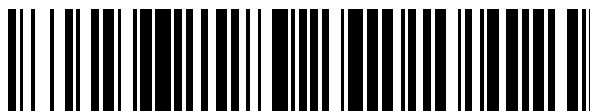


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 309**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2015 PCT/GR2015/000054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17072539**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2015 E 15795217 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3368683**

54 Título: **Método para la cuantificación de PD-L1**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.08.2020**

73 Titular/es:  
**PHARMASSIST LTD (100.0%)  
Anthrakorichon 15  
142 35 Nea Ionia, Athens, GR**

72 Inventor/es:  
**LIANIDOU, EVRYKLEIA y  
STRATI, ARETI**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 779 309 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la cuantificación de PD-L1

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un ensayo de RT-qPCR en tiempo real altamente sensible, específico y reproducible para la cuantificación de la expresión de *PD-L1* en una muestra de ARN, tal como una muestra de ARN aislado de Células Tumorales Circulantes (CTC) en sangre periférica de pacientes con cánceres sólidos.

10

Antecedentes de la invención

15 El descubrimiento de vías moleculares cruciales que promueven el crecimiento y mantenimiento de tumores junto con el desarrollo de fármacos que inhiben específicamente estas vías ha cambiado mucho en la serie de opciones perennemente limitadas para tratar muchos tipos de cáncer. La promesa del campo emergente de la medicina personalizada se utilizará cada vez más para adaptar los agentes terapéuticos a subpoblaciones definidas y, finalmente, a pacientes individuales con el fin de potenciar la eficacia y minimizar los efectos secundarios adversos. Sin embargo, el éxito de la medicina personalizada depende de tener pruebas diagnósticas complementarias precisas, reproducibles y clínicamente útiles para identificar a los pacientes que pueden beneficiarse de las terapias dirigidas. De acuerdo con este concepto, el paradigma más reciente es el exitoso desarrollo conjunto de un inhibidor selectivo de primera clase de la cinasa *BRAF* oncogénica, vemurafenib (ZELBORAF), que se dirige solo a la proteína *BRAF* mutante, que se detecta V600E positiva por la prueba de diagnóstico complementaria aprobada, la prueba de mutación de *BRAF* V600 Cobas 4800 (Roche Molecular Diagnostics).

25 A pesar del reciente desarrollo de terapias dirigidas en muchos tipos de cáncer, muchos pacientes no se benefician de estas terapias. Este hecho condujo a una mejor comprensión de los mecanismos de inmunidad protectora antitumoral y al desarrollo de inmunoterapias más eficaces que aumentan la supervivencia del paciente, lo que confirma la antigua idea de que la inmunidad desempeña un papel importante en la patogénesis del cáncer. La inmunoterapia es un tipo de tratamiento contra el cáncer diseñado para reforzar las defensas naturales del cuerpo para combatir el cáncer. Utiliza materiales producidos bien por el cuerpo o en un laboratorio para mejorar, dirigir o restaurar la función del sistema inmunitario. Ahora es evidente a través de intensos esfuerzos de investigación que las células cancerosas pueden desarrollar mecanismos específicos para evitar la inmunovigilancia. Uno de estos mecanismos es presentarse al sistema inmunitario de tal manera que no lo reconozca como algo que debería ser destruido. Otro mecanismo es interferir con las habilidades de los linfocitos T, cuyo deber es llevar a cabo tales destrucciones y que, al permanecer durante décadas en el cuerpo, proporciona inmunidad duradera a una enfermedad determinada. Por último, hay todo tipo de formas en que se puede suprimir el sistema inmunitario en su conjunto.

40 Los cánceres humanos se caracterizan por altas frecuencias de alteraciones genéticas y epigenéticas, que generan neoantígenos potencialmente reconocibles por el sistema inmunitario. La capacidad del sistema inmunitario para reconocer sus células normales de las células tumorales y para atacar a los invasores extraños, como los virus, proporciona la base para la eliminación rápida y específica de la mayoría de las infecciones. El sistema inmunitario es capaz de detectar y eliminar la mayoría de los tumores, que se encuentran en una etapa temprana y clínicamente no detectables por el concepto de inmunoeedición del cáncer. Sin embargo, las células cancerosas usan un "camuflaje celular" para engañar al sistema inmunitario y hacerle creer que son células normales; como resultado, algunos tumores no se destruyen por completo y escapan de la vigilancia inmunitaria. Un obstáculo básico para los enfoques inmunoterapéuticos es que la mayoría de los mecanismos están activos en el sitio del tumor, que actúan juntos para equilibrar de manera eficaz la inmunidad antitumoral.

50 A pesar del hecho de que se ha observado una respuesta inmunitaria endógena al cáncer en los pacientes, esta respuesta parece ser ineficaz y el sistema inmunitario tolera los cánceres establecidos. Contribuyendo a este estado de tolerancia, los tumores pueden explotar varios mecanismos distintos para suprimir activamente la respuesta inmunitaria del hospedador. Entre estos mecanismos, los tumores pueden cooptar los "puntos de control inmunitarios" endógenos que normalmente terminan las respuestas inmunitarias para mitigar el daño colateral del tejido, para evadir la destrucción inmunitaria. Recientemente, la FDA ha desarrollado y aprobado muchos inhibidores de la vía de puntos de control inmunitario específicos para proporcionar nuevos enfoques inmunoterapéuticos para el tratamiento del cáncer, incluyendo el desarrollo del anticuerpo (Ac) anti-CTLA-4, ipilimumab (Yervoy), para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado y el anticuerpo anti-PD-L1, nivolumab (Opdivo), para el tratamiento de pacientes con cáncer pulmonar no microcítico escamoso avanzado (NSCLC, por sus siglas en inglés) que han progresado con o después de la quimioterapia basada en platino.

60 La muerte programada 1 (*PD-1*) es un receptor inhibidor inmunitario expresado en varias células inmunitarias, particularmente en los linfocitos T citotóxicos. Este receptor interactúa con dos ligandos, el ligando de muerte programada 1 (*PD-L1*) (B7-H1, CD274) y *PD-L2* (B7-DC). El *PD-1* tiene una mayor afinidad por *PD-L1*, que se expresa ampliamente en las células tumorales, así como en otras células inmunitarias, mientras que *PD-L2* se expresa principalmente en macrófagos y células dendríticas. [Keir M, Butte M, Freeman G, Sharpe A. *PD-1* and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 2008;26: 677-704]. Cuando *PD-1* se une a las células tumorales que

65

expresan *PD-L1*, se suprime la actividad de los linfocitos T y la producción de citocinas, lo que conduce al agotamiento de los linfocitos T. La unión de *PD-L1* con *PD-1* durante la infección o inflamación en tejidos normales es de importancia crítica para mantener la homeostasia de la respuesta inmunitaria para prevenir la autoinmunidad. Sin embargo, la interacción *PD-1*/*PD-L1* en el microambiente tumoral, proporciona un escape inmunitario para las células tumorales al desactivar los linfocitos T citotóxicos. Por lo tanto, al bloquear esta interacción, se espera que las células tumorales sean atacadas por los linfocitos T citotóxicos. La activación de la vía *PD-1*/*PD-L1* protege a las células tumorales de las respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T. La inhibición de la vía *PD-1*/*PD-L1* revierte la evasión inmunitaria al reponer una gran cantidad de linfocitos T activados no agotados. El desarrollo y las pruebas clínicas de los anticuerpos de bloqueo inmunitario han dado como resultado, hasta ahora, una actividad clínica en una variedad de tumores malignos, incluyendo melanoma y cáncer pulmonar [Callahan MK, Wolchok JD. At the bedside: CTLA-4 and *PD-1*-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2013;94: 41-53].

Más recientemente, Larkin et al., presentaron un estudio de fase 3, aleatorizado, doblemente ciego, en el que se compararon nivolumab (anticuerpo anti-*PD-1*) como monoterapia o la combinación nivolumab más ipilimumab (anticuerpo anti-*CTLA-4*) con ipilimumab solo en pacientes con melanoma metastásico. La mediana de supervivencia sin progresión fue mayor con nivolumab más ipilimumab, en comparación con ipilimumab o nivolumab como monoterapia. Sin embargo, en pacientes con tumores *PD-L1* positivos, la mediana de supervivencia sin progresión (PFS por sus siglas en inglés) fue de 14,0 meses en el grupo de nivolumab-más-ipilimumab y en el grupo de nivolumab, pero en pacientes con tumores negativos para *PD-L1*, la PFS fue más larga con la terapia de combinación que con nivolumab solo. A partir de estos resultados, ha quedado claro que la expresión de *PD-L1* parece ser un biomarcador predictivo significativo en los tratamientos anti-*PD-L1*. Por lo tanto, está aumentando la necesidad de desarrollar una nueva prueba de diagnóstico complementaria para detectar tumores positivos o negativos para *PD-L1*, [Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373: 23-34].

El documento US2007/0231264 A1 proporciona composiciones, métodos y kits relacionados con proteínas que funcionan en el control de la biología y fisiología de las células de mamíferos, incluidas las células de un sistema inmunitario de mamíferos. El documento WO2014/151006 A2 divulga biomarcadores para la selección y el pronóstico de pacientes en cáncer, así como también métodos para usar antagonistas de la ruta *PD-L1*/*PD-1*. Geng H et al., *International Journal of Cancer*, vol. 118, n.º 11, 1 de junio de 2006, páginas 2657-2664 describe la implicación de B7-H1 en la evasión tumoral en el proceso de inmunoterapia con la vacuna HSP70, lo que sugiere una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer. Wu Y et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 392, n.º 4, 19 de febrero de 2010, páginas 510-515 revelan que la sobreexpresión de Dlk (DAK humana tipo cinasa) pudo sensibilizar las células a la apoptosis, mientras que la sobreexpresión del mutante inactivo de la cinasa pudo rescatar la muerte celular apoptótica, lo que respalda que la reconstitución de la expresión de Dlk podría brindar un posible enfoque terapéutico para el carcinoma del cuello uterino.

Recientemente, el enfoque de "biopsia líquida" tiene un alto potencial para cambiar significativamente la estrategia terapéutica en pacientes que padecen muchos tipos de cáncer. La detección, enumeración y caracterización molecular de las Células Tumorales Circulantes (CTC), el ADN tumoral circulante sin células (ADNtc) y los microARN circulantes (miARN) proporcionan una fuente no invasiva extremadamente potente y confiable de biomarcadores sanguíneos para el perfil molecular individual de cada paciente en tiempo real, y especialmente antes y después del tratamiento. Las aplicaciones de la biopsia líquida se basan en la identificación de dianas moleculares, la evaluación del pronóstico, el diagnóstico de recurrencia/progresión, la monitorización de la respuesta a la terapia y la monitorización de los perfiles genómicos tumorales en tiempo real. Lo que es más importante, estas pruebas basadas en sangre parecen ser muy desafiantes y altamente importantes en caso de que las biopsias tumorales no sean accesibles (como en el caso de NSCLC). Además, pueden ofrecer un seguimiento cercano de los biomarcadores de enfermedad, lo que permite monitorizar la eficacia del tratamiento y potencialmente mejorar la elección de las opciones de tratamiento.

Recientemente, Mazel et al., usando el sistema CellSearch™ (Veridex, J&J), una plataforma aprobada por la FDA para la enumeración de CTC, mediante el uso de un anticuerpo específico anti-*PD-L1* y el cuarto canal para la obtención de imágenes en CellSearch, encontraron CTC *PD-L1* positivos en 11 de 16 (68,8 %) pacientes con cáncer de mama metastásico. Más específicamente, en su estudio, han utilizado el anticuerpo monoclonal conjugado anti-B7-H1/*PD-L1*PE humano para determinar la expresión de *PD-L1*, lo que sugiere que este ensayo podría usarse para biopsia líquida para monitorizar y estratificar a pacientes con cáncer sometidos a bloqueo de puntos de control inmunitario [Mazel M, Jacot W, Klaus P, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L et al. Frequent expression of *PD-L1* on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol.* 2015, Article in press]. Además, Oliveira-Costa et al., encontraron una fuerte expresión citoplasmática de *PD-L1* en CTC en carcinoma oral de células escamosas usando inmunofluorescencia y Nanostring [Oliveira-Costa JP, Fiorini de Carvalho A, Gobbi da Silveira G, Amaya P, Wu Y et al., Gene expression patterns through oral squamous cell carcinoma development: *PD-L1* expression in primary tumor and circulating tumor cells. *Oncotarget.* 2015;6: 20902-20].

La detección de la expresión de *PD-L1* en CTC de forma cuantitativa podría utilizarse para monitorizar la eficacia de los inhibidores de puntos de control inmunitario como un enfoque de "biopsia líquida" y podría ofrecer muchos avances en la práctica clínica. Por lo tanto, por esta razón, se desarrolló y validó un método ultrasensible y altamente específico basado en RT-qPCR para la cuantificación de la expresión de *PD-L1* en CTC, adecuado para monitorizar la eficacia

de los inhibidores de puntos de control en sangre periférica de pacientes con cáncer. Este ensayo tiene una sensibilidad y especificidad analíticas muy altas para cuantificar la expresión de *PD-L1* en CTC, y es altamente sensible en comparación con otros métodos utilizados en tejidos tumorales como la inmunohistoquímica. Además, el método desarrollado es una prueba de diagnóstico molecular de tubo cerrado que comprende una herramienta clínica simple y de alto rendimiento, que puede automatizarse fácilmente y usarse en la mayoría de los laboratorios clínicos de diagnóstico molecular, ya que no requiere instrumentación costosa y es fácil de usar. Además, el método de desarrollo es cuantitativo, permitiendo así no solo reconocer las diferencias en la expresión de *PD-L1* en muestras clínicas, sino también someterse a pruebas de control de calidad de rendimiento diarias (consistencia, reproducibilidad, precisión dentro del ciclo y entre ciclos) que son muy importantes para fines de acreditación.

Por primera vez, se diseñó un nuevo método basado en RT-qPCR con nuevos cebadores específicamente diseñados y una sonda de hidrólisis para la cuantificación de transcritos de ARNm de *PD-L1* en una muestra clínica humana y especialmente en sangre periférica (CTC). Especialmente para la caracterización molecular de las CTC, se necesitan metodologías altamente sensibles, consistentes y específicas. En este caso se proporciona evidencia de que este ensayo es adecuado para seleccionar pacientes para inmunoterapia basándose en la administración de inhibidores de puntos de control, así como para monitorizar la eficacia de los inhibidores de puntos de control en sangre periférica de pacientes con cáncer.

#### Sumario de la invención

Es un objetivo proporcionar un método mejorado para cuantificar la expresión de ARNm de *PD-L1* en una muestra de ARN tal como una muestra de ARN aislado de CTC en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos. El objetivo se logra total o parcialmente mediante un método de acuerdo con la reivindicación 1. Las realizaciones y aspectos adicionales de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas, en los dibujos y en el listado de secuencias. En particular, la invención se refiere a un método *in vitro* para la determinación cuantitativa de la expresión del Ligando de Muerte Programada 1 (*PD-L1*) en una muestra de biopsia líquida de Células Tumorales Circulantes (CTC), comprendiendo dicho método las etapas:

- i. someter la muestra a la transcripción inversa utilizando ARN presente en la muestra como plantilla para sintetizar una secuencia de ADNc correspondiente,
- ii. formar una mezcla de reacción que comprende la muestra, reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, un par de cebadores diana, una sonda de hidrólisis diana, siendo dicho par de cebadores diana y la sonda de hidrólisis diana capaces de hibridar con el ARNm de *PD-L1* y consistiendo dicho par de cebadores diana en un cebador directo diana que comprende la secuencia 5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 4) y un cebador inverso diana que comprende la secuencia 5'-TTTCACATCCATCATTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 6)
- iii. someter la mezcla de reacción a condiciones de amplificación optimizadas para generar al menos una copia de una secuencia del ácido nucleico complementaria a una secuencia diana, siendo dicha secuencia diana un transcrito de ARNm de la secuencia de ARNm de *PD-L1* (SEQ ID NO: 1), y
- iv. determinar la cantidad de ARNm de *PD-L1* en dicha muestra,
- v. normalizar la expresión de *PD-L1* con respecto a una expresión de un gen de referencia, cuyos niveles de expresión permanecen constantes entre diferentes tipos de células y
- vi. comparar la cantidad de ARNm de *PD-L1* expresado en dicha muestra con un control positivo que es una muestra que comprende ARNm de *PD-L1* y un control negativo que es una muestra que no comprende ARNm de *PD-L1* para estimar una sobreexpresión de la secuencia de ARNm de *PD-L1*.

El método se basa en la determinación cuantitativa de la expresión de ARNm de *PD-L1* en una muestra. Este ensayo puede comprender un análisis cadena abajo de la expresión de ARNm de *PD-L1* en una muestra de ARN, tal como una muestra de ARN aislada de CTC en sangre periférica de pacientes con cánceres sólidos.

La etapa de aislamiento de CTC podría realizarse mediante métodos conocidos por los expertos, como p. ej. microfluídico y por filtración diferentes mediante dispositivos de tamaño, centrifugación por gradiente de densidad, selección inmunomagnética positiva y negativa, el dispositivo CellSearch<sup>TM</sup>, sistemas de análisis de células sueltas o sistemas de aislamiento de CTC *in vivo* tal como el sistema colector de células (Gilupi, GmbH) o sistemas de leucofóresis. Cabe entender que el aislamiento de CTC no se limita a los métodos enumerados.

En particular, la secuencia diana en el método descrito en el presente documento es el transcrito de ARNm del gen *PD-L1*, que deriva después de la transcripción inversa del ARN presente en la muestra mediante el uso de un kit de ADNc disponible comercialmente.

La cuantificación de la expresión de ARNm de *PD-L1* se puede usar en muchos tipos de cáncer tal como de mama, urotelial, colorrectal, esofágico, gástrico, carcinoma hepatocelular, pulmonar, melanoma, carcinoma de células escamosas orofaríngeo, nasofaríngeo, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, del cuello uterino, glioblastoma, mesoteliomas malignos, linfomas, de ovarios y de páncreas. Ventajosamente, la cuantificación de la expresión de ARNm de *PD-L1* se puede utilizar en cualquier tipo de enfermedad neoplásica maligna para cuantificar una expresión de ARNm de *PD-L1*.

El método de acuerdo con la invención amplifica específicamente solamente la secuencia de ARNm de *PD-L1*, evitando la amplificación del ADN genómico. El método comprende una RT-qPCR, que utiliza un par de cebadores diana, que comprende al menos un sitio que abarca secuencias intrónicas y una sonda de hidrólisis diana. Ventajosamente, el sitio que abarca secuencias intrónicas puede comprender solo una base en cualquier sitio del intrón, lo que da como resultado que los cebadores diana solo se unan a una secuencia sin intrones en las condiciones empleadas. El método utiliza un par de cebadores diana que solamente se unirán a una secuencia en la que se han desempalmado los intrones, por ejemplo, ARNm, ADNc. Además, la sonda de hidrólisis diana es parte de la mezcla de reacción de amplificación e hibrida con la secuencia diana recién sintetizada en las condiciones seleccionadas, siempre que esta secuencia diana esté presente en la muestra de prueba.

De acuerdo con la invención, la característica principal del par de cebadores diana es que comprende al menos un sitio que abarca secuencias intrónicas. Esto proporciona un par de cebadores diana que solamente se unirán a una secuencia en la que se han desempalmado los intrones, por ejemplo, ARNm, ADNc. Debe entenderse que dicho "empalme" se puede producir de forma natural, es decir, para proporcionar la detección de ARNm en una muestra biológica. Sin embargo, el término también abarca una secuencia modificada por ingeniería que tiene los intrones "desempalmados" de la secuencia, por ejemplo, ADNc. El sitio que abarca secuencias intrónicas puede comprender solo una base en cualquier sitio del intrón, siempre que el cebador diana solo se una a la secuencia sin intrones en las condiciones empleadas. Uno o ambos cebadores directo e inverso diana pueden comprender uno o más sitios que abarcan secuencias intrónicas. En una realización preferida, ambos cebadores diana comprenden un sitio que abarca secuencias intrónicas.

En particular, el cebador directo diana es el cebador que se extiende en la misma dirección que la cadena codificante del ácido nucleico diana. El cebador directo diana está diseñado para hibridar entre los exones 4 y 5 de la secuencia de ARNm de *PD-L1* para potenciar solamente la secuencia diana de ARNm evitando la amplificación genómica del ADN. El cebador directo diana es complementario al extremo 3'. Por el contrario, el cebador inverso diana es el cebador que se extiende en la misma dirección que la cadena no codificante del ácido nucleico diana. El cebador inverso diana está diseñado para hibridar entre los exones 5 y 6 de la secuencia de ARNm de *PD-L1* para la amplificación solamente de la secuencia diana evitando productos no específicos. En consecuencia, los cebadores diana se alinean con sus extremos 3' uno frente al otro.

Más en particular, el "par de cebadores diana", que se usa en el método, es capaz de hibridar con una secuencia de ARNm de *PD-L1*.

En particular, la secuencia diana es el transcrito de ARNm de la secuencia de ARNm de *PD-L1* (SEQ ID NO: 1). Cabe señalar que la secuencia de ADN para *PD-L1* (SEQ ID NO: 1) enumerada en los listados de secuencias incluidos corresponde a la secuencia de ARNm transcrita de dicha proteína. El cebador directo diana incluye la secuencia 5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 4). El cebador inverso diana incluye la secuencia 5'-TTTCACATCCATCATTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 6). La invención asimismo divulga secuencias de sondas específicas, tales como sondas de hibridación, sondas de hidrólisis (TaqMan) diana o sondas de tipo Beacon molecular o SCORPION, para la detección/cuantificación del producto de amplificación por PCR. Asimismo, la sonda puede usarse para garantizar la especificidad. Dicha sonda es una sonda de hidrólisis diana. Preferentemente, la sonda de hidrólisis diana debe incluir al menos la secuencia 5'-GCACATCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 7), más preferentemente, la sonda de hidrólisis diana incluye la secuencia 5'-6FAM-ACCTCTGGCACATCCTCCAATGAAAG-BBQ-3' (SEQ ID NO: 8) y dos partículas fluorescentes. Las sondas están preferentemente marcadas. El marcador puede ser bien directamente detectable con, por ejemplo, fluoróforos, quimioluminóforos, partículas fluorescentes y similares, o indirectamente detectable con compañeros de unión específicos y ácidos nucleicos. Los marcadores preferidos son directamente detectables, y los marcadores preferidos particulares son colorantes fluorescentes, tales como SYBR verde I, FAM, HEX, VIC, fluoresceína LC Red 610, LC Red640, LC Red670, LC Red 705 y otros colorantes fluorescentes conocidos en la técnica.

En particular, la sonda de hidrólisis diana está diseñada para hibridar con una región interna dentro del amplicón. Especialmente, la sonda de hidrólisis diana que se usa en este método está diseñada para hibridar con una región interna del exón 5 de la secuencia de ARNm de *PD-L1*. Es, por lo general, un oligonucleótido de 20-30 pb con un colorante indicador fluorescente (es decir, 6-fluoresceína, FAM) fijado covalentemente al extremo 5' y un colorante desactivador de fluorescencia (es decir, BlackBerry Quencher, BBQ). El colorante desactivador de fluorescencia situado de forma proximal reduce la intensidad de emisión del colorante indicador. La sonda de hidrólisis se añade directamente a la mezcla de PCR, y las condiciones son prácticamente idénticas a las establecidas para una PCR convencional. Durante la fase de extensión del ciclo de PCR, la ADN polimerasa Taq escinde la sonda de hidrólisis solo cuando está hibrida con la diana, separando el colorante indicador del colorante desactivador de fluorescencia. Un aumento en la intensidad de fluorescencia a 518 nm (cuando FAM es el colorante indicador) (debido a la liberación del efecto de desactivación en el indicador) es el resultado de la hidrólisis de la sonda de hidrólisis y es cuantitativo para la cantidad inicial de la plantilla. La intensidad de fluorescencia específica del colorante indicador aumenta debido a su falta de proximidad al colorante desactivador. Los ciclos repetidos de desnaturalización, emparejamiento y extensión dan como resultado una amplificación exponencial del producto de PCR y de la intensidad de fluorescencia.

En otro aspecto, la etapa (v) del método puede comprender además un par de cebadores de referencia que hibrida

con una secuencia de ARNm de referencia de un gen de referencia para asegurar que el material amplificable esté presente en las muestras de prueba y para evitar resultados negativos falsos.

Un gen de referencia idealmente debería ser estable, expresado en las células y tejidos de interés que no muestren cambios en las condiciones experimentales o en la patología. Estos genes se utilizan para normalizar los niveles de ARNm de genes de interés antes de la comparación entre diferentes muestras por la RT-qPCR. Estos genes de referencia son responsables de medir y reducir los errores de las variaciones entre las muestras, la extracción y la calidad y la eficacia del ARN en la síntesis de ADNc, los controles internos y las diferentes muestras experimentales como en células normales o tejido tumoral. En el método de RT-qPCR, se debe considerar un gen de referencia apropiado para la cuantificación precisa de la expresión de ARNm porque el ciclo de cuantificación ( $C_Q$ ) de los genes diana se compara con el  $C_Q$  del gen de referencia. Los niveles de expresión del gen de referencia deben permanecer constantes entre diferentes tipos de células; de lo contrario, la normalización a una referencia interna variable puede dar como resultado un aumento de los errores. Se han usado varios genes como genes de referencia, incluyendo hipoxantina fosforribosil transferasa (*HPR1*),  $\beta$ 2-microglobulina (*B2M*), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y  $\beta$ -actina (*ACTB*), ARN ribosómico 18S (*ARNr 18S*), ARN ribosómico 28S (*ARNr 28S*),  $\alpha$ -tubulina (*TUBA*), albúmina (*ALB*), proteína ribosómica L32 (*RPL32*), proteína de unión a secuencia TATA (*TBP*), ciclofilina C (*CYCC*), Factor 1 $\alpha$  de elongación (*EF1A*), ARN polimerasa II (*RPII*) [Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 2000; 29:332-7].

En una realización preferida, *B2M* usado como un gen de referencia en esta invención, y ventajosamente dicho par de cebadores de referencia se diseñó para hibridar con la secuencia de ARNm de *B2M* (Beta-2-Microglobulina) (SEQ ID NO: 2).

Por tanto, en otro aspecto de la invención proporciona un par de cebadores de referencia de la secuencia de ARNm de *B2M* (SEQ ID NO: 2). Cabe señalar que la secuencia de ADN para *B2M* (SEQ ID NO: 2) enumerada en los listados de secuencias incluidos corresponde a la secuencia de ARNm transcrita de dicha proteína. En una realización preferida, el cebador directo de referencia debe incluir al menos la secuencia 5'-GCCGTGTGAAC-3' (SEQ ID NO: 9), más preferentemente el cebador directo de referencia incluye la secuencia 5'-GCCTGCCGTGTGAACCATGT-3' (SEQ ID NO: 10). En una realización preferida, el cebador inverso de referencia debe incluir al menos la secuencia 5'-CTTCAAACCTC-3' (SEQ ID NO: 11), más preferentemente el cebador inverso de referencia incluye la secuencia 5'-AAATGCGGCATCTTCAAACCTC-3' (SEQ ID NO: 12).

En el contexto de la presente invención, "par de cebadores de referencia" y "par de cebadores diana" no son lo mismo. En el contexto de la presente invención, la expresión "par de cebadores de referencia" pretende significar un par de cebadores, que es capaz de hibridar con una secuencia de un gen, que es ubicuo para una célula dada. Más en particular, el "par de cebadores de referencia", que se usa en el método, es capaz de hibridar con una secuencia de ARNm de *B2M*. En otras palabras, se puede usar un "par de cebadores de referencia" como control interno en un método o kit de la invención.

En RT-qPCR en tiempo real, se puede usar una sonda de hibridación para la cuantificación de la expresión de *B2M* como se describe previamente en relación con el par de cebadores de *PD-L1*. En una realización preferida la sonda de hidrólisis de referencia debe incluir al menos la secuencia 5'-CTCGATCCCAC-3' (SEQ ID NO: 13), más preferentemente, la sonda de hidrólisis diana incluye la secuencia 5'-6FAM-CATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCAC-BBQ-3' (SEQ ID NO: 14) y dos partículas fluorescentes.

En un aspecto adicional, el presente documento también se refiere a un método para:

- i. diagnosticar y/o pronosticar la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- ii. predecir la eficacia del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- iii. evaluar el resultado del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- iv. evaluar la recurrencia de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control,

en donde dicho método comprende la cuantificación del ARNm de *PD-L1* en una muestra de acuerdo con las etapas para el método *in vitro* como se describe en el presente documento, en donde el sujeto es un ser humano, que padece una enfermedad neoplásica maligna, en donde los inhibidores de puntos de control pueden comprender los inhibidores de bloqueo de puntos de control inmunitario, tal como los inhibidores anti-PD-L1.

El método *in vitro* como se describe en el presente documento puede usarse ventajosamente para determinar la

cantidad de ARNm de *PD-L1* en una muestra para:

- 5 i. diagnosticar y/o pronosticar enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- ii. predecir la eficacia del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- 10 iii. evaluar el resultado del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- iv. evaluar la recurrencia de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control,

15 en donde la muestra analizada puede ser una muestra biológica, y dicha muestra biológica puede obtenerse de un sujeto. Ventajosamente, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano, que padece una enfermedad neoplásica maligna.

20 La enfermedad neoplásica maligna puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama, urotelial, colorrectal, esofágico, gástrico, carcinoma hepatocelular, pulmonar, nasofaríngeo, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, linfomas, melanoma, carcinoma orofaríngeo de células escamosas, del cuello uterino, glioblastoma, mesoteliomas malignos, ovárico y pancreático.

25 El método *in vitro* como se describe en el presente documento se usa ventajosamente cuando el sujeto padece cáncer de mama y pulmonar no microcítico.

Cuando se diagnostica y/o pronostica enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, el método comprende las etapas de:

- 30 a) realizar el método *in vitro* para la cuantificación del ARNm de *PD-L1* en una muestra como se describe en el presente documento,
- b) determinar la cantidad de ARNm de *PD-L1* en dicha una muestra,
- 35 c) normalizar la expresión de *PD-L1* con respecto a la expresión de *B2M*, usado como un gen de referencia,
- d) comparar la cantidad de ARNm de *PD-L1* detectada en dicha muestra con un control positivo y un control negativo para estimar la sobreexpresión de *PD-L1*, derivando así información pronóstica.

40 La muestra se obtiene ventajosamente de un sujeto que padece una enfermedad neoplásica maligna y a quien no se le ha recetado inmunoterapia con inhibidores de puntos de control. Realizaciones adicionales son en donde el control positivo comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de control sanas ya que las PBMC expresan también *PD-L1* a niveles muy bajos.

45 Por lo tanto, una indicación de información pronóstica es un cambio relativo en la cantidad de ARNm de *PD-L1* en dicha muestra que identifica antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control y puede estimar el riesgo de resultados futuros en un individuo basándose en sus características clínicas y no clínicas. En particular, un método para determinar el pronóstico tal como se usa en el presente documento se refiere a la predicción del resultado de o el curso futuro de, un sujeto. El pronóstico incluye la predicción de la supervivencia del paciente. Además, el pronóstico puede usarse para predecir el tiempo de supervivencia sin enfermedad de un individuo, el tiempo de supervivencia sin progresión, el tiempo de supervivencia específico de la enfermedad, la tasa de supervivencia o el tiempo de supervivencia. Las pruebas de pronóstico pueden realizarse con (por ejemplo, al mismo tiempo que) el diagnóstico de una afección cancerosa no diagnosticada previamente, o pueden relacionarse con una afección existente (diagnosticada previamente).

55 Cuando se predice la eficacia del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, el método comprende las etapas de:

- 60 a) realizar el método *in vitro* para la cuantificación del ARNm de *PD-L1* en una muestra como se describe en el presente documento,
- b) determinar la cantidad de ARNm de *PD-L1* en dicha una muestra,
- c) normalizar la expresión de *PD-L1* con respecto a la expresión de *B2M*, usado como un gen de referencia,
- 65 d) comparar la cantidad de ARNm de *PD-L1* detectada en dicha muestra con un control positivo y negativo para

estimar la sobreexpresión de *PD-L1*, prediciendo, de este modo, la eficacia del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto.

La muestra se obtiene ventajosamente de un sujeto que padece una enfermedad neoplásica maligna y a quien no se le ha administrado inhibidores de puntos de control como inmunoterapia. Por lo tanto, la predicción está asociada con la cantidad de sobreexpresión de ARNm de *PD-L1* en una muestra que se identifica antes de recibir inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, tales como los inhibidores anti-*PD-L1* y puede indicar si es probable que el sujeto responda favorablemente a un régimen de tratamiento y, por lo tanto, puede usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento eligiendo la modalidad de tratamiento más adecuada para cualquier sujeto en particular.

Cuanto se evalúa el resultado del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, el método comprende las etapas de:

- a) realizar el método *in vitro* para la cuantificación del ARNm de *PD-L1* en una muestra como se describe en el presente documento,
- b) determinar la cantidad de ARNm de *PD-L1* en dicha muestra,
- c) normalizar la expresión de *PD-L1* con respecto a la expresión de *B2M*, usado como un gen de referencia,
- d) comparar la cantidad de ARNm de *PD-L1* detectada en dicha muestra con un control positivo para estimar la sobreexpresión de *PD-L1*,
- e) repetir las etapas a) a d) en uno o más puntos temporales durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control de dicho sujeto, y en donde un cambio en la cantidad relativa de ARNm de *PD-L1* en dichas muestras a lo largo del tiempo indica la eficacia del tratamiento.

La muestra se obtiene ventajosamente de un sujeto que padece una enfermedad neoplásica maligna antes y después de que a dicho sujeto se le administren inhibidores de puntos de control como inmunoterapia. Por lo tanto, una indicación de tratamiento eficaz es un cambio relativo en la cantidad decreciente de ARNm de *PD-L1* en dicha muestra en relación con una muestra previa analizada en las etapas de repetición del método.

Cuando se evalúa la recurrencia de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, el método comprende las etapas de:

- a) realizar el método *in vitro* para la cuantificación del ARNm de *PD-L1* en una muestra como se describe en el presente documento,
- b) determinar la cantidad de ARNm de *PD-L1* en dicha una muestra,
- c) normalizar la expresión de *PD-L1* con respecto a la expresión de *B2M*, usado como un gen de referencia,
- d) comparar la cantidad de ARNm de *PD-L1* detectada en dicha una muestra con un control positivo y negativo para estimar la sobreexpresión de *PD-L1*,
- e) repetir las etapas a) a d) en uno o más puntos temporales durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control de dicho sujeto, y en donde un cambio en la cantidad relativa de ARNm de *PD-L1* en dichas muestras a lo largo del tiempo indica el riesgo de recurrencia.

Por lo tanto, una indicación de recurrencia es un cambio relativo en la cantidad creciente de ARNm de *PD-L1* en dichas muestras que identifican la enfermedad neoplásica maligna durante la inmunoterapia con inhibidores anti-*PD-L1*, es decir, un aumento en el tiempo en la cantidad de ARNm de *PD-L1* en una muestra en relación con una muestra previa analizada en las etapas de repetición del método.

La invención también se refiere a un kit para determinar la cantidad de ARNm de *PD-L1* en una muestra, el kit para la cuantificación de *PD-L1* en una muestra también puede usarse para:

- i. determinar la expresión de ARNm de *PD-L1* en una muestra, y/o
- ii. diagnosticar y/o pronosticar enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- iii. predecir la eficacia del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- iv. evaluar el resultado del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la



inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o

v. evaluar la recurrencia de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control.

- 5 El kit comprende
- a) reactivos de amplificación de ácidos nucleicos,
  - 10 b) un par de cebadores diana que son capaces de hibridar con el ARNm de *PD-L1* y que consisten en un cebador directo diana que comprende la secuencia 5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 4) y un cebador inverso diana que comprende la secuencia 5'-TTTCACATCCATCATTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 6),
  - 15 c) un par de cebadores de referencia que son capaces de hibridar con el ARNm de un gen de referencia,
  - d) una sonda de hidrólisis diana que es capaz de hibridar con el ARNm de *PD-L1*
  - e) una sonda de hidrólisis de referencia que es capaz de hibridar con el ARNm del gen de referencia,
  - 20 f) opcionalmente instrucciones para realizar el método *in vitro* de la presente invención.

El kit puede comprender

- 25 - un cebador directo diana para determinar la cantidad de *PD-L1* en una muestra, comprendiendo dicho cebador directo diana la secuencia 5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 4), y
- un cebador inverso diana para determinar la cantidad de *PD-L1* en una muestra, comprendiendo dicho cebador inverso diana la secuencia 5'-TTTCACATCCATCATTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 6) y
- 30 - una sonda de hidrólisis diana para determinar la cantidad de *PD-L1* en una muestra, comprendiendo o consistiendo en, dicha sonda de hidrólisis diana, al menos la secuencia 5'-6FAM-GCACATCCTCCA-BBQ-3' (SEQ ID NO: 7), más preferentemente la sonda de hidrólisis diana incluye la secuencia 5'-6FAM-ACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAAAG-BBQ-3' (SEQ ID NO: 8) y dos partículas fluorescentes (FAM, BBQ) y
- un cebador directo de referencia para la normalización de los datos para la cuantificación de *PD-L1* con respecto a la expresión de *B2M* como gen de referencia, comprendiendo o consistiendo en, dicho cebador directo de referencia, al menos la secuencia 5'-GCCGTGTGAAC-3' (SEQ ID NO: 9), más preferentemente el cebador directo de referencia incluye la secuencia 5'-GCCTGCCGTGTGAACCATGT-3' (SEQ ID NO: 10) y
- 35 - un cebador inverso de referencia para la normalización de los datos para la cuantificación de *PD-L1* con respecto a la expresión de *B2M* como gen de referencia, comprendiendo o consistiendo en, dicho cebador inverso de referencia, al menos la secuencia 5'-CTTCAAACCTC-3' (SEQ ID NO: 11), más preferentemente el cebador inverso de referencia incluye la secuencia 5'-AAATGCGGCATCTTCAAACCTC-3' (SEQ ID NO: 12) y
- 40 - una sonda de hidrólisis de referencia para la normalización de los datos para la cuantificación de *PD-L1* con respecto a la expresión de *B2M* como gen de referencia, comprendiendo o consistiendo en, dicha sonda de hidrólisis de referencia, al menos la secuencia 5'-6FAM-CTCGATCCCAC-BBQ-3' (SEQ ID NO: 13), más preferentemente la sonda de hidrólisis diana incluye la secuencia 5'-6FAM-CATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCAC-BBQ-3' (SEQ ID NO: 14) y dos partículas fluorescentes (FAM, BBQ).
- 45

Breve descripción de las figuras

- 50 Fig. 1: ilustra el procedimiento para el aislamiento de CTC de sangre periférica y RT-qPCR cadena abajo para *PD-L1* y *B2M*.
- Fig. 2: representa los sitios de hibridación para cebadores y sonda de hidrólisis para la amplificación de la secuencia de ARNm de *PD-L1*. Los cebadores -directo-, -inverso- y la sonda de hidrólisis se representaron en negrita y la unión exón-exón se representó con una barra diagonal.
- 55 Fig. 3: representa los sitios de hibridación para cebadores y sonda de hidrólisis para la amplificación de la secuencia de ARNm de *B2M*. Los cebadores -directo-, -inverso- y la sonda de hidrólisis se representaron en negrita y la unión exón-exón se representó con una barra diagonal.
- 60 Fig. 4: ensayos de RT-qPCR para *PD-L1*: diagrama de flujo experimental para determinar la expresión de ARNm de *PD-L1* en muestras clínicas.
- Fig. 5: presenta las curvas de calibración de RT-qPCR para *PD-L1* y *B2M* (copias/μl, todas medidas por triplicado).
- 65 Fig. 6: muestra la expresión cuantitativa de *PD-L1* en tumores primarios de NSCLC congelados frescos (valores de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ).

Fig. 7: muestra los valores de  $\Delta Cq$  entre los tejidos primarios de NSCLC y sus adyacentes normales.

Fig. 8: muestra la expresión cuantitativa de *PD-L1* en CTC (valores de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ).

Fig. 9: muestra los valores de  $\Delta Cq$  entre el grupo de control y las CTC aisladas de muestras de cáncer de mama metastásico.

#### Definiciones

En general, se espera que los términos utilizados en esta invención se adhieran a definiciones convencionales generalmente aceptadas por aquellos que tienen una experiencia habitual en la técnica de la biología molecular. Algunas excepciones, como se enumeran a continuación, se han definido adicionalmente dentro del alcance de la presente invención.

"Al menos uno" como se usa en el presente documento significa uno o más, es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 etc.

Como se usa en el presente documento, "secuencia diana" significa una secuencia que se detecta, amplifica, tanto amplifica como detecta o es complementaria a las secuencias proporcionadas en el presente documento o tiene al menos un intrón en su estado natural, es decir, como ADN genómico o ADN cromosómico extra. Si bien la expresión secuencia diana a veces se denomina monocatenaria, los expertos en la materia reconocerán que la secuencia diana puede ser bicatenaria. En particular, de acuerdo con este texto, la "secuencia diana" se refiere a la parte de la secuencia *PD-L1*, que se amplifica, cuando un par de cebadores se une a la secuencia deseada.

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que, producido sintéticamente, es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis de ácidos nucleicos cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena del ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente de polimerización como ADN polimerasa, transcriptasa inversa o similares y a una temperatura y pH adecuados. El cebador es preferentemente monocatenario para máxima eficacia, pero alternativamente puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus hebras antes de usarse para preparar productos de extensión. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de los agentes para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la fuente del cebador. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, un cebador por lo general contiene de 15 a 25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con una plantilla. En particular, los cebadores, que se usan en este caso, se diseñan preferentemente de una manera que evita la amplificación de ADN genómico o ADNc para evitar la amplificación no específica de ADN genómico contaminante en la muestra.

La etapa de transcripción inversa opcional en el método de la invención se incluye siempre que sea necesario para amplificar la secuencia diana, es decir, cuando la naturaleza de la secuencia diana sea ARN. Este proceso, designado transcripción inversa, se produce bajo la dirección de una enzima ADN polimerasa dependiente de ARN llamada transcriptasa inversa. Asimismo, el proceso requiere tampones y reactivos, tal como dNTP, para la transcripción inversa. Los kits de transcripción inversa están disponibles comercialmente y está dentro de la habilidad realizar este proceso. Los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos usados en la invención incluyen reactivos que son bien conocidos y pueden incluir, pero sin limitación, una enzima con actividad polimerasa, p. polimerasas termoestables tal como la Taq-polimerasa (y, según sea necesario, con actividad transcriptasa inversa, por ejemplo, cuando se monitoriza el ARNm), cofactores enzimáticos tal como magnesio o manganeso; sales y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP).

La expresión "condiciones de amplificación" se define generalmente como condiciones, que promueven la hibridación o emparejamiento de secuencias de cebadores a una secuencia diana y la posterior extensión de la secuencia de cebadores. Es bien sabido en la técnica que dicho emparejamiento depende de varios parámetros, incluyendo la temperatura, fuerza iónica, longitud de la secuencia, complementariedad y contenido de G:C de las secuencias. Por ejemplo, bajar la temperatura en el ambiente de las secuencias complementarias de los ácidos nucleicos promueve el emparejamiento. Para cualquier conjunto dado de secuencias, la temperatura de fusión, o  $T_f$ , puede estimarse por cualquiera de varios métodos conocidos. Por lo general, las aplicaciones de diagnóstico utilizan temperaturas de hibridación, que son cercanas (es decir, dentro de 10 °C) a la temperatura de fusión. La fuerza iónica o concentración de "sal" también afecta a la temperatura de fusión, ya que los cationes pequeños tienden a estabilizar la formación de doble hélice al anular la carga negativa en la cadena principal fosfodiéster. Las concentraciones de sal típicas dependen de la naturaleza y la valencia del catión, pero los expertos en la materia las entienden fácilmente. De manera similar, también se sabe que un alto contenido de G:C y una mayor longitud de secuencia estabilizan la formación de doble hélice porque los emparejamientos G:C implican 3 enlaces de hidrógeno cuando los pares A: T tienen solo dos, y porque las secuencias más largas tienen más enlaces de hidrógeno que mantienen juntas las secuencias. Por lo tanto, un alto contenido de G:C y longitudes de secuencia más largas afectan las condiciones de hibridación al elevar

la temperatura de fusión. Una vez que se seleccionan las secuencias para una aplicación de diagnóstico dada, el contenido de G:C y la longitud se conocerán y se pueden tener en cuenta para determinar con precisión qué condiciones de hibridación abarcarán. Debido a que la fuerza iónica se optimiza por lo general para la actividad enzimática, el único parámetro que puede variar es la temperatura. Generalmente, la temperatura de hibridación se selecciona cerca de o en la  $T_f$  de los cebadores o sonda. Por lo tanto, la obtención de condiciones de hibridación adecuadas para un cebador, sonda o conjunto de cebador y sonda particulares está dentro de las habilidades habituales de alguien que practica esta técnica. El producto de amplificación producido como anteriormente puede detectarse durante o posteriormente a la amplificación de la secuencia diana usando cualquier método adecuado y una sonda divulgada con mayor detalle a continuación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "temperatura de fusión" ( $T_f$ ) en relación con un oligonucleótido se define como la temperatura a la cual el 50 % del ADN forma una doble hélice estable y el otro 50 % se ha separado en moléculas monocatenarias. Como saben los expertos en la materia, la temperatura de hibridación por PCR es por lo general unos pocos grados menor que la  $T_f$ , la última de las cuales se calcula basándose en las concentraciones de oligo y sal en la reacción.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente. "Oligonucleótido" es un término que a veces se usa para describir un polinucleótido más corto.

Los términos "hibridado" e "hibridación" se refieren a las interacciones de emparejamiento de bases entre dos ácidos nucleicos que dan como resultado la formación de una doble hélice. No es un requisito que dos ácidos nucleicos tengan 100 % de complementariedad en toda su longitud para lograr la hibridación.

La expresión "patrón externo", como se usa en el presente documento, significa un ADN o transcrito de ARN sintético en cantidades o concentraciones conocidas que se prueba de forma separada de la muestra de prueba, es decir, mediante interpolación o extrapolación a una curva patrón.

Como se usa en el presente documento, "umbral de ciclo" ( $C_t$ , por sus siglas en inglés) se refiere a los valores del ciclo de cuantificación calculados a partir de las mediciones de fluorescencia de registro de la PCR cuantitativa en tiempo real. "Cq" se refiere al número de ciclos necesarios para que la señal de PCR alcance el umbral significativo. El valor de  $C_q$  calculado es proporcional al logaritmo del número de copias diana presentes en la muestra. La cuantificación de  $C_q$  se realiza con cualquier método para la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real descrita en la técnica [Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25: 169-193].

La "precisión" es la medida del grado de repetibilidad de un método analítico en funcionamiento normal y normalmente se expresa como la desviación estándar relativa porcentual para un número estadísticamente significativo de muestras. Las dos medidas de precisión más comunes son "repetibilidad" y "reproducibilidad". Estas son expresiones de dos medidas extremas de precisión que se pueden obtener. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea del tipo de variabilidad que se espera cuando un solo analista realiza un método en una pieza de equipo en una escala de tiempo corta. Si varios laboratorios analizan una muestra con fines comparativos, entonces, una medida de precisión más significativa para usar es la reproducibilidad (esta es la medida de precisión más grande).

El "Límite de detección" (LoD, por sus siglas en inglés) es la concentración de analito más baja que se distingue de manera confiable del blanco y en la cual es fiable la detección. El LoD se determina utilizando tanto el LoB medido como las repeticiones de prueba de una muestra que se sabe que contiene una baja concentración de analito.

Límite de cuantificación "(LoQ, por sus siglas en inglés) se refiere a la concentración más baja a la que el analito no solo se puede detectar de manera confiable, sino a la cual se cumplen algunos objetivos predefinidos de sesgo e imprecisión. El LoQ se define como tres veces el LOD.

La "linealidad" es la capacidad del método para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración de analito en un intervalo dado. La linealidad generalmente se indica como la varianza de la pendiente de la línea de regresión. Tradicionalmente, la linealidad se consideraba una propiedad deseable de los métodos, ya que solo las curvas lineales podían interpretarse fácilmente. Con la disponibilidad inmediata de la potencia informática, esto ahora es de poca importancia y las calibraciones no lineales pueden solucionarse fácilmente.

"Negativo falso" se refiere a un resultado de la prueba que indica que un sujeto no padece una enfermedad neoplásica maligna cuando el sujeto sí la tiene. En el contexto de esta solicitud, el "negativo falso" se refiere a un resultado de prueba que es incorrecto porque el método no pudo determinar la sobreexpresión de *PD-L1* en una muestra de un sujeto.

"Positivo falso" se refiere a un resultado de la prueba que indica que un sujeto padece una enfermedad neoplásica maligna cuando el sujeto realmente no la tiene. En el contexto de esta solicitud, el "positivo falso" se refiere a un resultado de prueba que es incorrecto porque el método indica determinar la sobreexpresión de *PD-L1* en una muestra de un sujeto, en la que no existe.

"Sano" se refiere a un sujeto que posee buena salud. Tal sujeto demuestra la ausencia de cualquier enfermedad maligna o no maligna. En el contexto de la presente solicitud, un "individuo sano" solo es sano porque no tiene ninguna enfermedad maligna o no maligna; un "individuo sano" puede tener otras enfermedades o afecciones con las que normalmente no se considerarían "sanos".

"Pronóstico" se usa en el presente documento para referirse a la predicción de la probabilidad de progresión, incluyendo recurrencia, propagación metastásica y resistencia a fármacos, de una enfermedad neoplásica maligna. Por ejemplo, un paciente que tiene un perfil de expresión, que se correlaciona con un fenotipo invasivo, puede mostrar una alta actividad proliferativa y, por lo tanto, puede ser demostrativo de una respuesta favorable a la terapia, ya que el fenotipo invasivo puede ser una característica histológica utilizada para indicar una enfermedad neoplásica sensible a terapia.

Una neoplasia "maligna" generalmente está poco diferenciada (anaplasia), tiene un crecimiento característicamente rápido acompañado de infiltración progresiva, invasión y destrucción del tejido circundante. Asimismo, una neoplasia maligna tiene la capacidad de metastatizar a sitios distantes. El término "metástasis" se refiere a la propagación o migración de células cancerosas de un tumor primario (original) a otro órgano o tejido, y es identificable, por lo general, por la presencia de un "tumor secundario" o "masa celular secundaria" del tipo de tejido del tumor primario (original) y no de aquel del órgano o tejido en el que se encuentra el tumor secundario (metastático). Por ejemplo, un carcinoma pulmonar que ha migrado a hueso se dice que es cáncer pulmonar metastatizado, y consiste en células cancerosas que se originan a partir de células pulmonares epiteliales que crecen en el tejido óseo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resultado clínico" o "resultado" debe expresarse en términos de diferentes criterios de valoración tal como la Supervivencia sin Enfermedad (DFS, por sus siglas en inglés), Supervivencia sin Recaída (RFS, por sus siglas en inglés), Tiempo hasta la Recurrencia (TR, por sus siglas en inglés), Supervivencia Específica del Cáncer (CSS, por sus siglas en inglés) o Supervivencia General (OS, por sus siglas en inglés), de acuerdo con las recomendaciones de Punt CJ, Buyse M, Köhne C-H, Hohenberger P, Labianca R, Schmoll HJ, et al. Endpoints in Adjuvant Treatment Trials: A Systematic Review of the Literature in Colon Cancer and Proposed Definitions for Future Trials. J. Natl. Cancer Inst. 2007;13: 998-1003.

Como se usa en el presente documento, la expresión "Supervivencia sin Recaída" o "Supervivencia sin recurrencia" (RFS) se define como el tiempo hasta cualquier evento, independientemente de la causa de este evento, a excepción de cualquier segundo cáncer primario. Son eventos, la recurrencia de o muerte por el mismo cáncer y todas las muertes relacionadas con el tratamiento o las muertes por otras causas. El segundo primario de los mismos cánceres y otros cánceres primarios se ignoran, y la pérdida de seguimiento es objeto de censura estadística.

Como se usa en el presente documento, la expresión "Supervivencia sin Enfermedad" (DFS) se define como el tiempo hasta cualquier evento, independientemente de la causa de este evento. Están incluidos todos los eventos, excepto la pérdida de seguimiento que es objeto de censura estadística. Como se usa en el presente documento, la "Supervivencia General" (OS) se define como el tiempo hasta la muerte, independientemente de la causa, independientemente de si la muerte se debió o no al cáncer. Se ignora la recurrencia locorregional, metástasis a distancia, segundos cánceres primarios y otros segundos cánceres primarios. La pérdida de seguimiento que es objeto de censura estadística.

"Sujeto", como se usa en el presente documento, incluye seres humanos, primates no humanos, tal como chimpancés y otros simios y especies de monos, animales de granja, tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos, mamíferos domésticos tales como perros y gatos, animales de laboratorio incluyendo roedores tal como ratones, ratas y cobayas y similares. El término no indica una edad o género en particular. Por lo tanto, sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, sean macho o hembra, están destinados a estar cubiertos. En algunas realizaciones preferidas, el sujeto es un mamífero, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos. En la realización más preferida, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, una "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidos de cualquier sujeto que tenga o no neoplasia maligna. Un sujeto típico es un ser humano. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen muestras obtenidas de un tejido o fluidos sanguíneos recogidos de un individuo sospechoso de tener una neoplasia maligna.

La "inmunoterapia" es un tratamiento que utiliza determinadas partes del sistema inmunitario de una persona para combatir enfermedades tales como el cáncer. Esto se puede hacer ya sea estimulando el sistema inmunitario para que trabaje más duro o de manera más inteligente para atacar las células cancerosas o dando los componentes del sistema inmunitario, tal como las proteínas artificiales del sistema inmunitario. Algunos tipos de inmunoterapia también se denominan a veces terapia biológica o bioterapia. En las últimas décadas, la inmunoterapia se ha convertido en una parte importante del tratamiento de algunos tipos de cáncer. La inmunoterapia incluye tratamientos que funcionan de diferentes maneras. Algunos estimulan el sistema inmunitario del cuerpo de una manera muy general. Otros ayudan a preparar al sistema inmunitario para atacar a las células cancerosas de manera específica.

Los "inhibidores de puntos de control" (también conocidos como moduladores de puntos de control inmunitario) están diseñados para disminuir la eficacia de las proteínas de los puntos de control. Podrían tener una variedad de mecanismos de acción, pero si son eficaces, permiten que el sistema inmunitario vea las otras moléculas en la superficie de las células cancerosas. Existen muchos tipos de inhibidores de puntos de control inmunitario, tal como los inhibidores anti-PD-L1, inhibidores anti-CTLA4, etc.

Como se usa en el presente documento, el término células tumorales circulantes (CTC) son células que se han desprendido a la vasculatura desde un tumor primario y circulan en el torrente sanguíneo. Por lo tanto, las CTC constituyen semillas para el crecimiento posterior de tumores adicionales (metástasis) en órganos vitales distantes, lo que desencadena un mecanismo responsable de la gran mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término *PD-L1* se refiere al nombre oficial del gen "Ligando 1 de muerte programada" (*PD-L1*; también llamado B7-H1 o CD274). El gen del "ligando 1 de muerte programada" se expresa en muchas células inmunitarias y cancerosas y desempeña un papel importante en el bloqueo del "ciclo de inmunidad contra el cáncer" mediante la unión de la muerte programada-1 (*PD-1*) y B7.1 (CD80), ambos son reguladores negativos de la activación de linfocitos T. La unión de *PD-L1* a sus receptores suprime la migración de linfocitos T, la proliferación y la secreción de mediadores citotóxicos, y restringe la destrucción de células tumorales. El eje *PD-L1*-*PD-1* protege al hospedador de los linfocitos T efectores hiperactivos no solo en el cáncer sino también durante las infecciones microbianas. Por lo tanto, el bloqueo de *PD-L1* debería potenciar la inmunidad contra el cáncer, pero se sabe poco sobre los factores predictivos de eficacia. De manera más específica, la expresión "secuencia diana", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de ARNm de *PD-L1*.

Como se usa en el presente documento, el término *B2M* se refiere al nombre oficial del gen "beta-2-microglobulina", que codifica una proteína sérica encontrada en asociación con la cadena pesada del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I en la superficie de casi todas las células nucleadas. La proteína tiene una estructura de lámina plegada beta predominantemente que puede formar fibrillas amiloides en algunas afecciones patológicas. La proteína antimicrobiana codificada muestra actividad antibacteriana en el líquido amniótico. De manera más específica, la expresión "secuencia de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de ARNm de *B2M*.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de referencia" se refiere a cualquier secuencia de genoma conocida particular, ya sea parcial o completa, de cualquier organismo o virus que pueda usarse para hacer referencia a secuencias identificadas de un sujeto. Por ejemplo, un genoma de referencia utilizado para seres humanos, así como muchos otros organismos, se encuentra en el National Center for Biotechnology Information en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Un "genoma" se refiere a la información genética completa de un organismo o virus, expresada en secuencias de los ácidos nucleicos. De manera más específica, la expresión "gen de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere al gen *B2M*.

#### Descripción detallada

La presente invención proporciona un método de RT-qPCR en tiempo real altamente sensible, específico y reproducible para la cuantificación de la expresión de *PD-L1* en una muestra biológica, tal como una muestra de ARN aislada a partir de CTC en sangre periférica de pacientes con cánceres sólidos. La importancia clínica de la expresión de ARNm de *PD-L1* está asociada con la respuesta a inmunoterapias dirigidas en muchos tipos de cánceres.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes

Como un primer grupo, se analizaron un total de 31 carcinomas primarios de NSCLC y sus correspondientes 31 tejidos adyacentes no neoplásicos. Como un segundo grupo, se obtuvieron un total de 32 muestras de sangre periférica de 22 pacientes con cáncer de mama metastásico y 10 de donantes de sangre femeninas sanas, que se utilizaron como grupo de control para definir la especificidad del ensayo. Las muestras de tejido se recogieron en el momento de la cirugía y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Todas las muestras se analizaron histológicamente para acceder al recuento del componente tumoral (al menos el 70 % de las células tumorales) y la calidad del material (es decir, ausencia de necrosis).

### Aislamiento de CTC de sangre periférica con selección inmunomagnética positiva

Se aislaron CTC de 20 ml de sangre periférica como se describe previamente [Strati A, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. BMC Cancer 2011;11: 422]. Este procedimiento se describe en la Figura 1. Además, el ensayo de RT-qPCR desarrollado para *PD-L1* se puede aplicar también en muestras de CTC aisladas con diferentes metodologías. Para reducir la contaminación sanguínea por las células epiteliales de la piel, se descartaron los primeros 5 ml de sangre, y el tubo de recogida se desconectó al final antes de retirar la aguja. Tras la recogida, la sangre periférica se diluyó con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,3) y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por densidad en gradiente

usando Ficol-Paque TM PLUS (GE Healthcare, Bio-Sciences AB) a 670 g por 30 min a temperatura ambiente. Las células de interfaz se eliminaron, se lavaron dos veces con 40 ml de PBS estéril (pH 7,3, 4 °C), a 530 g durante 10 minutos y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las CTC se enriquecieron usando perlas de captura inmunomagnéticas recubiertas con Ber-EP4 (Dynabeads® Epithelial Enrich, Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Se aislaron dos fracciones para cada muestra: la fracción de CTC EpCAM positivas (fracción CTC) y la fracción EpCAM negativa correspondiente que contiene las PBMC (fracción PBMC).

Aislamiento de ARN de tejidos tumorales y síntesis de ADNc

10 El ARN celular total se aisló con Qiagen RNeasy Mini Reagent Set (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las etapas de preparación y manejo de ARN se realizaron en una campana de flujo laminar en condiciones sin RNasa. El ARN aislado se disolvió en tampón de almacenamiento de ARN (Ambion) y se almacenó a -70 °C hasta su uso. La concentración de ARN se determinó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies). Se utilizó la cantidad de 1 µg de ARN total para realizar la transcripción inversa de ARN con el kit de alta capacidad de RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystems, EE. UU.) en un volumen total de 20 µl, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15

Aislamiento de ARN a partir de CTC y síntesis de ADNc

20 El aislamiento de ARN total se realizó utilizando el reactivo TRIZOL-LS (Invitrogen, EE. UU.). Todas las etapas de preparación y manejo de ARN se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones sin RNasa. El ARN aislado se disolvió en 20 µl de tampón de almacenamiento de ARN (Ambion, E.E.U.U.) y se almacenó a -70 °C hasta su uso. La concentración de ARN se determinó mediante lecturas de absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (NanoDrop, Technologies, EE. UU.). El ARNm se aisló del ARN total, utilizando el kit de purificación de ARNm Dynabeads (Invitrogen, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis de ADNc se realizó usando el kit de alta capacidad RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystems, EE. UU.) en un volumen total de 20 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25

Diseños de cebadores y sondas

30 Los cebadores y las sondas de hidrólisis para *PD-L1* y *B2M* utilizado como gen de referencia se diseñaron de novo *in-silico* (Tabla 1). El diseño *in-silico* se realizó utilizando el programa informático Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft, CA, EE. UU.) para evitar la formación cebador-dímero, sitios de cebado falsos y formación de estructuras de horquilla. La hibridación al ADN genómico se evitó por completo. Además, los cebadores y las sondas se diseñaron, para amplificar específicamente los genes diana *PD-L1* o *B2M* de acuerdo con la búsqueda en la herramienta de búsqueda de similitud de secuencia BLAST (NCBI, NIH). Las sondas de hidrólisis incluyeron una 5'-fluoresceína (FAM) como un fluoróforo fijado covalentemente al extremo 5' de la sonda de oligonucleótidos y un BlackBerry® Quencher (BBQ) como un desactivador en el extremo 3'. La posición de los cebadores y de las sondas de hidrólisis para cada gen diana se muestran en las Figuras 2 y 3.

35

40 Tabla 1. Ensayo de RT-qPCR para determinar la expresión de *PD-L1* y *B2M*; secuencias de cebadores y sondas de hidrólisis

Gen (M. ° de Registro)	Secuencia (5'-3')	Tf (°C)	Tamaño de amplicón (pb)
<i>PD-L1</i> (NM_014143)			
Cebador diana directo	5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 4), S1	59,8	147
Cebador diana inverso	5'-TTTCACATCCATCATTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 6), S1	60,2	
Sonda de hidrólisis diana	5'-6FAM-ACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAAAG-BBQ-3' (SEQ ID NO: 8), S1	69,8	

(continuación)

Gen (M. ° de Registro)	Secuencia (5'-3')	Tf (°C)	Tamaño de amplicón (pb)
<i>B2M</i> (NM_004048)			
Cebador directo de referencia	5'-GCCTGCCGTGTGAACCATGT-3' (SEQ ID NO: 10), S2	63,7	99
Cebador inverso de referencia	5'-AAATGCGGCATCTTCAAACCTC-3' (SEQ ID NO: 12), S2	63,2	
Sonda de hidrólisis de referencia	5'-6FAM-CATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCAC-BBQ-3' (SEQ ID NO: 14), S2	73,4	

Para cada gen, se diseñaron un par de cebadores y una sonda de hidrólisis. Para *PD-L1*, se diseñó un conjunto de cebadores S1 para amplificar la región (147 pb) que comprende al menos un sitio que abarca secuencias intrónicas. Esto proporciona un par de cebadores que solamente se unirán a una secuencia en la que se han desempalmado los intrones, por ejemplo, ARNm, ADNc. En particular, el cebador directo está diseñado entre los exones 4 y 5 (unión intrón exón) y el cebador inverso está diseñado entre los exones 5 y 6 (unión intrón exón) de la secuencia de ARNm de *PD-L1* para potenciar solamente la secuencia diana de ARNm evitando la amplificación genómica del ADN y productos no específicos. La sonda de hidrólisis está diseñada para hibridar con una región interna dentro del amplicón. Para *B2M*, se diseñaron un par de cebadores y una sonda de hidrólisis. Para *B2M*, se diseñó un conjunto de cebadores S2 para amplificar la región (99 pb) que comprende al menos un sitio que abarca secuencias intrónicas. Esto proporciona un par de cebadores que solamente se unirán a una secuencia en la que se han desempalmado los intrones, por ejemplo, ARNm, ADNc. En particular, el cebador directo está diseñado en la región interna del exón 9 de la secuencia de ARNm de *B2M* y el cebador inverso está diseñado entre los exones 2 y 3 de la secuencia de ARNm de *B2M* para la amplificación solamente de la secuencia diana evitando productos no específicos. En este caso, la sonda de hidrólisis está diseñada para hibridar entre los exones 3 y 4 (unión intrón exón). Todas las secuencias de cebadores y sondas se muestran en detalle en la Tabla 1.

#### Ensayo de RT-qPCR

La reacción de RT-qPCR se realizó en LightCycler 2.0 (instrumento IVD, Roche, Alemania) usando tubos capilares de vidrio (Roche Applied Science, Alemania). Como control positivo se usaron PBMC de muestras de control sanas ya que las PBMC expresan también *PD-L1*. El protocolo de ciclado fue idéntico tanto para *PD-L1* como para *B2M* y consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 s, emparejamiento a 58 °C durante 20 s, y extensión a 72 °C durante 20 s. La PCR en tiempo real se realizó en un volumen total de 10 µl por reacción. La mezcla de reacción de PCR para *PD-L1* y *B2M* se describe en detalle en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes de reacción para RT-qPCR de *PD-L1* y *B2M*

Reactivos	<i>PD-L1</i>			<i>B2M</i>		
	Conc inicial	V(µl)	Conc final	Conc inicial	V(µl)	Conc final
Tampón	5X	3	1.5X	5X	1	0.5X
Mg	25 mM	1	2,5 mM	25 mM	1,2	3 mM
dNTP	10 mM	0,2	200 µM	10 mM	0,15	150 µM
BSA	10 µg/µl	0,6	0,6 µg/µl	10 µg/µl	0,3	0,3 µg/µl
Cebador directo	10 µM	0,3	0,3 µM	10 µM	0,25	0,25 µM
Cebador inverso	10 µM	0,3	0,3 µM	10 µM	0,25	0,25 µM
Sonda de hidrólisis	3 µM	0,83	0,25 µM	3 µM	0,83	0,25 µM
Taq polimerasa	5U/µl	0,1	0,05U/µl	5U/µl	0,1	0,05U/µl
Volumen de reacción	-	10	-	-	10	-

#### Ejemplo 1

##### Desarrollo y validación analítica del ensayo

El diagrama de flujo experimental del estudio se describe en la Figura 4.

Optimización del protocolo. Se optimizaron métodos basados en RT-qPCR para la cuantificación de la expresión de *PD-L1* y *B2M* en una serie de experimentos, usando como control positivo muestras de ADNc de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de control sanas y control negativo de la mezcla de reacción de PCR, con respecto a: temperatura de emparejamiento por PCR, parámetros de ciclado, concentraciones de cebadores y sondas, concentraciones de Mg<sup>2+</sup> y dNTP.

Se realizó RT-qPCR única para determinar la expresión de *PD-L1* y *B2M*. La cuantificación se basa en la monitorización en tiempo real durante la PCR de la sonda de hidrólisis específica marcada para *PD-L1*. El ciclo donde la señal de fluorescencia se eleva por encima del ruido de fondo (ciclo de cuantificación, Cq) se cuantifica mejor a través del programa informático LightCycler como el segundo derivado máximo de la curva. La RT-PCR en tiempo real para el ARNm de *PD-L1* se realizó utilizando el sistema LightCycler (Roche Diagnostics). Para el protocolo desarrollado, los cebadores y las sondas de hidrólisis se usaron como se describe anteriormente.

La RT-PCR en tiempo real se realizó en un volumen total de 10 µl en los capilares de vidrio LightCycler. Para la PCR, Se colocó 1 µl de ADNc en un volumen de reacción de 9 µl que contenía una mezcla de reacción de PCR, que se describe en la Tabla 3. Además, se usó el protocolo de condiciones de PCR como se describe previamente.

El método también se puede aplicar a cualquier otro instrumento de PCR en tiempo real, como el instrumento LightCycler 1.5, el instrumento LightCycler 2.0, el instrumento LightCycler 480 (Roche Diagnostics) y de PCR en tiempo real de Applied Biosystems.

Ejemplo 2

Cuantificación de RT-qPCR utilizando calibradores externos

En primer lugar, se generaron amplicones de PCR individuales específicamente para *PD-L1* y *B2M* para utilizarlos como calibradores de cuantificación externos. Para este fin, el ARN total se extrajo del conjunto de PBMC de muestras normales, ya que las PBMC expresan también *PD-L1*. El ADNc se sintetizó y sirvió como plantilla para la amplificación de *PD-L1* y *B2M* por la RT-qPCR descrita anteriormente. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen, Alemania) y los amplicones se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (NanoDrop, Technologies, E.E.U.U.).

La concentración de ADN se convirtió en copias/µl mediante el uso del número de Avogadro y el peso molecular del número de bases del amplicón del producto de PCR multiplicado por el peso molecular medio de un par de ácidos nucleicos que es 660. Se preparó una solución madre patrón correspondiente a 10<sup>10</sup> copias/µl para cada transcrito génico. Las diluciones en serie de esta solución madre de amplicones en agua sin DNasa/RNasa que varían desde 10<sup>5</sup> copias/µl a 10 copias/µl sirvieron como calibradores de cuantificación durante todo el estudio. Para la cuantificación de los transcritos de los genes *PD-L1* y *B2M*, se obtuvo una curva de calibración externa trazando la concentración de cada calibrador de cuantificación expresada como copias/µl frente al ciclo de cuantificación correspondiente (Cq).

Ejemplo 3

El límite de detección y linealidad del ensayo

Se evaluó el límite de detección (LOD) del ensayo de RT-qPCR desarrollado tanto para *PD-L1* como para *B2M* como copias/µl en la reacción. Para estimar el LOD, los calibradores de cuantificación que contienen un número conocido de copias/µl se prepararon como se describe a continuación en detalle: Para cada gen diana se generó una curva de calibración utilizando diluciones en serie de estos patrones por triplicado para cada concentración, que van desde 10<sup>5</sup> copias/µl a 10 copias/µl. Las curvas de calibración mostraron linealidad desde 10 copias/µl hasta 10<sup>5</sup> copias/µl, con coeficientes de correlación superiores a 0,99 en ambos casos, lo que indica una relación lineal logarítmica precisa (Figura 5). Ninguno de los cebadores y de las sondas de hidrólisis dieron señal para ninguno de los transcritos de la diana génica cuando se analizaron 50 ng/µl de 10 ADN genómicos diferentes.

Se encontró que el LOD para ambos ensayos era de 3 copias/µl y el límite de cuantificación (LOQ) era de 9 copias/µl, (estimado de acuerdo con las Directrices MIQE, S. Bustin et.al. Clin Chem. 2009). Las características de las curvas de calibración se dan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de las curvas de calibración para RT-qPCR de *PD-L1* y *B2M*

Gen	pendiente media n=3	Intercepción n = 3	Eficacia <sup>a</sup> de PCR (%)	LOD, copias/µl	LOQ, copias/µl
<i>B2M</i>	-3,237 +0,013	37,67 +0,031	104	3 copias/µl	9 copias/µl
<i>PD-L1</i>	-3,506 +0,14	38,43 +0,32	93	3 copias/µl	9 copias/µl

a: La eficacia de la PCR se expresa como  $E = [10^{-1/pendiente}] - 1$

Ejemplo 4

Evaluación de la precisión intra e interensayo

La repetibilidad o la varianza intraensayo (precisión dentro de la ejecución) de la RT-qPCR de *PD-L1*, se evaluó analizando repetidamente 3 muestras de ADNc correspondientes a una expresión de ARNm baja, media y alta, mientras que para *B2M* se evaluó analizando repetidamente 4 muestras de ADNc correspondiente a 1, 10, 100 y 1000



células equivalentes por  $\mu\text{l}$  de ADNc en el mismo ensayo, en 3 determinaciones en paralelo.

La varianza intraensayo expresada como los CV (%) de la varianza de Cq para *PD-L1*, varió de 0,84 a 1,2, mientras que para *B2M* varió de 0,21 a 0,72 (Tabla 4). La varianza intraensayo expresada como CV dentro de la ejecución de copias/ $\mu\text{l}$  varió para *PD-L1*, del 16 % al 20 % y para *B2M* del 3,7 % al 14 % (Tabla 4). La reproducibilidad o la varianza inter-ensayos (precisión entre ejecuciones) de los ensayos de RT-qPCR, se evaluó analizando la misma muestra de ADNc, que representa 100 células SKBR-3 para *B2M* y PBMC para *PD-L1* y se mantuvo congelada en alícuotas a -20 °C, durante un período de un mes en 4 ensayos por separado realizados en 4 días diferentes. Los CV entre ejecuciones fueron del 17 % para *B2M* y del 15 % para *PD-L1* (Tabla 4).

Tabla 4. RT-qPCR para *PD-L1* y *B2M*: Evaluación de la precisión intra e interensayo

<i>B2M</i>	Cq (DE)	% de CV	Copias (DE)	% de CV
<b>SKBR-3</b>				
<i>Precisión intra-ensayo (n=3)</i>				
1	32,56 (0,11)	0,34	$3,8 (\pm 0,29) \times 10$	7,9
10	29,29 (0,21)	0,72	$3,8 (\pm 0,55) \times 10^2$	14
100	25,79 (0,053)	0,21	$4,5 (\pm 0,15) \times 10^3$	3,7
1000	22,40 (0,10)	0,45	$4,9 (\pm 0,36) \times 10^4$	7,3
<i>Precisión inter-ensayos (n=5)</i>				
100	25,73 0,26	1,0	$4,7 (\pm 0,85) \times 10^3$	17
<b><i>PD-L1</i></b>				
<i>Precisión intra-ensayo (n=3)</i>				
ADNc 1	35,63 (0,30)	0,84	$6,5 (\pm 1,3)$	20
ADNc 2	31,48 (0,25)	0,79	$0,97 (\pm 0,14) 10^2$	16
ADNc 3	24,45 (0,29)	1,2	$1,0 (\pm 0,18) \times 10^4$	19
<i>Precisión inter-ensayos (n=5)</i>				
ADNc 4	29,57 (0,21)	0,71	$5,32 (\pm 0,82) \times 10^2$	15

Ejemplo 5

Normalización de datos para la cuantificación de la expresión de *PD-L1* en tumores primarios y CTC

La normalización de los datos para la cuantificación de la expresión de *PD-L1* se ha realizado con respecto a la expresión de *B2M* como gen de referencia, y utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, Methods 2001).

En tumores primarios estaban disponibles dos muestras para cada paciente: a) el tumor primario y el tejido no canceroso correspondiente. En este caso, para cada muestra, la expresión de *PD-L1* se estima como una relación relativa a *B2M* utilizado como gen de referencia tanto en el tumor primario como en su tejido no canceroso adyacente, utilizado como calibrador. Después, utilizando el enfoque  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , la normalización de la señal analítica (Cq) de *PD-L1* en cada muestra de tumor primario a la señal analítica correspondiente (Cq) de *PD-L1* en la muestra adyacente no cancerosa.

En el caso de las CTC, para cada muestra, la expresión de *PD-L1* se estima como una relación relativa a *B2M* utilizado como gen de referencia tanto en la fracción de CTC EpCAM positivas como en la fracción de CTC EpCAM negativas correspondiente en el grupo de donantes de sangre sanos utilizados como calibrador. Después, utilizando el enfoque  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , se evaluó la sobreexpresión de *PD-L1* en la fracción de CTC EpCAM positivas de muestras de sangre periférica.

En la fracción de CTC EpCAM positivas, una muestra se definió como *PD-L1* sobreexpresada basándose en el factor de cambio de expresión de *PD-L1* con respecto al grupo de diez individuos sanos utilizados como grupo de control. Más específicamente, se estimó un valor de corte de acuerdo con la expresión de *PD-L1* en la fracción EpCAM positiva de diez individuos sanos analizados exactamente de la misma manera que las muestras de sangre periférica del paciente. Para estas diez muestras de control, se midió la diferencia del valor Cq ( $\Delta C_{q\text{control}}$ ) para *PD-L1* del valor Cq correspondiente para *B2M* ( $C_{qPD-L1} - C_{qB2M}$ ). El valor medio de estos 10 valores de  $\Delta C_q$  fue de  $15,78 \pm 0,83$  (Tabla 5).

Tabla 5. Expresión de *PD-L1* en PBMC (grupo de control). (Valores de  $\Delta C_q$ :  $C_{qPD-L1} - C_{qB2M}$ )

A/A	Cq <i>PD-L1</i>	Cq <i>B2M</i>	$\Delta C_q$
1	38,68	22,06	16,62
2	38,70	22,70	16,00
3	36,58	20,63	15,95

(continuación)

A/A	Cq <i>PD-L1</i>	Cq <i>B2M</i>	$\Delta Cq$
4	35,38	19,77	15,61
5	41,24	25,74	15,50
6	40,60	23,16	17,44
7	40,40	23,81	16,59
8	38,90	24,12	14,78
9	39,34	22,67	16,67
10	38,93	23,99	14,94
		DE	0,83
		Mediana	15,78
		Corte	14,70

Ejemplo 6

Expresión de *PD-L1* en tumores primarios (NSCLC)

5 En este grupo, la cuantificación de la expresión de *PD-L1* se realizó en 31 pares de tejidos de NSCLC y sus tejidos adyacentes no neoplásicos usando RT-qPCR. *PD-L1* se expresó en todos los tejidos, y su expresión se normalizó con respecto a la expresión del gen *B2M* y usando el enfoque de cuantificación relativa descrito por Livak y Schmittgen como se describe previamente. En este estudio se demostró que *PD-L1* se sobreexpresó en 14/31 (45,2%) de los tejidos de NSCLC (Figura 6). Los valores de  $\Delta Cq$  entre los tejidos primarios de NSCLC y sus muestras normales adyacentes se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 7

Expresión de expresión de *PD-L1* en CTC

15 En este grupo, se realizó la cuantificación de *PD-L1* en la fracción de CTC EpCAM positivas (aisladas de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama metastásico). Para cada muestra de paciente, se calculó el valor correspondiente de  $Cq_{PD-L1} - Cq_{B2M}$  ( $\Delta Cq_{muestra}$ ). Después, cada valor de  $\Delta Cq_{muestra}$  individual se evaluó encontrando su diferencia con el valor medio de  $\Delta Cq_{control}$  ( $\Delta \Delta Cq = \Delta Cq_{muestra} - \Delta Cq_{control}$ ) (Tabla 6). El valor medio del  $2^{-\Delta \Delta Cq}$  para el grupo de pacientes analizados fue de 2,20. Las muestras con un valor de  $2^{-\Delta \Delta Cq}$  superior a 2,20 o un valor de  $\Delta Cq$  inferior a 14,7 se definieron como positivas para la sobreexpresión de ARNm de *PD-L1* (Tabla 6). Además, los valores de  $\Delta Cq$  en todas las muestras de individuos sanos fueron superiores a 14,7 (Figura 8).

25 De acuerdo con los resultados, se encontró que *PD-L1* estaba sobreexpresado en 8/22 (36,4 %) pacientes con metástasis verificada (Figura 8). Los valores de  $\Delta Cq$  entre el grupo de control y las CTC aisladas de muestras de cáncer de mama metastásico se muestran en la Figura 9.

Tabla 6. Expresión de *PD-L1* en la fracción de CTC EpCAM positivas (valores de  $2^{-\Delta \Delta Cq}$ )

A/A	Cq <i>PD-L1</i>	Cq <i>B2M</i>	$\Delta Cq$ $Cq_{PD-L1} - Cq_{B2M}$	$\Delta \Delta Cq$ $\Delta Cq_{muestra} - \Delta Cq_{mediana\ del\ control}$	$2^{-\Delta \Delta Cq}$	Resultado
1	38,47	22,32	16,15	0,37	0,77	Negativo
2	36,32	19,49	16,83	1,05	0,48	Negativo
3	38,71	21,31	17,40	1,62	0,33	Negativo
4	37,51	21,92	15,59	-0,19	1,14	Negativo
5	39,24	24,24	15,00	-0,78	1,72	Negativo
6	39,52	22,74	16,78	1,00	0,50	Negativo
7	34,81	20,82	13,99	-1,79	3,46	Positivo
8	40,39	23,2	17,19	1,41	0,38	Negativo
9	38,45	21,89	16,56	0,78	0,58	Negativo
10	34,89	22,09	12,8	-2,98	7,89	Positivo
11	36,10	21,25	14,85	-0,93	1,91	Negativo
12	39,30	25,16	14,14	-1,64	3,12	Positivo
13	38,63	24,66	13,97	-1,81	3,51	Positivo
14	40,98	23,51	17,47	1,69	0,31	Negativo
15	35,78	21,21	14,57	-1,21	2,31	Positivo

(continuación)

A/A	Cq PD-L1	Cq B2M	$\Delta Cq_{Cq_{PD-L1}-Cq_{B2M}}$	$\Delta \Delta Cq_{\Delta Cq_{muestra}-\Delta Cq_{mediana del control}}$	$2^{\Delta \Delta Cq}$	Resultado
16	38,86	24,58	14,28	-1,5	2,83	Positivo
17	39,26	24,55	14,71	-1,07	2,10	Negativo
18	38,57	21,35	17,22	1,44	0,37	Negativo
19	39,82	25,54	14,28	-1,5	2,83	Positivo
20	39,23	20,97	18,26	2,48	0,18	Negativo
21	38,82	21,51	17,31	1,53	0,35	Negativo
22	35,37	20,91	14,46	-1,32	2,50	Positivo
				Mediana	2,21	

LISTADO DE SECUENCIAS

LISTADO DE SECUENCIAS

5

<110> Pharmassist Ltd

<120> Método para la cuantificación de la expresión de PD-L1

10

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 3691

<212> ADN

<213> Homo sapiens (secuencia de ARNm de PD-L1 (NM\_014143))

20

<400> 1

ES 2 779 309 T3

ggcgcaacgc tgagcagctg ggcggtcccg cgcgggcccca gttctgcgca gcttcccag	60
gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatattt	120
gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgctgaacg catttactgt cacggttccc	180
aaggacctat atgtggtaga gtatggtagc aatatgacaa ttgaatgcaa attcccagta	240
gaaaaacaat tagacctggc tgcactaatt gtctattggg aaatggagga taagaacatt	300
attcaatttg tgcattggaga ggaagacctg aaggttcagc atagtagcta cagacagagg	360
gcccggctgt tgaaggacca gctctccctg ggaaatgctg cacttcagat cacagatgtg	420
aaattgcagg atgcaggggt gtaccgctgc atgatcagct atggtggtgc cgactacaag	480
cgaattactg tgaaagtcaa tgccccatac aacaaaatca accaaagaat tttggttgtg	540
gatccagtca cctctgaaca tgaactgaca tgtcaggctg agggctacc caaggccgaa	600
gtcatctgga caagcagtga ccatcaagtc ctgagtggta agaccaccac caccaattcc	660
aagagagagg agaagctttt caatgtgacc agcacactga gaatcaacac aacaactaat	720
gagatcttct actgcacttt taggagatta gatcctgagg aaaaccatac agctgaattg	780
gtcatcccag aactacctct ggcacatcct ccaaataaaa ggactcactt ggtaattctg	840
ggagccatct tattatgcct tgggtgtagca ctgacattca tcttccgttt aagaaaaggg	900
agaatgatgg atgtgaaaaa atgtggcatc caagatacaa actcaaagaa gcaaagtgat	960
acacatttgg aggagacgta atccagcatt ggaacttctg atcttcaagc agggattctc	1020
aacctgtggt ttaggggttc atcggggctg agcgtgacaa gaggaaggaa tgggcccgtg	1080
ggatgcaggc aatgtgggac ttaaaaggcc caagcactga aaatggaacc tggcgaaagc	1140
agaggaggag aatgaagaaa gatggagtca aacagggagc ctggaggagg accttgatac	1200
tttcaaagtc ctgaggggct catcgacgcc tgtgacaggg agaaaggata cttctgaaca	1260
aggagcctcc aagcaaatca tccattgctc atcctaggaa gacgggttga gaatccctaa	1320
tttgagggtc agttcctgca gaagtgcctt ttgcctccac tcaatgcctc aatttgtttt	1380

ES 2 779 309 T3

ctgcatgact	gagagtctca	gtggtggaac	gggacagtat	ttatgtatga	gtttttccta	1440	
tttattttga	gtctgtgagg	tcttcttgtc	atgtgagtgt	ggttgtgaat	gatttctttt	1500	
gaagatatat	tgtagtagat	gttacaatth	tgtogccaaa	ctaaacttgc	tgcttaatga	1560	
tttgctcaca	tctagtaaaa	catggagtat	ttgtaagggtg	cttggtctcc	tctataacta	1620	
caagtataca	ttggaagcat	aaagatcaaa	ccggttggtg	cataggatgt	cacctttatt	1680	
taaccatta	atactctggg	tgacctaatc	ttattctcag	acctcaagtg	tctgtgcagt	1740	
atctgttcca	tttaaatatc	agctttacaa	ttatgtggta	gcctacacac	ataatctcat	1800	
ttcatcgctg	taaccaccct	gttgtgataa	ccactattat	tttaccatc	gtacagctga	1860	
ggaagcaaac	agattaagta	acttgcccaa	accagtaa	agcagacctc	agactgccac	1920	
ccactgtcct	tttataatac	aatttacagc	tatattttac	tttaagcaat	tctttttattc	1980	
aaaaaccatt	tattaagtgc	ccttgcaata	tcaatcgctg	tgccaggcat	tgaatctaca	2040	
gatgtgagca	agacaaagta	cctgtcctca	aggagctcat	agtataatga	ggagattaac	2100	
aagaaaatgt	attattacaa	tttagtccag	tgtcatagca	taaggatgat	gcgaggggaa	2160	
aacccgagca	gtggtgccaa	gaggagaaa	taggccaatg	tggtctggga	cggttgata	2220	
tacttaaa	tcttaataat	cagagtaatt	ttcatttaca	aagagaggtc	ggtacttaaa	2280	
ataaccctga	aaaataacac	tggaattcct	tttctagcat	tatatttatt	cctgatttgc	2340	
ctttgccata	taatcta	cttgtttata	tagtgtctgg	tattgtttaa	cagttctgtc	2400	
ttttctattt	aatgccact	aaattttaaa	ttcatacctt	tccatgattc	aaaattcaaa	2460	
agatccc	atg	ggagatgggt	ggaaaatctc	cacttcatcc	tccaagccat	tcaagtttcc	2520
tttccagaag	caactgctac	tgctttcat	tcatatgttc	ttctaaagat	agtctacatt	2580	
tggaaatgta	tgttaaaagc	acgtatttt	aaaattttt	tcctaaatag	taacacattg	2640	
tatgtctgct	gtgtactttg	ctattttt	ttatttttagt	gtttcttata	tagcagatgg	2700	
aatgaatttg	aagttcccag	ggctgaggat	ccatgccttc	ttgtttcta	agttatcttt	2760	
cccatagctt	ttcattatct	ttcatatgat	ccagtatatg	ttaa	aatatgt	cctacatata	2820
catttagaca	accaccattt	gttaagtatt	tgctctagga	cagagtttg	atttgtttat	2880	
gtttgctcaa	aaggagacc	atgggctctc	cagggtgac	tgagtcaatc	tagtcctaaa	2940	
aagcaatctt	attattaact	ctgtatgaca	gaatcatgtc	tggaactttt	gttttctgct	3000	
ttctgtcaag	tataaacttc	actttgatgc	tgtacttgca	aatcacatt	ttctttctgg	3060	
aaattccggc	agtgtacctt	gactgctagc	taccctgtgc	cagaaaagcc	tcattcggtg	3120	
tgcttgaacc	cttgaatgcc	accagctgtc	atcactacac	agccctccta	agaggcttcc	3180	
tggaggtttc	gagattcaga	tgccctggga	gatcccagag	tttctttcc	ctcttgcca	3240	
tattctgggtg	tcaatgacaa	ggagtacctt	ggctttgcca	catgtcaagg	ctgaagaaac	3300	

ES 2 779 309 T3

agtgtctcca acagagctcc ttgtggtatc tgtttgtaca tgtgcatttg tacagtaatt 3360  
 ggtgtgacag tgttctttgt gtgaattaca ggcaagaatt gtggctgagc aaggcacata 3420  
 gtctactcag tctattccta agtcctaact cctccttgtg gtgttgatt tgtaaggcac 3480  
 tttatccctt ttgtctcatg tttcatcgt aatggcatag gcagagatga tacctaattc 3540  
 tgcatttgat tgtcactttt tgtacctgca ttaatttaat aaaatattct tatttatttt 3600  
 gttacttggg acaccagcat gtccattttc ttgtttattt tgtgtttaat aaaatgttca 3660  
 gtttaacatc ccagtggaga aagttaaaaa a 3691

5 <210> 2  
 <211> 987  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens (secuencia de ARNm de B2M (NM004048))

<400> 2

aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag 60  
 atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct 120  
 atccagcgt a ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca 180  
 aatttcctga attgctatgt gtctggggtt catccatccg acattgaagt tgacttactg 240  
 aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg 300  
 tctttctatc tcttgtacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc 360  
 cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa 420  
 gcagcatcat ggaggtttga agatgcccga tttggattgg atgaattcca aattctgctt 480  
 gcttgctttt taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt 540  
 ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat 600  
 gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca ggtagctcta ggagggctgg caacttagag 660  
 gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca 720  
 atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta 780  
 catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa 840  
 tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt 900  
 gataaagtaa ggcattggtt tggttaactc ggtttatttt tgttccacaa gttaaataaa 960  
 10 tcataaaaact tgatgtgtta tctotta 987

15 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador directo diana 1 (PD-L1)

ES 2 779 309 T3

	<400> 3 tcatcccaga a	11
5	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo diana 2 (PD-L1)	
15	<400> 4 gctgaattgg tcatcccaga a	21
20	<210> 5 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso diana 1 (PD-L1)	
30	<400> 5 cattctccct t	11
35	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador inverso diana 2 (PD-L1)	
45	<400> 6 ttcacatcc atcattctcc ctt	23
50	<210> 7 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sonda de hidrólisis diana 1 (PD-L1)	
60	<400> 7 gcacatcctc ca	12
65	<210> 8 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Sonda de hidrólisis diana 2 (PD-L1)	
75	<400> 8 acctctggca catcctccaa atgaaag	27
80	<210> 9 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220> <223> Cebador directo de referencia 1 (B2M)	

# ES 2 779 309 T3

	<400> 9 gccgtgtgaa c	11
5	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo de referencia 2 (B2M)	
15	<400> 10 gcctgccgtg tgaacctgt	20
20	<210> 11 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso de referencia 1 (B2M)	
30	<400> 11 cttcaaacct c	11
35	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador inverso de referencia 2 (B2M)	
45	<400> 12 aaatgcgga tcttcaaacc tc	22
50	<210> 13 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sonda de hidrólisis de referencia 1 (B2M)	
	<400> 13 ctcgatccca c	11
	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda de hidrólisis de referencia 2 (B2M)	
	<400> 14 catgatgctg cttacatgtc tcgatccac	30



## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la determinación cuantitativa de la expresión del Ligando de Muerte Programada 1 (*PD-L1*) en una muestra de biopsia líquida de Células TumORAles Circulantes (CTC), comprendiendo dicho método las etapas:

- i. someter la muestra de biopsia líquida a transcripción inversa utilizando ARN presente en la muestra como plantilla para sintetizar una secuencia de ADNc correspondiente,
- ii. formar una mezcla de reacción que comprende la muestra, reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, un par de cebadores diana, una sonda de hidrólisis diana, siendo dicho par de cebadores diana y la sonda de hidrólisis diana capaces de hibridar con el ARNm de *PD-L1* y consistiendo dicho par de cebadores diana en un cebador directo diana que comprende la secuencia 5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 4) y un cebador inverso diana que comprende la secuencia 5'-TTTCACATCCATCATTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 6)
- iii. someter la mezcla de reacción a condiciones de amplificación optimizadas para generar al menos una copia de una secuencia del ácido nucleico complementaria a una secuencia diana, siendo dicha secuencia diana un transcrito de ARNm de la secuencia de ARNm de *PD-L1* (SEQ ID NO: 1), y
- iv. determinar la cantidad de ARNm de *PD-L1* en la muestra de biopsia líquida,
- v. normalizar la expresión de *PD-L1* con respecto a una expresión de un gen de referencia cuyos niveles de expresión permanecen constantes entre los diferentes tipos de células,
- vi. comparar la cantidad de ARNm de *PD-L1* expresado en dicha muestra con un control positivo que es una muestra que comprende ARNm de *PD-L1* y un control negativo que es una muestra que no comprende ARNm de *PD-L1* para estimar una sobreexpresión de la secuencia de ARNm de *PD-L1*.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, para

- i. diagnosticar y/o pronosticar la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- ii. predecir la eficacia del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto antes de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- iii. evaluar el resultado del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control, y/o
- iv. evaluar la recurrencia de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto durante y después de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control,

en donde el sujeto es un mamífero, que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad neoplásica maligna.

3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la sonda de hidrólisis diana de *PD-L1* comprende al menos la secuencia 5'-6FAM-GCACATCCTCCA-BBQ-3' (SEQ ID NO: 7), preferentemente, la sonda de hidrólisis diana de *PDL1* comprende la secuencia 5'-6FAM-ACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAAAG-BBQ-3' (SEQ ID NO: 8) y dos partículas fluorescentes.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el gen de referencia se selecciona del grupo que consiste en hipoxantina fosforribosil transferasa (*HPRT*),  $\beta$ 2-microglobulina (*B2M*), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y  $\beta$ -actina (*ACTB*), ARN ribosómico 18S (*ARNr 18S*), ARN ribosómico 28S (*ARNr 28S*),  $\alpha$ -tubulina (*TUBA*), albúmina (*ALB*), proteína ribosómica L32 (*RPL32*), proteína de unión a secuencia TATA (*TBP*), ciclofilina C (*CYCC*), Factor 1 $\alpha$  de elongación (*EF1A*), ARN polimerasa II (*RP11*).

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el gen de referencia es la secuencia de ARNm de  $\beta$ 2-microglobulina (*B2M*) (SEQ ID NO: 2) y el cebador directo de referencia de *B2M* comprende al menos la secuencia de 5'-GCCGTGTGAAC-3' (SEQ ID NO: 9) o el cebador directo de referencia de *B2M* comprende la secuencia 5'-GCCTGCCGTGTGAACCATGT-3' (SEQ ID NO: 10) y en donde el cebador inverso de referencia de *B2M* comprende al menos la secuencia de 5'-CTTCAAACCTC-3' (SEQ ID NO: 11) o el cebador inverso de referencia de *B2M* comprende la secuencia 5'-AAATGCGGCATCTTCAAACCTC-3' (SEQ ID NO: 12).

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sonda de hidrólisis diana o de referencia comprende partículas fluorescentes.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las partículas fluorescentes de la sonda de hidrólisis diana o de referencia es un indicador fluorescente fijado covalentemente al extremo 5' de la sonda de hidrólisis diana o de referencia y un colorante desactivador fluorescente fijado al extremo 3'.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el colorante indicador fluorescente es 6-fluoresceína (FAM) y el colorante desactivador fluorescente es BlackBerry Quencher (BBQ).

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la sonda de hidrólisis de referencia de *B2M* comprende al menos la secuencia 5'-6FAM-CTCGATCCAC-BBQ-3' (SEQ ID NO: 13), preferentemente, la sonda de hidrólisis de referencia de *B2M* comprende la secuencia 5'-6FAM-

CATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCAC-BBQ-3' (SEQ ID NO: 14) y dos partículas fluorescentes.

5 10. El método de acuerdo con cualquier reivindicación de 2 a 9, en donde la enfermedad neoplásica maligna se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, urotelial, colorrectal, esofágico, gástrico, carcinoma hepatocelular, pulmonar, melanoma, nasofaríngeo, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, linfomas, carcinoma orofaríngeo de células escamosas, del cuello uterino, glioblastoma, mesoteliomas malignos, ovárico y pancreático.

10 11. Un kit para amplificar una secuencia diana de *PD-L1* y determinar la expresión de ARNm de *PD-L1* en una muestra que comprende;

- 15
- a) reactivos de amplificación de ácidos nucleicos,
  - b) un par de cebadores diana que son capaces de hibridar con el ARNm de *PD-L1* y que consisten en un cebador directo diana que comprende la secuencia 5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 4) y un cebador inverso diana que comprende la secuencia 5'-TTTCACATCCATCATTCTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 6),
  - c) un par de cebadores de referencia que son capaces de hibridar con el ARNm de un gen de referencia,
  - d) una sonda de hidrólisis diana que es capaz de hibridar con el ARNm de *PD-L1*
  - e) una sonda de hidrólisis de referencia que es capaz de hibridar con el ARNm del gen de referencia,
  - f) opcionalmente instrucciones para realizar el método *in vitro* como se define en las reivindicaciones 1 a 10.

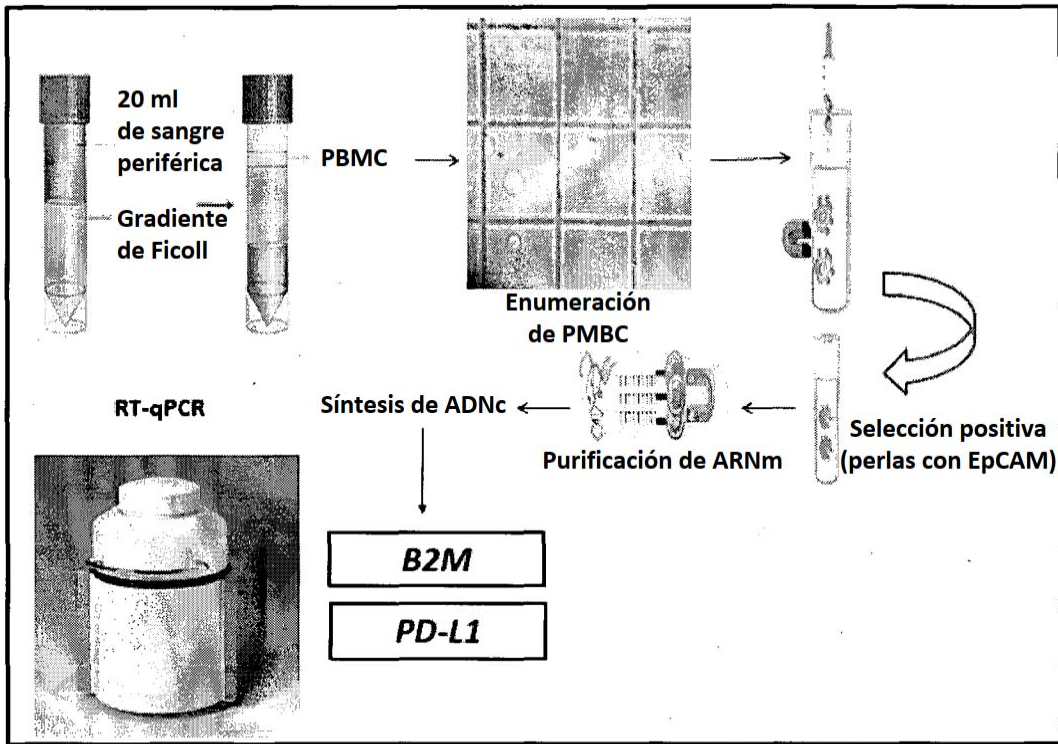


Fig. 1

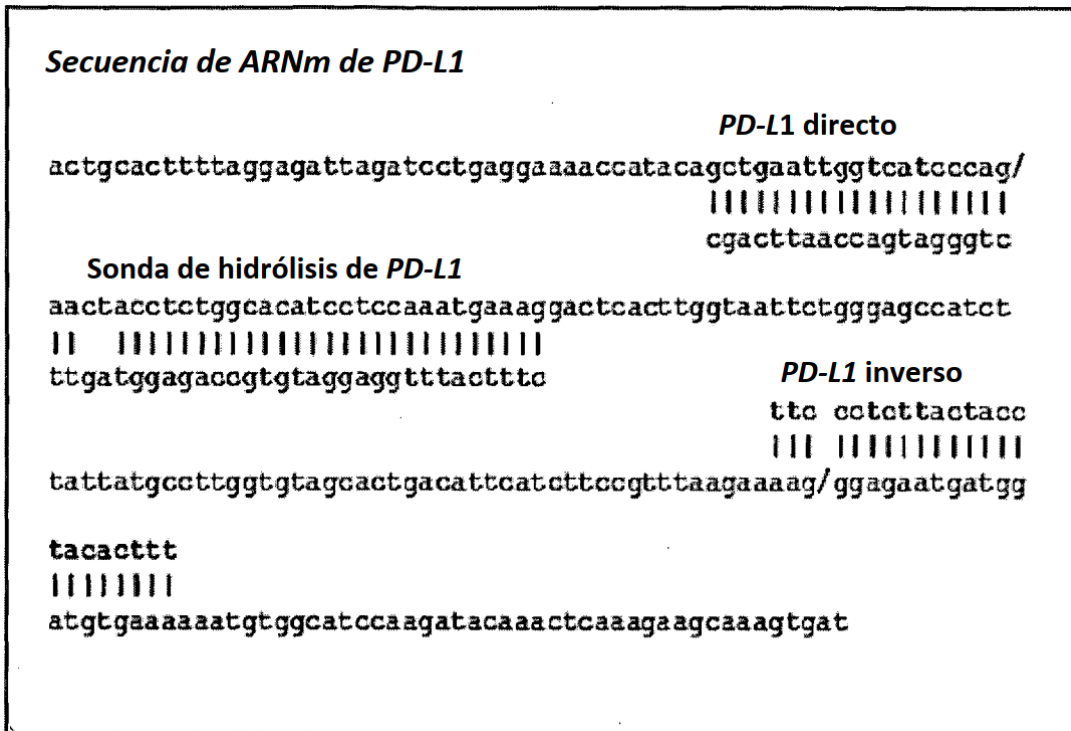


Fig. 2

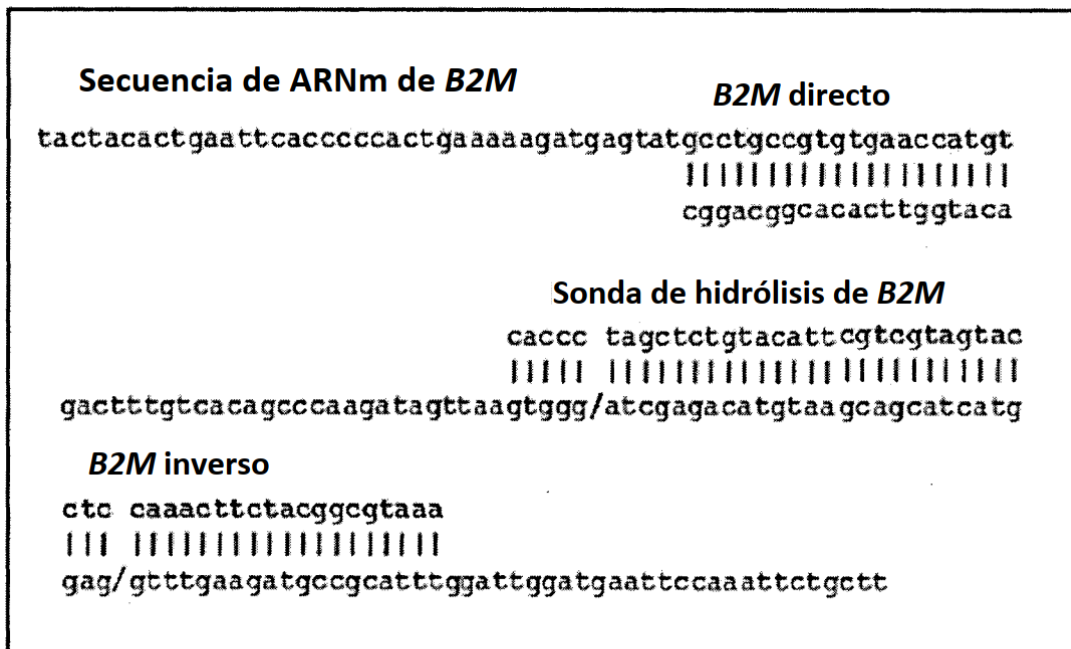
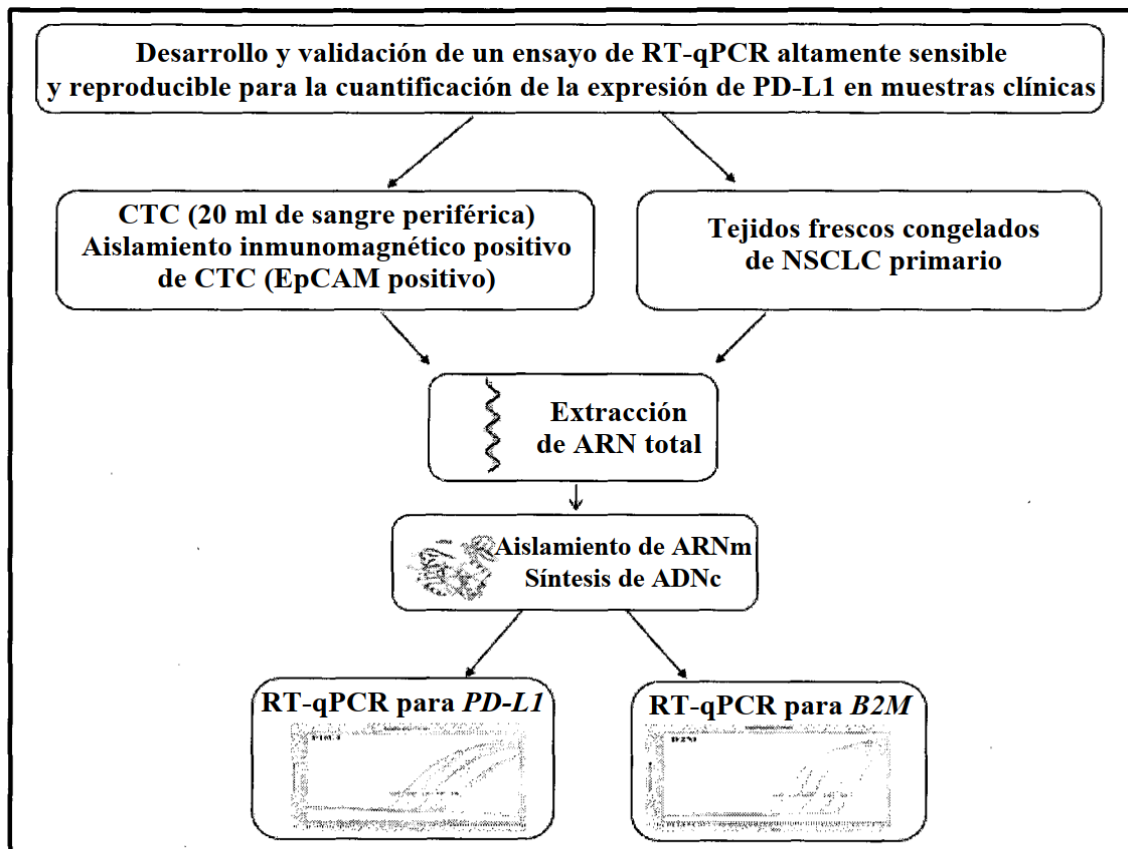
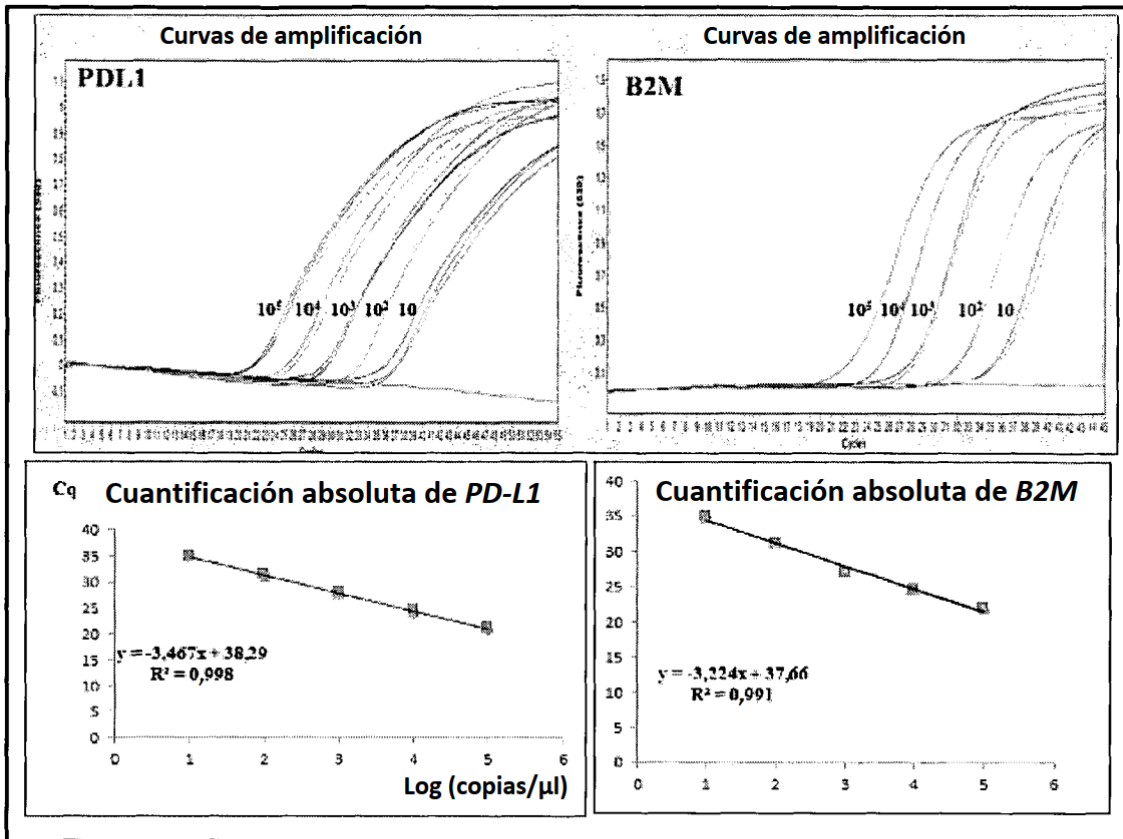


Fig. 3



**Fig. 4**



**Fig. 5**

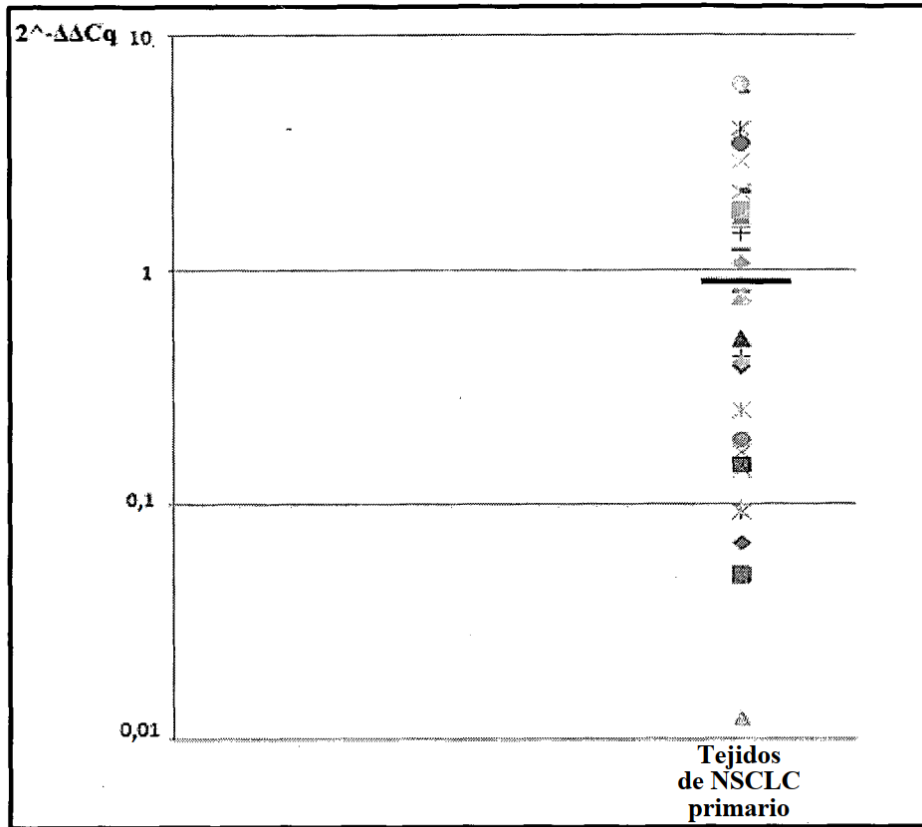
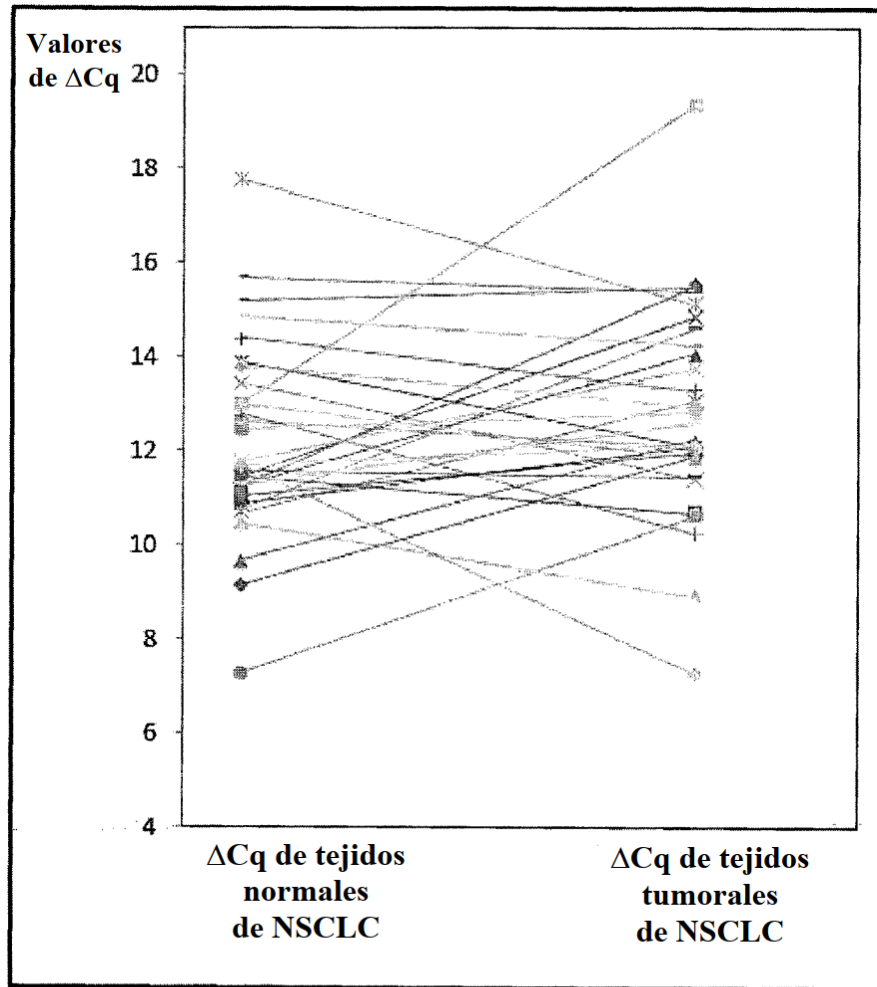


Fig. 6



**Fig. 7**



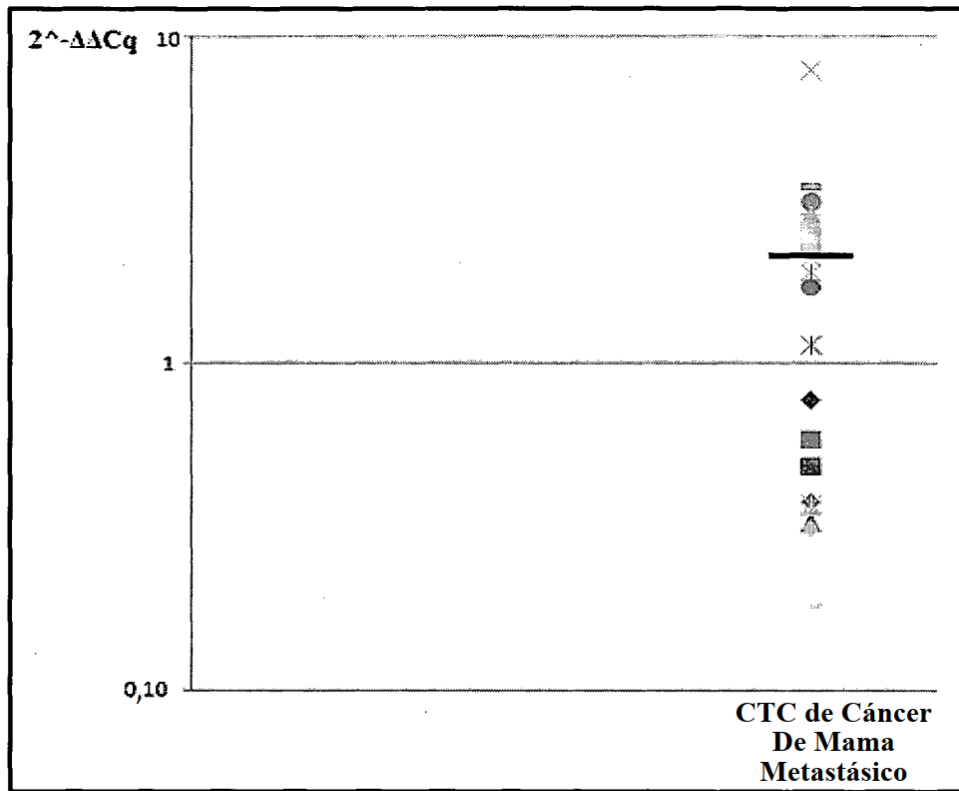


Fig. 8

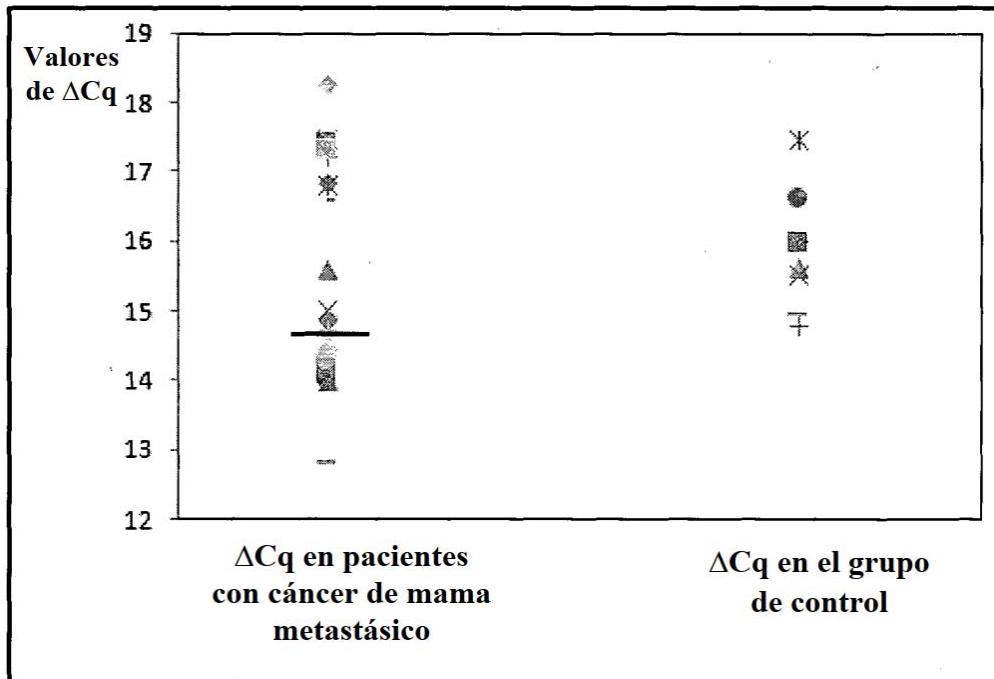


Fig. 9