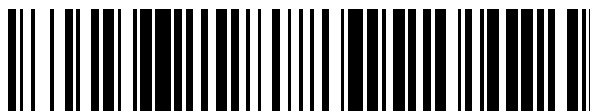


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 030**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2015 PCT/IB2015/002046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16063122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2015 E 15816218 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3209797**

54 Título: **Métodos para explorar a un individuo en busca de un cáncer**

30 Prioridad:

20.10.2014 EP 14306666

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

08.04.2019

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris , FR;
INSTITUT RÉGIONAL DU CANCER DE
MONTPELLIER (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**THIERRY, ALAIN y
EL MESSAOUDI, SAFIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 030 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

Métodos para explorar a un individuo en busca de un cáncer

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a métodos para explorar a un individuo en busca de un cáncer.

5 Antecedentes de la invención:

El descubrimiento del ADN libre circulante (*circulating cell-free DNA*) (ADNlc) en el sistema circulatorio humano ha conducido a una investigación intensiva sobre su uso en diversos campos clínicos. El ADNlc fue descubierto en 1948 por Mandel y Metais¹, aunque en aquel momento no atrajo mucha curiosidad. Sin embargo, de 30 a 40 años después, el interés por el ADNlc fue demostrado por varios grupos: Leon *et al.*² descubrieron que la concentración de ADNlc era considerablemente mayor en individuos con cáncer y Stroun *et al.*³ describieron una proporción de ADNlc que se derivaba de un tumor y tenía sus características moleculares, conduciendo así al concepto de una "biopsia líquida". Adicionalmente, el interés por la fragmentación del ADNlc ha crecido en términos de diagnóstico desde la revelación de diferencias significativas entre individuos con cáncer e individuos sanos⁴ (patente de EE.UU. 5,952,170 de Stroun). Por lo tanto, el análisis del ADNlc podría proporcionar información de diagnóstico, pronóstico y trataméntico⁵. Varios investigadores están desarrollando intensivamente técnicas que permiten la detección y caracterización de alteraciones genéticas y epigenéticas de células tumorales utilizando análisis del ADNlc en el plasma/suero de individuos con cáncer. Dichas técnicas podrían revolucionar la atención dirigida de individuos con cáncer a través de la detección de mutaciones que conducen a resistencia a terapias dirigidas, control terapéutico personalizado y seguimiento no invasivo de la enfermedad. El análisis de ADNlc se utiliza actualmente en la práctica de diagnóstico prenatal⁶ y es un análisis prometedor en otros campos clínicos, como enfermedades autoinmunes, traumatismos, sepsis o infarto de miocardio⁷.

A pesar de la investigación intensiva, pocas pruebas basadas en ADNlc se han traducido a la práctica clínica. Se están desarrollando diversas técnicas para detectar y caracterizar el ADNlc en individuos con cáncer, incluido el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, la secuenciación directa, el análisis de fusión de alta resolución, la PCR digital, la PCR en frío y otras técnicas habitualmente utilizadas para el análisis de tejido tumoral. Sin embargo, la concentración de ADNlc todavía no ha sido validada como un biomarcador del cáncer, ya que la literatura revela datos contradictorios: las concentraciones plasmáticas de ADNlc en individuos con cáncer varían de unos pocos ng/ml a varios miles de ng/ml, lo que se superpone con el intervalo de concentración de individuos sanos⁵. Además se ha comprobado que la estimación de la fragmentación del ADNlc en individuos con cáncer es más baja, equivalente o más alta que en individuos control. Estas discrepancias se pueden explicar por la falta de conocimientos fundamentales sobre el ADNlc. De hecho, los aspectos cognitivos de ADNlc todavía no han sido identificados ni dilucidados: las contribuciones respectivas de diferentes mecanismos de liberación potencial de ADNlc (apoptosis, necrosis, fagocitosis, trampas de ADN extracelular, liberación activa...) no están claramente identificadas. De modo similar, las estructuras del ADNlc todavía no están claramente definidas (parte de la cromatina, nucleosomas, complejos de nucleoproteínas, exosomas, cuerpos apoptóticos...) ⁸.

La concentración total de ADN circulante se contempló durante mucho tiempo como un biomarcador potencial para el cáncer, pero se comprobó que los valores de concentración de ADNlc de individuos sanos y con cáncer se superponían parcialmente, lo que excluye su desarrollo como uso clínico⁹. Con los métodos recientes y el diseño específico de sistemas de PCR, recientemente se ha demostrado una distinción estadística entre individuos sanos e individuos con cáncer¹⁰. Además, nosotros revelamos que el ADN tumoral circulante está altamente fragmentado en comparación con el ADNlc de individuos sanos (US20130224740,¹¹). Mediante la dirección de secuencias cortas se comprobó que hasta un 50% del ADNlc total se podría derivar del tumor ¹², lo que contradice la declaración de la literatura anterior que indicaba que el ADNlc derivado del tumor era una porción minúscula del ADNlc total.

No obstante, las características estructurales y de tamaño del ADNlc todavía están mal caracterizadas en la literatura, aunque podrían contribuir a mejorar el conocimiento cognitivo sobre el ADNlc y a diseñar procesos analíticos precisos y específicos. Además de la pujante investigación actual sobre el análisis del ADNlc nuclear (ADNCn), el análisis del ADNlc mitocondrial (ADNCn) está emergiendo como un campo de estudio muy atractivo.

El ADN mitocondrial (ADNmt) está compuesto por un ADN circular de 16.000 pb que se inserta en 37 genes, que codifican dos ARNr, 22 ARNt y 14 polipéptidos (presentados más arriba, uno que codifica tanto el 16S ribosómico como la humanina). Hay de 5 a 10 copias de este ADN circular por mitocondria, y solo existen en eucariotas en todos los tipos de células excepto en los glóbulos rojos; cada célula contiene de 1.000 a 3.000 mitocondrias sobre tipos celulares. Por lo tanto, hay de cientos a miles de copias de ADNmt, estando la variación del número en función de las condiciones ambientales (tales como la hipoxia o la estimulación de hormonas esteroideas)¹³. El ADNmt corresponde a aproximadamente un 1% del ADN celular total. Dado que se deriva de ADN bacteriano, contiene numerosos dinucleótidos CpG no metilados¹⁴. Debido a la falta de protección por histonas y a los mecanismos eficientes de reparación del ADN, es sensible al estrés genotóxico y oxidante¹⁵. Existe una tasa de mutación de 10 a 200 veces mayor que la del ADN nuclear. Durante la tumorigénesis, el ADN mitocondrial es sometido a muchas mutaciones en una proporción mucho mayor que el ADN nuclear debido a su falta de protección por histonas y la

falta de mecanismos de reparación del ADN. Además, este genoma poliploide está sujeto a una variación en el número de copias durante la carcinogénesis. Estas alteraciones específicas se podrían determinar fácilmente a partir del ADNlc mitocondrial, ya que las copias del ADNmt están presentes en mayor cantidad (de cien a mil copias por célula) que el ADN nuclear¹³. Se han publicado algunos estudios sobre la importancia clínica de la concentración y la integridad del ADNlc mitocondrial en individuos con cáncer¹⁶. En este momento, los datos publicados son discordes y es imposible llegar a una conclusión. La falta de procedimientos normalizados de trabajo preanalíticos y analíticos podría explicar en parte esta discordancia.

Poco se sabe acerca de las propiedades estructurales del ADNlc mitocondrial (ADNCm). Podemos suponer que son diferentes a las del ADNlc nuclear (ADNCn), ya que el ADNm no está protegido por histonas y una parte de ADNlc nuclear está formada por nucleosomas. Se ha demostrado que los neutrófilos liberaban ADNm de un modo ROS dependiente para formar las Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET)¹⁷. De modo similar, los eosinófilos liberan ADNmt para formar las trampas extracelulares (EET), lo que contribuye a la defensa antibacteriana¹⁸.

Biológica y fisiológicamente, se ha demostrado que el ADNlc mitocondrial era un DAMP¹⁴. Su patrón de CpG no metilado específico y sus características similares a las del ADN bacteriano son reconocidos por TLR9 de las células inmunes y condujeron a respuesta inflamatoria a través de p38¹⁹. Este punto es crucial, ya que se sabe poco sobre las propiedades biológicas del ADNlc y este descubrimiento podría conducir a agentes terapéuticos dirigidos contra el ADNlc. Por todas estas razones, el ADNlc mitocondrial es muy prometedor, y es necesario realizar más estudios sobre este ADN en particular. Está mal caracterizado²⁰ y se han notificado pocos resultados en comparación con el ADNlc nuclear.

20 **Compendio de la invención:**

La presente invención se refiere a métodos para explorar a un individuo en busca de un cáncer en un individuo que lo requiera. En particular, la presente invención está definida por las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención:

En la presente memoria, los inventores demuestran por primera vez que cuantificar y asociar el contenido de ADNmt y de ADNnuc permite distinguir a individuos con cáncer de individuos sanos. Más específicamente, la relación de contenido de ADNlc mitocondrial/ADNlc nuclear (ADNCmCn) es estadísticamente más baja en individuos con cáncer que en individuos sanos. Como la capacidad de diagnóstico es óptima (ABC de 1), este valor es un biomarcador fuerte para explorar la presencia de un tumor y puede ser utilizado para detectar a individuos no sintomáticos o no diagnosticados. Además hemos demostrado que el índice de fragmentación (DII como se calcula aquí) del ADNlc mitocondrial (ADNCmt) es más alto que el del ADNlc nuclear (ADNCnu), siendo la relación de DII de ADNCmt/DII de ADNCnu más alta en individuos con tumores que en individuos sanos. Dado que únicamente la concentración de ADNlc nuclear total (ADNCn) presenta un potencial para el diagnóstico de cáncer, sería posible combinar la relación de contenido de ADNCmCn únicamente con la concentración de ADNlc nuclear total o tanto con la proporción de DII y como con la concentración de ADNlc de ADNlc nuclear total para mejorar la potencia de escrutinio, en especial para un escrutinio a gran escala. Un algoritmo podría ser útil para este objetivo.

Hasta la fecha, ningún otro biomarcador ha mostrado un rendimiento tal como el de la relación de contenido de ADNCmCn para diagnosticar cáncer mediante un análisis de sangre. Se han hecho muchos intentos con biomarcadores basados en proteínas o en ácidos nucleicos, y se ha comprobado que todos ellos son inespecíficos o no son suficientemente sensibles. Por ejemplo, el PSA es un biomarcador utilizado habitualmente para el cáncer de próstata, pero requiere mucha precaución, ya que no es específico de una enfermedad maligna y presenta inconvenientes analíticos en términos de sensibilidad. Los biomarcadores CEA o CA15-3 también se utilizan de forma rutinaria en individuos con cáncer, en especial para los individuos con cáncer colorrectal (CCR) o con cáncer de mama, respectivamente, pero solo se emplean para el pronóstico, el seguimiento del tratamiento o la vigilancia de la recurrencia.

Además de su alta capacidad de escrutinio, la relación de contenido de ADNCmCn puede ser útil como biomarcador para el pronóstico, el seguimiento del tratamiento o la vigilancia de la recurrencia en la atención de la gestión del cáncer.

Definiciones generales

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cáncer" tiene su significado general en la técnica e incluye, pero no se limita a tumores sólidos y tumores de origen sanguíneo. El término cáncer incluye enfermedades de la piel, tejidos, órganos, huesos, cartílagos, sangre y vasos. Además, el término "cáncer" abarca tanto cánceres primarios como metastásicos. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, tracto gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente de los siguientes tipos histológicos, aunque no se limita a éstos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma de células gigantes y espinocelular; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células

5 basales; pilomatrixoma; carcinoma de células transicionales; carcinoma de células transicionales papilar; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquial-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma adrenocortical; carcinoma endometriode; carcinoma de apéndice cutáneo; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma; cistoadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistoadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en forma de anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, de mama; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecoma, maligno; tumor de células granulosas, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de propagación superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomiomasarcoma; rhabdomiomasarcoma embrionario; rhabdomiomasarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mulleriano mixto; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; tumor neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfatorio; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoides; otros linfomas no Hodgkin específicos; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas. En algunas realizaciones, el individuo padece un cáncer colorrectal, más particularmente un cáncer colorrectal metastásico.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el concepto "ácido nucleico" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una secuencia nucleica codificadora o no codificadora. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Por lo tanto, los ejemplos de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a ADN, ARNm, ARNt, ARNr, ARNtm, ARNm, ARNpi, ARNsno y ARNs. Por consiguiente, los ácidos nucleicos abarcan la región codificadora y no codificadora de un genoma (es decir, nuclear o mitocondrial).

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el concepto "ácido nucleico nuclear" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un ácido nucleico procedente del núcleo de la célula. El concepto "ácido nucleico nuclear" abarca todas las formas de los ácidos nucleicos, excepto las procedentes de las mitocondrias. El concepto "ácido nucleico nuclear" se define así en oposición al concepto "ácido nucleico mitocondrial". Las mitocondrias son de hecho estructuras dentro de las células que convierten la energía de los alimentos en una forma que puede ser utilizada por las células. Aunque la mayor parte del ADN está empaquetado en cromosomas dentro del núcleo, las mitocondrias también tienen una pequeña cantidad de su propio ADN. Este material genético se conoce como "ADN mitocondrial" o "ADNmt". En los seres humanos, el ADN mitocondrial abarca aproximadamente 16.500 bloques de construcción de ADN (pares de bases), lo que representa una pequeña fracción del ADN total en las células. El ADN mitocondrial contiene 37 genes, siendo todos ellos esenciales para la función mitocondrial normal: ATP6; ATP8; COX1; COX2; COX3; CYTB; ND1; ND2; ND3; ND4; ND4L; ND5; ND6; RNR1, RNR2 TRNA; TRNA; TRNC; TRND; TRNE; TRNF; TRNG; TRNI; TRNK; TRNL1; TRNL2; TRNM; TRNN; TRNN; TRNP; TRNQ; TRNR; TRNS1; TRNS2; TRNT; TRNV; TRNW; y TRNY. Los genes que codifican la NADH deshidrogenasa (complejo I) incluyen MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5 y MT-ND6. Los genes que codifican la Coenzima Q - citocromo c reductasa/Citocromo b (complejo III) incluyen MT-CYB. El gen que codifica la citocromo c oxidasa (complejo IV) incluye MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3. El gen que codifica la ATP sintasa (complejo V) incluye MT-ATP6 y MT-ATP8. El gen que codifica la humanina incluye MT-RNR2 (que codifica tanto el 16S ribosómico como la humanina). Los genes MT-RNR1 y MT-RNR2 proporcionan instrucciones para producir 12S y 16S ribosómicos, respectivamente. Las 22 especies de ARNt mitocondriales (ARNt mt) codificadas por ADNmt que intervienen en la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales. El ADN mitocondrial humano (ADNmt) tiene tres promotores, H1, H2 y L (promotores de cadena pesada 1, de cadena pesada 2 y de cadena ligera). El genoma mitocondrial también comprende regiones de control o secuencias de lazo D. El experto en la materia conoce de por sí los ácidos

nucleares mitocondriales (por ejemplo, la secuencia de referencia NCBI: NC_012920.1, SEQ ID N°: 1). Trece de estos genes proporcionan instrucciones para producir enzimas que intervienen en la fosforilación oxidante. La fosforilación oxidante es un proceso que utiliza oxígeno y azúcares simples para crear trifosfato de adenosina (ATP), la principal fuente de energía de la célula. Los genes restantes proporcionan instrucciones para producir moléculas denominadas ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr), que son de la familia química del ADN. Estos tipos de ARN ayudan a ensamblar bloques de construcción de proteínas (aminoácidos) en proteínas funcionales.

Por "ácido nucleico libre" se entiende que el ácido nucleico es liberado por la célula y está presente en la muestra. En algunas realizaciones, el ácido nucleico libre es ADN libre circulante (ADNlc) y un experto en la técnica puede distinguir de forma sencilla y rutinaria los ácidos nucleicos lc mitocondriales o "ADNlc mitocondriales" de los "ADNlc nucleares". En realidad, el ADNlc mitocondrial abarca cualquier ácido nucleico mitocondrial de ADN y, en cambio, el ADNlc nuclear abarca cualquier ácido nucleico nuclear de ADN.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el concepto "secuencia de ácido nucleico diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico específica (codificadora o no codificadora) cuya amplificación y cuantificación se busca, por ejemplo, mediante Q-PCR y/o análisis por secuenciación. En particular, una secuencia de ácido nucleico nuclear diana es una secuencia procedente del genoma nuclear humano, y una secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana es una secuencia procedente del genoma mitocondrial humano (por ejemplo, SEQ ID N°: 1). De acuerdo con la invención, una secuencia de ácido nucleico diana tiene una longitud de 10 pares de bases. En particular, una secuencia de ácido nucleico diana tiene una longitud de 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; o 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126; 127; 128; 129; 130; 131; 132; 133; 134; 135; 136; 137; 138; 139; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 146; 147; 148; 149; 150; 151; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 160; 161; 162; 163; 164; 165; 166; 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174; 175; 176; 177; 178; 179; 180; 181; 182; 183; 184; 185; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 196; 197; 198; 199; 200; 201; 202; 203; 204; 205; 206; 207; 208; 209; 210; 211; 212; 213; 214; 215; 216; 217; 218; 219; 220; 221; 222; 223; 224; 225; 226; 227; 228; 229; 230; 231; 232; 233; 234; 235; 236; 237; 238; 239; 240; 241; 242; 243; 244; 245; 246; 247; 248; 249; 250; 251; 252; 253; 254; 255; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 267; 268; 269; 270; 271; 272; 273; 274; 275; 276; 277; 278; 279; 280; 281; 282; 283; 284; 285; 286; 287; 288; 289; 290; 291; 292; 293; 294; 295; 296; 297; 298; 299; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 309; 310; 311; 312; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 319; 320; 321; 322; 323; 324; 325; 326; 327; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 336; 337; 338; 339; 340; 341; 342; 343; 344; 345; 346; 347; 348; 349; 350 pares de bases. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico nuclear diana tiene un 5% de diferencia con la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana. De acuerdo con la invención, una primera secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 5% de diferencia con una segunda secuencia de ácido nucleico significa que la primera secuencia tiene un 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100% de diferencia con la segunda secuencia de aminoácidos. La diferencia de la secuencia de ácido nucleico se determina por regla general utilizando un algoritmo de alineación de secuencia adecuado y parámetros por defecto, como BLAST P (Karlin y Altschul, 1990). En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico nuclear diana tiene un 10% de diferencia con la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico nuclear diana tiene un 20% de diferencia con la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico nuclear diana tiene un 50% de diferencia con la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica obtenida del individuo que pueda contener ácidos nucleicos libres. Por regla general, las muestras incluyen, pero no se limitan a muestras de fluidos corporales, como sangre, líquido ascítico, orina, líquido amniótico, heces, saliva o líquidos cefalorraquídeos. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. Por "muestra de sangre" se entiende un volumen de sangre total o una fracción de la misma, por ejemplo, suero, plasma, etc. El experto en la materia puede utilizar cualquier método bien conocido en la técnica para extraer el ácido nucleico libre de la muestra preparada. Por ejemplo, se puede utilizar el método descrito en el EJEMPLO.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya tenga lugar naturalmente como en una digestión de restricción purificada, ya se produzca sintéticamente, que sea capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis de la secuencia de ácido nucleico cuando se somete a condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión por cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de diferentes trifosfatos de nucleótido y una polimerasa en un tampón apropiado ("tampón" incluye pH, fuerza iónica, cofactores, etc.) y a una temperatura adecuada. Por regla general, un cebador tiene una longitud de 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; o 30 nucleótidos. Uno o más de los nucleótidos del cebador se pueden modificar, por ejemplo, mediante la adición de un grupo metilo, un resto de biotina o de digoxigenina, una etiqueta fluorescente o mediante el uso de nucleótidos radiactivos. No es necesario que una secuencia de cebador refleje la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede estar unido al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la

secuencia del cebador sustancialmente complementario a la cadena. Los cebadores se marcan por regla general con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otra etiqueta conocida en la técnica. En la técnica se conocen etiquetas que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal. El término "etiquetado" tiene la finalidad de abarcar el etiquetado directo de la sonda y los cebadores mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable, así como el etiquetado indirecto por reactividad con otro reactivo que está etiquetado directamente. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen, pero no se limitan a agentes radiactivos o un fluoróforo (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)).

Métodos (A) basados en la relación de contenido de ADNCmCn calculada:

- 10 Un objeto de la presente invención se refiere a un método (A) para explorar a un individuo en busca de un cáncer, que comprende las etapas consistentes en
- i) extraer los ácidos nucleicos libres de una muestra obtenida del individuo,
 - ii) determinar la concentración total de ácidos nucleicos libres mitocondriales,
 - iii) determinar la concentración total de ácidos nucleicos libres nucleares,
 - 15 - iv) calcular la relación del nivel determinado en la etapa ii) con respecto a la concentración determinada en la etapa iii) (relación de contenido de ADNCmCn),
 - v) comparar la relación determinada en la etapa iv) con un valor de referencia correspondiente predeterminado y
 - 20 - vi) concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación determinada en la etapa iv) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación determinada en la etapa iv) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.

25 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos libres son ácidos nucleicos de ADN libre (ADNlc). En esta realización, la relación del nivel determinado en la etapa ii) con respecto al nivel determinado en la etapa iii) se denomina por regla general como la "**relación de contenido de ADNCmCn**".

Los métodos para determinar la concentración total de ácidos nucleicos libres son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método descrito en el documento WO2012/028746. Por lo tanto, la Q-PCR es el método preferente para determinar dicha concentración.

30 En alguna realización, el método comprende las etapas consistentes en a) amplificar y cuantificar una secuencia de ácido nucleico nuclear diana y b) amplificar y cuantificar una secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana. Por lo tanto, la relación de contenido de ADNCmCn se representa mediante la relación de la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana amplificada con respecto a la secuencia de ácido nucleico nuclear diana amplificada. De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico nuclear diana es una secuencia que se encuentra en el núcleo del genoma humano. En cambio, la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana es una secuencia que está presente en el genoma humano mitocondrial (SEQ ID N°: 1). Normalmente, la secuencia de ácido nucleico diana forma parte de una secuencia codificadora o no codificadora. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana está comprendida en los siguientes genes mitocondriales: ND1; ND2; COX1; COX2; ATP8; ATP6; COX3; ND3; ND4L; ND4; ND5; ND6; CYTB; TRNF; TRND; RNR1 TRNV; TRNK; RNR2 TRNL1; TRNS1; TRN1; TRNP; TRNQ; TRNE; TRNM; TRNT TRNW; TRNL2 TRNA; TRNS2; TRNN; TRNR; TRNA; TRNG; TRNN; TRNC; y TRNY. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana está comprendida en una región no codificadora del genoma mitocondrial tal como promotores de ADN mitocondrial, tales como H1, H2 y L (promotores de cadena pesada 1, de cadena pesada 2 y de cadena ligera) o regiones de control mitocondrial o secuencias de lazo D. Por lo tanto, el experto en la materia puede seleccionar fácilmente las secuencias de ácido nucleico nuclear y mitocondrial diana apropiadas. De acuerdo con la invención, las secuencias de ácido nucleico nuclear y mitocondrial diana tienen aproximadamente la misma longitud (es decir, tamaño). Por regla general, la longitud de las secuencias de ácido nucleico mitocondrial diana es un 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; o 15% más larga o más corta que la secuencia de ácido nucleico nuclear diana. En algunas realizaciones, las dos secuencias de ácido nucleico diana tienen la misma longitud. Por regla general, las secuencias de ácido nucleico diana tienen una longitud inferior a 110 pares de bases. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana tiene una longitud de 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; o 110 pares de bases.

55 En algunas realizaciones, el método (A) de la presente invención comprende además las etapas consistentes en comparar la concentración total de ADNlc nuclear con un valor de referencia correspondiente predeterminado (ADNCn_R) y concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación de contenido de ADNCmCn es menor que

su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es mayor que su valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación de contenido de ADNCmCn es mayor que su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es menor que su valor de referencia correspondiente predeterminado.

- 5 De acuerdo con la invención, el método (A) de la presente invención implica por regla general el uso de 2 conjuntos de 2 cebadores: 1 conjunto de 2 cebadores (1 cebador homosenrido y 1 cebador antisenido) para amplificar la secuencia de ácido nucleico nuclear diana y 1 conjunto de 2 cebadores (1 cebador homosenrido y 1 cebador antisenido) para amplificar la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana.

Métodos (B) basados en la relación DII MITO/DII NUC:

- 10 Otro objeto de la presente invención se refiere a un método (B) para explorar a un individuo en busca de un cáncer, que comprende las etapas consistentes en
- i) extraer los ácidos nucleicos libres de una muestra obtenida del individuo,
 - ii) determinar el nivel de los ácidos nucleicos mitocondriales que tienen una longitud inferior a 110 pares de bases,
 - 15 - iii) determinar el nivel de los ácidos nucleicos mitocondriales que tienen una longitud superior a 250 pares de bases,
 - iv) calcular la relación del nivel determinado en la etapa iii) con respecto al nivel determinado en la etapa ii) (DII MITO),
 - v) determinar el nivel de los ácidos nucleicos nucleares que tienen una longitud inferior a 110 pares de bases,
 - 20 - vi) determinar el nivel de los ácidos nucleicos nucleares que tienen una longitud superior a 250 pares de bases,
 - vii) calcular la relación del nivel determinado en la etapa vi) con respecto al nivel determinado en la etapa v) (DII NUC),
 - 25 - viii) calcular la relación entre la relación determinada en la etapa iv) y la relación determinada en la etapa vii) (relación DII MITO/DII NUC),
 - ix) comparar la relación determinada en la etapa viii) con un valor de referencia correspondiente predeterminado y
 - 30 - x) concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación determinada en la etapa viii) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación determinada en la etapa viii) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos libres son ácidos nucleicos de ADN libre (ADNlc).

- 35 La Q-PCR es también el método preferente para determinar el nivel de los ácidos nucleicos que tienen una longitud inferior a 110 pares de bases y el nivel de los ácidos nucleicos que tienen una longitud de al menos 250 pares de bases (por ejemplo, véase el método descrito en el documento WO2012/028746). En alguna realización, el método consiste en a) amplificar y cuantificar una primera secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana que tiene una longitud inferior a 110 pares de bases y una segunda secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana que tiene una longitud de al menos 250 pares de bases, y b) amplificar y cuantificar una primera secuencia de ácido nucleico nuclear diana que tiene una longitud inferior a 110 pares de bases y una segunda secuencia de ácido nucleico nuclear diana que tiene una longitud de al menos 250 pares de bases. Entonces es posible calcular las relaciones entre la secuencia de ácido nucleico diana amplificada que tiene una longitud de al menos 250 pares de bases y la secuencia de ácido nucleico diana amplificada que tiene una longitud inferior a 110 pares de bases, lo que posibilita la determinación de las relaciones determinadas en las etapas iv) y vii). En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico (mitocondrial o nuclear) diana tiene una longitud de 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; o 110 pares de bases. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de ácido nucleico (mitocondrial o nuclear) diana tiene una longitud de 250; 251; 252; 253; 254; 255; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 267; 268; 269; 270; 271; 272; 273; 274; 275; 276; 277; 278; 279; 280; 281; 282; 283; 284; 285; 286; 287; 288; 289; 290; 291; 292; 293; 294; 295; 296; 297; 298; 299; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 309; 310; 311; 312; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 319; 320; 321; 322; 323; 324; 325; 326; 327; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 336; 337; 338; 339; 340; 341;

342; 343; 344; 345; 346; 347; 348; 349; 350 pares de bases. De acuerdo con la invención, la primera y la segunda secuencias nucleicas (mitocondrial o nuclear) diana están ubicadas en el mismo gen. En algunas realizaciones, la primera y la segunda secuencias nucleicas (mitocondrial o nuclear) diana están ubicadas en el mismo exón.

5 De acuerdo con la invención, la relación del nivel de ácidos nucleicos que tienen una longitud superior a 250 pares de bases con respecto al nivel de los ácidos nucleicos que tienen una longitud inferior a 110 pares de bases se denomina por regla general "**Índice de Integridad de ADN**" o "**DII**". Por lo tanto, es posible determinar el Índice de integridad de ADN mitocondrial ("**DII MITO**") y el índice de integridad de ADN nuclear ("**DII NUC**").

10 En algunas realizaciones, el método (B) de la presente invención comprende además las etapas consistentes en comparar la concentración total de ADNlc nuclear con un valor de referencia correspondiente predeterminado (ADNC_{N_R}) y concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación DII MITO/DII NUC es mayor que su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es mayor que su valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación DII MITO/DII NUC es menor que su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es menor que su valor de referencia correspondiente predeterminado.

15 De acuerdo con la invención, el método (B) de la presente invención implica por regla general el uso de 2 conjuntos de 3 cebadores: 1 conjunto de 3 cebadores (1 cebador homosentido y 2 cebadores antisentido) para amplificar las secuencias de ácido nucleico nuclear diana corta (< 110 pb) y larga (> 250 pb), y 1 conjunto de 3 cebadores (1 cebador homosentido y 2 cebadores antisentido) para amplificar las secuencias de ácido nucleico mitocondrial diana corta (< 110 pb) y larga (> 250 pb).

20 Métodos de combinación:

En algunas realizaciones, los métodos (A) y (B) arriba descritos se pueden combinar. Otro objeto de la presente invención se refiere a un método para explorar a un individuo en busca de un cáncer, que combina en un solo ensayo realizado en una muestra obtenida del individuo la determinación de la relación de contenido de ADNC_{mCn}, la relación DII MITO/DII NUC y opcionalmente la concentración total de ADNlc nuclear. Cuando se combinan los métodos (A) y (B), el uso de 2 conjuntos de 3 cebadores es suficiente: 1 conjunto de 3 cebadores (1 cebador homosentido y 2 cebadores antisentido) para amplificar las secuencias de ácido nucleico nuclear diana corta (< 110 pb) y larga (> 250 pb), y 1 conjunto de 3 cebadores (1 cebador homosentido y 2 cebadores antisentido) para amplificar las secuencias de ácido nucleico mitocondrial diana corta (< 110 pb) y larga (> 250 pb). La comparación entre los valores determinados (por ejemplo, relación de contenido de ADNC_{mCn}, relación DII MITO/DII NUC ...) y los valores correspondientes predeterminados se puede realizar mediante herramientas informáticas. Estas herramientas informáticas implican por regla general el uso de un algoritmo para calcular una puntuación que es el valor compuesto de los valores determinados. La puntuación facilita la comprensión de los resultados de las etapas de comparación.

PCR cuantitativa (QPCR):

35 No es necesario purificar el ácido nucleico molde. Los ácidos nucleicos se pueden extraer de una muestra mediante técnicas rutinarias tales como las descritas en Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing et al. (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington DC).

Las patentes de EE. UU. nº 4,683,202, 4,683,195, 4,800,159 y 4,965,188 describen técnicas de PCR convencionales. Por regla general, la PCR emplea dos cebadores de oligonucleótido que se unen a una secuencia de ácido nucleico diana seleccionada. Los cebadores útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como un punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico dentro de la secuencia de ácido nucleico diana. Un cebador se puede purificar a partir de una digestión de restricción mediante métodos convencionales, o se puede producir sintéticamente. Si el ácido nucleico molde es bicatenario (por ejemplo, ADN), es necesario separar las dos cadenas antes de que pueda ser utilizado como molde en la PCR. La separación de las cadenas se puede llevar a cabo mediante cualquier método de desnaturalización adecuado, incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un método para separar las cadenas de ácido nucleico consiste en calentar el ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, desnaturalizado más de un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal del tampón y de la longitud y la composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero generalmente están dentro del intervalo de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C, durante un tiempo que depende de características de la reacción, como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. Por regla general, la desnaturalización se realiza durante aproximadamente 30 segundos a 4 minutos (por ejemplo, de 1 minuto a 2 minutos y 30 segundos, o 1,5 minutos). Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar a una temperatura que promueve la reasociación de cada cebador con su secuencia diana en la secuencia de ácido nucleico diana. Normalmente, la temperatura para la reasociación es de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, aproximadamente de 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de reasociación pueden ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto (por ejemplo, de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 50 segundos; de aproximadamente 30 segundos a

aproximadamente 40 segundos). Después, la mezcla de reacción se ajusta a una temperatura que promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca una extensión a partir del cebador reasociado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que está reasociado con un molde de ácido nucleico, pero no ha de ser tan alta que desnaturalice un producto de extensión a partir de su molde complementario (por ejemplo, por regla general la temperatura para la extensión está dentro del intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 5 minutos (por ejemplo de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 4 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 minutos; de aproximadamente 1 minuto y 30 segundos a aproximadamente 2 minutos).

La QPCR implica el uso de una polimerasa termoestable. El concepto "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es estable al calor, es decir, que la enzima cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando es sometida a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena molde. Se han aislado polimerasas termoestables de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. No obstante, también es posible emplear polimerasas que no sean termoestables en ensayos de PCR siempre que la enzima se reponga. Por regla general, la polimerasa es una polimerasa Taq (es decir, *Thermus aquaticus polymerase*).

Los cebadores se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Normalmente, las reacciones de extensión de cadena incluyen por regla general KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,001% (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador de oligonucleótido, 2,5 U de polimerasa Taq, y 10% DMSO). Las reacciones contienen generalmente de 150 a 320 µM de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, o uno o más análogos de los mismos.

Las cadenas recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que puede ser utilizada en etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de separación de cadenas, reasociación y alargamiento se pueden repetir tantas veces como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a la molécula de secuencia de ácido nucleico diana. Los factores limitativos en la reacción consisten en las cantidades de cebadores, enzimas termoestables y trifosfatos de nucleósido presentes en la reacción. Las etapas de ciclación (es decir, desnaturalización, reasociación y extensión) se repiten preferiblemente al menos una vez. Para su uso en la detección, la cantidad de etapas de ciclación dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra consiste en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclación para amplificar la secuencia diana en medida suficiente para la detección. Por regla general, las etapas de ciclación se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir tantas como 40, 60 o incluso 100 veces.

Generalmente, la PCR cuantitativa se realiza en un termociclador con capacidad para iluminar cada muestra con un haz de luz de una longitud de onda específica y detectar la fluorescencia emitida por el fluoróforo excitado. El termociclador también puede calentar y enfriar rápidamente las muestras, aprovechando así las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y la polimerasa térmica.

Con el fin de detectar y medir la cantidad de amplicón (es decir, la secuencia de ácido nucleico diana amplificada) en la muestra, se ha de generar una señal mensurable que sea proporcional a la cantidad de producto amplificado. Todos los sistemas de detección actuales utilizan tecnologías fluorescentes. Algunas de ellas son técnicas inespecíficas y, en consecuencia, solo permiten la detección de una diana cada vez. Alternativamente, algunas técnicas químicas de detección específicas pueden distinguir entre amplificación inespecífica y amplificación de diana. Estas técnicas específicas pueden ser utilizadas para multiplexar el ensayo, es decir, detectar varias dianas diferentes en el mismo ensayo.

SYBR® Green I: El SYBR® Green I es el colorante más utilizado para la detección inespecífica. Se trata de un colorante intercalante de ADN bicatenario, que es fluorescente una vez que se une al ADN. Para amplificar la diana con esta técnica química se requiere un par de cebadores específicos. La cantidad de colorante incorporado es proporcional a la cantidad de diana generada. El colorante emite a 520 nm y la fluorescencia emitida se puede detectar y relacionar con la cantidad de diana. El inconveniente de esta técnica consiste en que el SYBR® Green I se unirá a cualquier ADNds amplificado. En consecuencia, los dímeros de cebador o los productos inespecíficos introducen un sesgo en la cuantificación. Sin embargo, todavía es posible verificar la especificidad del sistema ejecutando una curva de fusión al final de la ejecución de la PCR. El principio consiste en que cada producto tiene una temperatura de disociación diferente, dependiendo del tamaño y del contenido de base, por lo que todavía es posible comprobar la cantidad de productos amplificados. Un ensayo SYBR® válido - par de cebadores - debe producir un único pico bien definido en la curva de fusión. Por estas razones, el SYBR® Green I casi nunca se utiliza para PCR cualitativa. Sin embargo, el SYBR® Green I se utiliza a menudo como la primera etapa para optimizar un ensayo de sistema de detección específico, para comprobar la especificidad de los cebadores y validar el diseño.

Colorantes de fusión de alta resolución (colorantes HRM): El análisis de Curva de Fusión de Alta Resolución es una nueva tecnología emergente que caracteriza muestras de ácido nucleico en función de su comportamiento de disociación. Combina el principio de colorantes intercalantes, análisis de curva de fusión y la aplicación de análisis estadísticos específicos. La HRM utiliza la propiedad fundamental de la separación de las dos cadenas de ADN con calor (fusión) y el seguimiento de esta fusión con un colorante fluorescente. Al contrario que el SYBR Green, los colorantes HRM no inhiben la PCR en altas concentraciones. En consecuencia, el colorante puede saturar el ADN diana amplificado y emite fluorescencia. La temperatura de fusión de una diana de ADN depende del contenido, la longitud y la secuencia de GC. Debido a la alta sensibilidad de los colorantes HRM, incluso un solo cambio de base inducirá diferencias en la curva de fusión, y por consiguiente en la fluorescencia (Erali M. et al., 2008). Este método emergente es menos costoso y tan preciso como los métodos basados en sondas. Actualmente, solo unos pocos termocicladores existentes en el mercado permiten el uso de esta tecnología, entre ellos el Roche LightCycler®480, el Corbett Life Science Rotor-Gene™ 6000 y el ABI Prism®7500. Los principales colorantes HRM disponibles son EvaGreen®, LCGreen®, SYTO® 9 y BEBO.

Sondas TaqMan® = sondas de Colorante Doble: Las sondas TaqMan®, también llamadas Oligonucleótidos de Colorante Doble, Sondas de Colorante Doble o sondas de Etiquetado Doble, son el tipo de sondas más utilizado y con frecuencia son el método de elección para científicos que acaban de empezar a utilizar PCR en tiempo real. Fueron desarrolladas por Roche (Basilea, Suiza) y ABI (Foster City, EE. UU.) a partir de un ensayo que originalmente utilizaba una sonda radiomarcada (Holland et al. 1991), que consistía en una secuencia de sonda monocatenaria que era complementaria a una de las cadenas del amplicón. Un fluoróforo se une al extremo 5' de la sonda y un desactivador de fluorescencia (*quencher*) al extremo 3'. El fluoróforo es excitado por la máquina y pasa su energía, a través de FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia) al desactivador de fluorescencia. Tradicionalmente, el par de FRET ha consistido en FAM como el fluoróforo y TAMRA como el desactivador de fluorescencia. En una sonda bien diseñada, el FAM no emite fluorescencia cuando pasa su energía al TAMRA. Como la fluorescencia de TAMRA se detecta en una longitud de onda diferente a la de FAM, el nivel de fondo de FAM es bajo. La sonda se une al amplicón durante cada etapa de reasociación de PCR. Cuando la polimerasa Taq se extiende desde el cebador que está unido al amplicón, desplaza el extremo 5' de la sonda, que después es degradado por la actividad de exonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq. La escisión continúa hasta que la sonda restante separa el amplicón por fusión. Este proceso libera el fluoróforo y el desactivador de fluorescencia en solución, separándolos en el espacio (en comparación con cuando la sonda los mantenía unidos). Esto conduce a un aumento irreversible de la fluorescencia en la FAM y a una disminución en el TAMRA.

Sondas de Colorante Doble LNA®: El LNA® (ácido nucleico bloqueado) fue desarrollado por Exiqon® (Vedbaek, Dinamarca). El LNA® cambia la conformación de la hélice y aumenta la estabilidad del dúplex. La integración de las bases de LNA® en las sondas de Oligonucleótido de Colorante Doble abre grandes oportunidades para mejorar las técnicas que requieren sondas de alta afinidad lo más específicas posible, como la detección por SNP, el perfil de expresión y la hibridación *in situ*. El LNA® es un análogo de ARN bicíclico, en el que el resto de ribosa en el esqueleto de azúcar-fosfato está restringido estructuralmente por un puente de metileno entre los átomos de 2'-oxígeno y 4'-carbono. La integración de bases de LNA® en sondas cambia la conformación de la doble hélice del tipo B al A (Ivanova A. et al, 2007). La conformación del LNA® permite un apilamiento mucho mejor y por lo tanto una mayor estabilidad. Mediante el aumento de la estabilidad del dúplex, la integración de monómeros de LNA® en la secuencia de oligonucleótidos permite un aumento de la temperatura de fusión (Tf) del dúplex. Por lo tanto, es posible reducir el tamaño de la sonda, lo que aumenta la especificidad de la sonda y ayuda a diseñar la misma (Karkare S. et al., 2006).

Sondas de Baliza Molecular: Las Balizas Moleculares son sondas que contienen una estructura de tallo-lazo, con un fluoróforo y un desactivador de fluorescencia en sus extremos 5' y 3', respectivamente. El tallo suele tener 6 bases de longitud, debería consistir principalmente en C y G, y mantiene la sonda en la configuración de horquilla (Li Y. et al., 2008). La secuencia de 'tallo' mantiene el fluoróforo y el desactivador de fluorescencia muy próximos entre sí, pero solo en ausencia de una secuencia complementaria a la secuencia de 'lazo'. Mientras el fluoróforo y el desactivador de fluorescencia están muy próximos entre sí, el desactivador de fluorescencia absorbe cualquier fotón emitido por el fluoróforo. Este fenómeno se denomina desactivación de fluorescencia de colisión (o de proximidad). En presencia de una secuencia complementaria, la Baliza se despliega y se hibrida con la diana, y entonces el fluoróforo se aleja del desactivador de fluorescencia, de modo que ya no puede absorber los fotones emitidos por el fluoróforo, y la sonda comienza a emitir fluorescencia. La cantidad de señal es proporcional a la cantidad de secuencia diana, y se mide en tiempo real para permitir la cuantificación de la cantidad de secuencia diana (Takacs T. et al, 2008). El aumento en la fluorescencia que se produce es reversible (a diferencia de las sondas TaqMan®), ya que no hay escisión de la sonda, que se puede cerrar de nuevo en la estructura de horquilla a baja temperatura. La estructura del tallo añade especificidad a este tipo de sonda, ya que el híbrido formado entre la sonda y la diana ha de ser más fuerte que la asociación del tallo intramolecular. Un buen diseño de Balizas Moleculares puede dar buenos resultados; sin embargo, la señal puede ser deficiente, ya que no se produce ninguna separación física entre el fluoróforo y el desactivador de fluorescencia. Las Balizas Moleculares de Cambio de Longitud de Onda son más brillantes que las Balizas Moleculares estándar debido a una mayor intensidad de fluorescencia del fluoróforo emisor. Estas sondas contienen un fluoróforo recolector que presenta una fuerte absorción en el rango de longitudes de onda de la fuente de luz monocromática, un fluoróforo emisor del color de emisión deseado y un desactivador de fluorescencia no fluorescente (oscuro). En ausencia de dianas de ácido nucleico complementarias, las sondas no

son fluorescentes, mientras que en presencia de dianas, emiten fluorescencia, no en el rango de emisión del fluoróforo recolector, que absorbe la luz, sino en el rango de emisión del fluoróforo emisor. Este cambio en el espectro de emisión se debe a la transferencia de la energía absorbida desde el fluoróforo recolector al fluoróforo emisor por FRET, que solo tiene lugar en sondas que están unidas a las dianas. Las Balizas Moleculares de Cambio de Longitud de Onda son sustancialmente más brillantes que las Balizas Moleculares convencionales, que no pueden absorber eficientemente la energía de la fuente de luz monocromática disponible (Tyagi S. et al, 2000).

Cebadores Scorpions®: Los cebadores Scorpions® son adecuados tanto para PCR en Tiempo Real cuantitativa como para genotipado/análisis de punto final de dianas de ADN específicas. Se trata de cebadores de PCR con una cola de "tallo-lazo" que consiste en una secuencia de sonda específica, un fluoróforo y un desactivador de fluorescencia. La cola de "tallo-lazo" está separada de la secuencia del cebador de PCR por un "bloqueador de PCR", una modificación química que evita que la polimerasa Taq copie la secuencia del tallo lazo del cebador Scorpions®. Dicha ultralectura conduciría a una apertura inespecífica del lazo, produciendo una señal fluorescente inespecífica. El lazo de la horquilla está unido al extremo 5' de un cebador a través de un bloqueador de PCR. Después de la extensión del cebador durante la amplificación por PCR, la secuencia de la sonda específica se puede unir a su complemento dentro de la misma cadena de ADN. Este evento de hibridación abre el lazo de la horquilla, de modo que la fluorescencia ya no se desactiva y se observa un aumento en la señal. El sondeo unimolecular es cinéticamente favorable y altamente eficiente. La unión covalente de la sonda al amplicón diana asegura que cada sonda tenga una diana en sus inmediaciones. No se requiere escisión enzimática, lo que reduce el tiempo necesario para la señalización en comparación con las sondas TaqMan®, que se han de unir y dividir antes de que se observe un aumento de la fluorescencia. Hay tres tipos de cebadores Scorpions®. Standard Scorpions®, que consisten en una sonda bi-etiquetada con un colorante fluorescente en el extremo 5' y un desactivador de fluorescencia interno no fluorescente. FRET Scorpions®, para uso en un sistema LightCycler®. Como el sistema capilar solo se excitará a 470 nm (longitud de onda de absorción de FAM), es necesario incorporar un FAM dentro del tallo. Se dispone un ROX en el extremo 5' del cebador Scorpions®, el FAM se excita y pasa su energía al ROX. También se han desarrollado Duplex Scorpions® para proporcionar una intensidad de señal mucho mejor que el formato de Scorpions® normal. En Standard Scorpions®, el desactivador de fluorescencia y el fluoróforo permanecen dentro de la misma cadena de ADN y se puede producir cierta desactivación de fluorescencia incluso en forma abierta. En el Duplex Scorpions® el desactivador de fluorescencia está en un oligonucleótido diferente y la separación física entre el desactivador de fluorescencia y el fluoróforo aumenta considerablemente, reduciendo la desactivación de fluorescencia cuando la sonda se une a la diana.

Sondas de hibridación (también llamadas sondas FRET): Roche ha desarrollado sondas de hibridación (Caplin et al. 1999) para utilizarlas con su LightCycler®. Dos sondas están diseñadas para unirse una junto a la otra en el amplicón. Una tiene una etiqueta 3' de FAM, mientras que la otra tiene un colorante 5' LC, LC rojo 640 o 705. Cuando las sondas no están unidas a la secuencia diana, la señal fluorescente del colorante indicador no se detecta. Sin embargo, cuando las sondas se hibridan con la secuencia diana durante la etapa de reasociación de PCR, la proximidad de los dos fluoróforos permite la transferencia de energía del donador al colorante aceptor, dando como resultado una señal fluorescente, que es detectada.

Sondas TaqMan® MGB®: Las sondas TaqMan® MGB® han sido desarrolladas por Epoch Biosciences (Bothell, EE. UU.) y Applied Biosystems (Foster City, EE. UU.). Se unen al surco menor de la hélice de ADN con gran especificidad y afinidad. Cuando la sonda TaqMan® MGB® se complementa con ADN, forma un dúplex muy estable con ADN. La sonda porta el resto MGB® en el extremo 3'. La MGB aumenta fuertemente la Tf de la sonda, permitiendo diseños más cortos y por lo tanto más específicos. La sonda funciona particularmente bien con regiones ricas en A/T y tiene muy buenos resultados en la detección de SNP (Walburger et al., 2001). También puede ser una buena alternativa cuando se intenta diseñar una sonda que debería estar ubicada en la unión de empalme (para lo que las sondas convencionales son difíciles de diseñar). Las sondas más pequeñas se pueden diseñar con una Tf tal como 65-67 °C, lo que produce una mejor distinción (la sonda es más específica para un solo apareamiento erróneo). Una buena alternativa a las sondas MGB son las sondas LNA®, en las que el aumento de la Tf inducido por la adición de bases LNA® es específico, al contrario que el resto MGB (véase p. 15). Durante la etapa de extensión de cebador, la actividad de exonucleasa 5' de la polimerasa Taq escinde la sonda hibridada y se observa un aumento en la fluorescencia. La fluorescencia de la sonda escindida durante la PCR se controla en Tiempo Real mediante el termociclador.

Sondas MGB Eclipse®: Las sondas MGB Eclipse®, también conocidas como QuantiProbes, fueron desarrolladas originalmente por Epoch Biosciences (Bothell, EE. UU.). Las sondas MGB Eclipse® portan un resto de ligante de surco menor que permite el uso de sondas cortas para una especificidad muy alta. Se trata de sondas lineales cortas que tienen un ligante de surco menor y un desactivador de fluorescencia en el extremo 5' y un fluoróforo en el extremo 3'. Esta es la orientación opuesta a las sondas TaqMan® MGB® y se cree que el ligante de surco menor evita que la actividad exonucleasa de la polimerasa Taq escinda la sonda. El desactivador de fluorescencia es un Desactivador de Fluorescencia No Fluorescente también conocido como Eclipse Dark Quencher. La desactivación de fluorescencia se produce cuando el enrollamiento aleatorio de la sonda en la forma libre acerca el desactivador de fluorescencia y el fluoróforo entre sí. La sonda se endereza cuando se une a su diana y se reduce la desactivación de fluorescencia, lo que conduce a un aumento de la señal fluorescente. Las tecnologías que se han discutido más arriba son las más utilizadas en la actualidad, pero muchas otras tecnologías se han presentado en

publicaciones, o están disponibles en el mercado, tales como: sondas Resonsense, sondas Light-up, sondas HyBeacon®, cebadores LUX, sondas Yin-yang, o Amplifluor®. Pueden ponerse en contacto con nosotros para más información sobre cualquiera de ellas.

5 La mayoría de los termocicladores existentes ahora en el mercado ofrecen características similares. Por regla general, los termocicladores implican un formato de capilares de vidrio, tubos de plástico, placas de 96 pocillos o placas de 384 pocillos. El termociclador también implica un análisis por software.

En general, la PCR cuantitativa implica el uso de:

- 10 - Polimerasa Taq: Una polimerasa HotStart Taq está inactiva a bajas temperaturas (temperatura ambiente). Un calentamiento a 95 °C durante varios minutos, generalmente de 5 a 10, activa la enzima, y la amplificación puede comenzar una vez que los cebadores están reasociados. La enzima no está activa hasta que se desnaturaliza todo el ADN. Existen dos modificaciones principales de HotStart, el Taq bloqueado por anticuerpos y el Taq bloqueado químicamente. El Taq bloqueado por anticuerpos está inactivo porque está unido a un inhibidor termolábil que se desnaturaliza durante la etapa inicial de la PCR. El Taq bloqueado químicamente proporciona una clara ventaja sobre el Taq bloqueado por anticuerpos, ya que es completamente inactivo a 60 °C (la temperatura de hibridación de los cebadores), evitando así la formación de amplificación inespecífica y reduciendo la formación de dímeros de cebador.
- 15 - dNTP/dUTP: Algunos *kits* contienen una mezcla de dNTP y dUTP, otros solo contienen dNTP. El uso únicamente de dNTP aumenta la sensibilidad. La razón de ello consiste en que la Taq incorpora dNTP más fácilmente que dUTP. Sin embargo, el uso de una mezcla que contiene dUTP proporciona seguridad al ensayo en caso de contaminación de un producto de PCR anterior. Esta contaminación se puede eliminar gracias a la actividad de UNG en asociación con las dUTP incorporadas.
- 20 - Uracil-N-Glicosilasa: La Uracil-N-Glicosilasa es una enzima que hidroliza todo el ADN monocatenario y bicatenario que contiene dUTP. En consecuencia, si todas las amplificaciones por PCR se realizan en presencia de una mezcla de dNTP/dUTP, cualquier producto de PCR anterior se puede eliminar llevando a cabo una etapa UNG antes de cada ejecución.
- 25 - Colorante de referencia ROX: Algunos termocicladores requieren MasterMix que contiene colorante ROX para la normalización. Este es el caso de las máquinas ABI y Eppendorf, y es opcional en las máquinas Stratagene. Si se trabaja con estas máquinas, es más fácil trabajar con el colorante ROX ya incorporado en el MasterMix en lugar de añadirlo manualmente. Esto garantiza un mayor nivel de reproducibilidad y homogeneidad de los ensayos.
- 30 - Fluoresceína: para las máquinas iCycler iQ®, My iQ® e iQ5 (termocicladores BioRad), el método de normalización para el ensayo SYBR® Green utiliza Fluoresceína para crear un "fondo virtual". Al igual que en el caso del ROX, es mejor y más fácil utilizar un MasterMix que contenga Fluoresceína previamente diluida, lo que garantiza una mayor reproducibilidad y homogeneidad de los ensayos.
- 35 - MgCl₂: El MgCl₂ es necesario para la actividad de Taq. La concentración de MgCl en MasterMixes se optimiza de acuerdo con la cantidad de Taq y también la composición del tampón. Sin embargo, a veces puede ser necesario agregar MgCl₂ y la mayoría de los MasterMixes incluyen un tubo adicional de MgCl₂.
- 40 - Colorante de color inerte: Algunos tampones también incluyen un colorante de color inerte para permitir la visualización del tampón cuando se carga en los pocillos. Este colorante de color no tiene ningún efecto en la sensibilidad del ensayo y es una herramienta de trabajo conveniente. Se ha de tener en cuenta que dichas mezclas, en combinación con las placas de plástico blancas, proporcionan mejores niveles de fluorescencia y una forma de trabajar realmente sencilla.
- 45 Unos cebadores y sondas bien diseñados son un requisito previo para el éxito de una PCR cuantitativa. Mediante el uso de cebadores y sondas bien diseñados se pueden obtener eficiencias de PCR de un 100%. Por lo general, los cebadores se diseñan utilizando un *software* de diseño (por ejemplo, el Oligo® Primer Analysis Software). La mayoría de los *softwares* de termocicladores ofrecen ahora herramientas para ayudar en el diseño de cebadores con las mejores características. Algunos de los mejores *softwares* son Beacon Designer, Primer Express y DNA Star ...
- 50 Algunas otras herramientas están disponibles gratuitamente en la web, por ejemplo:

- <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/> (base de datos de sondas y cebadores humanos)
- <http://firontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/> (para probar estructuras secundarias)
- <http://www.ebi.ac.uk/~lenov/meltinghome.html> (calculadoras de Tf)
- http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

- <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2>
- <http://www.premierbiosoft.com/qpcr/index>

Por regla general, la Q PCR implica la preparación de una curva patrón para cada secuencia de ácido nucleico diana amplificada. De hecho, la preparación de una curva patrón puede proporcionar una buena idea del rendimiento de la qPCR y, por lo tanto, sirve como control de calidad. La curva patrón debería cubrir el rango completo de la expresión esperada. Utilizando material estándar, la curva patrón debería incluir al menos 5 puntos de dilución, cada uno de ellos por duplicado (al menos). El rango de dilución de 10 o 2 veces debería cubrir el rango más grande de niveles de expresión. El trazado de estos puntos en una curva patrón determinará la linealidad, la eficiencia, la sensibilidad y la reproducibilidad del ensayo. De acuerdo con la presente invención, la curva patrón se prepara a partir de una muestra de ADN genómico. Tal como se usa en la presente memoria, "muestra de ADN genómico" o "ADNg" se refiere a una muestra de ADN genómico preparada a partir de una preparación de ADN. Los métodos para la purificación de ADN son muy conocidos en la técnica. El ADN genómico se puede preparar a partir de una célula que sea del mismo organismo que la célula utilizada para preparar la muestra de ácido nucleico de la invención (es decir, una célula humana). Además, la célula a partir de la cual se prepara la muestra genómica debe presentar la misma ploidía que la célula utilizada para preparar la muestra de ácido nucleico de la invención; es decir, las células presentan las mismas anomalías cromosómicas (por ejemplo, en caso de células cancerosas). Por regla general, la muestra de ADN genómico se prepara a partir de una célula para la cual el DII tal como se define más arriba es de aproximadamente 1.

Valores de referencia correspondientes predeterminados:

Por regla general, el valor de referencia correspondiente predeterminado puede ser relativo a un número o valor derivado de estudios de población, incluidos, entre otros, individuos del mismo o similar rango de edad, individuos del mismo o similar grupo étnico, individuos con riesgo de cáncer e individuos que presentan la misma gravedad de cáncer. Dichos valores de referencia correspondientes predeterminados se pueden derivar de análisis estadísticos y/o de datos de predicción de riesgo de poblaciones obtenidos a partir de algoritmos matemáticos e índices calculados de la enfermedad.

Por regla general, el valor de referencia correspondiente predeterminado es un valor umbral o un valor de corte. Un "valor umbral" o "valor de corte" se puede determinar experimental, empírica o teóricamente. Un valor umbral también se puede seleccionar arbitrariamente sobre la base de las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, tal como lo reconocería un experto en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la medición retrospectiva del nivel de expresión del marcador de interés (por ejemplo, relación de contenido de ADNCmCn, relación DII MITO/DII NUC, concentración total de ADNlc nuclear) en muestras históricas de individuos correctamente acumuladas para establecer el valor de referencia correspondiente predeterminado. En algunas realizaciones, el valor de referencia correspondiente predeterminado es la mediana medida en la población de los individuos para el marcador de interés (por ejemplo, relación de contenido de ADNCmCn, relación DII MITO/DII NUC, concentración total de ADNlc nuclear). En algunas realizaciones, el valor umbral se debe determinar para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas de acuerdo con la función de la prueba y el balance beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falso positivo y falso negativo). Por regla general, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) se pueden determinar utilizando una curva Característica Operativa del Receptor (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar el nivel de expresión del marcador de interés (por ejemplo, relación de contenido de ADNCmCn, relación DII MITO/DII NUC, concentración total de ADNlc nuclear) en un grupo de referencia, se puede utilizar un análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de los niveles de expresión determinados en las muestras que se han de probar, para de este modo obtener un patrón de clasificación significativo para la clasificación de la muestra. El nombre completo de la curva ROC es curva característica del operador del receptor, que también se conoce como curva característica operativa del receptor. Se utiliza principalmente para pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. La curva ROC es un indicador integral que refleja las variables continuas de la tasa de positivos reales (sensibilidad) y la tasa de positivos falsos (1-especificidad). Revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imágenes. Una serie de valores de corte diferentes (umbrales o valores críticos, valores límite entre los resultados normales y anómalos de la prueba de diagnóstico) se establece como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad se utiliza después como la coordenada vertical y la especificidad se utiliza como la coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuanto mayor es el área bajo la curva (ABC), mayor es la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano a la esquina superior izquierda del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores tanto de alta sensibilidad como de alta especificidad. El valor ABC de la curva ROC está entre 1,0 y 0,5. Cuando $ABC > 0,5$, el resultado del diagnóstico mejora progresivamente a medida que el ABC se aproxima a 1. Cuando el ABC está entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando la ABC está entre 0,7 y 0,9, la precisión es moderada. Cuando la ABC es mayor de 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Para dibujar la curva ROC se pueden utilizar *softwares* o sistemas existentes en la técnica, tales como: el software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT VI.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Md., EE. UU.), etc.

En algunas realizaciones, el valor de referencia correspondiente predeterminado se determina por regla general mediante la realización de un método que comprende las etapas consistentes en:

- a) proporcionar una colección de muestras de individuos;
- 5 b) proporcionar, para cada muestra provista en la etapa a), información relativa al perfil clínico real del individuo (sano o con cáncer);
- c) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios;
- d) determinar el nivel del marcador de interés (por ejemplo, relación de contenido de ADNCmCn, relación DII MITO/DII NUC, concentración total de ADNlc nuclear) para cada muestra incluida en la colección proporcionada en la etapa a);
- 10 e) clasificar dichas muestras de sangre en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico proporcionado en la etapa c), respectivamente: (i) un primer grupo que comprende muestras que presentan un valor de cuantificación para un nivel más bajo que dicho valor de cuantificación arbitrario incluido en el dicha serie de valores de cuantificación; (ii) un segundo grupo que comprende muestras que presentan un valor de cuantificación para dicho nivel que es más alto que dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de
- 15 cuantificación; con lo que se obtienen dos grupos de muestras para dicho valor de cuantificación específico, enumerándose las muestras de cada grupo por separado;
- f) calcular la significación estadística entre (i) el valor de cuantificación obtenido en la etapa e) y (ii) el perfil clínico real de los individuos de los que se derivan las muestras incluidas en el primer y segundo grupo definidos en la etapa f);
- 20 g) repetir las etapas f) y g) hasta haber probado cada valor de cuantificación arbitrario proporcionado en la etapa d);
- h) establecer dicho valor de referencia correspondiente predeterminado como el valor de cuantificación arbitrario para el que se ha calculado la mayor significación estadística (el más significativo) en la etapa g).

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el valor de referencia correspondiente predeterminado permite la distinción entre individuos sanos e individuos que padecen cáncer. En la práctica, los valores de alta significación estadística (por ejemplo, valores P bajos) se obtienen generalmente para un rango de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no solo para un único valor de cuantificación arbitrario. Por lo tanto, en una realización alternativa de la invención, en lugar de utilizar un valor de referencia correspondiente predeterminado definitivo se proporciona un rango de valores. Por consiguiente, se establece arbitrariamente un valor de significación estadística mínima (umbral mínimo de significación, por ejemplo, valor P umbral máximo) y se conserva un rango de una pluralidad de valores de cuantificación arbitrarios para los cuales el valor de significación estadística calculado en la etapa g) es mayor (más significativo, por ejemplo, valor P más bajo), con lo que se proporciona un rango de valores de cuantificación. Este rango de valores de cuantificación incluye un valor "de corte" tal como se ha descrito más arriba. Por ejemplo, de acuerdo con esta realización específica de un valor "de corte", el diagnóstico se puede determinar comparando el nivel del marcador de interés (por ejemplo, relación de contenido de ADNCmCn, relación DII MITO/DII NUC, concentración total de ADNlc nuclear) con el rango de valores identificados. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, un valor de corte consiste en un rango de valores de cuantificación, por ejemplo centrado en el valor de cuantificación para el que se ha encontrado el valor de significación estadística más alto (por ejemplo, generalmente el valor p mínimo encontrado). Por ejemplo, en una escala hipotética de 1 a 10, si el valor de corte ideal (el valor con la mayor significación estadística) es 5, un rango adecuado (ejemplar) puede ser de 4-6. Por lo tanto, un individuo puede ser evaluado comparando valores obtenidos a través de la medición del nivel del marcador de interés (por ejemplo, relación de contenido de ADNCmCn, relación DII MITO/DII NUC, concentración total de ADNlc nuclear), en donde los valores mayores (o menores, dependiendo del marcador seleccionado) de 5 revelan que el individuo padece cáncer y los valores menores (o mayores, dependiendo del marcador seleccionado) de 5 revelan que el individuo no padece cáncer. En algunas realizaciones, un individuo puede ser explorado en busca de un cáncer comparando los valores obtenidos a través de la medición del nivel del marcador de interés (por ejemplo, relación de contenido de ADNCmCn, relación DII MITO/DII NUC, concentración total de ADNlc nuclear) y comparando los valores en una escala, en donde los valores mayores (o menores, dependiendo del marcador seleccionado) que el rango de 4-6 indican que el individuo padece un cáncer y los valores menores (o mayores, dependiendo del marcador seleccionado) que el rango de 4-6 indican que el individuo no padece un cáncer, y los valores que entran dentro del rango de 4-6 indican que se requiere más investigación para determinar si el individuo padece un cáncer.

Aplicaciones terapéuticas:

El método de la presente invención permite distinguir a individuos sanos de individuos que padecen un cáncer. Después se busca el origen del cáncer en el individuo para determinar su ubicación y estadio. Un método para investigar la ubicación del cáncer por regla general implica técnicas de imagen. Una vez que ha localizado el cáncer

en el individuo, se podrían realizar investigaciones adicionales, como biopsias, para determinar el origen, la diseminación y el estadio del cáncer.

Los métodos de la presente invención también pueden ser adecuados para determinar si un individuo reúne o no las condiciones necesarias para un tratamiento anticanceroso. Por regla general, un tratamiento anticanceroso consiste en radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia o una combinación de las mismas. El tratamiento también puede consistir en una terapia adyuvante (es decir, tratamiento después de la resección quirúrgica del tumor primario), o en una terapia neoadyuvante (es decir, tratamiento antes de la resección quirúrgica del tumor primario).

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención son adecuados para determinar si un individuo reúne o no las condiciones necesarias para un tratamiento con un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, cuando se determina que el individuo tiene un diagnóstico deficiente, el médico puede optar por administrarle un agente quimioterapéutico.

El concepto "agente quimioterapéutico" se refiere a compuestos químicos que son eficaces para inhibir el crecimiento de tumores. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfanón y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamilaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calliestatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial caliqueamicina (11 y caliqueamicina 211, véase, por ejemplo, Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una espiramicina; así como cromóforo de neocarzinoestatina y cromomóforos de antibiótico de enediina cromoproteína relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinoestatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminogluteimida, mitotano, trilostano; regenerador de ácido fólico, tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentoestatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (en especial toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbine; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-1 1; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. En esta definición también están incluidos agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en tumores, tales como los antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifen, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención son adecuados para determinar si un individuo reúne o no las condiciones necesarias para una terapia dirigida. Por ejemplo, cuando se determina que el individuo tiene un diagnóstico deficiente, el médico puede optar por administrarle una terapia dirigida.

Las terapias dirigidas contra el cáncer son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la propagación del cáncer al interferir con moléculas específicas ("dianas moleculares") que intervienen en el crecimiento, la

progresión y la propagación del cáncer. Las terapias dirigidas contra el cáncer se designan a veces como "fármacos dirigidos molecularmente", "terapias dirigidas molecularmente", "medicamentos de precisión" o nombres similares.

En algunas realizaciones, la terapia dirigida consiste en administrar al individuo un inhibidor de la tirosina quinasa. El concepto "inhibidor de la tirosina quinasa" se refiere a cualquiera de una variedad de agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de las tirosina quinasa receptoras y/o no receptoras. Los inhibidores de la tirosina quinasa y los compuestos relacionados son muy conocidos en la técnica y se describen en la publicación de patente de EE. UU. 2007/0254295, que se incorpora en su totalidad por referencia en la presente memoria. Un experto en la técnica entenderá que un compuesto relacionado con un inhibidor de la tirosina quinasa recapitulará el efecto del inhibidor de la tirosina quinasa, por ejemplo, el compuesto relacionado actuará sobre un miembro diferente de la vía de señalización de la tirosina quinasa para producir el mismo efecto que un inhibidor de la tirosina quinasa de dicha tirosina quinasa. Los ejemplos de inhibidores de la tirosina quinasa y compuestos relacionados adecuados para su uso en métodos de realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a dasatinib (BMS-354825), PP2, BEZ235, saracatinib, gefitinib (Iressa), sunitinib (Sutent; SU11248), erlotinib (Tarceva; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec; ST1571), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima; ZD6474), MK-2206 (clorhidrato de 8- [4-aminociclobutil]fenil]-9-fenil-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naftiridin-3(2H)-ona) derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 2007/0254295 y en las patentes de EE. UU. n° 5,618,829, 5,639,757, 5,728,868, 5,804,396, 6,100,254, 6,127,374, 6,245,759, 6,306,874, 6,313,138, 6,316,444, 6,329,380, 6,344,459, 6,420,382, 6,479,512, 6,498,165, 6,544,988, 6,562,818, 6,586,423, 6,586,424, 6,740,665, 6,794,393, 6,875,767, 6,927,293 y 6,958,340, todas ellas incorporadas en su totalidad por referencia en la presente memoria, se describen inhibidores de la tirosina quinasa adicionales y compuestos relacionados adecuados para su uso en la presente invención. En determinadas realizaciones, el inhibidor de la tirosina quinasa es un inhibidor de quinasa de molécula pequeña que ha sido administrado por vía oral y que ha sido objeto de al menos un ensayo clínico de Fase I, más preferiblemente de al menos un clínico de Fase II, incluso más preferiblemente de al menos un ensayo clínico de Fase III, y de forma totalmente preferible aprobado por la FDA para al menos una indicación hematológica u oncológica. Algunos ejemplos de dichos inhibidores incluyen, pero no se limitan a Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Canertinib, BMS-599626 (AC-480), Neratinib, KRN-633, CEP-11981, Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, AZM-475271, CP-724714, TAK-165, Sunitinib, Vatalanib, CP-547632, Vandetanib, Bosutinib, Lestaurtinib, Tandutinib, Midostaurina, Enzastaurina, AEE-788, Pazopanib, Axitinib, Motasenib, OSI-930, Cediranib, KRN-951, Dovitinib, Seliciclib, SNS-032, PD-0332991, MKC-I (Ro-317453; R-440), Sorafenib, ABT-869, Brivanib (BMS-582664), SU-14813, Telatinib, SU-6668, (TSU-68), L-21649, MLN-8054, AEW-541 y PD-0325901.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención son adecuados para determinar si un individuo reúne o no las condiciones necesarias para un tratamiento con un agente inmunoterapéutico. Por ejemplo, cuando se determina que el individuo tiene un diagnóstico deficiente, el médico puede optar por administrarle un agente inmunoterapéutico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el concepto "agente inmunoterapéutico" se refiere a un compuesto, composición o tratamiento que indirecta o directamente mejora, estimula o aumenta la respuesta inmunitaria del cuerpo contra las células cancerosas y/o que disminuye los efectos secundarios de otras terapias contra el cáncer. Por lo tanto, la inmunoterapia es una terapia que directa o indirectamente estimula o mejora las respuestas del sistema inmunitario a las células cancerosas y/o disminuye los efectos secundarios que pueden haber sido causados por otros agentes anticancerosos. La inmunoterapia también se designa en la técnica como terapia inmunológica, terapia modificadora de respuesta biológica a terapia biológica y bioterapia. Algunos ejemplos de agentes inmunoterapéuticos comunes conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a citocinas, vacunas contra el cáncer, anticuerpos monoclonales y adyuvantes no citocínicos. Alternativamente, el tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en administrar al individuo una cantidad de células inmunitarias (células T, células NK, células dendríticas, células B...).

Los agentes inmunoterapéuticos pueden ser inespecíficos, es decir, reforzar el sistema inmunitario en general, de modo que el cuerpo humano se vuelve más eficaz en la lucha contra el crecimiento y/o la propagación de las células cancerosas, o pueden ser específicos, es decir, dirigidos a las propias células cancerosas. Los regímenes de inmunoterapia pueden combinar el uso de agentes inmunoterapéuticos inespecíficos y específicos.

Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos son sustancias que estimulan o mejoran indirectamente el sistema inmunitario. Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos se han utilizado solos como terapia principal para el tratamiento del cáncer, así como de forma adicional a una terapia principal, en cuyo caso el agente inmunoterapéutico inespecífico actúa como un adyuvante para mejorar la eficacia de otras terapias (por ejemplo, vacunas contra el cáncer). Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos también pueden actuar en este último contexto para reducir los efectos secundarios de otras terapias, por ejemplo, la supresión de la médula ósea inducida por determinados agentes quimioterapéuticos. Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos pueden actuar sobre células clave del sistema inmunitario y provocar respuestas secundarias, como un aumento de la producción de citocinas e inmunoglobulinas. Alternativamente, los propios agentes pueden comprender citocinas. Los agentes inmunoterapéuticos se clasifican generalmente como citocinas o adyuvantes no citocínicos.

Una serie de citocinas tienen aplicación en el tratamiento del cáncer, bien como inmunoterapias inespecíficas generales diseñadas para reforzar el sistema inmunitario, bien como adyuvantes administrados con otras terapias. Las citocinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a interferones, interleucinas y factores estimulantes de colonias.

5 Los interferones (IFN) contemplados por la presente invención incluyen los tipos comunes de IFN, IFN-alfa (IFN-a), IFN-beta (IFN-beta) e IFN-gamma (IFN-y). Los IFN pueden actuar directamente sobre las células cancerosas, por ejemplo disminuyendo su crecimiento, promoviendo su desarrollo hacia células con un comportamiento más normal y/o aumentando su producción de antígenos, lo que hace que las células cancerosas sean más fáciles de reconocer y destruir por el sistema inmunitario. Los IFN también pueden actuar indirectamente sobre células cancerosas, por ejemplo ralentizando la angiogénesis, reforzando el sistema inmunitario y/o estimulando las células asesinas naturales (NK), las células T y los macrófagos. El IFN-alfa recombinante está disponible comercialmente como Roferon (Roche Pharmaceuticals) e Intron A (Schering Corporation). El uso de IFN-alfa, solo o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos o con agentes quimioterapéuticos, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de diversos cánceres, incluyendo melanoma (incluyendo melanoma metastásico), cáncer de riñón (incluyendo cáncer de riñón metastásico), cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de cuello uterino (incluyendo cáncer de cuello uterino metastásico).

Las interleucinas contempladas por la presente invención incluyen IL-2, IL-4, IL-11 e IL-12. Algunos ejemplos de interleucinas recombinantes disponibles comercialmente incluyen Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) y Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Washington) está probando actualmente una forma recombinante de IL-21, que también se contempla para utilizarla en las combinaciones de la presente invención. Las interleucinas, solas o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos o con agentes quimioterapéuticos, han demostrado ser eficaces en el tratamiento de diversos cánceres, incluyendo cáncer de riñón (incluyendo cáncer de riñón metastásico), melanoma (incluyendo melanoma metastásico), cáncer de ovario (incluyendo cáncer de ovario recurrente), cáncer de cuello uterino (incluyendo cáncer de cuello uterino metastásico), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro y cáncer de próstata.

Las interleucinas también han mostrado una buena actividad en combinación con IFN-alfa en el tratamiento de diversos cánceres (Negrier et al., Ann Oncol. 2002 13 (9): 1460-8; Tourani et al., J. Clin. Oncol. 2003 21(21): 3987-94).

Los factores estimulantes de colonias (CSF) contemplados por la presente invención incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o filgrastim), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF o sargramostim) y la eritropoyetina (epoetina alfa, darbepoetina). El tratamiento con uno o más factores de crecimiento puede ayudar a estimular la generación de nuevas células sanguíneas en individuos sometidos a quimioterapia tradicional. Por consiguiente, el tratamiento con CSF puede ser útil para disminuir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y puede permitir el uso de dosis mayores de agentes quimioterapéuticos. Diversos factores estimulantes de colonias recombinantes están disponibles comercialmente, por ejemplo Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pegfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (eritropoyetina; Ortho Biotech), Epogen (eritropoyetina; Amgen), Arnesp (eritropoyetina). Algunos factores estimulantes de colonias han demostrado ser eficaces en el tratamiento de cánceres, incluyendo melanoma, cáncer colorrectal (incluyendo cáncer colorrectal metastásico) y cáncer de pulmón.

Los adyuvantes no citocínicos adecuados para utilizarlos en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a Levamisol, hidróxido de alumbre (alumbre), bacilo Calmette-Guerin (ACG), Adyuvante de Freund incompleto (IFA), QS-21, DETOX, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) y dinitrofenilo (DNP). Los adyuvantes no citocínicos en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos y/o quimioterapéuticos han demostrado ser eficaces contra diversos cánceres, incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon y cáncer colorrectal (Levamisol); melanoma (BCG y QS-21); cáncer de riñón y cáncer de vejiga (BCG).

Además de tener dianas específicas o no específicas, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser activos, es decir, estimular la respuesta inmunitaria propia del cuerpo, o pueden ser pasivos, es decir, comprender componentes del sistema inmunitario generados fuera del cuerpo.

Por regla general, la inmunoterapia específica pasiva implica el uso de uno o más anticuerpos monoclonales que son específicos para un antígeno particular que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa o que son específicos para un factor de crecimiento celular en particular. Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer de diversos modos, por ejemplo para mejorar la respuesta inmunitaria de un individuo a un tipo específico de cáncer, para interferir en el crecimiento de las células cancerosas dirigiéndose a factores de crecimiento celular específicos, como los que intervienen en la angiogénesis, o mejorando el suministro de otros agentes anticancerosos a células cancerosas cuando están unidos o conjugados con agentes tales como agentes quimioterapéuticos, partículas radiactivas o toxinas.

Los anticuerpos monoclonales utilizados actualmente como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer que son adecuados para su inclusión en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (C-225, Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®) y BL22. Los

anticuerpos monoclonales se utilizan en el tratamiento de una amplia gama de cánceres, incluido cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico avanzado), cáncer colorrectal (incluyendo cáncer colorrectal avanzado y/o metastásico), cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, melanoma y tumores cerebrales. Otros ejemplos incluyen anticuerpos anti-CTLA4 (por ejemplo, Ipilimumab), anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-PDL1, anticuerpos anti-TIMP3, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7H3, anticuerpos anti-B7H4 o anticuerpos anti-B7H6.

Por regla general, la inmunoterapia específica activa implica el uso de vacunas contra el cáncer. Se han desarrollado vacunas contra el cáncer que comprenden células cancerosas enteras, partes de células cancerosas o uno o más antígenos derivados de células cancerosas. Algunas vacunas contra el cáncer, solas o en combinación con uno o más agentes inmunoterapéuticos o quimioterapéuticos, están siendo investigadas en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo melanoma, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón. Algunos agentes inmunoterapéuticos inespecíficos son útiles en combinación con vacunas contra el cáncer para mejorar la respuesta inmunitaria del cuerpo.

El tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en una inmunoterapia adoptiva de acuerdo con la descripción de Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley y Steven A. Rosenberg "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volumen 12, abril de 2012). En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos circulantes del individuo o los linfocitos infiltrados en el tumor se aíslan *in vitro*, se activan mediante linfocinas tales como la IL-2 o se exudan con genes para necrosis tumoral, y se vuelven a administrar (Rosenberg et al., 1988; 1989). De forma totalmente preferible, los linfocitos activados son las células del propio individuo previamente aisladas de una muestra de sangre o de tumor y activadas (o "expandidas") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y de carcinoma renal.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención son adecuados para determinar si un individuo reúne o no las condiciones necesarias para un tratamiento con un agente radioterapéutico. Por ejemplo, cuando se determina que el individuo tiene un diagnóstico deficiente, el médico puede optar por administrarle un agente radioterapéutico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el concepto "agente radioterapéutico" tiene la finalidad de referirse a cualquier agente radioterapéutico conocido por un experto en la técnica por ser eficaz para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el agente radioterapéutico puede ser un agente tal como los administrados en braquiterapia o terapia por radionucleidos. Dichos métodos también pueden comprender opcionalmente la administración de una o más terapias contra el cáncer adicionales, tales como, entre otras, quimioterapias y/u otra radioterapia.

Los métodos de la presente invención también son adecuados para determinar la eficacia de un tratamiento anteriormente mencionado en el individuo.

En particular, la presente invención se refiere además a un método para determinar si un individuo logra una respuesta con un tratamiento (tal como se ha mencionado más arriba) que comprende las etapas (o una de cada) consistentes en i) determinar la relación de contenido de ADN_{CmCn} antes del tratamiento, ii) determinar la relación de contenido de ADN_{CmCn} después del tratamiento, iii) comparar la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i) con la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa ii) y concluir que el individuo logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa ii) es mayor que la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i), o concluir que el individuo no logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa ii) está por encima de la misma o es menor que la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i).

En particular, la presente invención se refiere además a un método para determinar si un individuo logra una respuesta con un tratamiento (tal como se ha mencionado más arriba) que comprende las etapas consistentes en i) determinar la relación DII MITO/DII NUC antes del tratamiento, ii) determinar la relación DII MITO/DII NUC después del tratamiento, iii) comparar la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) con la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) y concluir que el individuo logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) es menor que la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i), o concluir que el individuo no logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) está por encima de la misma o es mayor que la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i).

En particular, la presente invención se refiere además a un método para determinar si un individuo logra una respuesta con un tratamiento (tal como se ha mencionado más arriba) que comprende las etapas (o una de cada) consistentes en i) determinar la relación de contenido de ADN_{CmCn} antes del tratamiento, ii) determinar la relación de contenido de ADN_{CmCn} después del tratamiento, iii) comparar la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i) con la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa ii) y concluir que el individuo logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa ii) es mayor que la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i), o concluir que el individuo

no logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa ii) está por encima de la misma o es menor que la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i).

5 En particular, la presente invención se refiere además a un método para determinar si un individuo logra una respuesta con un tratamiento (tal como se ha mencionado más arriba) que comprende las etapas consistentes en i) determinar la relación DII MITO/DII NUC antes del tratamiento, ii) determinar la relación DII MITO/DII NUC después del tratamiento, iii) comparar la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) con la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) y concluir que el individuo logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) es menor que la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i), o concluir que el individuo no logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) está por encima de la misma o es mayor que la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i).

15 Los métodos de la presente invención arriba mencionados son particularmente adecuados para distinguir al respondedor del no respondedor. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "respondedor" en el contexto de la presente descripción se refiere a un individuo que logrará una respuesta, es decir, un individuo en el que el cáncer se erradica, reduce o mejora, o se estabiliza de modo que la enfermedad no progresa después del tratamiento. En los respondedores, en los que el cáncer se estabiliza, el período de estabilización es tal que la calidad de vida y/o la esperanza de vida de los individuos aumenta (por ejemplo, enfermedad estable durante más de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses) en comparación con un individuo que no recibe el tratamiento. Los individuos no respondedores o resistentes al tratamiento incluyen individuos en los que el cáncer no muestra reducción o mejoría después del tratamiento. Opcionalmente, la caracterización del individuo como respondedor o no respondedor se puede realizar por referencia a un patrón o un conjunto de adiestramiento. El patrón puede consistir en el perfil de un individuo del que se sabe que es respondedor o no respondedor, o alternativamente puede consistir en un valor numérico. Dichos patrones predeterminados se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada, como una lista o diagrama impreso, un programa de *software* de ordenador, u otros medios. Cuando se concluye que el individuo es no respondedor, el médico podría tomar la decisión de interrumpir el tratamiento para evitar más efectos secundarios adversos.

30 En particular, la presente invención se refiere además a un método para determinar si un individuo que ha padecido un cáncer tiene una recaída después de un tratamiento (tal como se ha mencionado más arriba e incluyendo la resección del tumor) que comprende las etapas (o una de cada) consistentes en i) determinar la relación de contenido de ADN_{CmCn} después del tratamiento, ii) comparar la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i) con un valor de referencia correspondiente predeterminado, iii) y concluir que el individuo tiene una recaída cuando la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no ha recaído cuando la relación de contenido de ADN_{CmCn} determinada en la etapa i) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.

40 En particular, la presente invención se refiere además a un método para determinar si un individuo que ha padecido un cáncer tiene una recaída después de un tratamiento (tal como se ha mencionado más arriba e incluyendo la resección del tumor) que comprende las etapas consistentes en i) determinar la relación DII MITO/DII NUC, ii) comparar la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) con un valor de referencia correspondiente predeterminado, iii) y concluir que el individuo tiene una recaída cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no ha recaído cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recaída" se refiere a la reaparición de un cáncer o de los signos y síntomas de un cáncer después de un período de mejoría en el que no se podía detectar ningún cáncer. La causa de la recaída probable consiste en que algunas de las células cancerosas originales sobrevivieron al tratamiento inicial. Algunas veces, esto se debe a que las células cancerosas se diseminaron a otras partes del cuerpo y eran demasiado pequeñas para ser detectadas durante el seguimiento que se tiene lugar después del tratamiento (metástasis).

50 Por regla general, la relación de contenido de ADN_{CmCn} y/o la relación DII MITO/DII NUC se determina después de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 meses o más después de finalizar el tratamiento.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no han de ser interpretados en modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

Figuras:

55 Figura 1: Diseño de conjunto de cebadores para estudiar la cuantificación y la fragmentación del ADN nuclear y mitocondrial.

- Figura 2: A. Gráfico de puntos de la relación de contenido de ADNCmCn en sangre de individuos sanos (n = 80) y de pacientes con CCR desde el estadio I al IV (n = 146). B. Gráfico de puntos de la relación de contenido de ADNCmCn en sangre de individuos sanos (n = 80) y de pacientes con CCR en los estadios I/II/III (n = 74). C. Gráfico de puntos de la relación de contenido de ADNCmCn en sangre de individuos sanos (n = 80) y de pacientes con CCR en los estadios I/III/III (n = 72).
- Figura 3: A. Capacidad predictiva de diagnóstico de la de la relación de contenido de ADNCmCn para distinguir plasma de pacientes con CCR (n = 138) y de individuos sanos (n = 80). Representación de la curva ROC derivada del análisis logístico univariante correspondiente al ADNlc total (ABC = 0,98). B. Capacidad predictiva de diagnóstico de la relación de contenido de ADNCmCn para distinguir plasmas de pacientes con CCR en los estadios I-III (n = 74) y de individuos sanos (n = 80). Representación de la curva ROC derivada del análisis logístico univariante correspondiente al ADNlc total (ABC = 0,98). C. Capacidad predictiva de diagnóstico de la relación de contenido de ADNCmCn para distinguir plasmas de pacientes con CCR en el estadio IV (n = 72) y de individuos sanos (n = 80). Representación de la curva ROC derivada del análisis logístico univariante correspondiente al ADNlc total (ABC = 0,98).
- Figura 4: Gráfico de puntos de la relación de contenido de ADNCmCn en sangre de individuos sanos (n = 80) y de pacientes con cáncer de pulmón desde el estadio I al IV (n = 73).
- Figura 5: Capacidad predictiva de diagnóstico de la relación de contenido de ADNCmCn para distinguir plasma de pacientes con cáncer de pulmón (n = 73) y de individuos sanos (n = 80). Representación de la curva ROC derivada del análisis logístico univariante correspondiente al ADNlc total (ABC = 0,99).
- Figura 6: Valores de la relación de contenido de ADNCmCn determinada en plasma de pacientes con cáncer (círculo) y de individuos sanos (cuadrado).
- Figura 7: Comparación entre la concentración de ADN mitocondrial circulante en la sangre de individuos sanos (n = 80) y de pacientes con cáncer (n = 207).
- Figura 8: A. Comparación entre la concentración de ADN nuclear circulante en la sangre de individuos sanos (n = 80) y de pacientes con cáncer (n = 207). B. Capacidad predictiva de diagnóstico de la concentración de ADNlc nuclear para distinguir plasma de pacientes con cáncer (n = 207) y de individuos sanos (n = 80). Representación de la curva ROC derivada del análisis logístico univariante correspondiente al ADNlc total (ABC = 0,82).
- Figura 9: Análisis de la curva ROC del contenido de ADNCm con comparación de 80 pacientes sanos y 207 con cáncer.
- Figura 10: Esquema del diseño del múnrido dirigido a secuencias mitocondriales y nucleares detectadas en el ensayo Q-PCR.
- Figura 11: Comparación de la relación de contenido de ADNCmCn de ADNlc derivado de tumor y no derivado de tumor en ratones con injerto heterólogo HCT 116.
- Figura 12: Comparación de la relación de contenido de ADNCmCn de ADNlc derivado de tumor y no derivado de tumor en ratones con injerto heterólogo de SW620 (n = 14).
- Figura 13: Comparación entre la relación de contenido ADNCmCn en el sobrenadante de varias líneas de células tumorales y líneas de células normales.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Determinación de la relación de contenido de ADNCmCn en individuos sanos y con cáncer.

40 Material y métodos:

Las muestras de sangre de individuos sanos se obtienen en el Etablissement français du sang (convención EFS nº 21/PLER/MTP/INSERM02/2013-0073). La sangre de pacientes con CCR se obtiene del estudio clínico Kplex 1 y Kplex2, habiendo firmado los pacientes un consentimiento informado para el análisis genético de su sangre. También obtuvimos muestras de sangre de cohortes de los centros hospitalarios de Clermont-Ferrand y Limoges en Francia, habiendo firmado los pacientes un consentimiento informado para el análisis genético de su sangre. Las muestras de plasma de cáncer de pulmón proceden del Manchester Hospital (Reino Unido), habiendo firmado los pacientes un consentimiento informado para el análisis genético de su sangre. Las muestras de plasma de cáncer hepatocelular (CHC^o) se obtuvieron en la CHU de Montpellier, habiendo firmado los pacientes un consentimiento informado para el análisis genético de su sangre.

50 Aislamiento de plasma y extracción de ADNlc: Las muestras se manejaron de acuerdo con la pauta preanalítica establecida por nosotros (CCA). Se recogió una muestra de 4 ml de sangre de pacientes en tubos con EDTA. La sangre se centrifugó a 1.200 g a 4 °C en una centrifuga Heraeus Multifuge LR durante 10 min. Los sobrenadantes se

aislaron en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se centrifugaron a 16.000 g a 4 °C durante 10 minutos (Mouliere et al, 2011). Posteriormente, el plasma se manipuló inmediatamente para la extracción de ADN o se almacenó a -80 °C. El ADNlc se extrajo de 200 µl de plasma utilizando el *kit* QIAmp DNA Mini Blood (Qiagen, CA) de acuerdo con el "Protocolo de sangre y fluidos corporales" y nuestro protocolo detallado (Mouliere et al, 2013). Las muestras de ADN se guardaron a -20 °C hasta su uso.

Diseño de cebadores: Los cebadores se diseñaron utilizando el *software* Primer 3 y todas las secuencias se comprobaron en cuanto a autorreasociación o reasociación intermolecular con *software* de plegamiento de ácidos nucleicos (mfold y oligoAnalyzer 1.2). Realizamos análisis de alineación local con el programa BLAST para confirmar la especificidad de los cebadores diseñados. Se sintetizaron oligonucleótidos y se purificaron en HPLC mediante Eurofins (Ebersberg, Alemania) y el control de calidad de los oligonucleótidos se realizó mediante MALDI TOF. Las secuencias y características de los cebadores seleccionados se presentan en la Tabla 1 (SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°: 6; y SEQ ID N°: 7).

NOMBRE DE CEBADOR	SENTIDO	SECUENCIA	Tf	%GC	TAMAÑO DE AMPLICÓN
ADN MITOCONDRIAL					
MIT MT-CO ₃ F	homosentido	GAC CCA CCA ATC ACA TGC	56	55,60	
MIT MT-CO ₃ R 67	antisentido	TGA GAG GGC CCC TGT TAG	58,2	61,1	67
MIT MT-CO ₃ R 296	antisentido	CTC AGA AAA ATC CTG CGA AGA	55,9	42,9	296
ADN MITOCONDRIAL					
KRAS A1 inv	homosentido	GCCTGCTGAAAATGACTGA	54,5		305
KRAS B1 inv	homosentido	CCTTGGGTTTCAAGTTATATC	54		67
KRAS B2 inv	antisentido	CCCTGACATACTCCAAGGA	59,4		

Tabla 1. Características de los cebadores seleccionados para estudiar el ADN libre nuclear y mitocondrial

- 15 Cuantificación de ADN genómico y ADNlc mediante Q-PCR: Nuestros experimentos de Q-PCR siguieron la pauta MIQE (Bustin et al., 2009). En un instrumento CFX96 se llevaron a cabo amplificaciones por Q-PCR al menos por duplicado en un volumen de reacción de 25 µl utilizando el *software* de gestión CFX (Bio-Rad). Cada mezcla de reacción de PCR estaba compuesta por 12,5 µl de mezcla de PCR (Bio-Rad Supermix So Advanced), 2,5 µl de cada cebador de amplificación (0,3 pmol/µl), 2,5 µl de agua analizada por PCR y 5 µl de extracto de ADN. La ciclación térmica consistía en tres etapas repetidas: una etapa de 3 minutos de activación-desnaturalización de polimerasa de arranque en caliente a 95 °C, seguida por 40 ciclos repetidos a 90 °C durante 10 segundos, y después a 60 °C durante 30 segundos. Se obtuvieron curvas de fusión aumentando la temperatura de 55 °C a 105 °C con una lectura de placa cada 0,2 °C. La concentración se calculó a partir de Cq detectada por Q-PCR y también una curva patrón de control en ADN de la línea celular Difi de concentración y número de copias conocidos. Como patrón de
- 20 cuantificación se utilizaron diluciones en serie del ADN genómico de las células Difi, y su concentración y calidad se evaluaron utilizando un espectrofluorímetro Qubit (Invitrogen). La subunidad III de la citocromo c oxidasa (COIII o MTCO3) es 1 de 3 subunidades codificadas por el ADN mitocondrial (ADNmt) (MTCO1, MTCO2, MTCO3) del Complejo respiratorio IV, una enzima de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidante mitocondrial. Como tal, es puramente específica del ADN mitocondrial.
- 25
- 30 Estudio de cuantificación y fragmentación de ADN nuclear y mitocondrial mediante Q-PCR: En la Figura 1 están representados diseños de conjuntos de cebadores nucleares y mitocondriales. Para cada extracto de ADN, se cuantificó por separado un amplicón nuclear *KRAS* corto de 67 pb y un amplicón mitocondrial *MT-CO3* corto de 67 pb. Cada medición se presentó en una curva patrón realizada con el mismo conjunto de cebadores. Cada conjunto de cebadores presenta una eficacia cercana a un 100%. Cada medición se realizó por triplicado.
- 35 Para estudiar la relación relativa entre el ADN mitocondrial y el nuclear, los resultados de la PCR cuantitativa se expresaron como la relación entre el valor medio del ADN mitocondrial de experimentos por triplicado y el valor medio del ADN nuclear de experimentos por triplicado (ADNm/ADNn). Tanto para las curvas patrón de *KRAS* nuclear de 67 pb y 305 pb como para la curva patrón de *MT-CO3* mitocondrial de 67 pb y 296 pb se utilizaron las mismas concentraciones de ADN genómico.
- 40 Resultados:

Con el fin de comparar el contenido relativo del ADNlc mitocondrial frente al ADNlc nuclear, los datos se expresan como la relación de la concentración de ADNlc mitocondrial con respecto a la concentración de ADNlc nuclear (relación de contenido de ADNCmCn) en 80 individuos sanos y en 146 con CCR. El gráfico de puntos de la Figura 2A muestra una diferencia significativa de la relación de contenido de ADNCmCn de contenido relativo entre muestras de individuos sanos y con CCR. La mediana de ADNCmCn en individuos sanos (3,8) era considerablemente más alta que la de pacientes con CCR (0,18) (prueba de la t de Student: $p < 0,0001$). Esta observación se confirma al separar los pacientes en el estadio IV ($n = 72$) de los pacientes en los estadios I-III ($n = 74$). Al analizar la relación de contenido de ADNCmCn, existe una diferencia significativa entre los pacientes con CCR en los estadios I-III y los individuos sanos. La mediana en pacientes con CCR en los estadios I-III era de 0,17, mientras que en individuos sanos era de 3,8 (prueba de la t de Student $p < 0,0001$) (Figura 2B). En pacientes en el estadio IV, la mediana era de 0,25 y era considerablemente menor que en individuos sanos ($p < 0,0001$) (Figura 2C). Esta fuerte capacidad de diagnóstico se ilustró en el análisis por curva ROC, que muestra un ABC de 0,98, que es claramente óptimo cuando se comparan individuos sanos y pacientes con CCR (Figuras 3 A, B, C). También estudiamos la relación de contenido de ADNCmCn en una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón ($n = 73$). La relación de contenido de ADNCmCn era considerablemente mayor en los donantes sanos ($n = 80$) que en los pacientes con cáncer de pulmón. La mediana de la relación de contenido de ADNCmCn era de 3,8 en individuos sanos, mientras que en pacientes con cáncer de pulmón era de 0,09 (prueba de la t de Student $p < 0,0001$) (Figura 4). Esos resultados confirmaban la fuerte capacidad de diagnóstico de la relación de contenido de ADNCmCn para distinguir a individuos sanos y pacientes con cáncer (ABC curva Roc = 0,99) (Figura 5). Tal como se presenta en la Figura 6, no hay superposición entre los valores encontrados en pacientes sanos y con cáncer. Se ha de señalar que el contenido de ADNcm solo muestra una capacidad de diagnóstico estadísticamente significativa, pero en menor medida que la relación de contenido de ADNCmCn, ya que existe una superposición entre los valores de individuos sanos y pacientes con cáncer (Figura 7).

La relación de base de ADN en el ADNmt se parece a la de las células procariotas, y es más que la del ADN nuclear. El ADNmt forma un lazo a partir del cual la replicación comienza y se extiende en una dirección. El ADN mitocondrial incluye más contenido de guanina-citosina (GC) que el ADN nuclear y es de mayor densidad. Como resultado de ello, analizando el contenido o la densidad de GC se puede llevar a cabo una comparación entre el ADNcm y el ADNcn. Por ejemplo, la temperatura de desnaturalización o de fusión del ADNmt (y en consecuencia del ADNcm) es más alta que la del ADN nuclear.

De modo similar al ADNmt, entre el ARN mitocondrial (ARNmt) y el ARNnuc existen diferencias. Se sintetiza dentro de las mitocondrias en un molde de ADN. Es diferente al ARN de origen nuclear, ya que es resistente a la enzima ribonucleasa. Como tal, el nivel de resistencia a la ribonucleasa del contenido total de ADNlc es un biomarcador potencial para la detección del cáncer, mediante el uso de un patrón de referencia.

Estos resultados sorprendentes tienen una importancia incomparable en lo que respecta a la detección del cáncer. El ADN mitocondrial se presenta no fragmentado en comparación con el ADN nuclear en la circulación sanguínea. La explicación se basa en tres hipótesis: (1) en las células cancerosas hay menos liberación de ADNm en la circulación; (2) en las células cancerosas hay más liberación de ADNn en la circulación; y (3) el ADNm liberado es menos estable que el ADNn en sangre. Esto sugeriría que la apoptosis desempeña un papel muy importante en las células cancerosas. No se observa ningún cambio morfológico obvio de las mitocondrias hasta la etapa final de la apoptosis (Ozawa T, Bioscience reports, 17, 337-250, 1997). La fragmentación del ADN durante la apoptosis se presenta como un evento nuclear específico. Dado que las mitocondrias pueden liberar proteínas apoptogénicas de mitocondrias específicas, como la caspasa o el citocromo C, es posible que las mitocondrias y su ADN se conserven para preservar el proceso completo de la apoptosis. Dado que el ADNm de la apoptosis no se puede degradar, el evento apoptótico es el fenómeno biológico implicado en esta diferencia encontrada entre individuos con cáncer e individuos sanos. Sin duda alguna, el evento de apoptosis se produce en gran medida en las células cancerosas, como el cáncer CCR.

Ejemplo 2: Combinación de la relación de contenido de ADNCmCn y la concentración del ADN nuclear circulante total para distinguir entre individuos sanos y con cáncer

Se calculó la concentración total de ADN nuclear circulante (concentración de ADNcn) en la misma cohorte de individuos sanos ($n = 80$) y en pacientes con cáncer ($n = 207$) y se presentó en la Figura 8A. Existe una diferencia estadística muy importante del contenido de ADNcn en sangre entre individuos sanos y con cáncer ($p < 0,0001$). En la Figura 8B se presenta la capacidad predictiva de diagnóstico de la concentración de ADNlc total para distinguir plasmas de pacientes con CCRm y de individuos sanos. La representación de la curva ROC derivada del análisis logístico univariante correspondiente al ADNlc total (Figura 8B, ABC = 0,82) lo confirma, aunque es ligeramente inferior cuando se utiliza la relación de contenido de ADNCmCn. Esta observación ya había sido realizada (Patente CNRS y Mouliere et al, Mol. Oncol). El objeto de la invención consiste en combinar los dos análisis para mejorar la potencia de prueba de la exploración. La combinación de los dos biomarcadores se puede prever, por ejemplo, mediante el uso de un algoritmo. Se ha de tener en cuenta que el análisis de correlación entre la relación de contenido de ADNCmCn y el contenido de ADNcn es deficiente en individuos sanos (Spearman, $p = 0,64$) y parece mejor en pacientes con cáncer ($p = 0,08$). Se ha de tener en cuenta que hay una menor capacidad de diagnóstico cuando se analiza solo el ADNcm tal como se presenta en la Figura 9.

Los valores de la relación de contenido de ADNcmCn en 3 pacientes con cáncer hepatocelular (CHC) eran considerablemente más bajos (0,004; 0,152 y 0,084; media = 0,080) que la mediana de individuos sanos (3,8) y no se superponen con valores obtenidos de individuos sanos.

	Cm	Cn	Relación CmCn
	(ng/ml)	(ng/ml)	
paciente 1	0,06	15,68	
	0,06	13,15	
	0,07	15,01	
media	0,06	14,61	0,004
paciente 2	0,86	6,95	
	1,79	7,46	
	0,59	6,92	
media	1,08	7,11	0,152
paciente 3	0,4	4,64	
	0,45	1,66	
	0,34	8,06	
media	0,4	4,79	0,084

- 5 Tabla 2: Determinación de la relación CmCn a partir de la medición por triplicado de Cm y Cn en plasma de tres pacientes con pacientes con CHC diagnosticado

Los datos obtenidos de plasma de diferentes tipos de cáncer (CCR, CHC, cánceres de pulmón o de mama) muestran el potencial de la determinación de la relación de contenido de ADNcmCn para distinguir a individuos sanos y pacientes con cualquier tipo de cáncer.

- 10 Ejemplo 3: Determinación de la relación ADNcmCn DII en individuos sanos y con cáncer

La integridad se puede evaluar determinando el índice de integridad de ADN (DII) calculado como la relación del contenido del fragmento de ADN circulante sobre el contenido del fragmento de ADN circulante de un tamaño menor. Por regla general se puede utilizar el análisis Q-PCR: para cada extracto de ADN se cuantificaron en una ejecución separada el amplicón *KRAS* nuclear largo de 305 pb y el amplicón *MT-CO3* mitocondrial largo de 296 pb. Los DII nuclear y mitocondrial se calcularon mediante la relación de la concentración determinada con el conjunto de cebadores dirigido a una secuencia larga con respecto a la concentración determinada con el grupo de cebadores dirigido a una región de 67 pb. En la Tabla 3 se muestra el DII de cada muestra de los dos grupos de individuos. Aunque la capacidad de diagnóstico es mucho más baja que la de la relación de contenido de ADNcmCn, la relación ADNcmCn DII tiene un poder de diagnóstico que se puede combinar o asociar con la relación de contenido de ADNcmCn.

	ADN genómico	Sanos 1	Sanos 2	Sanos 3	CCR 1	CCR 2	CCR 3
DII NUC	1,1308	0,2700	0,1468	0,0470	0,0985	0,0423	0,0192
DII MITO	1,1000	0,8715	1,4532	1,2500	0,8671	0,9680	1,0747
DII/MITO/DII NUC	0,9727	3,2278	9,9007	26,5957	8,8021	22,9070	55,9084

Tabla 3: Capacidad de diagnóstico de la relación ADNcmCn DII. DII, Índice de Integridad de ADN. SANOS, individuos sanos. CCR, pacientes con cáncer colorrectal.

Ejemplo 4: Demostración experimental en un modelo animal del interés de la utilización de ADNCm para distinguir el origen tumoral y no tumoral

Con el fin de confirmar nuestra hipótesis, evaluamos la relación de contenido de ADNCmCn en sangre de un modelo experimental de injerto heterólogo de ratón previamente diseñado (Thierry et al, NAR, 2010), que permite distinguir en el mismo individuo el ADNlc derivado no tumoral (de origen múrido) y el ADNlc derivado de tumor (de origen humano). Estudiamos nuestra hipótesis en un ratón con injerto heterólogo HCT116 y en 14 ratones con injerto heterólogo SW620. El ADNCmCn humano (origen tumoral del ADNcir) y el ADNCmCn múrido (origen no tumoral del ADNcir) se determinaron en las mismas muestras de plasma múrido utilizando conjuntos de cebadores adecuados para cada amplificación. El ADNCmCn humano se calculó mediante la relación entre la concentración de ADNmtlc humano y la concentración de ADNnlc humano. El ADNCmCn múrido se calculó mediante la relación entre la concentración de ADNmtlc múrido y la concentración de ADNnlc múrido.

En la Figura 10 se muestran el diseño del sistema de Q-PCR y la secuencia de cebador. La Tabla 4 presenta la secuencia de cebadores dirigida a una secuencia mitocondrial y nuclear detectada en el ensayo de Q-PCR (SEQ ID N°: 8; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12; y SEQ ID N°: 13).

NOMBRE DE CEBADOR	SENTIDO	SECUENCIA	Tf	%GC	TAMAÑO DE AMPLICIÓN
ADN MITOCONDRIAL					
MUMT CO ₁ F	homosentido	GTCCCACTAATAATCGGAGC	60	50	
MUMT Co ₁ REV C	antisentido	TGCTTCTACTATTGATGATGC	58	55,5	114
MUMT CO ₁ REV L	antisentido	TTGATACTGTGTTATGGCTG	56	40	294
ADN MITOCONDRIAL					
KRAS 63-382 Nf	homosentido	AAGAGTGAAGACCCGTGTGC	59,4	55,00	
KRAS 63 Mr	antisentido	GGAGAACAAGCACCCAACAG	59,4	55	63
KRAS 284 Mr	antisentido	GTCTTTGTAATCCCAACCTCCT	58,9	43,5	284

Tabla 4. Características de los cebadores seleccionados para estudiar el ADN libre nuclear y mitocondrial de origen múrido

Los datos se muestran en las Figuras 11 y 12.

En el modelo de ratón con injerto heterólogo HCT116, la relación de contenido de ADNCmCn de ADNlc derivado de tumor es de 0,007, mientras que la de ADNlc no derivado de tumor es de 1,08 (diferencia en un factor 154), lo que sugiere que este biomarcador es de alto valor para la exploración (Figura 11). En los 14 ratones con injerto heterólogo SW620, la mediana de ADNCmCn múrido (0,047) era considerablemente más alta que la mediana de ADNCmCn humano (0,0020) (prueba de la t pareada p = 0,023) (Figura 12).

Pueden indicar que existe una gran diferencia de liberación en la circulación del ADN mitocondrial entre las células tumorales y las células no tumorales, o una gran diferencia de su estabilidad respectiva debido a sus estructuras y naturalezas. Se ha de tener en cuenta que, en el modelo de injerto heterólogo HCT116, la relación ADNCmCn DII es mucho mayor en ADNlc derivado de tumor (~ 20) que en ADNlc no tumoral (~ 4).

Ejemplo 4: Demostración experimental *in vitro* del interés de la utilización de ADNCm para distinguir células de origen tumoral y no tumoral

Como se ha demostrado que el sobrenadante de cultivos celulares presenta ADN extracelular, evaluamos la relación de contenido de ADNCmCn en el sobrenadante de cultivos celulares. Probamos nuestra hipótesis en ADN extracelular liberado por líneas celulares tumorales y líneas celulares normales. Analizamos 14 líneas celulares tumorales de diversos orígenes (5 líneas celulares de próstata, 3 líneas celulares de cáncer de mama, 3 líneas celulares de CCR, 2 líneas celulares de linfoma, 1 línea celular de cáncer de pulmón) y 6 líneas celulares normales de diversos orígenes (mama, prepucio, piel, pulmón, hepatocitos humanos y fibroblastos embrionarios múridos). Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 13.

La mediana de la relación de contenido de ADNCmCn era considerablemente mayor en el sobrenadante de líneas celulares normales (0,20) que la mediana de la relación de contenido de ADNCmCn en el sobrenadante de líneas celulares tumorales (0,020) (prueba t de Student, p = 0,0011). Esto puede confirmar nuestras otras observaciones en

muestras clínicas y muestras experimentales húmedas consistentes en que puede haber una gran diferencia de liberación en la circulación de ADN mitocondrial entre células tumorales y células no tumorales.

	Origen	Identificación	Relación de contenido de ADNCmCn
Línea celular tumoral	Próstata	VCAP	0,0573
		22rV1	0,0088
		DU145	0,0102
		LNCAP	0,0505
		PC3	0,0795
	Mama	MDA 468	0,0216
		R2shP53	0,0276
		SUM159	0,015
	Colon	SW620	0,0135
		SW480	0,0161
		CaCo2	0,022
	Linfoma B	Ramos	0,007
	Linfoma de Burkitt	BJAB	0,0262
Cáncer de pulmón	H1975	0,0714	
Línea celular normal	Fibroblastos embrionarios húmedos	MEF	0,2299
	Fibroblastos de mama humanos	R2	0,1447
	Fibroblastos de prepucio humanos	HFF	0,5517
	Fibroblastos de piel humanos	CDC45K	0,1191
	Fibroblastos de pulmón humanos	IMR90 A	0,0685
	Hepatocitos humanos normales	LWFD	1,0341

5 Tabla 5. Relación de contenido de ADNCmCn en el sobrenadante de varias líneas celulares tumorales y líneas celulares normales

10 Como se ejemplifica en el ejemplo 5, en el que el sobrenadante de células sanas demostró ser estadísticamente diferente en términos de relación de CmCn en comparación con líneas celulares de cáncer de varios tipos (cáncer de mama, colorrectal, próstata, pulmón y linfoma), la relación de CmCn parece útil para discriminar el ADNlc de muchos tipos de cáncer, ya sean tumores sólidos o tumores líquidos. Por lo tanto, parece que el análisis mediante el cálculo de la relación de CmCn permite distinguir el ADNlc que se deriva de células normales del ADNlc procedente de células cancerosas, destacando su capacidad en la detección del cáncer.

Referencias:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Inserm	
	<120> Métodos para explorar a un individuo en busca de un cáncer	
	<130> BIO14374 THIERRY / MC	
10	<160> 13	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 16569	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
20	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (3107)..(3107)	
	<223> n is a, c, g, o t	
	<400> 1	
	gatcacaggt ctatcacctcct attaacctcact cacgggagct ctccatgcat ttggtatctt 60	
	cgtctggtggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgct 120	
	gcagtatctg tctttgattc ctgcctcctc ctattattta tgcacacctac gttcaatatt 180	
	acaggcgaac atacttacta aagtgtgtta attaatat gctttagtagga cataataata 240	
	acaattgaat gtctgcacag ccactttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca 300	
	aacccccct cccccgcttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aacccccaaa 360	
	acaaagaacc ctaacaccag cctaaccaga ttcaaattt tatcttttg cggtatgcat 420	
	ttttaacagt cacccccca ctaacacatt attttcccct cccactcca tactactaat 480	
	ctcatcaata caacccccgc ccatcctacc cagcacacac acaccgctgc taacccccata 540	
	ccccgaacca accaaacccc aaagacaccc cccacagttt atgtagctta cctcctcaaa 600	
	gcaatacact gaaaatgttt agacgggctc acatcacccc ataaacaaat aggtttggtc 660	
	ctagcctttc tattagctct tagtaagatt acacatgcaa gcatccccgt tccagtgagt 720	
	tcaccctcta aatcaccacg atcaaaagga acaagcatca agcacgcagc aatgcagctc 780	
	aaaacgctta gcctagccac acccccacgg gaaacagcag tgattaacct ttagcaataa 840	
	acgaaagttt aactaagcta tactaacccc aggttggtc aatttcgtgc cagccaccgc 900	
	ggtcacacga ttaacccaag tcaatagaag cggcgtaaa gagtgtttta gatcaccccc 960	
	tccccataa agctaaaact cacctgagtt gtaaaaaact ccagttgaca caaaatagac 1020	
	tacgaaagtg gctttaacat atctgaacac acaatagcta agaccctaac tgggattaga 1080	
	tacccccacta tgcttagccc taaacctcaa cagttaaact aacaaaactg ctgcgacaga 1140	
25	cactacgagc cacagcttaa aactcaaagg acctggcggg gcttcatatc cctctagagg 1200	

ES 2 708 030 T3

agcctgttct gtaatcgata aaccccgatc aacctcacca cctcttgctc agcctatata 1260
 ccgcatcctt cagcaaacc tcatgaaggc tacaaagtaa gcgcaagtac ccacgtaaag 1320
 acgttaggtc aagggtgtagc ccatgaggtg gcaagaaatg ggctacattt tctaccccag 1380
 aaaactacga tagcccttat gaaacttaag ggtcgaaggt ggatttagca gtaaactaag 1440
 agtagagtgc ttagttgaac agggccctga agcgcgtaca caccgcccgt caccctcctc 1500
 aagtatactt caaaggacat ttaactaaaa cccctacgca tttatataga ggagacaagt 1560
 cgtaacatgg taagtgtact ggaaagtgca cttggacgaa ccagagtgta gcttaacaca 1620
 aagcacccaa cttacactta ggagatttca acttaacttg accgctctga gctaaaccta 1680
 gccccaaacc cactccacct tactaccaga caaccttagc caaacctttt acccaaataa 1740
 agtataggcg atagaaattg aaacctggcg caatagatat agtaccgcaa gggaaagatg 1800
 aaaaattata accaagcata atatagcaag gactaacccc tataccttct gcataatgaa 1860
 ttaactagaa ataactttgc aaggagagcc aaagctaaga cccccgaaac cagacgagct 1920
 acctaagaac agctaaaaga gcacaccctg ctatgtagca aaatagtggg aagatttata 1980
 ggtagaggcg acaaacctac cgagcctggg gatagctggg tgtccaagat agaactctag 2040
 ttcaacttta aatttgccca cagaaccctc taaatcccct tgtaaattta actgttagtc 2100
 caaagaggaa cagctctttg gacactagga aaaaaccttg tagagagagt aaaaaattta 2160
 acaccatag taggcctaaa agcagccacc aattaagaaa gcgttcaagc tcaacacca 2220
 ctacctaaaa aatcccaaac atataactga actcctcaca cccaattgga ccaatctatc 2280
 accctataga agaactaatg ttagtataag taacatgaaa acattctcct ccgcataagc 2340
 ctgcgtcaga ttaaaacact gaactgacaa ttaacagccc aatatctaca atcaaccaac 2400
 aagtcattat taccctcact gtcaacccaa cacaggcatg ctcataagga aaggttaaaa 2460
 aaagtaaaag gaactcggca aatcttacc cgcctgttta ccaaaaacat cacctctagc 2520
 atcaccagta ttagaggcac cgctgcccga gtgacacatg ttaaacggcc gcggtaccct 2580
 aaccgtgcaa aggttagcata atcacttggt ccttaaataag ggacctgtat gaatggctcc 2640
 acgagggttc agctgtctct tacttttaac cagtgaatt gacctgccg tgaagaggcg 2700
 ggcataacac agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta 2760
 cctaacaaac ccacaggtcc taaactacca aacctgcatt aaaaatttcg gttggggcga 2820
 cctcggagca gaaccaacc tccgagcagt acatgctaag acttcaccag tcaaagcgaa 2880
 ctactatact caattgatcc aataacttga ccaacggaac aagttaccct agggataaca 2940
 gcgcaatcct attctagagt ccatatcaac aatagggttt acgacctcga tggttgatca 3000
 ggacatccc atggtgcagc cgctattaa gggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac 3060

ES 2 708 030 T3

gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctacnttc aaattcctcc 3120
 ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc ccgtaaatga 3180
 tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc 3240
 agagcccggg aatcgcataa aacttaaaac tttacagtca gaggttcaat tcctcttctt 3300
 aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgttac ccatttcaat cgcaatggca 3360
 ttctaatgct ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac 3420
 gttgtaggcc cctacgggct actacaaccc ttcgctgacg ccataaaaact cttcaccaaa 3480
 gagcccctaa aaccggccac atctaccatc accctetaca tcaccgcccc gaccttagct 3540
 ctccaccatg ctcttctact atgaaccccc ctccccatac ccaaccccct ggtcaacctc 3600
 aacctaggcc tcctatthtatt tctagccacc tctagcctag ccgtttactc aatcctctga 3660
 tcagggtgag catcaaactc aaactacgcc ctgatcggcg cactgcgagc agtagcccaa 3720
 acaatctcat atgaagtcac cctagccatc attctactat caacattact aataagtggc 3780
 tcctttaacc tctccaccct tatcacaaca caagaacacc tctgattact cctgcatca 3840
 tgacccttgg ccataaatatg atttatctcc acactagcag agaccaaccg aacccccttc 3900
 gaccttgccg aaggggagtc cgaactagtc tcaggcttca acatcgaata cgccgaggc 3960
 cccttgccc tattcttcat agccgaatac acaaacatta ttataataaa caccctcacc 4020
 actacaatct tcctaggaac aacatatgac gcactctccc ctgaactcta cacaacatat 4080
 tttgtcacca agaccctact tctaacctcc ctggttctat gaattcgaac agcatacccc 4140
 cgattccgct acgaccaact catacacctc ctatgaaaaa acttcctacc actcacceta 4200
 gcattactta tatgatatgt ctccataccc attacaatct ccagcattcc ccctcaaacc 4260
 taagaaatat gtctgataaa agagttactt tgatagagta aataatagga gcttaaacc 4320
 ccttatttct aggactatga gaatcgaacc catccctgag aatccaaaat tctccgtgcc 4380
 acctatcaca ccccatccta aagtaaggtc agctaaataa gctatcgggc ccataccccg 4440
 aaaatggttg ttataaccctt cccgtaacta ttaatccctt ggcccaaccg gtcactctact 4500
 ctaccatctt tgcaggcaca ctcatcacag cgctaagctc gcaactgattt tttacctgag 4560
 taggcctaga aataaacatg ctagctttta ttccagttct aaccacaaaa ataaaccctc 4620
 gttccacaga agctgccatc aagtatttcc tcacgcaagc aaccgcatcc ataactcttc 4680
 taatagctat cctcttcaac aatatactct ccggacaatg aaccataacc aatactacca 4740
 atcaatactc atcattaata atcataatag ctatagcaat aaaactagga atagcccct 4800
 ttcacttctg agtcccagag gttacccaag gcacccctct gacatccggc ctgcttcttc 4860
 tcacatgaca aaaactagcc cccatctcaa tcataacca aatctctccc tcaactaaag 4920
 taagccttct cctcactctc tcaatcttat ccatcatagc aggcagttga ggtggattaa 4980

ES 2 708 030 T3

accaaaacca gctacgcaaa atcttagcat actcctcaat taccacata ggatgaataa 5040
 tagcagttct accgtacaac cctaacataa ccattcttaa tttactatt tatattatcc 5100
 taactactac cgcattccta ctactcaact taaactccag caccacgacc ctactactat 5160
 ctcgcacctg aaacaagcta acatgactaa caccctaat tccatccacc ctcctctccc 5220
 taggaggcct gccccgcta accggctttt tgcccaaatg ggccattatc gaagaattca 5280
 caaaaaaaca tagcctcatc atccccacca tcatagccac catcaccctc cttaacctct 5340
 acttctacct acgcctaate tactccacct caatcacact actccccata tctaacaacg 5400
 taaaaataaa atgacagttt gaacatacaa aaccacccc attcctccc acactcatcg 5460
 cccttaccac gctactccta cctatctccc cttttatact aataatctta tagaaattta 5520
 ggttaataac agaccaagag cttcaaaagc cctcagtaag ttgcaatact taatttctgt 5580
 aacagctaag gactgcaaaa cccactctg catcaactga acgcaaatca gccacttta 5640
 ttaagctaag cccttactag accaatggga cttaaaccca caaacactta gttaacagct 5700
 aagcaccta atcaactggc ttcaatctac ttctcccgcc gccgggaaaa aaggcgggag 5760
 aagccccggc aggtttgaag ctgcttctc gaatttgcaa ttcaatatga aatcacctc 5820
 ggagctggtt aaaagaggcc taaccctgt ctttagattt acagtccaat gttcactca 5880
 gccatthtac ctcaccccc ctgatgttcg cgcaccgtg actattctct acaaccaca 5940
 aagacattgg aacactatac ctattattcg ggcgatgagc tggagtccca ggcacagctc 6000
 taagcctcct tattcgagcc gagctgggcc agccaggcaa ccttctaggt aacgaccaca 6060
 tctacaacgt tatcgtcaca gcccatgcat ttgtaataat cttcttcata gtaataacca 6120
 tcataatcgg aggccttggc aactgactag ttcccctaat aatcgggtgcc cccgatatgg 6180
 cgtttccccg cataaacaac ataagcttct gactcttacc tcctctctc ctactcctgc 6240
 tcgcatctgc tatagtggag gccggagcag gaacaggttg aacagtctac cctcccttag 6300
 caggaacta ctcccacct ggagcctccg tagacctaac catcttctcc ttacacctag 6360
 caggtgtctc ctctatctta gggccatca atttcatcac aacaattatc aatataaac 6420
 cccctgccat aaccaatac caaacgccc tcttcgtctg atccgtccta atcacagcag 6480
 tcctacttct cctatctctc ccagtctag ctgctggcat cactatacta ctaacagacc 6540
 gcaacctcaa caccacctc ttcgacccg cgggaggagg agacccatt ctataccaac 6600
 acctattctg atttttcggc caccctgaag tttatattct tatcctacca ggcttcggaa 6660
 taatctccca tattgtaact tactactccg gaaaaaaga accatttggg tacataggtg 6720
 tggctctgagc tatgatatca attggcttcc tagggtttat cgtgtgagca caccatata 6780
 ttacagtagg aatagacgta gacacagcag catatttcac ctccgctacc ataactcatg 6840

ES 2 708 030 T3

ctatccccac cggcgtcaaa gtatttagct gactcgccac actccacgga agcaatatga 6900
aatgatctgc tgcagtgctc tgagccctag gattcatctt tcttttcacc gtaggtggcc 6960
tgactggcat tgtattagca aactcatcac tagacatcgt actacacgac acgtactacg 7020
ttgtagccca cttccactat gtcctatcaa taggagctgt atttgccatc ataggaggct 7080
tcattcactg atttccccta ttctcaggct acaccctaga ccaaacctac gccaaaatcc 7140
attcactat catattcatc ggcgtaaadc taactttctt cccacaacac tttctcggcc 7200
tatccggaat gccccgacgt tactcggact accccgatgc atacaccaca tgaaacatcc 7260
tatcatctgt aggtcattc atttctctaa cagcagtaat attaataatt ttcattgattt 7320
gagaagcctt cgcttcgaag cgaaaagtcc taatagtaga agaacctcc ataaacctgg 7380
agtgactata tggatgcccc ccaccctacc acacattcga agaaccctga tacataaaat 7440
ctagacaaaa aaggaaggaa tcgaaccccc caaagctggt ttcaagccaa ccccatggcc 7500
tccatgactt tttcaaaaag gtattagaaa aaccatttca taactttgtc aaagttaaat 7560
tataggctaa atcctatata tcttaatggc acatgcagcg caagtaggtc tacaagacgc 7620
tacttcccct atcatagaag agcttatcac ctttcatgat cagccctca taatcatttt 7680
ccttatctgc ttcctagtcc tgtatgccct tttcctaaca ctcaacaaca aactaactaa 7740
tactaacatc tcagacgctc aggaaataga aaccgtctga actatcctgc ccgccatcat 7800
cctagtccct atcgccctcc catccctacg catcctttac ataacagacg aggtcaacga 7860
tcctccctt accatcaaat caattggcca ccaatggtac tgaacctacg agtacaccga 7920
ctacggcgga ctaatcttca actcctacat acttccccca ttattcctag aaccaggcga 7980
cctgcgactc ottgacgctt acaatcgagt agtactcccg attgaagccc ccattcgtat 8040
aataattaca tcacaagacg tcttgactc atgagctgtc cccacattag gcttaaaaac 8100
agatgcaatt cccggacgctc taaaccaaac cactttcacc gctacacgac cgggggtata 8160
ctacggctca tgcctctgaaa tctgtggagc aaaccacagt ttcattgccc tcgtcctaga 8220
attaattccc ctaaaaatct ttgaaatagg gcccgatatt accctatagc acccccteta 8280
ccccctctag agcccactgt aaagctaact tagcattaac cttttaagtt aaagattaag 8340
agaaccaaca cctctttaca gtgaaatgcc ccaactaaat actaccgtat ggcccacat 8400
aattaccccc atactcctta cactattcct catcacccaa ctaaaaatat taaacacaaa 8460
ctaccaccta octccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aaccctgaga 8520
acaaaaatga acgaaaatct gttcgttca ttcatgccc ccacaatcct aggcctaccc 8580
gccgcagtac tgatcattct atttcccct ctattgatcc ccacctcaa atatctcatc 8640
aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaa acaaatgata 8700
accatacaca aactaaag acgaacctga tctcttatac tagtatcctt aatcattttt 8760

ES 2 708 030 T3

attgccacaa ctaacctcct cggactcctg cctcactcat ttacaccaac cacccaacta 8820
 tctataaacc tagccatggc catcccctta tgagcgggca cagtgattat aggccttgcg 8880
 tctaagatta aaaatgcctt agcccacttc ttaccacaag gcacacctac accccttatc 8940
 cccatactag ttattatcga aaccatcagc ctactcattc aaccaatagc cctggccgta 9000
 cgcctaaccg ctaacattac tgcaggccac ctactcatgc acctaattgg aagcgcacc 9060
 ctagcaatat caaccattaa ccttccctct acacttatca tcttcacaat tctaattcta 9120
 ctgactatcc tagaaatcgc tgcgcctta atccaagcct acgttttcac acttctagta 9180
 agcctctacc tgcacgacaa cacataatga cccaccaatc acatgcctat catatagtaa 9240
 aaccagccc atgacccta acaggggccc tctcagccct cctaatagacc tccggcctag 9300
 ccatgtgatt tcacttccac tccataacgc toctcactact aggcctacta accaacadac 9360
 taacatata ccaatgatgg cgcgatgtaa cacgagaaag cacatacaca ggccaccaca 9420
 caccactgt ccaaaaaggc cttcgatagc ggataatcct atttattacc tcagaagttt 9480
 ttttcttgcg aggatttttc tgagcctttt accactccag cctagcccct acccccact 9540
 taggagggca ctggcccca acagycatca ccccgctaaa tcccctagaa gtcccactcc 9600
 taaacacatc cgtattactc gcatcaggag tatcaatcac ctgagctcac catagtctaa 9660
 tagaaaacaa ccgaaaccaa ataattcaag cactgcttat tacaatttta ctgggtctct 9720
 attttacct cctacaagcc tcagagtact togagtctcc cttcaccatt tccgacggca 9780
 tctacggctc aacatttttt gtagccacag gcttccacgg acttcacgtc attattggct 9840
 caactttcct cactatctgc ttcatccgcc aactaatatt tcactttaca tccaaacatc 9900
 actttggctt cgaagccgcc gcctgatact ggcattttgt agatgtggtt tgactatttc 9960
 tgtatgtctc catctattga tgagggtctt actcttttag tataaatagt accgttaact 10020
 tccaattaac tagttttgac aacattcaaa aaagagtaat aaacttcgcc ttaatttta 10080
 taatcaacac cctcctagcc ttactactaa taattattac attttgacta ccacaactca 10140
 acggctacat agaaaaatcc accccttacg agtgcggctt cgaccctata tccccgccc 10200
 gcgtcccttt ctocataaaa ttcttcttag tagctattac cttcttatta tttgatctag 10260
 aaatgcctt ccttttacc ctacatgag ccctacaac aactaacctg ccaactaatag 10320
 ttatgtcatc cctcttatta atcatcatcc tagccctaag tctggcctat gagtgactac 10380
 aaaaaggatt agactgaacc gaattggtat atagtttaa caaacgaat gatttcgact 10440
 cattaatta tgataatcat atttacaaa tgcccctcat ttacataaat attatactag 10500
 catttaccat ctacttcta ggaatactag tatatcgtc acacctata toctccctac 10560
 tatgcctaga aggaataata ctatcgtgt tcattatagc tactctcata accctcaaca 10620

ES 2 708 030 T3

cccactccct cttagccaat attgtgccta ttgccatact agtctttgcc gcctgcgaag 10680
 cagcgggtggg cctagcccta ctagtctcaa tctccaacac atatggccta gactacgtac 10740
 ataacctaaa cctactccaa tgctaaaact aatcgtccca acaattatat tactaccact 10800
 gacatgactt tccaaaaaac acataatttg aatcaacaca accaccaca gcctaattat 10860
 tagcatcatc cctctactat tttttaacca aatcaacaac aacctattta gctgttcccc 10920
 aaccttttcc tccgaccccc taacaacccc cctcctaata ctaactacct gactcctacc 10980
 cctcacaate atggcaagcc aacgccactt atccagtga ccaactatcac gaaaaaaact 11040
 ctacctctct ataactaatct ccctacaaat ctoccttaatt ataacattca cagccacaga 11100
 actaatcata ttttatatct ttttcgaaac cacacttatc cccaccttgg ctatcatcac 11160
 ccgatgaggc aaccagccag aacgcctgaa cgcaggcaca tacttcctat tctacaccct 11220
 agtaggctcc cttcccctac tcatcgcact aatttacact cacaacaccc taggctcact 11280
 aaacattcta ctactcactc tcaactgccc agaactatca aactcctgag ccaacaactt 11340
 aatatgacta gcttacacaa tagcttttat agtaaagata cctcttttacg gactccactt 11400
 atgactccct aaagcccatg tcgaagcccc catcgcctggg tcaatagtac ttgccgcagt 11460
 actcttaaaa ctagcgggct atgggtataat acgcctcaca ctcaattctca accccctgac 11520
 aaaaacacata gcctaccctc tccttgtact atccctatga ggcataatta taacaagctc 11580
 catctgccta cgacaaacag acctaaaact gctcattgca tactcttcaa tcagccacat 11640
 agccctcgta gtaacagcca ttctcatcca aacccctga agcttcaccg gcgcagtcac 11700
 tctcataatc gccacgggct ttacatcctc attactattc tgcttagcaa actcaaaacta 11760
 cgaacgcact cacagtgca tcataatcct ctctcaagga cttcaaaactc tactcccact 11820
 aatagctttt tgatgacttc tagcaagcct cgctaaccct gccttaccoc ccaactattaa 11880
 cctactggga gaactctctg tgctagtaac cacgttctcc tgatcaaata tcactctcct 11940
 acttacagga ctcaacatac tagtcacagc cctatactcc ctctacatat ttaccacaac 12000
 acaatggggc tcaactaccc accacattaa caacataaaa ccctcattca cacgagaaaa 12060
 caccctcatg ttacataacc tatcccccat tctcctccta tccctcaacc ccgacatcat 12120
 taccgggttt tcctcttgta aatatagttt aaccaaaca tcagatttg aatctgacaa 12180
 cagaggctta cgaccctta tttaccgaga aagctcaca gaactgctaa ctcatgcccc 12240
 catgtotaac aacatggctt totcaacttt taaaggataa cagctatcca ttggtcttag 12300
 gcccaaaaa ttttggtgca actccaaata aaagtaataa ccatgcacac tactataacc 12360
 accctaacc tgacttcctc aattcccccc atccttacca ccctcgtaa ccctaacaaa 12420
 aaaaactcat acccccatta tgtaaaatcc attgtcgcac ccaccttat tatcagctctc 12480
 ttcccacaa caatattcat gtgcctagac caagaagtta ttatctcgaa ctgacactga 12540

ES 2 708 030 T3

gccacaaccc aaacaaccca gctctcccta agcttcaaac tagactactt ctccataata 12600
 ttcacccctg tagcattggt cgttacatgg tccatcatag aattctcact gtgatataata 12660
 aactcagacc caaacattaa tcagttcttc aaatatctac tcatcttcct aattaccata 12720
 ctaatcttag ttaccgctaa caacctattc caactgttca tcggctgaga gggcgtagga 12780
 attatatcct tcttgctcat cagttgatga tacgcccagag cagatgcaa cacagcagcc 12840
 attcaagcaa tcctatacaa ccgatcggc gatatcgggt tcatcctcgc cttagcatga 12900
 tttatcctac actccaactc atgagacca caacaaatag cccttctaaa cgctaatacca 12960
 agcctcacc cactactagc cctcctccta gcagcagcag gcaaatcagc ccaattaggt 13020
 ctccaccctt gactcccctc agccatagaa ggccccaccc cagtctcagc cctactccac 13080
 tcaagcacta tagttgtagc aggaatcttc ttactcatcc gcttcacccc cctagcagaa 13140
 aatagcccac taatcacaac tctaactacta tgcttaggcy ctatcaccac tctgttcgca 13200
 gcagctcgcg cccttacaca aatgacatc aaaaaaatcg tagccttctc cacttcaagt 13260
 caactaggac tcataatagt tacaatcggc atcaaccaac cacacctagc attcctgcac 13320
 atctgtacc acgccttctt caaagccata ctatttatgt gctccgggtc catcatccac 13380
 aaccttaaca atgaacaaga tattcgaaaa ataggaggac tactcaaac catacctctc 13440
 acttcaacct ccctcacatc tggcagccta gcattagcag gaataccttt cctcacaggt 13500
 ttctactcca aagaccacat catcgaaacc gcaaacatat catacaciaa cgcctgagcc 13560
 ctatctatta ctctcatcgc tacctccctg acaagcgcct atagcactcg aataattctt 13620
 ctccacctaa caggtcaacc tcgcttcccc acccttacta acattaacga aaataacccc 13680
 accctactaa accccattaa acgcctggca gccggaagcc tattcgcagc atttctcatt 13740
 actaacaaca tttccccgcg atccccctc caaacaacia tccccctcct cctaaaactc 13800
 acagccctcg ctgtcacttt cctaggactt ctaacagccc tagacctcaa ctacctaac 13860
 aacaaactta aaataaaatc cccactatgc acattttatt tctccaacat actcggattc 13920
 taccctagca tcacacaccg cacaatcccc tatctaggcc ttcttacgag ccaaacctg 13980
 cccctactcc tcctagacct aacctgacta gaaaagctat tacctaaaac aatttcacag 14040
 caccaaatct ccacctccat catcacctca acccaaaaag gcataattaa actttacttc 14100
 ctctctttct tcttcccact catcctaacc ctactcctaa tcacataacc tattcccccg 14160
 agcaatctca attacaatat atacaccaac aaacaatggt caaccagtaa ctactactaa 14220
 tcaacgcccc taatcataca aagccccgcg accaatagga tcctcccga tcaaccctga 14280
 cccctctcct tcataaatta ttcagcttcc tacactatta aagtttacca caaccaccac 14340
 cccatcatac tctttcacc acagcaccaa tcctacctcc atcgctaacc ccactaaaac 14400

ES 2 708 030 T3

actcaccaag acctcaaccc ctgaccccca tgcctcagga tactcctcaa tagccatcgc 14460
 tgtagtatat ccaaagacaa ccatcattcc ccctaaataa attaaaaaaa ctattaaacc 14520
 catataacct cccccaaaat tcagaataat aacacacccg accacaccgc taacaatcaa 14580
 tactaaaccc ccataaatag gagaaggctt agaagaaaac cccacaaaacc ccattactaa 14640
 acccacactc aacagaaaca aagcatacat cattattctc gcacggacta caaccacgac 14700
 caatgatatg aaaaaccatc gttgtatttc aactacaaga acaccaatga cccaatcag 14760
 caaaaactaac cccetaataa aattaattaa ccaactcattc atcgacctcc ccaccccatc 14820
 caacatctcc gcatgatgaa acttcggctc actccttggc gcctgcctga tcctccaaat 14880
 caccacagga ctattcctag ccatgcacta ctaccagac gcctcaaccg ccttttcatc 14940
 aatcgccac atcactcgag acgtaaatta tggctgaatc atccgctacc ttcacgcaa 15000
 tggcgctca atattcttta tctgcctctt cctacacatc gggcgaggcc tatattacgg 15060
 atcatttctc tactcagaaa cctgaaacat cggcattatc ctctgcttg caactatagc 15120
 aacagccttc ataggtatg tcctcccgctg aggccaaata tcattctgag gggccacagt 15180
 aattacaaac ttactatccg ccatcccata cattgggaca gacctagttc aatgaatctg 15240
 aggaggctac tcagtagaca gtcccacct cacacgattc tttaccttc acttcatett 15300
 gcccttcatt attgcagccc tagcaaacct ccacctccta ttcttgcaag aaacgggatc 15360
 aaacaacccc ctaggaatca cctcccattc cgataaaatc acctccacc ctactacac 15420
 aatcaaagac gccctcggct tacttctctt ccttctctcc ttaatgacat taacactatt 15480
 ctaccagac ctctagggc accagacaa ttatacccta gccaacccct taaacacccc 15540
 tccccacatc aagcccgaat gatatttctt attcgctac acaattctcc gatccgtccc 15600
 taacaaacta ggagcgtcc ttgccctatt actatccatc ctcatcctag caataatccc 15660
 catcctccat atatccaaac aacaaagcat aatatttgc ccaactaagg aatcacttta 15720
 ttgaactccta gccgcagacc tcctcattct aacctgaatc ggaggacaac cagtaagcta 15780
 cccttttacc atcattggac aagtagcatc cgtactatac ttcacaaca tcctaatacct 15840
 aataccaact atctccctaa ttgaaaacaa aataactcaa tgggcctgtc cttgtagtat 15900
 aaactaatac accagtcttg taaaccggag atgaaaacct ttttccaagg acaaatcaga 15960
 gaaaaagtct ttaactccac cattagcacc caaagctaag attctaattt aaactattct 16020
 ctgttcttc atggggaagc agatttgggt accaccaag tattgactca cccatcaaca 16080
 accgctatgt atttcgtaca ttactgccg ccacatgaa tattgtacgg taccataaat 16140
 acttgaccac ctgtagtaca taaaaaccca atccacatca aaacccctc cccatgctta 16200
 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc 16260
 cctcaccac taggatacca acaaacctac ccaccctaa cagtacatag tacataaagc 16320
 cattaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtccccatgg atgaccccc 16380
 tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatccgca caagagtgt 16440
 actctoctcg ctccgggccc ataacacttg gggtagcta aagtgaactg tatccgacat 16500
 ctggttccta cttcagggtc ataaagccta aatagccac acgttcccct taaataagac 16560
 atcacgatg 16569

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 gaccaccaa tcacatgc 18
 10 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 20 tgagagggcc cctgtag 18
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 4
 ctcaaaaaa tctgogaag a 21
 <210> 5
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 5
 gcctgctgaa aatgactga 19
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador
 <400> 6
 cctgggttt caagttatat g 21
 55 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 65 ccctgacata ctccaagga 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
 10 gtcctactaa taatcggagc 20
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 9
 tgcttctact attgatgatg c 21
 <210> 10
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 10
 ttgatactgt gttatggctg 20
 <210> 11
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 11
 aagagtgaag acccgtgtgc 20
 45 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 12
 55 ggagaacaag cacccaacag 20
 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 65 gctttgtaa ttccaacct cct 23

REIVINDICACIONES

1. Un método (A) para explorar a un individuo en busca de un cáncer, que comprende las etapas consistentes en
 - i) extraer los ácidos nucleicos libres de una muestra obtenida del individuo,
 - 5 ii) determinar la concentración total de ácidos nucleicos libres mitocondriales,
 - iii) determinar la concentración total de ácidos nucleicos libres nucleares,
 - iv) calcular la relación del nivel determinado en la etapa ii) con respecto a la concentración determinada en la etapa iii) (relación de contenido de ADNCmCn),
 - 10 v) comparar la relación determinada en la etapa iv) con un valor de referencia correspondiente predeterminado y
 - vi) concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación determinada en la etapa iv) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación determinada en la etapa iv) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos libres son ácidos nucleicos de ADN libre (ADNlc).
3. El método de la reivindicación 1, que comprende las etapas consistentes en a) amplificar y cuantificar una secuencia de ácido nucleico nuclear diana y b) amplificar y cuantificar una secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que el ácido nucleico nuclear diana o mitocondrial forma parte de una secuencia codificadora o no codificadora.
5. El método de la reivindicación 3, en el que la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana está incluida en un gen mitocondrial seleccionado entre el grupo consistente en ND1; ND2; COX1; COX2; ATP8; ATP6; COX3; ND3; ND4L; ND4; ND5; ND6; CYTB; TRNF; TRND; RNR1 TRNV; TRNK; RNR2 TRNL1; TRNS1; TRN1; TRNP; TRNQ; TRNE; TRNM; TRNT TRNW; TRNL2 TRNA; TRNS2; TRNN; TRNR; TRNA; TRNG; TRNN; TRNC; y TRNY, o está comprendida en una región no codificadora del genoma mitocondrial tal como promotores de ADN mitocondrial tales como H1, H2 y L (promotores de cadena pesada 1, de cadena pesada 2 y de cadena ligera) o regiones de control mitocondrial o secuencias de lazo D.
- 25 6. El método de la reivindicación 3, en el que las secuencias de ácido nucleico mitocondrial diana y nuclear tienen aproximadamente la misma longitud (es decir, tamaño).
7. El método de la reivindicación 3, en el que la mitocondrial diana es un 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; o 15% más larga o más corta que la secuencia de ácido nucleico nuclear diana.
8. El método de la reivindicación 3, en el que las dos secuencias de ácido nucleico diana tienen la misma longitud.
- 35 9. El método de la reivindicación 3, en el que las secuencias de ácido nucleico diana tienen una longitud inferior a 110 pares de bases.
10. El método de la reivindicación 3, en el que las secuencias de ácido nucleico diana tienen una longitud de 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 40 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; o 110 pares de bases.
- 45 11. El método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende las etapas consistentes en comparar la concentración total de ADNlc nuclear con un valor de referencia correspondiente predeterminado (ADNCnR) y concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación de contenido de ADNCmCn es menor que su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es mayor que su valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación de contenido de ADNCmCn es mayor que su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es menor que su valor de referencia correspondiente predeterminado.

12. El método de la reivindicación 3, que implica el uso de 2 conjuntos de 2 cebadores, en donde 1 conjunto de 2 cebadores se utiliza para amplificar la secuencia de ácido nucleico nuclear diana y 1 conjunto de 2 cebadores se utiliza para amplificar la secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana.
- 5 13. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de fluido corporal, tal como sangre, líquido ascítico, orina, líquido amniótico, heces, saliva o líquidos cefalorraquídeos.
14. Un método (B) para explorar a un individuo en busca de un cáncer, que comprende las etapas consistentes en
- 10 i) extraer los ácidos nucleicos libres de una muestra obtenida del individuo,
- ii) determinar el nivel de los ácidos nucleicos mitocondriales que tienen una longitud inferior a 110 pares de bases,
- iii) determinar el nivel de los ácidos nucleicos mitocondriales que tienen una longitud superior a 250 pares de bases,
- iv) calcular la relación del nivel determinado en la etapa iii) con respecto al nivel determinado en la etapa ii) (DII MITO),
- 15 v) determinar el nivel de los ácidos nucleicos nucleares que tienen una longitud inferior a 110 pares de bases,
- vi) determinar el nivel de los ácidos nucleicos nucleares que tienen una longitud superior a 250 pares de bases,
- 20 vii) calcular la relación del nivel determinado en la etapa vi) con respecto al nivel determinado en la etapa v) (DII NUC),
- viii) calcular la relación entre la relación determinada en la etapa iv) y la relación determinada en la etapa vii) (relación DII MITO/DII NUC),
- ix) comparar la relación determinada en la etapa viii) con un valor de referencia correspondiente predeterminado ("relación DII MITO/DII NUC") y
- 25 x) concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación determinada en la etapa viii) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación determinada en la etapa viii) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.
15. El método de la reivindicación 14, en el que los ácidos nucleicos libres son ácidos nucleicos de ADN libre (ADNlc).
- 30 16. El método de la reivindicación 14, que comprende las etapas consistentes en a) amplificar y cuantificar una primera secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana que tiene una longitud inferior a 110 pares de bases y una segunda secuencia de ácido nucleico mitocondrial diana que tiene una longitud de al menos 250 pares de bases, y b) amplificar y cuantificar una primera secuencia de ácido nucleico nuclear diana que tiene una longitud inferior a 110 pares de bases y una segunda secuencia de ácido nucleico nuclear diana que tiene una longitud de al menos 250 pares de bases.
- 35 17. El método de la reivindicación 16, en el que i) la primera secuencia de ácido nucleico mitocondrial o nuclear diana tiene una longitud de 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; o 110 pares de bases y/o ii) la segunda secuencia de ácido nucleico mitocondrial o nuclear diana tiene una longitud de 250; 251; 252; 253; 254; 255; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 267; 268; 269; 270; 271; 272; 273; 274; 275; 276; 277; 278; 279; 280; 281; 282; 283; 284; 285; 286; 287; 288; 289; 290; 291; 292; 293; 294; 295; 296; 45 297; 298; 299; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 309; 310; 311; 312; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 319; 320; 321; 322; 323; 324; 325; 326; 327; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 336; 337; 338; 339; 340; 341; 342; 343; 344; 345; 346; 347; 348; 349; 350 pares de bases.
18. El método de la reivindicación 16, en el que la primera y la segunda secuencias nucleicas mitocondrial o nuclear diana están ubicadas en el mismo gen o en el mismo exón.
- 50 19. El método de la reivindicación 16, que adicionalmente comprende las etapas consistentes en comparar la concentración total de ADNlc nuclear con un valor de referencia correspondiente predeterminado (ADNCnR) y concluir que el individuo padece un cáncer cuando la relación DII MITO/DII NUC es mayor que

- su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es mayor que su valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no padece cáncer cuando la relación DII MITO/DII NUC es menor que su valor de referencia correspondiente predeterminado y la concentración total de ADNlc nuclear es menor que su valor de referencia correspondiente predeterminado.
- 5
20. El método de la reivindicación 16, que implica el uso de 2 conjuntos de 3 cebadores, en donde 1 conjunto de 3 cebadores se utiliza para amplificar las secuencias de ácido nucleico nuclear diana corta (< 110 pb) y larga (> 250 pb), y 1 conjunto de 3 cebadores se utiliza para amplificar las secuencias de ácido nucleico mitocondrial diana corta (< 110 pb) y larga (> 250 pb).
- 10 21. El método de la reivindicación 14, en el que la muestra es una muestra de fluido corporal, tal como sangre, líquido ascítico, orina, líquido amniótico, heces, saliva o líquidos cefalorraquídeos.
22. Un método para determinar si un individuo logra una respuesta con un tratamiento, que comprende las etapas consistentes en
- i) determinar la relación de contenido de ADNCmCn antes del tratamiento,
- 15 ii) determinar la relación de contenido de ADNCmCn después del tratamiento,
- iii) comparar la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa i) con la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa ii) y
- 20 iv) concluir que el individuo logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa ii) es mayor que la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa i), o concluir que el individuo no logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa ii) está por encima de la misma o es menor que la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa i).
23. Un método para determinar si un individuo logra una respuesta con un tratamiento, que comprende las etapas consistentes en
- 25 i) determinar la relación DII MITO/DII NUC antes del tratamiento,
- ii) determinar la relación DII MITO/DII NUC después del tratamiento,
- iii) comparar la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) con la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) y
- 30 iv) concluir que el individuo logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) es menor que la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i), o concluir que el individuo no logra una respuesta con su tratamiento cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa ii) está por encima de la misma o es mayor que la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i).
24. Un método para determinar si un individuo que ha padecido un cáncer tiene una recaída después de un tratamiento, que comprende las etapas consistentes en
- 35 i) determinar la relación de contenido de ADNCmCn después del tratamiento,
- ii) comparar la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa i) con un valor de referencia correspondiente predeterminado,
- 40 iii) y concluir que el individuo tiene una recaída cuando la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa i) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, y
- iv) concluir que el individuo no ha recaído cuando la relación de contenido de ADNCmCn determinada en la etapa i) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.
25. Un método para determinar si un individuo que ha padecido un cáncer tiene una recaída después de un tratamiento, que comprende las etapas consistentes en
- 45 i) determinar la relación DII MITO/DII NUC,
- ii) comparar la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) con un valor de referencia correspondiente predeterminado, y

iii) concluir que el individuo tiene una recaída cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) es mayor que el valor de referencia correspondiente predeterminado, o concluir que el individuo no ha recaído cuando la relación DII MITO/DII NUC determinada en la etapa i) es menor que el valor de referencia correspondiente predeterminado.

- 5 26. El método de la reivindicación 24 o 25, en el que la relación de contenido de ADNCmCn y/o la relación DII MITO/DII NUC se determina después de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 meses o más después de finalizar el tratamiento.
- 10 27. El método de la reivindicación 1, 14, 22, 23, 24 o 25, en el que el individuo padece un cáncer seleccionado entre un cáncer de células de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, tracto gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero, y en el que el tipo histológico del cáncer se selecciona entre el grupo consistente en neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma de células gigantes y espinocelular; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; pilomatrixoma; carcinoma de células transicionales; carcinoma de células transicionales papilar; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquial-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma adrenocortical; carcinoma endometriode; carcinoma de apéndice cutáneo; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma; cistoadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistoadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en forma de anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, de mama; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecoma, maligno; tumor de células granulosas, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de propagación superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabiomasarcoma; rabiomasarcoma embrionario; rabiomasarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mulleriano mixto; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno;ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; tumor neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfatorio; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoides; otros linfomas no Hodgkin específicos; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mielode; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mielode; y leucemia de células pilosas.
- 50 28. El método de la reivindicación 1, 14, 22, 23, 24 o 25, en el que el individuo padece un cáncer colorrectal, un cáncer colorrectal metastásico o un cáncer hepatocelular.
- 55

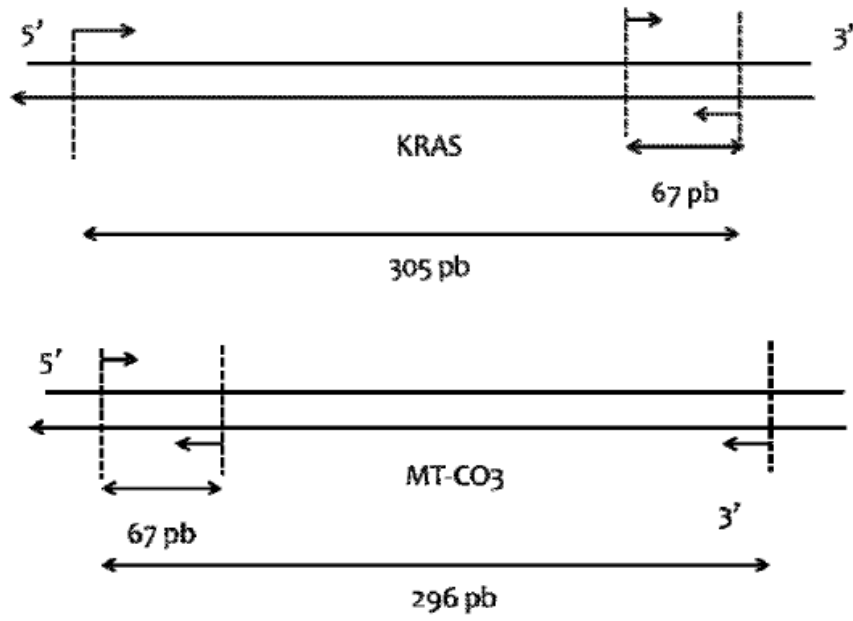
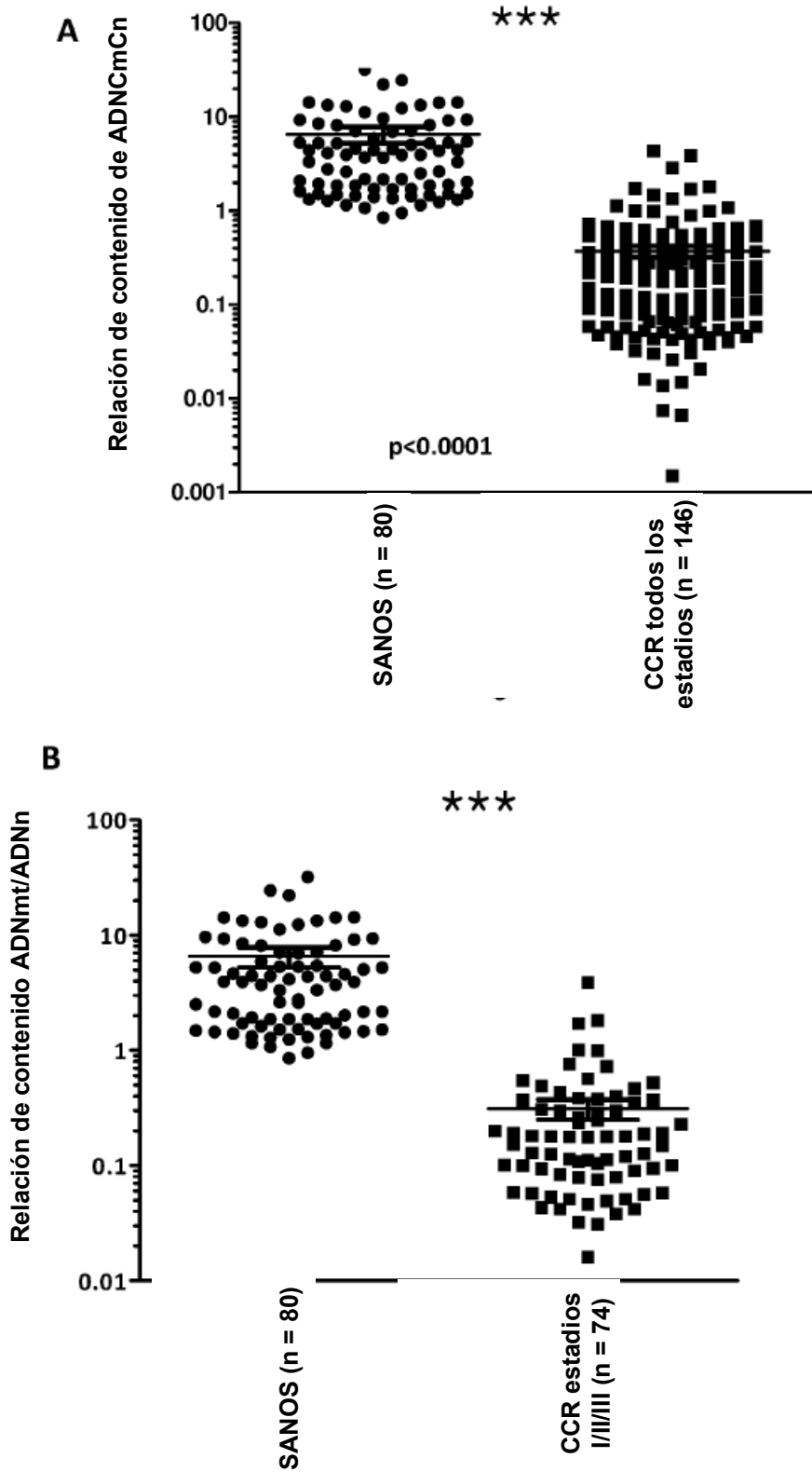


Figura 1



Figuras 2 A y B

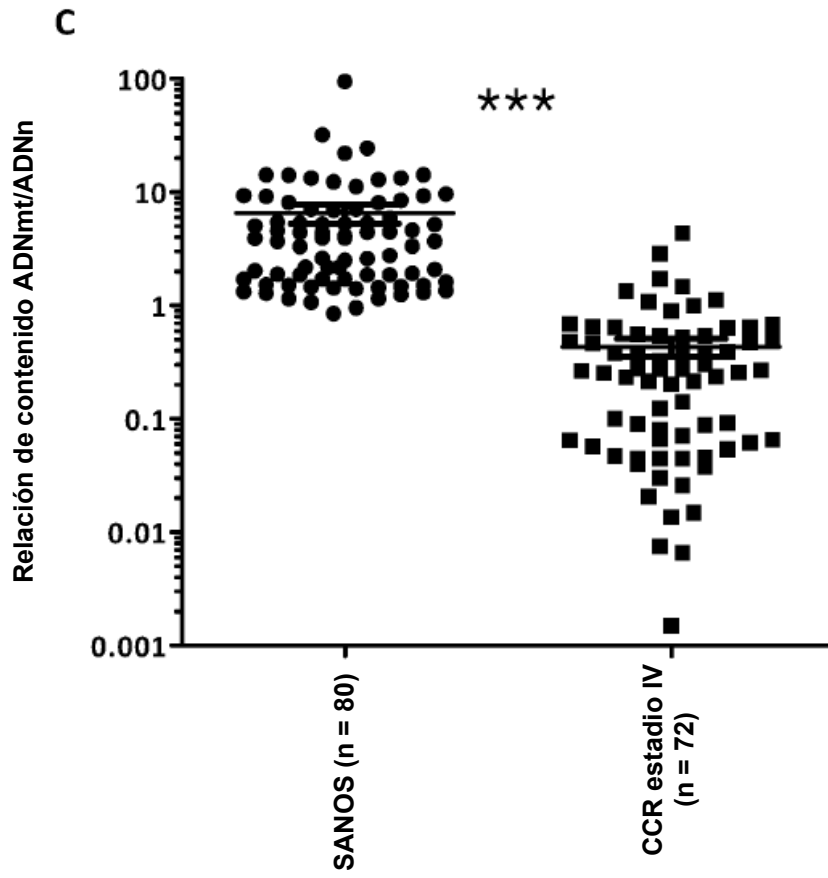
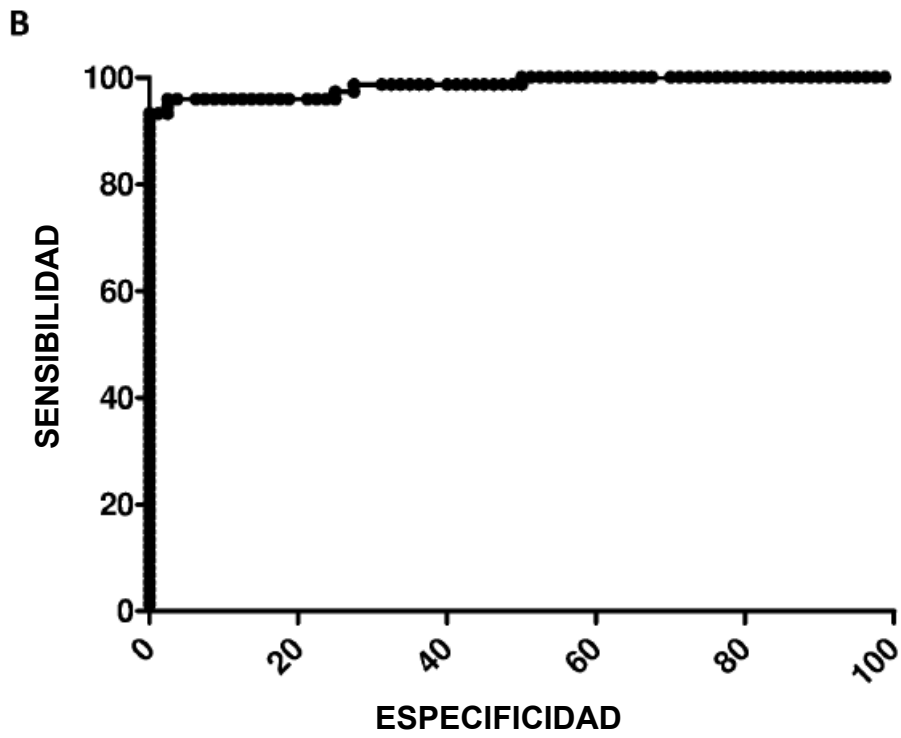
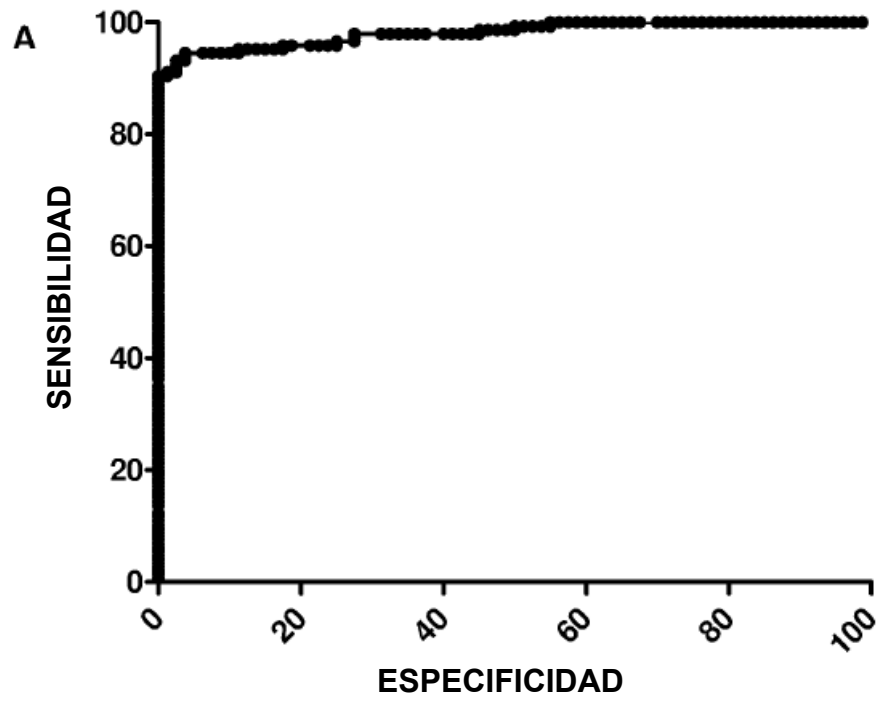


Figura 2C



Figuras 3 A y B

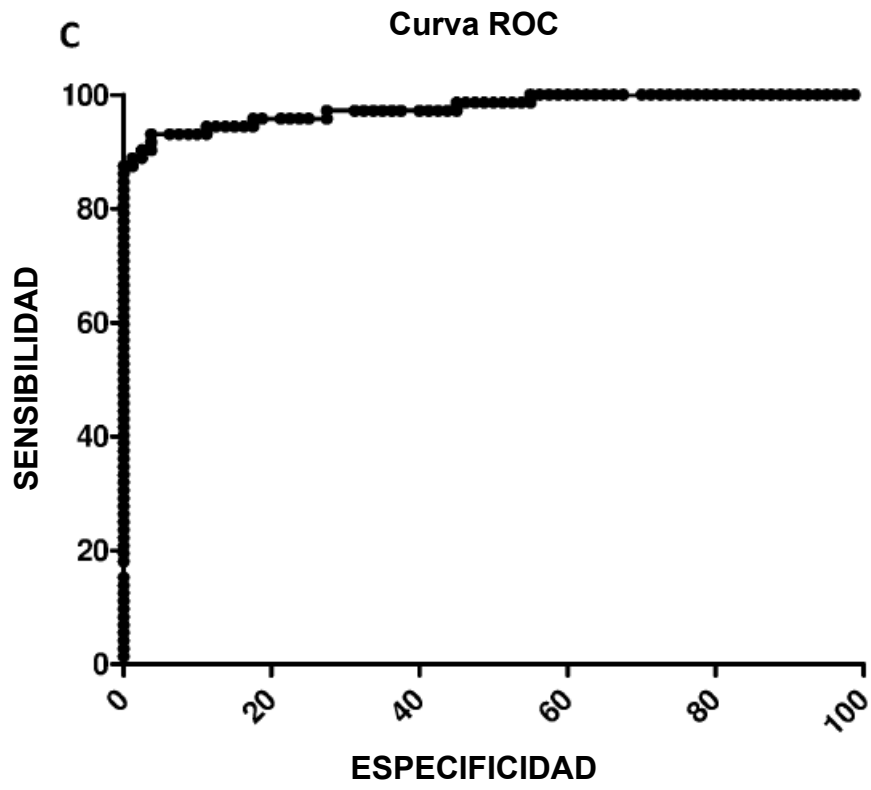


Figura 3C

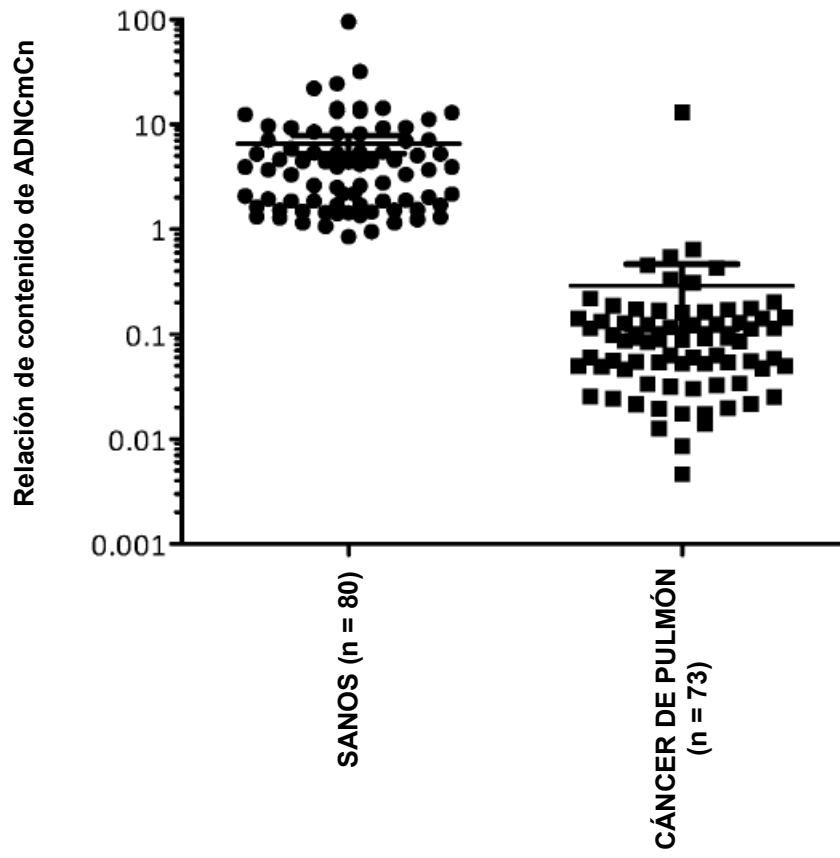


Figura 4

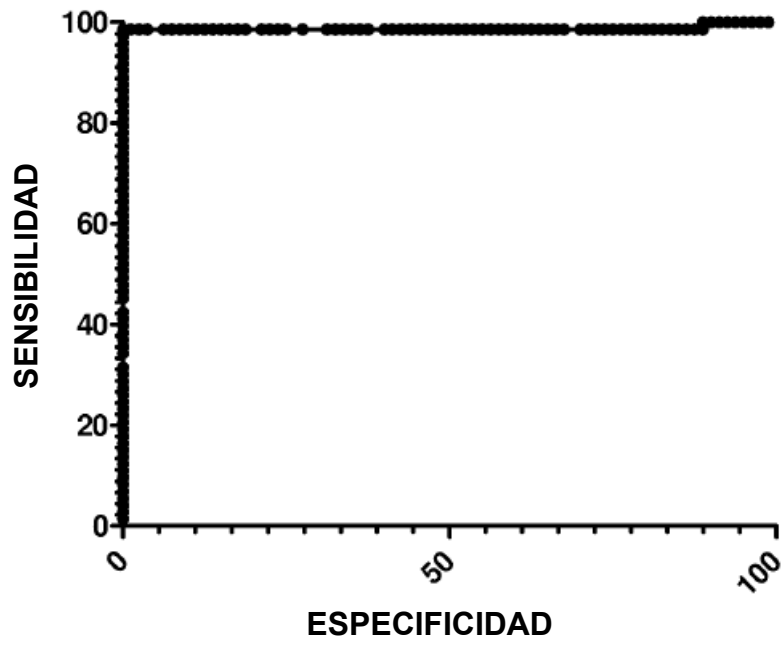


Figura 5

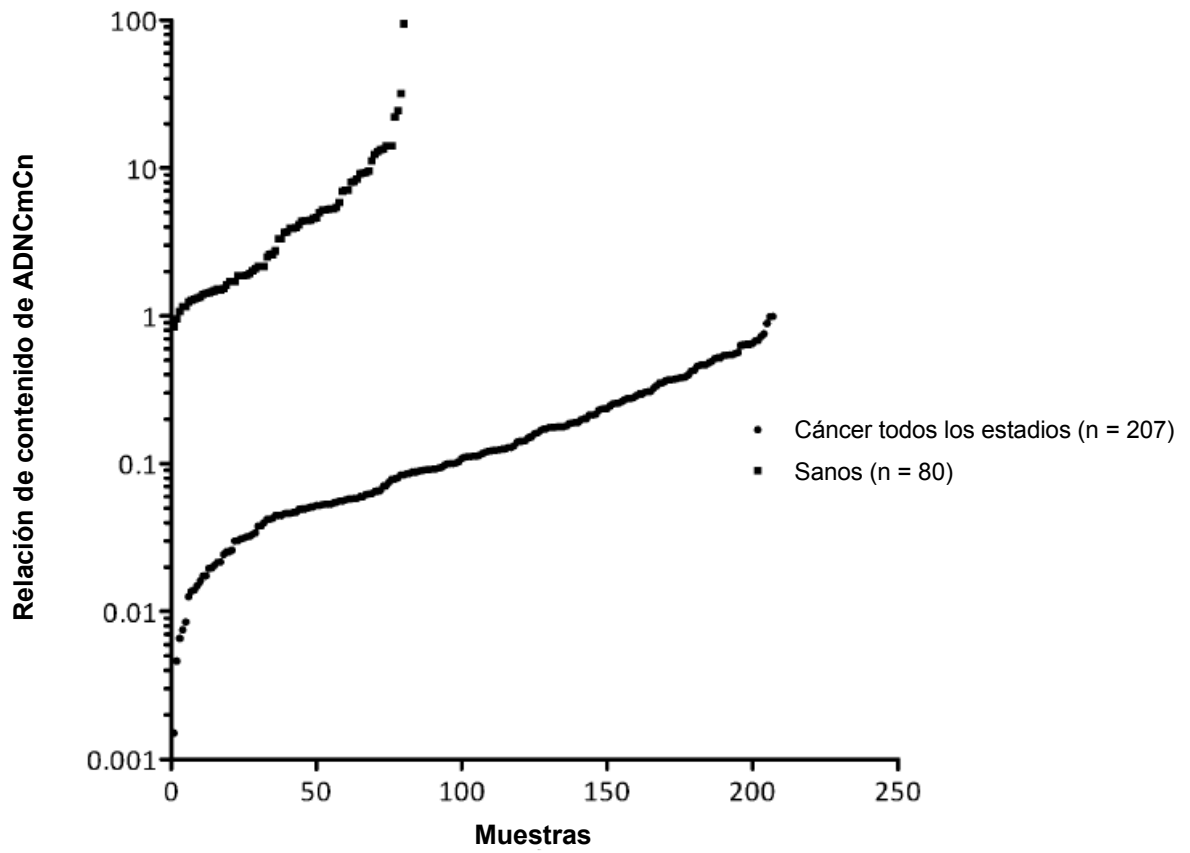


Figura 6

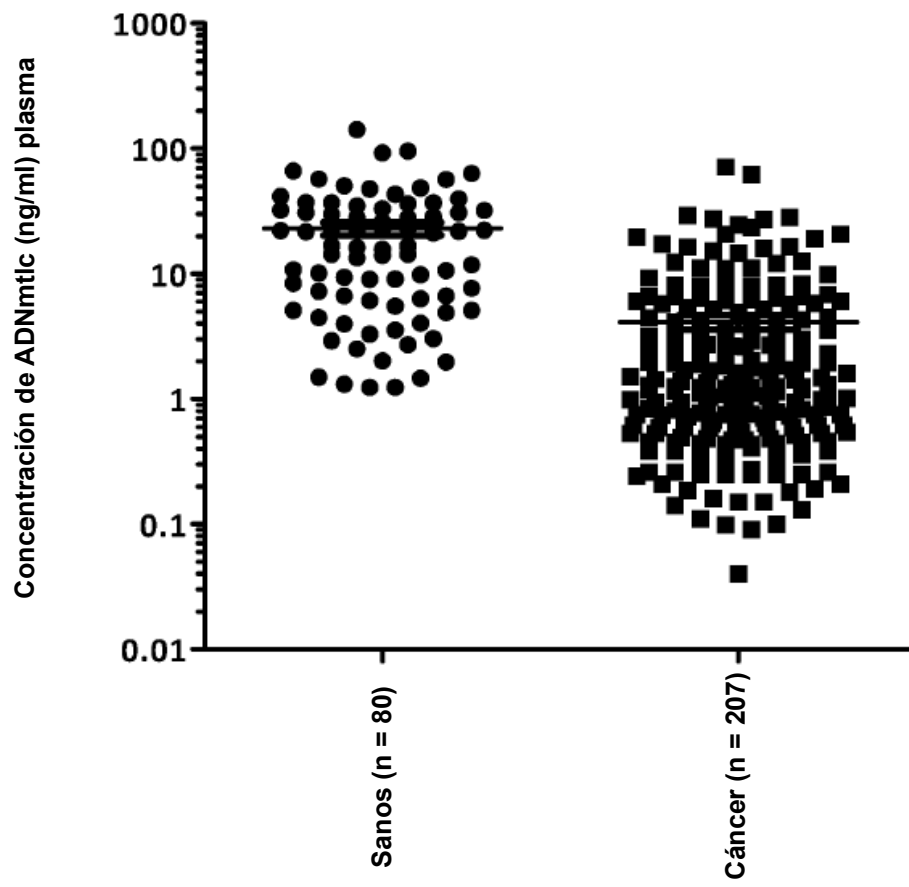


Figura 7

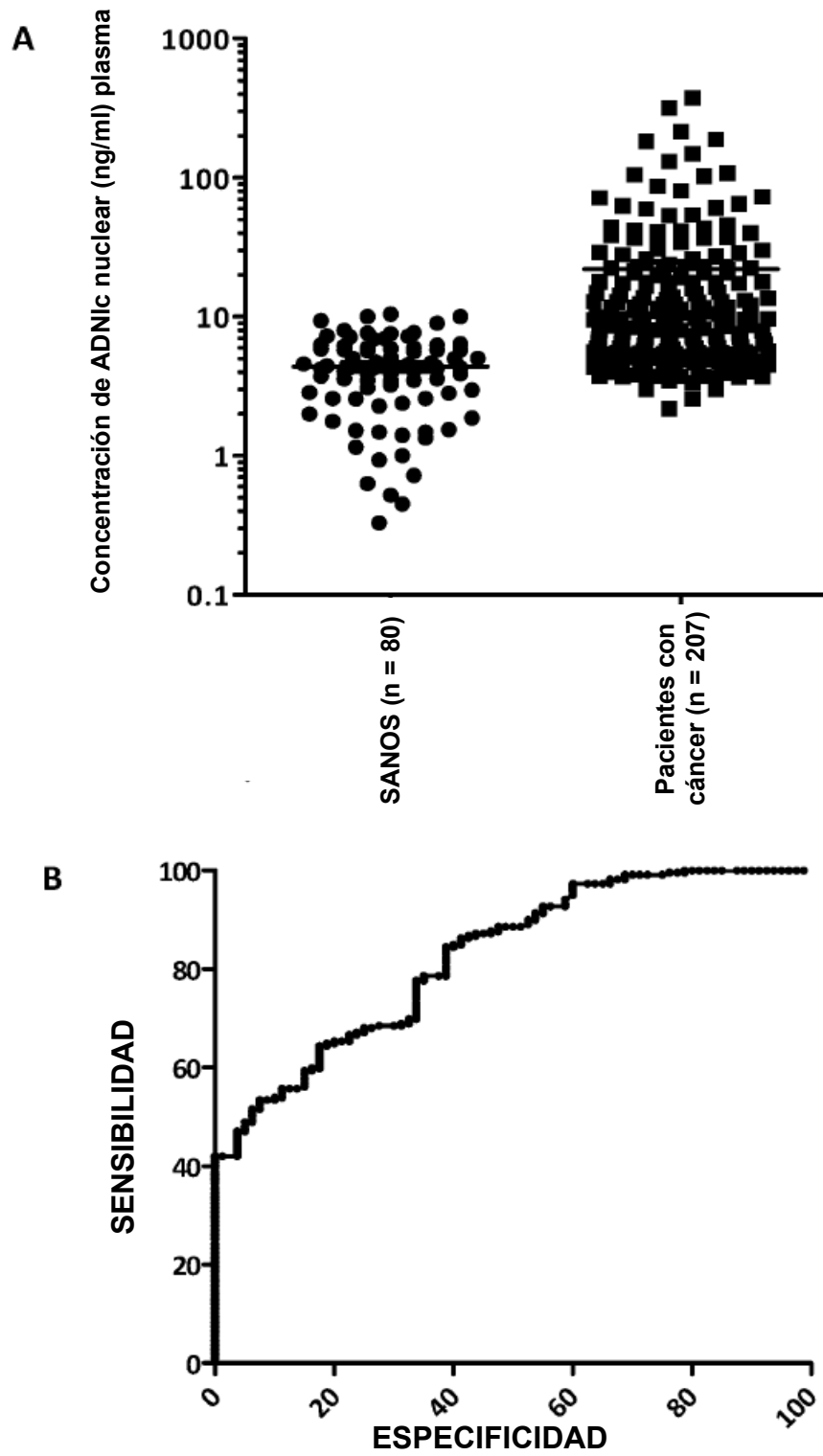


Figura 8

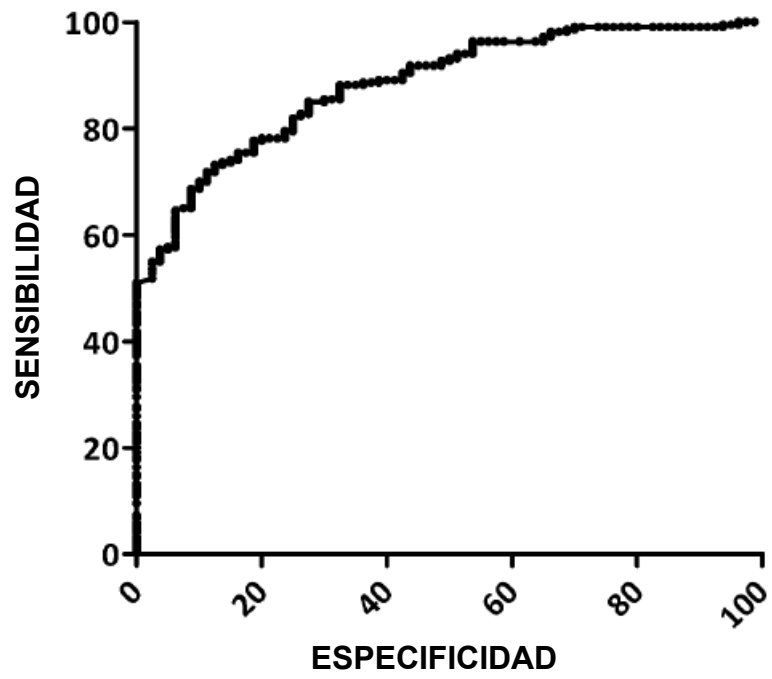
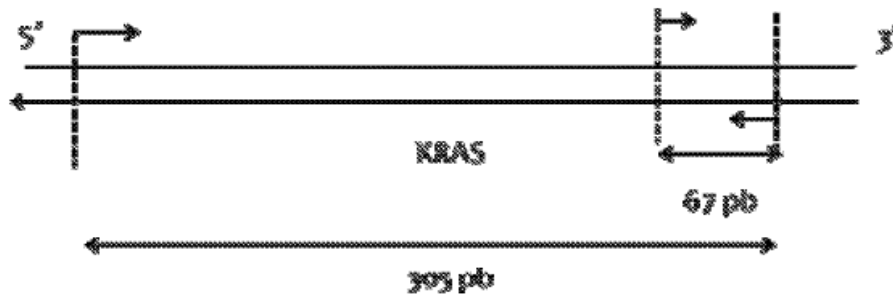


Figura 9

**Secuencia diana de ADN nuclear
(KRAS)**



**Secuencia diana de ADN mitocondrial
(Co1mt, citocromo C oxidasa 1)**

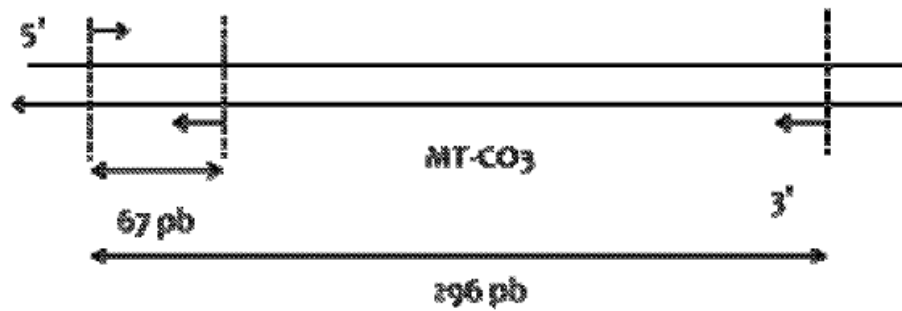


Figura 10

CONTENIDO RELATIVO DE ADN MITOCONDRIAL/NUCLEAR

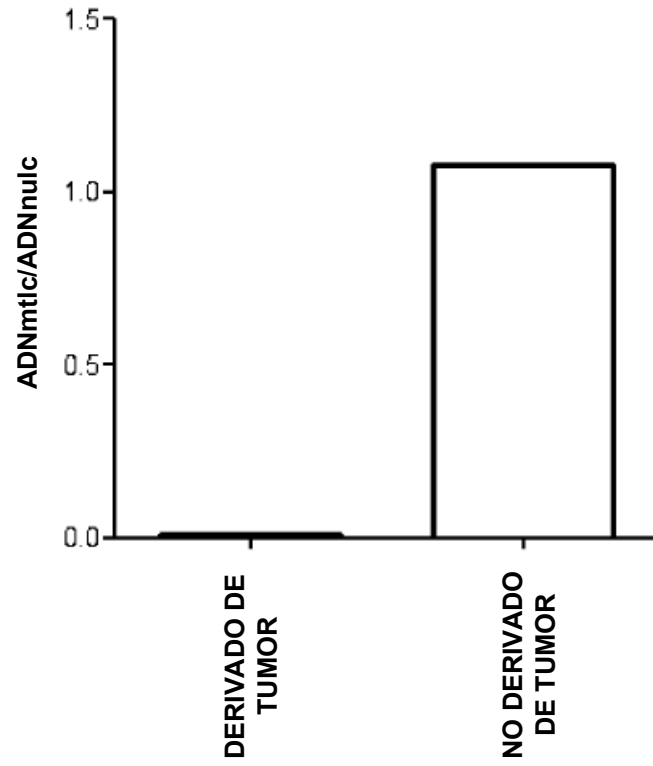


Figura 11

RATONES MNR CON INJERTO HETERÓLOGO SW620

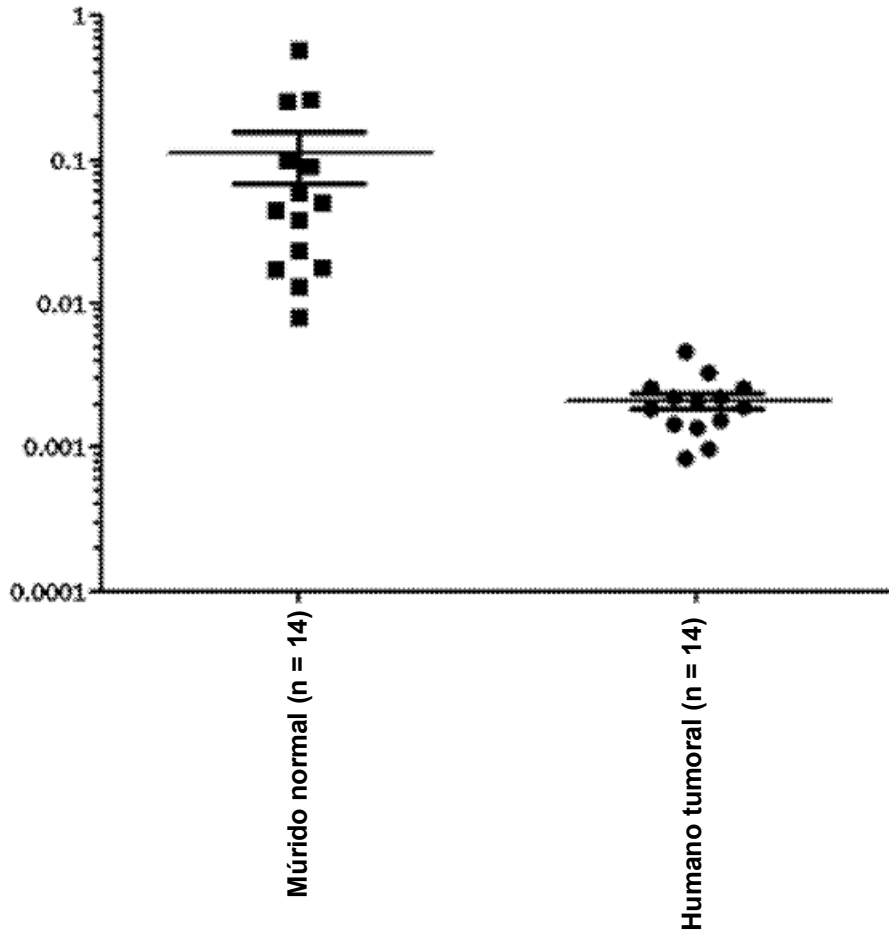


Figura 12

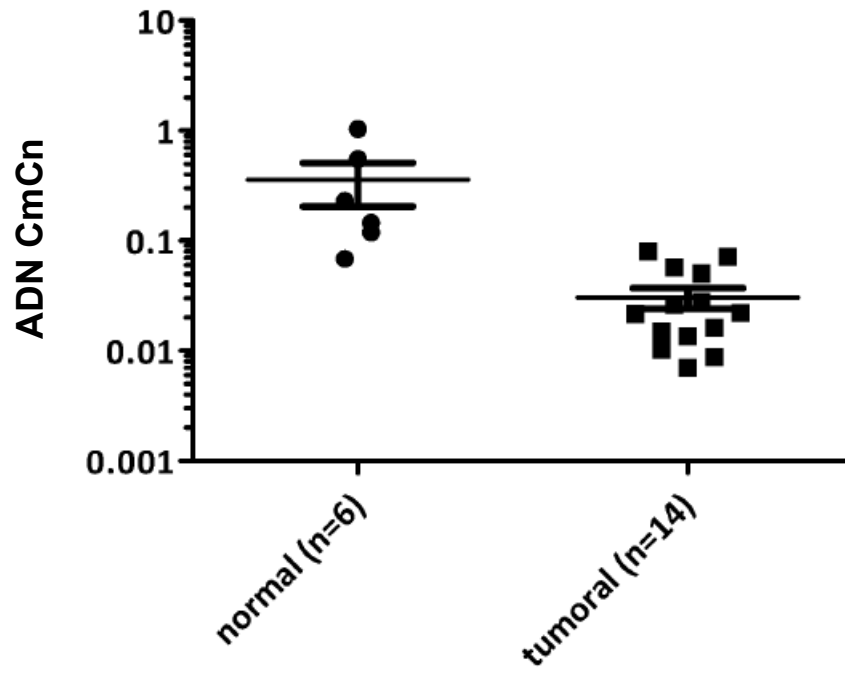


Figura 13