páginas 1023-1028) da a conocer que los niveles de ADN libre en el plasma pueden usarse para distinguir cáncer de próstata de tumores benignos y, en particular, cita las secuencias ALE 247 y ALU 115 y su razón relativa como marcadores.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención da a conocer un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de próstata, en el que se detectan secuencias ALU específicas en una muestra corporal.

30 **Objeto de la invención**

Un primer objeto de la invención está representado por un método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de próstata. En un aspecto adicional, la invención da a conocer un método para el pronóstico de cáncer de próstata.

35 **Descripción detallada de la invención**

*Definiciones*

40 Para los propósitos de la presente invención, una muestra es una alícuota aislada de un líquido corporal de un sujeto.

En particular, la muestra usada es una muestra de plasma, suero, saliva, orina, líquido de ganglios linfáticos u órganos linfáticos, médula ósea, líquido de la pleura, conductos mamarios, líquido lagrimal, líquido seroso, líquido peritoneal, licor (líquido cefalorraquídeo), heces, esputo, ascitis, jugo gástrico o pancreático, sudor.

En una realización preferida de la invención la muestra es una muestra aislada de muestra de sangre o suero o licor, mientras que en una muestra más preferida es una muestra aislada de sangre o suero.

50 El volumen de la muestra adecuada para realizar el método de la invención depende del tipo de líquido corporal.

En particular, un volumen adecuado está comprendido entre aproximadamente 300 µl-1 ml y preferiblemente es de aproximadamente 500 µl.

55 En un primer aspecto de la invención, la muestra de sangre no está purificada.

Por consiguiente, una vez tomada del sujeto, las únicas etapas realizadas comprenden la centrifugación y/o filtración con el fin de eliminar el material particulado (células). Además, pueden realizarse sobre la muestra otros tratamientos adecuados con el fin de eliminar o inactivar proteínas, como por ejemplo una etapa de tratamiento con enzimas.

60 En otra realización de la invención, la muestra se somete a una etapa para la extracción de ADN.

Dicha etapa puede realizarse según técnicas bien conocidas en la técnica, como por ejemplo la extracción con fenol/cloroformo.

65

Para los fines de la presente invención, un sujeto se pretende que sea un ser humano o un animal.

Dentro de los animales, se prefieren las mascotas y animales de jardín, en los que los se prefieren particularmente los mamíferos. En una realización incluso más preferida, los animales se refieren a perros.

5 El "ADN circulante total" según la invención puede determinarse con PCR cuantitativa u otro método adecuado en la técnica.

10 Dentro de la presente invención, la "cantidad de" se usa para referirse a un valor que es representativo de la concentración de una secuencia particular (secuencia nucleica) en la muestra.

"Representativo" se usa para referirse a una relación entre dos valores.

15 Por ejemplo, una medición de un compuesto en una muestra podría proporcionar un valor que puede usarse para determinar la concentración a través de un cálculo conocido.

La manera de calcular la concentración a partir del primer valor depende de las circunstancias así como del método usado.

20 La "integridad del ADN" se refiere a la razón de la cantidad del ADN circulante liberado de células cancerosas con respecto a la cantidad total de ADN.

En el método de diagnóstico de la invención, el sujeto es una persona o un animal que es probable que desarrolle cáncer u otro cáncer (es decir, recidiva del cáncer) o se sospecha que tiene cáncer.

25 El método de diagnóstico *in vitro* de la presente invención comprende en particular las etapas de:

1) determinar el ADN circulante total en una muestra;

30 2) determinar el ADN liberado por células cancerosas;

3) determinar el valor "II" (índice de integridad), que se corresponde con la relación entre los valores de las etapas 1) y 2).

35 En particular, la etapa 1) comprende determinar la cantidad de ALU 83 presente en la muestra.

Para dicho fin, se usan los siguientes cebadores:

	<b>Secuencia 5'→3':</b>	<b>SEQ. ID. n.</b>
<b>directo</b>	CTGAGGTCAGGAGTTCGAGACC	1
<b>inverso</b>	CCACGCCCGGCTAATTTT	2

40 En lo que respecta a la etapa 2), comprende determinar la cantidad de ALU 244 presente en la muestra.

Para dicho fin, se usan los siguientes cebadores:

	<b>Secuencia 5'→3':</b>	<b>SEQ. ID. n.</b>
<b>directo</b>	GCGGTGGCTCACGCCTGTAA	3
<b>inverso</b>	GGAGTGCAGTGGCGCATCT	4

45 En la etapa 3) se calcula la razón "II" entre la cantidad del ADN liberado por células cancerosas y el ADN circulante total, tal como puede representarse a continuación:

$$II = \frac{\text{Valor de ALU244}}{\text{Valor de ALU83}}$$

50 En una realización preferida "valor" representa una medida de cantidad, como concentración, determinada con PCR cuantitativa; por tanto, el valor "C" se calcula como a continuación:

$$C = \frac{\text{Valor de ALU244-qPCR}}{\text{Valor de ALU83-qPCR}}$$

Según una realización preferida de la presente invención, en las etapas anteriores 1) y 2) las secuencias ALU se amplifican por PCR cuantitativa (qPCR).

5 Además de las etapas anteriores 1) a 3), el método de diagnóstico *in vitro* de la invención comprende la etapa adicional de comparar los datos obtenidos para el valor de "I" con un grupo de valores de referencia.

10 Para los fines de la presente invención un grupo de valores de referencia comprende valores que se sabe que corresponden a o bien:

- pacientes sanos, o bien
- pacientes con cáncer, o bien
- 15 - a un estado patológico de un grupo de pacientes.

20 En particular, el valor de referencia depende de características del paciente que se somete al método de diagnóstico *in vitro* de la invención, como edad, sexo, raza, etc.

Además de eso, el valor de referencia depende de la clase de muestra en examen y del tipo de tumor que se investiga.

25 En la realización preferida, el método dado a conocer anteriormente permite el diagnóstico del cáncer de próstata. Según otro objeto de la invención, se da a conocer un método de tratamiento que comprende la etapa de realizar el método de diagnóstico *in vitro* de la invención.

En particular, dicho método puede usarse para el tratamiento de cáncer y, más en particular, del cáncer de próstata.

30 Más en detalle, dicho método puede realizarse en un sujeto que desarrolló un cáncer o que está tratándose contra un cáncer o que se sometió a tratamiento contra el cáncer, como una intervención quirúrgica para eliminar el cáncer. Por consiguiente, el presente método puede usarse para monitorizar la progresión del cáncer así como la respuesta al tratamiento terapéutico.

35 De hecho, cualquier variación en los datos recogidos puede ser indicativa de la progresión o regresión del cáncer en caso de que el tratamiento terapéutico sea ineficaz o satisfactorio.

Por tanto, el método de la invención puede usarse también para identificar si un fármaco o un tratamiento es eficaz contra el cáncer.

40 En otro objeto de la invención, se da a conocer un método para el pronóstico del cáncer que comprende llevar a cabo el método de la invención.

Para dicho fin, el método puede realizarse en un sujeto que es probable que desarrolle un cáncer en el futuro.

45 A este respecto, debe considerarse el entorno en el que vive el sujeto (si en el pasado ha estado en contacto con sustancias potencialmente peligrosas) y/o su familiaridad con la patología (por ejemplo, si uno o más parientes cercanos desarrollaron un cáncer).

50 Los datos del valor de "C" pueden recogerse a uno o posteriores tiempos y compararse con valores de referencia, que son indicativos de la aparición de la patología. También en este caso, los datos de referencia dependen de características del paciente que se somete al método de la invención, como edad, sexo, raza, etc.

55 Además de eso, los datos de referencia dependen de la clase de muestra de muestra en examen y del tipo de tumor que se investiga.

Gracias al método de la invención, el tratamiento curativo del paciente puede empezarse ventajosamente en un estadio muy temprano de la patología.

60 Los métodos dados a conocer anteriormente que hacen uso del método de diagnóstico *in vitro* de la invención pueden usarse en combinación con otro método de modo que se logren resultados incluso más fiables y eficaces.

Según un objeto adicional de la presente invención, se proporciona un kit para realizar el método de diagnóstico *in vitro* de la invención.

En particular, dicho kit comprende:

- 5
- cebadores para la amplificación de ALU 83; y
  - cebadores para amplificación de ALU 244.
- 10 Más en detalle, cada uno de los cebadores se incluye en una disolución de reacción apropiada que comprende una sonda adecuada.

En una primera realización de la invención, un reactivo para la amplificación de ALU 83 comprende:

15	Sonda de mezcla maestra Fluocycle II™ (sin ROX) (Euroclone S.p.A.)	10 µl
	ALU83 directo (10 µM)	0,1 µl
	ALU83 inverso (10 µM)	1,8 µl
	Sonda (10 µM)	0,5 µl
	Agua	hasta 20 µl

20 La formulación de mezcla maestra Fluocycle II™ comprende: KCl 100 mM, Tris HCl 20 mM pH 8,3, Tween-20 al 0,02%, 0,8 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Taq ADN polimerasa 200 unidades/ml, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, estabilizadores.

25 Por otro lado, el reactivo para la amplificación de ALU 244 comprende:

30	Sonda de mezcla maestra Fluocycle II™ (sin ROX) (Euroclone S.p.A.)	10 µl
	ALU83 directo (10 µM)	1,8 µl
	ALU83 inverso (10 µM)	1,8 µl
	Sonda (10 µM)	0,5 µl
	Agua	hasta 20 µl

35 La formulación de mezcla maestra Fluocycle II™ comprende: KCl 100 mM, Tris HCl 20 mM pH 8,3, Tween-20 al 0,02%, 0,8 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Taq ADN polimerasa 200 unidades/ml, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, estabilizadores.

40 El kit de la invención también comprende preferiblemente una secuencia para realizar la curva de referencia patrón. Por ejemplo, una preparación de una secuencia ALU, puede estar en forma liofilizada o en disolución. Según otro aspecto, el kit puede comprender adicionalmente una muestra que puede usarse para verificar la variabilidad entre ensayos.

En un primer kit de la invención, se incluyen:

- 45
- el reactivo anterior para la amplificación de ALU83;
  - el reactivo anterior para la amplificación de ALU244;
  - la secuencia para realizar la curva de referencia patrón, tal como una preparación de una secuencia ALU;
- 50
- una muestra para verificar la variabilidad entre ensayos.

En un kit alternativo, pueden incluirse:

- 55
- una disolución de la sonda de mezcla maestra Fluocycle II™ (sin ROX) (Euroclone S.p.A.);
  - una disolución que comprende los cebadores para la secuencia ALU83 y una sonda adecuada;
  - una disolución que comprende los cebadores para la secuencia ALU244 y una sonda adecuada;
- 60
- la secuencia para realizar la curva de referencia patrón, tal como una preparación de una secuencia ALU;
  - una muestra de referencia para verificar la variabilidad entre ensayos.

En el kit anterior, las disoluciones de cebador para las secuencias ALU son preferiblemente:

65

# ES 2 692 393 T3

ALU83 directo (10 µM)	0,1 µl
ALU83 inverso (10 µM)	1,8 µl
Sonda (10 µM) de agua	0,5 µl

5 y

ALU244 directo (10 µM)	1,8 µl
ALU244 inverso (10 µM)	1,8 µl
Sonda (10 µM) de agua	0,5 µl

10 El kit puede comprender adicionalmente una colección de datos que pueden usarse como referencia en el método de diagnóstico *in vitro*, terapéutico o de pronóstico de la invención.

*Materiales y métodos*

15 Kit de extracción de ADNlc

Kit de virus QIAamp(R) UltraSens™ (QIAGEN):

20 Volumen de partida, plasma: 500 µl

Volumen de elución de ADNlc: 50 µl

25 Protocolo de amplificación por PCR en tiempo real

Curva patrón

Patrón 6:	0,5 pg/µl
Patrón 5:	1 pg/µl
Patrón 4:	10 pg/µl
Patrón 3:	100 pg/µl
Patrón 2:	1*10 <sup>3</sup> pg/µl
Patrón 1:	10*10 <sup>3</sup> pg/µl

30

Reactivo para la mezcla ALU83	µl
Sonda de mezcla maestra Fluocycle II (SIN ROX)	10
ALU83 directo (10 µM)	0,1
ALU83 inverso (10 µM)	1,8
Sonda (10 µM)	0,5
H <sub>2</sub> O	6,6
ADNlc/patrón	1
Volumen total	20

Reactivo para la mezcla ALU244	µl
Sonda de mezcla maestra Fluocycle II (SIN ROX)	10
ALU244 directo (10 µM)	1,8
ALU244 inverso (10 µM)	1,8
Sonda (10 µM)	0,5
H <sub>2</sub> O	4,9
ADNlc/patrón	1
Volumen total	20

35

Protocolo de amplificación para la mezcla ALU

95°C	5 min	X40 ciclos
95°C	15 s	
62°C	1 min	

40 Sonda

6FAM-CCTGGCCAACATGGTGAACCCC-TMR SEQ.ID. n. 5

Ejemplo 1

*PCR cuantitativa de fragmentos de ADN plasmático*

5 La cuantificación de fragmentos de ADN libre de células (ADNlc) en plasma se realizó mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR), que amplificó y cuantificó los fragmentos de ADN más corto y más largo. Para maximizar la sensibilidad de la cuantificación de ADNlc, se usaron las repeticiones de ALU como diana de la qPCR.

10 Se diseñaron dos pares de cebadores tal como sigue: el primer conjunto de cebadores (ALU244) amplificó sólo el fragmento de ADN más largo (244 pb), mientras que el segundo conjunto de cebadores (ALU83) amplificó tanto el más corto (83 pb) como el más largo, porque el sitio de apareamiento de ALU83 estaba dentro del sitio de apareamiento de ALU244. Los resultados obtenidos usando los cebadores de ALU83 representan el ADN circulante en plasma libre de células total, mientras que los resultados obtenidos usando los cebadores de ALU244 reflejan la cantidad de ADN liberado de células no apoptóticas.

15 La secuencia de sonda fue 6FAM-CCTGGCCAACATGGTCAAACCCC-TMR.

20 Las dos reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenía 1 µl de muestra, sonda FluoCycle™ II 1X (Euroclone®, Milán, Italia), 0,25 µM de la sonda y 0,9 µM de cada cebador de ALU244 en una o 0,05 µM de cebador directo y 0,9 mM de cebador inverso para ALU83 en la otra. La amplificación por qPCR consistió en una etapa de desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de desnaturalización durante 15 segundos a 95°C y apareamiento/extensión durante 1 minuto a 62°C, usando el sistema de PCR en tiempo real 7300 y el sistema de PCR en tiempo real rápido 7500 (Applied Biosystems, Milán, Italia).

25 Las muestras se sometieron a prueba por triplicado y se incluyó una muestra de referencia negativa apropiada (sin molde). La cantidad absoluta de ADNlc en cada muestra se determinó mediante una curva patrón, usando diluciones en serie de 10 veces (desde 10 ng hasta 1 pg) de ADN genómico obtenido de la capa leucocítica de sujetos sanos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de diagnóstico *in vitro* para cáncer de próstata que comprende la etapa de determinar la cantidad de la secuencia ALU 244 y la cantidad de la secuencia ALU 83 en una muestra aislada de líquido corporal, determinar un valor que es la razón entre la cantidad de ALU 244 y de ALU 83 en la muestra aislada de líquido corporal, en el que dicha razón se compara con un valor de referencia de pacientes sanos.
- 10 2. Método de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 1, en el que la muestra aislada de líquido corporal se purifica en una etapa de purificación antes de determinar la cantidad de la secuencia ALU.
- 15 3. Método de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de la reivindicación 1 ó 2, en el que la muestra aislada del líquido corporal se trata con el fin de extraer el ADN de la muestra aislada antes de determinar la cantidad de la secuencia ALU.
- 20 4. Método de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra aislada de líquido corporal es una muestra de sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido de ganglios linfáticos u órganos linfáticos, médula ósea, líquido de la pleura, conductos mamarios, líquido lagrimal, líquido seroso, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, heces, esputo, ascitis, jugo gástrico o pancreático, sudor.
- 25 5. Método de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho líquido corporal es de un ser humano o un animal.
6. Método de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 5, en el que dicho líquido corporal es de un perro.
7. Método de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra aislada tiene un volumen comprendido entre aproximadamente 300 µl-1 ml y preferiblemente es de aproximadamente 500 µl.
- 30 8. Método de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de determinar la cantidad de ALU 244 comprende el uso de los siguientes cebadores:

	Secuencia 5'→3':	
directo	CTGAGGTCAGGAGTTCGAGACC	SEQ. ID. n. 1
inverso	CCACGCCCGGCTAATTTT	SEQ. ID. n. 2
- 35 9. Método de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de determinar la cantidad de ALU 83 comprende el uso de los siguientes cebadores:

	Secuencia 5'→3':	
directo	GCGGTGGCTCACGCCTGTAA	SEQ. ID. n. 3
inverso	GGAGTGCAGTGGCGCATCT	SEQ. ID. n. 4
- 40 10. Método de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de ALU 244 y/o de ALU 83 se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa.
11. Uso de una secuencia nucleotídica aislada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ.ID. n.º 1, 2, 3, 4 y 5 para los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.