



Ministero dello Sviluppo Economico

Ricevuta di presentazione

per

Brevetto per invenzione industriale



Domanda numero: 102017000045353

Data di presentazione: 26/04/2017

DATI IDENTIFICATIVI DEL DEPOSITO

Ruolo	Mandatario
Data di compilazione	26/04/2017
Titolo	METODO PER LA RICERCA E L'INDIVIDUAZIONE DI UNA CONDIZIONE GENETICA PRODROMICA ALL'INSORGENZA DI TUMORI SOLIDI
Carattere domanda	Ordinaria
Esenzione	NO
Accessibilità al pubblico	NO
Numero rivendicazioni	15
Autorità depositaria	

RICHIEDENTE/I

Natura giuridica	Persona giuridica
Denominazione	BIOSCIENCE SERVICES S.r.l.
Partita IVA	241255
Nazione sede legale	San Marino
Tipo Società	societa' a responsabilita' limitata
Quota percentuale	100.0%

DOMICILIO ELETTIVO

Cognome/R.sociale	Ruzzu Ing. Giammario
Indirizzo	via Gulli 5
CAP	40068
Comune	San Lazzaro di Savena
Telefono	051 - 6257522
Fax	051 - 6258256

Indirizzo Email \ PEC	g.ruzzu@studioingruzzo.eu
Riferimento depositante	BIO11BRIT12

MANDATARI/RAPPRESENTANTI

Cognome	Nome
Ruzzu	Giammario

INVENTORI

Cognome	Nome	Nazione residenza
MUCCI	GIUSEPPE	San Marino

CLASSIFICAZIONI

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q	3	

NUMERO DOMANDE COLLEGATE

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Tipo documento	Riserva	Documento
Riassunto	NO	BIO11BRIT12-Riassunto-ITA.pdf.p7m hash: 89ae48e0b721f2320c824e1fdc654678
Rivendicazioni	NO	BIO11BRIT12-Rivendicazioni-ITA.pdf.p7m hash: 08f554cf9571b639962ccf52fb20dc90
Disegni provvisori	NO	BIO11BRIT12-Tavole-Provvvisorie.pdf.p7m hash: c1dbfc3f33e56c46f3ba2c8a1dc85a67
Descrizione in italiano*	NO	BIO11BRIT12-Descrizione-ITA.pdf.p7m hash: 5ecf2ef2278a2d570a0dde2fac92808

Lettera di Incarico	SI	hash:
Rivendicazioni in inglese	SI	hash:
Disegni	SI	hash:
Disegni	SI	hash:

PAGAMENTI

Tipo	Identificativo	Data
Bollo	01152066831229	26/01/2017

METODO PER LA RICERCA E L'INDIVIDUAZIONE DI UNA CONDIZIONE GENETICA PRODROMICA ALL'INSORGENZA DI TUMORI SOLIDI

A nome: BIOSCIENCE SERVICES S.r.l.

Con sede in: Falciano (RSM) – Strada Rovereta, 42

RIASSUNTO

Il metodo per la ricerca e l'identificazione di una condizione genetica prodromica all'insorgenza di tumori solidi in un soggetto sano comprende un ciclo di valutazione di una condizione di stabilità o instabilità genetica e almeno un ciclo di ripetizione di detta valutazione. I cicli di ripetizione sono effettuati periodicamente sul soggetto, secondo cadenze che possono variare in funzione del risultato del ciclo precedente.

Ciascun ciclo comprende le fasi di:

- prelevare un campione di materiale biologico del soggetto, isolare il DNA dal materiale biologico, amplificare e sequenziare il DNA isolato;
 - verificare la presenza di mutazioni selezionate in un insieme predefinito di geni del campione in esame, detto insieme di geni e dette mutazioni essendo connessi all'insorgenza di tumori solidi;
 - l'insieme predefinito di geni comprendendo un sottoinsieme del pannello di geni od *hotspot* connessi ad uno o più tumori solidi, oppure l'intero pannello di geni connessi ai tumori solidi;
 - per ciascun ciclo di valutazione, verificare la frequenza delle mutazioni rilevate per ciascun gene, le mutazioni essendo scelte fra le sopra citate mutazioni selezionate;
 - registrare le mutazioni rilevate per ciascun gene o gruppo di geni e la loro frequenza;
 - per ciascun ciclo di ripetizione, definire o aggiornare un indice di instabilità genetica, complessivo (I_T) oppure per singolo gene (I_G), del soggetto, sulla base della frequenza delle mutazioni rilevata e sulla base dell'incremento di detta frequenza di mutazioni;
- per ciascun ciclo di ripetizione, valutare l'ingresso del soggetto in una

condizione genetica prodromica all'insorgenza di uno o più tumori solidi o gruppi di tumori solidi sulla base di del superamento di un valore di soglia ($I_{TS,IG}$) dell'indice di instabilità genetica ($I_{T,IG}$) definito per ogni singolo gene o gruppo di geni.

METODO PER LA RICERCA E L'INDIVIDUAZIONE DI UNA CONDIZIONE GENETICA PRODROMICA ALL'INSORGENZA DI TUMORI SOLIDI

A nome: BIOSCIENCE SERVICES S.r.l.

Con sede in: Falciano (RSM) – Strada Rovereta, 42

DESCRIZIONE

La presente invenzione, in linea generale, si inserisce nel settore della prevenzione delle patologie oncologiche, e più in dettaglio della prevenzione dei tumori solidi.

In particolare, l'invenzione comprende un metodo per la ricerca e l'identificazione, in un soggetto, di uno stato genetico prodromico all'insorgenza di tumori solidi, e per la predizione statistica della presenza di possibilità significative di contrarre tali tumori in soggetti per cui è stato valutato un rischio.

Un tumore solido è costituito da una o più masse di tessuto, composto da cellule tumorali e da stroma (a loro volta costituiti da diversi tipi di cellule e da matrice extracellulare), caratterizzati da una crescita abnorme e incontrollata, che può determinare, in taluni casi, una patologia sistemica.

I tumori sono patologie causate da alterazioni genetiche; si sviluppano in diverse fasi temporalmente consecutive nelle quali una serie di successive mutazioni si accumulano nel patrimonio genetico di una o più cellule.

Un marcatore di particolare rischio per la formazione di tumori è costituito da una condizione di instabilità genetica, legata a un incremento nelle alterazioni geniche del soggetto. Queste portano all'acquisizione, da parte delle cellule portatrici, di un aumentato rischio di dar luogo a linee di cellule tumorali.

Questo processo è stato estesamente studiato per i tumori colorettali. Nella genesi di tali tumori, la prima mutazione, a carico di geni denominati "guardiani" (*gatekeepers/caretakers*), deputati al controllo

della stabilità genetica, induce un vantaggio selettivo nella crescita di una normale cellula epiteliale, permettendole di sovrastare le cellule circostanti e di divenire un microscopico clone.

Il più noto dei geni “*gatekeepers*” nel colon è il gene APC.

La quasi totalità (circa l'80%) dei tumori colo-rettali sono caratterizzati da una mutazione del gene APC. Il piccolo adenoma che si forma da questa mutazione ha una crescita molto lenta, ma se avviene una seconda mutazione in un altro gene, come ad esempio il gene KRAS (o ATK1, etc.), questo innesca una nuova fase di crescita clonale che provoca un'espansione del numero di cellule coinvolte. Le cellule che possiedono solo la mutazione APC possono permanere nell'adenoma, ma il loro numero è limitato rispetto a quelle che portano mutazioni in entrambi i (o più) geni.

Questo processo di mutazioni successive, seguite da corrispondenti espansioni clonali, prosegue con mutazioni in altri geni, quali PIK3CA, SMAD4 e TP53, con elevate probabilità di generare una neoplasia maligna che può estendersi attraverso la sottostante membrana basale e metastatizzare, dapprima in genere verso i linfonodi regionali, e successivamente in organi distanti, quali il fegato o i polmoni.

Nel corso dell'ultima decade una serie esaustiva di lavori di sequenziamento ha svelato gli scenari genomici delle forme più comuni di cancro umano. Il sequenziamento del genoma di un gran numero di tumori ha prodotto informazioni relative a migliaia di mutazioni ed altre alterazioni genomiche. Allo stato attuale sono stati sequenziati più di diecimila genomi tumorali e, con il progressivo decrescere dei costi di sequenziamento, molti altri genomi tumorali verranno caratterizzati in un prossimo futuro.

Il sequenziamento dei genomi tumorali ha consentito di catalogare diversi “geni con mutazioni pilota-*driver*”, e consentirà di catalogarne ancora molti altri. Una mutazione pilota è una mutazione all'interno di un gene che conferisce un significativo vantaggio nella crescita.

Ad oggi, gli studi condotti hanno consentito di identificare circa 140

geni i quali, quando mutati possono promuovere, o “pilotare”, l’oncogenesi. Un tipico tumore può generalmente contenere da due a otto di tali mutazioni nei “geni-pilota”. Le rimanenti mutazioni sono da considerare passeggero, e non conferiscono alcun vantaggio di crescita cellulare.

I geni-pilota sono spesso coinvolti nella regolazione di *pathway* molecolari chiave della cellula che regolano, con forme e modalità diverse, tre principali processi cellulari: il differenziamento, la sopravvivenza (tramite segnali pro- o anti-apoptotici) e la manutenzione cellulare. Il raggiungimento di una profonda comprensione di tali diversi percorsi è attualmente una delle esigenze più pressanti nella ricerca oncologica di base. Tuttavia, anche il grado di comprensione raggiunto finora nella struttura dei genomi tumorali è sufficiente per guidare alcune odierne scelte terapeutiche, e ha determinato lo sviluppo di approcci più efficaci nella riduzione della morbilità e della mortalità degli eventi tumorali.

I programmi di screening e di diagnosi precoce hanno già oggi un impatto importante nel miglioramento della sopravvivenza in buone condizioni di salute e nella riduzione della mortalità nei pazienti oncologici. Poiché approcci non invasivi finalizzati alla diagnosi precoce contribuiscono a incoraggiare la cooperazione del paziente, appare senz’altro consigliabile inserirli nei programmi di screening e di prevenzione.

La sempre maggiore conoscenza della patogenesi molecolare delle patologie tumorali, e il rapido sviluppo di nuove tecniche di analisi molecolare, stanno contribuendo allo sviluppo e all’affermazione di identificazione e analisi delle alterazioni molecolari precoci nei fluidi corporei. DNA extracellulare (“*cell-free DNA*”, o “*cfDNA*”) può essere ritrovato nel siero, nel plasma, nelle urine e in altri fluidi corporei. Il prelievo e l’analisi molecolare del cfDNA rappresenta quindi una sorta di “biopsia liquida”, che può costituire una sorta di “immagine circolante” di diverse patologie specifiche.

Nel sangue, l'apoptosi sembra essere il processo più frequente che genera cfDNA anche se nei pazienti tumorali non è completamente trascurabile la porzione fornita da processi necrotici. Interessante è uno studio che analizzando cfDNA dal plasma di 32 pazienti con tumore al colon retto in fase 4 ha mostrato che nel 34.4% dei pazienti il DNA estratto aveva due dimensioni di grandezza (166bp e 332bp).

Stroun et al. hanno descritto che nel cfDNA di un paziente possono essere identificate diverse alterazioni cancerose. Diversi articoli pubblicati successivamente hanno confermato che il cfDNA contiene alterazioni specifiche correlate alla presenza di tumori quali mutazioni, metilazioni e variazioni del numero di copie ("*copy number variations*", o CNVs) di specifici geni direttamente riconducibili alle cellule tumorali, confermando in tal modo l'esistenza di DNA tumorale circolante (ctDNA).

Diversi studi, finalizzati alla correlazione di campioni selezionati di tessuto e di plasma sono stati condotti allo scopo di confermare che l'analisi del cfDNA circolante può essere utilizzata come strumento diagnostico.

Una valutazione con tecniche NGS (*next-generation sequencing*) effettuata su 50 geni tumorali, che copre 2.800 mutazioni COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* - <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) in 60 tessuti tumorali e 31 campioni di plasma da 17 pazienti con tumore metastatico al seno ha evidenziato una concordanza del 76% fra tessuto e plasma. Da questi dati gli autori sono arrivati alla conclusione che il plasma può essere considerato il campione biologico di elezione per lo screening dei tumori in sostituzione alla biopsia metastatica.

I risultati sopra citati sono stati confermati in un gruppo di 34 pazienti affetti da 18 diversi tipi di tumore: l'analisi ha interessato 46 geni e ha coperto 6.800 mutazioni COSMIC in campioni di tessuto e di plasma. Ventisette dei trentaquattro pazienti hanno mostrato una concordanza del 97% fra le mutazioni ritrovate nei campioni di tessuto e quelle ritrovate nel ctDNA. Ne consegue che le analisi NGS basate sul ctDNA potrebbero

rivoluzionare la gestione di pazienti affetti da patologie oncologiche potenzialmente curabili o metastatiche.

La valutazione dello stato di rischio costituisce un componente essenziale delle procedure di testing e di analisi genetica. Nell'immediato futuro è altamente plausibile che questo tipo di approccio venga implementato in maniera sistematica nei processi di valutazione preventiva delle patologie oncologiche.

E' d'altra parte sempre più frequente la richiesta che proviene da parte di persone "sane" di avere a disposizione test genetici relativi alla propria predisposizione all'insorgenza di patologie gravi, oppure al rilevamento di uno stato pre-patologico. Anche per questo motivo i medici dovrebbero inserire tecniche per la definizione e la gestione del rischio, e per l'identificazione di condizioni sicuramente o molto probabilmente pre-patologiche, nei loro programmi di controllo routinario.

Il rischio genetico si riferisce alla probabilità per un soggetto portatore di una mutazione specificamente associata a una determinata patologia – in particolare, per quanto concerne questa trattazione, una patologia oncologica -, di sviluppare effettivamente quella patologia. L'individuazione di una condizione pre-patologica, o prodromica all'insorgenza di una patologia, si riferisce invece al rilevamento di segnali biomolecolari indicativi di una situazione di instabilità genetica la quale, per effetto di una successiva evoluzione, certamente o con buona probabilità potrà portare nel tempo all'insorgenza della patologia.

Considerato, come già più volte sottolineato nel testo, che la carcinogenesi è influenzata sia da fattori ambientali che da una predisposizione ereditaria, il *background* genetico legato a un disturbo specifico influisce significativamente sulla definizione del rischio correlato a quel particolare disturbo.

Secondo Wang E. et al. un algoritmo basato su una serie (*network* o rete)rete di elementi caratteristici può essere adottato per generare un modello genetico delle componenti chiave del tumore, e per collegare genotipi mutanti a fenotipi clinici. Utilizzando questo schema (e altri simili)

vengono illustrate strategie per la predizione dei possibili *target* terapeutici del tumore, delle probabilità di recidiva, e del rischio di insorgenza del tumore basato su un profilo individuale della sequenza genomica del paziente.

In conclusione, metodi di predizione derivati da un modello basato su un *network* di elementi caratteristici possono essere utilizzati nella diagnosi e in programmi di gestione e prevenzione ottimizzata delle patologie oncologiche.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE.

L'invenzione è relativa a un metodo (basato su un algoritmo e un database associato) per la ricerca e l'identificazione in un soggetto sano di una condizione genetica prodromica allo sviluppo di tumori solidi, ad eccezione dei tumori del cervello. Questo metodo definisce la suddetta condizione in base a una serie di cicli periodici di valutazione della frequenza di mutazioni a carico di un pannello di geni selezionato fra quelli connessi con l'insorgenza dei citati tumori solidi.

Il metodo prevede il prelievo di un campione biologico da un soggetto (costituito da fluidi corporei, quali sangue o urine), l'isolamento e l'amplificazione del DNA, e il suo sequenziamento. Segue una fase di analisi, che comprende la valutazione della presenza di una o più mutazioni a carico del citato pannello di geni, scelte fra una lista di mutazioni note per i geni monitorati e indicative di un'evoluzione verso la formazione di cellule neoplastiche.

In particolare, viene effettuata una valutazione con tecniche NGS (*next-generation sequencing*) su 50 geni, e un totale di 2.800 mutazioni classificate all'interno del database COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* - <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

In ogni ciclo di valutazione viene rilevata, per ciascun gene monitorato, l'esistenza di mutazioni a suo carico, con particolare attenzione a mutazioni che occorrono in corrispondenza di *hotspot* noti (posizioni frequentemente mutate in pazienti oncologici). In presenza di

una mutazione viene verificato se la medesima mutazione rilevata fosse già stata rilevata nei precedenti cicli di valutazione, e a quale livello (percentuale o frazione mutata - allelic frequency). In caso negativo la nuova mutazione a carico di quel gene viene registrata e viene calcolato, mediante un algoritmo, un valore indicativo del trend che la frequenza di mutazione esprime nel tempo, che costituisce il “Key Risk Indicator” del sistema. Il trend viene rappresentato con un valore numerico, ottenuto dal calcolo di un rapporto fra l’ultimo valore di frequenza della mutazione e i valori ricavati nei precedenti cicli di valutazione, e il suo andamento può essere riprodotto su un grafico, per fornire indicazioni del livello di stabilità o instabilità genetica.

Una volta rilevato il superamento di un livello di soglia predefinito per la frequenza di mutazione, secondo il metodo di identificazione dell’invenzione viene emesso un *report* di ingresso in un percorso di instabilità genetica, nel corso del quale ulteriori mutazioni porteranno nel tempo il soggetto a sviluppare, con certezza o con buona probabilità, un tumore solido.

I pannelli di geni e le loro mutazioni presi in considerazione per ciascun ciclo di valutazione possono ricomprendere l’intero panorama dei 50 geni connessi all’insorgenza di tumori solidi, oppure solo alcuni geni ed hotspot connessi solo a uno o più tumori selezionati.

In particolare, può essere monitorata nel soggetto la situazione genetica la cui instabilità è connessa all’insorgenza di un solo tipo di tumore, oppure di una singola famiglia di tumori. In questo caso il numero di geni che si analizzano è limitato a quelli direttamente connessi con quel tumore o con quel gruppo di tumori.

Secondo l’invenzione, il pannello di geni e le mutazioni da analizzare possono essere scelti sulla base dell’anamnesi del soggetto, ottenuta con un’indagine storico-familiare dello stesso.

Quando viene rilevata una frequenza di mutazione che esprime una tendenza di crescita superiore a un valore predefinito, ad esempio il 10%, (valore che può comunque essere soggetto ad aggiornamenti, in funzione

dei dati che verranno accumulati nel corso degli anni) vale a dire un aumento numerico della allelic frequency (secondo quanto sopra definito) per una determinata mutazione (ad esempio passaggio di una mutazione del gene APC da allelic frequency 0.1% a 5% in una successiva ripetizione del test), il sistema di monitoraggio incrementa la sensibilità relativa al pannello in esame (i.e. richiederà che il paziente effettui nuovamente il test questa volta però con l'utilizzo di un pannello diverso che ha una sensibilità e specificità analitica superiore al test di primo livello) per quel che riguarda i geni coinvolti nell'incremento delle mutazioni, fino al 100%.

Il metodo prevede un continuo aggiornamento dei parametri di valutazione, quali la frequenza di ripetizione dei cicli di analisi del pannello di geni prescelto e la sensibilità relativa ai geni oggetto dell'analisi. In particolare, la frequenza di ripetizione è definita in funzione dell'indice di stabilità; più precisamente, a valori più elevati dell'indice di instabilità corrisponde una maggiore frequenza di ripetizione dei test, in quanto si ritiene che una situazione di instabilità tenda naturalmente a crescere, e che comporti una probabilità maggiore di avere nuove mutazioni significative in tempi più brevi.

Secondo l'invenzione, tutti i dati grezzi e i risultati ottenuti, relativi al DNA analizzato per ciascun ciclo di valutazione, vengono registrati, e rielaborati nel corso dei cicli successivi per migliorare l'accuratezza delle valutazioni all'aumentare del numero di dati disponibili.

Allo scopo di rendere la valutazione e la predizione dello stato di rischio quanto meno invasiva possibile, il campione biologico prelevato dal soggetto e dal quale viene isolato il DNA da analizzare è costituito da una biopsia liquida (come già precedentemente definita nel testo). In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la biopsia liquida è costituita da un campione di sangue periferico.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, la biopsia liquida è costituita da urina.

Il DNA isolato dal campione biologico, e utilizzato per la valutazione

e la predizione dello stato di rischio, è costituito da cfDNA (“*cell free DNA* – DNA cellulare libero”).

In una forma di realizzazione dell’invenzione il cfDNA viene isolato dal plasma separato dal campione di sangue periferico.

In una diversa forma di realizzazione dell’invenzione il cfDNA viene isolato dal siero separato dal campione di sangue periferico.

Il metodo secondo l’invenzione prevede inoltre la ricerca della presenza, nella biopsia liquida prelevata, di ctDNA (“*circulating tumor DNA* – DNA tumorale circolante”).

Nel caso in cui venga rilevata la presenza di ctDNA, il metodo di valutazione e predizione del rischio sostanzialmente conclude la propria funzione, in quanto ciò significa che almeno una delle linee di mutazione ha dato luogo alla formazione di cellule neoplastiche. A questo punto il sistema di valutazione e predizione del rischio emette un’informazione atta a trasferire il controllo del soggetto a un sistema di riconoscimento precoce (“*Early Detection*”), quale ad esempio il sistema “*SCED – Solid Cancer Early Detection*” sviluppato e utilizzato dalla medesima Richiedente.

Le caratteristiche dell’invenzione, così come risulteranno dalle rivendicazioni, sono evidenziate nella seguente descrizione dettagliata, con riferimento alle tavole di disegno allegate, nelle quali:

- la Fig. 1 illustra uno schema di flusso del metodo per la ricerca e l’individuazione di una condizione genetica prodromica all’insorgenza di tumori solidi secondo una forma di realizzazione generale dell’invenzione;
- la Fig. 2 illustra una lista del pannello di geni coinvolti nella valutazione delle mutazioni che definiscono una condizione di stabilità o instabilità genetica secondo il metodo dell’invenzione.

La presente invenzione riguarda un metodo per la ricerca e l’identificazione, in un soggetto sano, di una condizione genetica prodromica all’insorgenza di tumori solidi, ad eccezione dei tumori del cervello, per il monitoraggio dello stesso soggetto nel tempo riguardo al possibile ingresso in detta condizione, sulla base dell’andamento del

trend di stabilità genetica del medesimo soggetto.

I tumori del cervello sono generalmente esclusi dall'approccio utilizzato nel metodo di ricerca e individuazione di una condizione genetica prodromica all'insorgenza di tumori solidi secondo l'invenzione. Allo stato attuale non esiste infatti sufficiente evidenza scientifica per poter utilizzare tale approccio anche per i tumori del cervello. Il set dei geni legato all'insorgenza di questo tipo di tumori non è ancora stato propriamente identificato, ed al momento essi sembrano essere principalmente legati allo stato della metilazione del DNA più che ad una specifica mutazione della sua sequenza. Di fatto i pannelli qui proposti non sono atti alla valutazione dello stato di metilazione del DNA. Inoltre è atto dovuto precisare che, come già descritto da Bettegowda, C et al. (*Bettegowda, C. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Science translational medicine 6, 224ra224, doi:10.1126/scitranslmed.3007094 - 2014*), la barriera ematoencefalica costituisce con tutta probabilità un filtro che diminuisce sensibilmente la presenza di cfDNA nella circolazione generale. Per tanto le attuali tecniche di estrazione e successiva analisi non consentono ad oggi di poter produrre dati sufficientemente solidi e quindi utilizzabili per una analisi del rischio della presenza di tumori.

Il metodo prevede l'esecuzione, a intervalli di tempo prestabiliti, di una serie di cicli periodici di valutazione della frequenza di mutazioni a carico di un pannello di geni selezionato fra quelli connessi con l'insorgenza dei citati tumori solidi. In figura 1 è illustrato, a titolo esemplificativo, un possibile flusso operativo delle fasi del metodo che verranno descritte nel seguito. Varianti non essenziali del flusso operativo sono comunque possibili senza peraltro uscire dall'ambito dell'invenzione.

Ove non diversamente specificato, si conviene che i termini tecnici utilizzati nella presente trattazione presentino significato comunemente e univocamente noto a persone provviste di ordinaria esperienza nel settore (ad esempio, "biopsia liquida", "isolamento del DNA", "amplificazione del DNA", "sequenziamento del DNA", "ctDNA", "cfDNA", "Cellule Tumorali

Circolanti”, etc.). Si conviene inoltre che le tecniche di biologia molecolare e di ingegneria genetica, alle quali viene fatto riferimento e che si intendono utilizzare per l’attuazione del metodo secondo l’invenzione (ad esempio, “NGS - *Next Generation Sequencing*”), siano tecniche standard comunemente utilizzate nella pratica, e che siano altresì ben note alle persone provviste di ordinaria esperienza nel settore.

Per ciascun ciclo di ricerca e identificazione di una condizione genetica prodromica all’insorgenza di tumori solidi, il metodo oggetto dell’invenzione prevede il prelievo di un campione biologico da un soggetto, l’isolamento del DNA dal campione biologico, e quindi il suo sequenziamento, preferibilmente con tecnica NGS, dopo aver opportunamente amplificato la frazione di DNA rilevante.

Allo scopo di rendere la valutazione e la predizione dello stato di rischio quanto meno invasiva possibile, il campione biologico prelevato dal soggetto e dal quale viene isolato il DNA da analizzare è costituito da una biopsia liquida. Una biopsia liquida è costituita in sostanza da materiale biologico liquido o semiliquido circolante nel soggetto o da esso prodotto per secrezione o escrezione, in sostanza un fluido corporeo.

In una forma di realizzazione preferita dell’invenzione la biopsia liquida è costituita da un campione di sangue periferico, che viene prelevato ed eventualmente trattato per separare il plasma o il siero, in funzione dell’utilizzo successivo.

In una diversa forma di realizzazione dell’invenzione, la biopsia liquida è costituita da urina.

Secondo l’invenzione, il DNA isolato dal campione biologico, e utilizzato per la valutazione e la predizione dello stato di rischio, è costituito da cfDNA (“*cell free DNA* – DNA cellulare libero”).

L’esistenza del DNA libero circolante, cf-DNA (“*Cell Free DNA*”), è stata dimostrata per la prima volta circa 70 anni fa da Mendel and Metis. Il suddetto DNA origina da cellule necrotiche (morte prematura) e/o apoptotiche (morte programmata) ed è generalmente rilasciato da tutti i tipi di cellule. Circa 40 anni dopo la scoperta del cf-DNA, Stroun *et al.*

hanno dimostrato che specifiche alterazioni cancerogene potevano essere identificate anche nel cf-DNA. Successivamente sono stati pubblicati diversi articoli che hanno confermato l'esistenza del DNA circolante tumorale (ctDNA) tramite lo studio di specifiche alterazioni legate ai tumori. Il ctDNA è quindi una porzione del cfDNA totale ed è stato stimato che può rappresentare tra lo 0.01% e l'1% in fasi molto precoci fino al 40% negli stadi avanzati, come già descritto da Bettgowda, C et al (*Bettgowda, C. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Science translational medicine 6, 224ra224, doi:10.1126/scitranslmed.3007094 - 2014*).

Come già accennato, nel sangue l'apoptosi sembra essere il processo più frequente che genera cfDNA anche se nei pazienti tumorali non è completamente trascurabile la porzione fornita da processi necrotici.

La quantità e la variabilità di cfDNA nel siero e nel plasma sembra essere significativamente più elevata in pazienti affetti piuttosto che in controlli sani, specialmente in quei casi in cui il tumore è in uno stadio avanzato piuttosto che in stadi precoci.

E' da considerare che la quantità del cfDNA è influenzata anche da condizioni fisiopatologiche come può essere un processo infiammatorio, e poiché il cfDNA ha una stabilità molto bassa (dai 15 minuti a diverse ore), quindi l'attendibilità e la coerenza del risultato non sono sempre garantite. In questo caso, un approccio basato sulla ripetizione periodica del test produce il vantaggio di ottenere una minore incidenza di falsi negativi.

In uno studio con un pannello NGS, che può valutare 50 geni coinvolti nel cancro (vedasi figura 2) coprendo 2,800 mutazioni (COSMIC) in 60 tumori solidi e 31 tumori del sangue, sono stati analizzati 17 pazienti con tumore metastatico del seno ed è stata stimata una concordanza del 76% fra tessuto e plasma. Da questi dati gli autori sono arrivati alla conclusione che il plasma può essere considerato il campione biologico di elezione per lo screening dei tumori in sostituzione della biopsia metastatica.

In una forma di realizzazione dell'invenzione il cfDNA viene isolato dal plasma separato dal campione di sangue periferico prelevato dal soggetto.

In una diversa forma di realizzazione dell'invenzione il cfDNA viene isolato dal siero separato dal campione di sangue periferico prelevato dal soggetto.

Il cfDNA presente nel plasma, secondo tecniche note, può essere isolato utilizzando delle biglie magnetiche rivestite di silice o delle resine siliciche. In entrambi i casi, si sfrutta la capacità del DNA (carico negativamente) di legarsi alla silice (carica positivamente) in presenza di alte concentrazioni di Sali caotropici a pH prossimo a 7.5 (Chen and Thomas, 1980; Marko et al. 1982; Boom et al. 1990). Il legame del DNA alla silice viene indotto dalla disidratazione indotta dai sali caotropici e dalla formazione di legami idrogeno, che competono con le deboli repulsioni elettrostatiche (Melzak *et al.* 1996). I sali in eccesso, proteine, carboidrati, metaboliti e altri contaminanti vengono successivamente rimossi mediante lavaggi ripetuti con soluzioni a base alcolica. Infine, il DNA purificato viene eluito mediante una soluzione a bassa forza ionica (come il TE-buffer o l'acqua).

La fase successiva del metodo di valutazione e predizione del rischio secondo l'invenzione è costituita dall'analisi del pannello di geni selezionato (figura 1), con particolare attenzione a un gruppo selezionato di hotspot, che comprende la valutazione della presenza di una o più mutazioni a carico del citato pannello di geni, scelte fra una lista di mutazioni note per i geni monitorati e indicative di un'evoluzione verso la formazione di cellule neoplastiche.

Ad esempio, circa il 10% dei pazienti affetti da tumore del polmone (del tipo a cellule non piccole) negli Stati Uniti e in Europa si caratterizzano dal punto di vista genetico per la mutazioni del gene EGFR (Lynch et al 2004 ;. Paez et al 2004 ;. Pao et al., 2004). Queste mutazioni avvengono principalmente all'interno degli esoni EGFR 18-21, che codificano per una porzione del dominio EGFR tirosin-chinasico. Circa il

90% di queste mutazioni a carico dell'esone 19, sono delezioni o nell'esone 21 sono SNV (tipo la mutazione L858R) (Ladanyi e Pao 2008). Queste mutazioni aumentano l'attività tirosin-chinasica della proteina EGFR, che determina una iperattivazione dei pathways cellulari che stimolano la sopravvivenza delle cellule tumorali (Sordella et al. 2004). Indipendentemente dall'appartenenza etnica, le mutazioni del gene EGFR sono più spesso ritrovate in tumori di pazienti donne non fumatrici (meno di 100 sigarette in tutta la vita di un paziente) con istologia di tipo adenocarcinoma (Lynch et al 2004). Tuttavia, queste mutazioni a carico del gene EGFR possono anche essere trovati in altri sottogruppi di pazienti con carcinoma del polmone, quindi anche in fumatori. La presenza di suddette mutazioni nel cfDNA di un paziente apparentemente "sano" rappresenta un evidente campanello di allarme che deve necessariamente essere seguito da un monitoraggio e una serie di approfondite analisi per valutare la presenza di una massa tumorale.

In particolare, sul cfDNA viene effettuata una valutazione con tecniche NGS (*next-generation sequencing*) su 50 geni, il cui elenco è fornito in figura 2, che attualmente copre 2.800 mutazioni COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*).

E' da intendersi che, ai fini dell'invenzione, sia l'elenco dei geni che quello delle mutazioni sui quali si effettuano le valutazioni non devono essere considerati statici, in quanto l'intensa attività di ricerca in questo settore e le moderne tecniche di sequenziamento e di analisi disponibili possono portare all'identificazione di nuovi geni, di nuovi *hotspot* o di nuove mutazioni coinvolti nella carcinogenesi di una o più forme tumorali solide.

In ogni ciclo di valutazione viene ricercata, per ciascun gene monitorato, l'esistenza di mutazioni a suo carico (vedi esempio sopra dell'EGFR), con particolare attenzione a mutazioni che occorrono in corrispondenza di *hotspot* noti. In presenza di una mutazione significativa, questa viene registrata in un'area di memoria di un sistema computerizzato che materialmente è deputato all'attuazione delle fasi

computazionali del metodo (figura 1).

In ogni ciclo di ripetizione del test, vale a dire in ogni ciclo successivo al primo, viene verificato se la mutazione rilevata fosse già stata rilevata nei precedenti cicli di valutazione. In caso negativo la nuova mutazione a carico di quel gene viene registrata e viene calcolato, mediante un algoritmo, un valore indicativo del trend che la frequenza di mutazione esprime nel tempo, che costituisce il “Key Risk Indicator” del sistema.

Il trend viene rappresentato con un valore numerico, ottenuto dal calcolo di un rapporto fra l'ultimo valore di frequenza della mutazione e i valori ricavati nei precedenti cicli di valutazione, e il suo andamento può essere riprodotto su un grafico, per fornire indicazioni del livello di stabilità o instabilità genetica.

In una forma di realizzazione non limitativa del metodo secondo l'invenzione, il confronto tra due controlli può essere riassunto da un indice di instabilità genetica complessiva I_T secondo la formula:

$$I_T = \sum_{k=1}^n \frac{\Delta F_k}{n}$$

Dove:

n : numero di geni su cui viene effettuato il controllo

F_k frequenza di mutazione del singolo gene

Da notare che in questo caso l'indice di instabilità complessiva I_T restituisce la situazione complessiva, senza distinguere le variazioni su geni specifici.

In maniera del tutto analoga è possibile definire un indice di instabilità I_G di un particolare gene secondo la formula:

$$I_G = \sum_{j=1}^n \frac{\Delta F_j}{n}$$

Dove:

n : numero di hotspot valutati del gene su cui viene effettuato il controllo

F_j : frequenza di mutazione del singolo hotspot all'interno del gene

I pannelli di geni e le loro mutazioni presi in considerazione per ciascun ciclo di valutazione possono ricomprendere l'intero panorama dei 50 geni connessi all'insorgenza di tumori solidi (figura 2), oppure solo alcuni geni ed *hotspot* connessi solo a uno o più tumori selezionati.

In particolare, può essere monitorato il rischio connesso all'insorgenza di un solo tipo di tumore, oppure di una singola famiglia di tumori. In questo caso il numero di geni che si analizzano è limitato a quelli direttamente connessi con quel tumore o con quella famiglia di tumori.

In ogni caso, la definizione dell'indice di instabilità secondo il procedimento sopra descritto può interessare, in funzione del target di ricerca prefissato, un singolo gene, un pannello costituito da un set di geni connesso all'insorgenza di uno specifico tumore o famiglia di tumori, oppure l'intero pannello costituito dai 50 geni (allo stato attuale, oppure da un numero maggiore di geni se o quando, in futuro, ne verranno identificati degli altri) connessi all'insorgenza di tumori solidi in generale.

Secondo l'invenzione, il pannello di geni e le mutazioni da analizzare possono essere scelti sulla base dell'anamnesi del soggetto, ottenuta con un'indagine storico-familiare dello stesso.

Quando, nel corso di un ciclo di valutazione, viene rilevata una frequenza di mutazione che esprime una tendenza di crescita superiore al 10%, (valore che può comunque essere soggetto ad aggiornamenti, in funzione dei dati che verranno accumulati nel corso degli anni) vale a dire un aumento numerico della "allelic frequency" per una determinata mutazione (ad esempio passaggio di una mutazione del gene APC da allelic frequency 0.1% a 5% in una successiva ripetizione del test), il

sistema di monitoraggio incrementa la sensibilità relativa al pannello in esame (i.e. richiederà che il paziente effettui nuovamente il test questa volta però con l'utilizzo di un pannello diverso che ha una sensibilità e specificità analitica superiore al test di primo livello) per quel che riguarda i geni coinvolti nell'incremento delle mutazioni, fino al 100%.

Ad esempio, utilizzando i pannelli e la tecnologia "Oncomine cfDNA", si raggiungono livelli di detezione estremamente bassi, pari allo 0.05%. Questo significa che il sistema, basato su una chimica particolare ("Oncomine TagSequencing") diversa da quella dello screening di primo livello, è in grado di identificare una mutazione presente appena nello 0.05% del campione di DNA analizzato.

Il metodo prevede un continuo aggiornamento dei parametri di valutazione, quali la frequenza di ripetizione dei cicli di analisi del pannello di geni prescelto e la sensibilità relativa ai geni oggetto dell'analisi. In particolare, la frequenza di ripetizione è definita in funzione dell'indice di instabilità (I_T oppure I_G , a seconda che si stia analizzando un pannello costituito da diversi geni, oppure un gene singolo); più precisamente, a valori bassi dell'indice di instabilità corrisponde una frequenza base di ripetizione dei test, che può essere ad esempio di un test/anno. Un incremento anche modesto del valore di tale indice può suggerire l'aumento di tale frequenza di ripetizione, in quanto si ritiene che una situazione di instabilità tenda naturalmente a crescere, e comporti una probabilità maggiore di avere nuove mutazioni significative in tempi più brevi. Il superamento di uno specifico valore di soglia I_T, I_G dell'indice di instabilità I_T, I_G è identificativo di un'evoluzione della sequenza di mutazioni in una condizione genetica prodromica all'insorgenza del tumore o del gruppo di tumori oggetto del monitoraggio, vale a dire in un percorso che porterà, certamente o con buona probabilità, il soggetto a sviluppare il suddetto tumore, o comunque almeno uno dei tumori monitorati. Secondo l'invenzione, l'aumento progressivo della frequenza di ripetizione dei test consente quindi di monitorare al meglio la situazione del soggetto, e di capire quando potranno avvenire le specifiche

mutazioni indicative di un'oncogenesi in atto.

Secondo l'invenzione, tutti i dati grezzi e i risultati ottenuti, relativi al DNA analizzato per ciascun ciclo di valutazione, vengono registrati, e rielaborati nel corso dei cicli successivi per migliorare l'accuratezza delle valutazioni all'aumentare del numero di dati disponibili.

Il metodo secondo l'invenzione prevede inoltre, quale attività accessoria e complementare a quella di valutazione della stabilità genetica, e di identificazione della fase prodromica dell'oncogenesi, la ricerca della presenza, nella biopsia liquida prelevata, di ctDNA ("*circulating tumor DNA* – DNA tumorale circolante"). Tale operazione può essere effettuata solo nel caso in cui l'indice di instabilità calcolato superi il valore di soglia ITS,IGS prestabilito, come indicato in figura 1, oppure anche per valori dell'indice di instabilità sotto tale soglia, a scopo precauzionale.

Nel caso in cui venga rilevata la presenza di ctDNA, il metodo di valutazione della stabilità genetica, e di identificazione della fase prodromica dell'oncogenesi sostanzialmente conclude la propria funzione, in quanto ciò significa che almeno una delle linee di mutazione ha dato luogo alla formazione di cellule neoplastiche. A questo punto il sistema di valutazione della condizione genetica emette un'informazione atta a trasferire il controllo del soggetto a un sistema di riconoscimento precoce ("*Early Detection*"), quale ad esempio il sistema "*SCED – Solid Cancer Early Detection*" sviluppato e utilizzato dalla medesima Richiedente.

Nel seguito, a titolo esemplificativo, verranno descritte alcune applicazioni mirate alla valutazione valutazione della stabilità genetica, e di identificazione della fase prodromica dell'oncogenesi relative a singoli tumori solidi o famiglie di tumori solidi, e in particolare a tumori a carico del polmone, del seno e dell'ovaio, e del colon-retto.

Esempio 1: Tumori del polmone

In una forma di realizzazione dell'invenzione, il metodo per la valutazione della stabilità genetica, e di identificazione della fase prodromica dell'oncogenesi è applicato al monitoraggio della condizione genetica associata all'insorgenza di tumori del polmone.

La più grave minaccia per l'insorgenza di un tumore a carico del polmone è data dal fumo di sigaretta. Una chiara corrispondenza fra dose di fumo inalata dal fumatore e aumento della probabilità di contrarre tale tumore è stata ampiamente dimostrata ed è ormai considerata un dato di fatto.

Diversi studi riportano che il rischio di contrarre un tumore del polmone è 14 volte maggiore fra i fumatori rispetto ai non fumatori (fino a 20 volte per grandi fumatori – oltre 20 sigarette/giorno). Il fumo di sigaretta è responsabile per 8/9 tumori del polmone ogni 10, per quanto l'inquinamento atmosferico, predisposizione familiare per questo tipo di tumore e la presenza di altre patologie polmonari possano incrementare la probabilità di contrarre un tumore.

Sulla base della quantificazione del proprio, personale rischio che specifiche mutazioni di predeterminati geni connessi ai tumori del polmone, e che il numero e la frequenza di tali mutazioni possano in futuro portare alla generazione di cellule tumorali, al soggetto che si sottopone al monitoraggio viene offerta la possibilità di conoscere con buona approssimazione se si è in presenza di una fase evolutiva, e qual è lo stadio di evoluzione raggiunto.

Secondo il presente metodo, la definizione dello stato di rischio è in questo caso connessa alla mutazione di 11 geni direttamente coinvolti nei tumori del polmone, con particolare riguardo a 169 diversi *hotspot*. La tabella 1 fornisce un elenco dei geni e di alcuni degli hotspot che costituiscono il pannello sui quali vengono effettuate le valutazioni.

Tabella 1

ALK	MET	EGFR: T790M, L858R, Exon19 del, C797S KRAS: G12X, G13X, Q61X ALK: 1151 Tins, L1152R, C1156Y BRAF: V600E
BRAF	NRAS	
EGFR	PIK3CA	
ERBB2	ROS1	
KRAS	TP53	
MAP2K1		

Esempio 2: Tumori del seno e delle ovaie

Il test di valutazione della stabilità genetica, e di identificazione della fase prodromica dell'oncogenesi che attua il metodo secondo l'invenzione è applicato in modo particolarmente mirato a donne che si sottopongono, o si sono sottoposte in passato, a terapie ormonali sostitutive, contraccezione o a programmi stimolazione ovarica.

Può essere inoltre vantaggiosamente utilizzato in altri specifici casi di monitoraggio e prevenzione, ad esempio quale programma di prevenzione per donne che possiedono ereditariamente la mutazione BRCA 1|2, e presentano un elevato rischio di sviluppare il tumore nell'utero o nelle ovaie.

Il pannello di geni e di mutazioni utilizzato in questo caso comprende (vedasi tabella 2) 10 geni e 159 hotspot, alcuni dei quali elencati in tabella.

Tabella 2

AKT1	FBXW7	PIK3CA: E545K e H1047R AKT1: E17K ESR1: Mutazioni associate a resistenza anti-estrogeni TP53: Mutazioni associate a perdita funzionale ERBB2: Mutazioni associate a terapie anti-ERBB2
EGFR	KRAS	
ERBB2	PIK3CA	
ERBB3	SF3B1	
ESR1	TP53	

Esempio 3: Tumori del colon e del retto

La valutazione della stabilità genetica, e di identificazione della fase prodromica dell'oncogenesi relativa alla classe di tumori del colon e del retto prevede l'analisi periodica di 14 geni e 246 *hotspot*, come dalla Tabella 3, nella quale sono elencati tutti i geni attualmente coinvolti e alcuni degli hotspot.

Le neoplasie a carico del sistema colon-retto sono spesso una conseguenza dell'evoluzione di una lesione benigna, quale un polipo adenomatoso, nella membrana mucosa intestinale.

La formazione di neoplasie può essere favorita da alcuni fattori di rischio, quali l'obesità, oppure una dieta regolarmente ricca di calorie e grassi e povera di fibre, oppure da fattori genetici, ad esempio una familiarità con la patologia. L'età, patologie infiammatorie intestinali croniche e una storia clinica di polipi possono anch'essi contribuire ad aumentare la probabilità di insorgenza del tumore.

Il tempo di evoluzione dalla neoformazione benigna a una maligna è molto spesso lungo (da 7 a 15 anni), e tale evoluzione può essere vantaggiosamente seguita con l'applicazione dei test periodici e della conseguente valutazione dello stato di rischio offerta dal metodo secondo l'invenzione.

Tabella 3

AKT1	KRAS
BRAF	MAP2K1
CTNNB1	NRAS
EGFR	PIK3CA
ERBB2	SMAD4
FBXW7	TP53
GNAS	APC

KRAS/NRAS:	G12/G13/Q61
BRAF:	V600E
PIK3CA:	E545K, H1047R
TP53:	R175H R273H/C/L
Mutazioni APC ricorrenti deleterie (comprendenti p.R876*, p.Q1378*, e d p.R1450*)	
SMAD:	R361C/H
CTNNB1:	S45F, T41A

Si intende che quanto sopra è stato descritto a titolo puramente esemplificativo e non limitativo. Pertanto, possibili modifiche e varianti dell'invenzione si considerano rientranti nell'ambito protettivo accordato al presente metodo, così come sopra descritto e nel seguito rivendicato.

Riferimenti

- **Cancer Genome Landscapes Science.** 2013 Mar 29; 339(6127): 1546–1558.. Bert Vogelstein, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz, Jr., and Kenneth W. Kinzler*
- **Hereditary Cancer Risk Assessment: New Perspectives and Challenges for the Next-Gen Sequencing Era.** Front Oncol. 2016; 6: 133. Israel Gomy
- **Principles in genetic risk assessment** Ther Clin Risk Manag. 2005 Mar; 1(1): 15–20. Pedro Viana Baptista
- **Predictive genomics: A cancer hallmark network framework for predicting tumor clinical phenotypes using genome sequencing data.** Wang E. et al.
- **Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l' homme [The nucleic acids in blood plasma in humans].** C R Seances Soc Biol Fil. 1948;142(3–4):241–243.
- **Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients.** Oncology. 1989;46(5):318–322
- **Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, Anagnostou V, Parpart-Li S, Murphy D, Kay Li Q, Hruban CA, Scharpf R, White JR, O'Dwyer PJ, Allen PJ, Eshleman JR, Thompson CB, Klimstra DS, Linehan DC, Maitra A, Hruban RH, Diaz LA Jr, Von Hoff DD, Johansen JS, Drebin JA, Velculescu VE. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. Nat Commun. 2015 Jul 7;6:7686. doi: 10.1038/ncomms8686.**
- **Hao TB, Shi W, Shen XJ, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer.** Br J Cancer. 2014;111(8):1482–1489.
- **Zonta E, Nizard P, Taly V. Assessment of DNA integrity, applications for cancer research.** Adv Clin Chem. 2015;70:197–246

- **Chen, C.W. and Thomas, C.A. Jr. (1980) Recovery of DNA segments from agarose gels.** *Anal. Biochem.* 101, 339–41.
- **Marko, M.A. et al. (1982) A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder.** *Anal. Biochem.* 121, 382–7.
- **Boom, R. et al. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- **Melzak, K.A. et al. (1996) Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions.** *J. Colloid Interface Sci. (USA)* 181, 635–44.

Jones S, Anagnostou V, Lytle K, Parpart-Li S, Nesselbush M, Riley DR, Shukla M, Chesnick B, Kadan M, Papp E *et al*: **Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation.** *Science translational medicine* 2015, 7(283):283ra253.

Ng CK, Piscuoglio S, Geyer FC, Burke KA, Pareja F, Eberle C, Lim R, Natrajan R, Riaz N, Mariani O *et al*: **The Landscape of Somatic Genetic Alterations in Metaplastic Breast Carcinomas.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017.

Gagan J, Van Allen EM: **Next-generation sequencing to guide cancer therapy.** *Genome medicine* 2015, 7(1):80.

Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA *et al*: **A global reference for human genetic variation.** *Nature* 2015, 526(7571):68-74.

Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho JS: **Genetic interactions in cancer progression and treatment.** *Cell* 2011, 145(1):30-38.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E *et al*: **Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.** *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2015, 17(5):405-424.

7.De Mattos-Arruda L, Caldas C: **Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer**. *Molecular oncology* 2016, **10**(3):464-474.

8.Diaz LA, Jr., Bardelli A: **Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA**. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014, **32**(6):579-586.

9.Pantel K, Diaz LA, Jr., Polyak K: **Tracking tumor resistance using 'liquid biopsies'**. *Nature medicine* 2013, **19**(6):676-677.

10.Garraway LA, Verweij J, Ballman KV: **Precision oncology: an overview**. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013, **31**(15):1803-1805.

11.Yohe SL, Carter AB, Pfeifer JD, Crawford JM, Cushman-Vokoun A, Caughron S, Leonard DG: **Standards for Clinical Grade Genomic Databases**. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2015, **139**(11):1400-1412.

12.Aaboud M, Aad G, Abbott B, Abdallah J, Abdinov O, Abeloos B, Aben R, AbouZeid OS, Abraham NL, Abramowicz H *et al*: **Search for triboson [Formula: see text] production in pp collisions at [Formula: see text] [Formula: see text] with the ATLAS detector**. *The European physical journal C, Particles and fields* 2017, **77**(3):141.

13.Dacheva D, Dodova R, Popov I, Goranova T, Mitkova A, Mitev V, Kaneva R: **Validation of an NGS Approach for Diagnostic BRCA1/BRCA2 Mutation Testing**. *Molecular diagnosis & therapy* 2015, **19**(2):119-130.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM *et al*: **Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies**. *Science translational medicine* 2014, **6**(224):224ra224.

•

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la ricerca e l'identificazione di una condizione genetica prodromica all'insorgenza di tumori solidi in un soggetto sano, caratterizzato dal fatto di comprendere un ciclo di valutazione di una condizione di stabilità o instabilità genetica e almeno un ciclo di ripetizione di detta valutazione, detti cicli di ripetizione essendo effettuati periodicamente sul soggetto, ciascun ciclo comprendente le fasi di:
 - prelevare un campione di materiale biologico del soggetto, isolare il DNA dal materiale biologico, amplificare e sequenziare il DNA isolato;
 - verificare la presenza di mutazioni selezionate in un insieme predefinito di geni del campione in esame, detto insieme di geni e dette mutazioni essendo connessi all'insorgenza di tumori solidi;
 - l'insieme predefinito di geni comprendendo un sottoinsieme del pannello di geni od *hotspot* connessi ad uno o più tumori solidi, oppure l'intero pannello di geni connessi ai tumori solidi;
 - per ciascun ciclo di valutazione, verificare la frequenza delle mutazioni rilevate per ciascun gene, le mutazioni essendo scelte fra le sopra citate mutazioni selezionate;
 - registrare le mutazioni rilevate per ciascun gene o gruppo di geni e la loro frequenza;
 - per ciascun ciclo di ripetizione, definire o aggiornare un indice di instabilità genetica, complessivo (I_T) oppure per singolo gene (I_G), del soggetto, sulla base della frequenza delle mutazioni rilevata e sulla base dell'incremento di detta frequenza di mutazioni;
 - per ciascun ciclo di ripetizione, valutare l'ingresso del soggetto in una condizione genetica prodromica all'insorgenza di uno o più tumori solidi o gruppi di tumori solidi sulla base di del superamento di un valore di soglia (I_{TS}, I_{GS}) di detto indice di instabilità genetica (I_T, I_G) definito per ogni singolo gene o gruppo di geni.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto indice di instabilità genetica (I_T, I_G) viene definito anche sulla base dell'incremento di detta

- frequenza di mutazioni rispetto a uno o più cicli di valutazione precedenti.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto indice di instabilità genetica complessivo (I_T) viene definito quale sommatoria, estesa all'intero gruppo di geni monitorato, dei rapporti fra un valore (ΔF_k) responsivo dell'incremento delle mutazioni monitorate per ciascun gene e il numero di geni oggetto di valutazione.
 4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto indice di instabilità genetica per singolo gene (I_G) viene definito quale sommatoria, estesa all'intero gruppo di hotspot monitorato per il citato gene, dei rapporti fra un valore (ΔF_j) responsivo dell'incremento delle mutazioni monitorate per ciascun hotspot e il numero di hotspot oggetto della valutazione.
 5. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il campione biologico è costituito da una biopsia liquida, e la fase di verifica della presenza di mutazioni in detto insieme predefinito di geni viene effettuata su un campione di DNA isolato da detta biopsia liquida, e successivamente amplificato e sequenziato.
 6. Metodo secondo la rivendicazione 5, in cui la biopsia liquida è costituita da sangue periferico.
 7. Metodo secondo la rivendicazione 5, in cui la biopsia liquida è costituita da urina.
 8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 7, in cui, in detto campione di DNA analizzato viene ricercata una frazione di cfDNA, e in cui detta verifica della presenza di mutazioni viene effettuata su detta frazione di cfDNA.
 9. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 7, in cui in detto campione di DNA analizzato viene inoltre ricercato ctDNA isolato da detta biopsia liquida.
 10. Metodo secondo la rivendicazione 9 in cui, a seguito dell'identificazione di ctDNA circolante, viene emessa un'informazione di indirizzamento verso un sistema di rivelazione precoce ("*Early Detection*").
 11. Metodo secondo la rivendicazione 9 in cui, a seguito dell'identificazione di

ctDNA in detto campione di DNA analizzato, in detta biopsia liquida viene ricercata la presenza di CTC (“*Circulating Tumor Cells* – Cellule Tumoralì Circolanti”)

12. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il set predefinito di geni e le mutazioni selezionate sono definiti in considerazione dell'anamnesi del soggetto.
13. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il set predefinito di geni e le mutazioni selezionate sono definiti in considerazione della loro connessione a particolari tipi di tumore.
14. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui, dopo ciascun ciclo di ripetizione, viene ricalcolato il periodo di ripetizione, in funzione del valore del citato indice di instabilità ($I_{T,G}$) calcolato nel ciclo attuale e il valore dello stesso calcolato in uno o più cicli precedenti.
15. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui, in ciascun ciclo di ripetizione, a seguito di un incremento nel valore calcolato per il citato indice di instabilità ($I_{T,G}$) rispetto al valore del medesimo indice ($I_{T,G}$) calcolato in uno o più cicli precedenti, viene impostata una maggiore sensibilità di analisi relativa al gene o al pannello di geni monitorato.

Bologna, 26/04/2017

Il Mandatario

Ing. Giammario Ruzzu

(Albo Prot. N. 956BM)

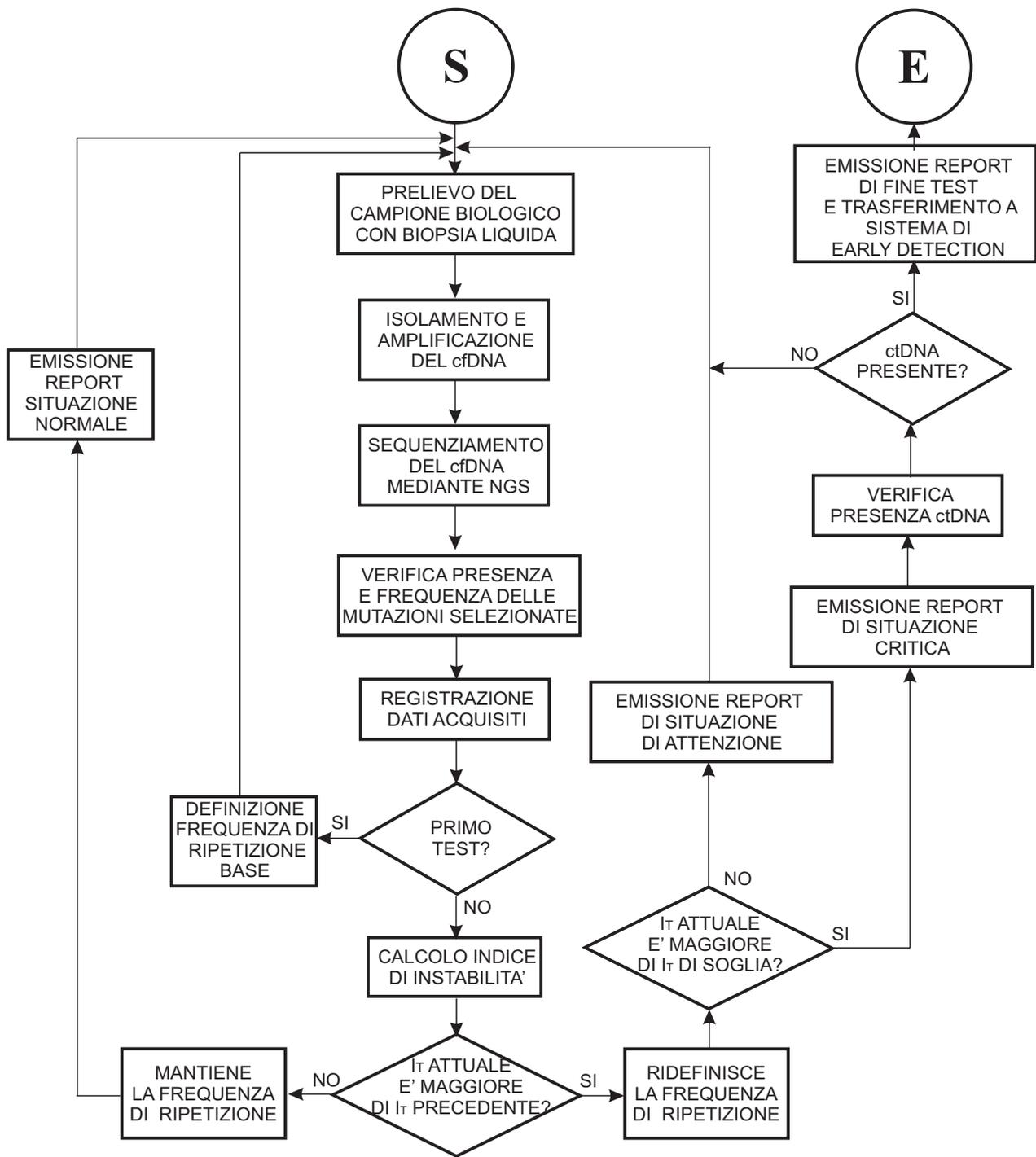


Fig. 1

ABL1	AKT1	ALK	APC	ATM	BRAF	CDH1	CDKN2A	CSF1R	CTNNB1
EGFR	ERBB2	ERBB4	EZH2	FBXW7	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FLT3	GNA11
GNAS	GNAQ	HNF1A	HRAS	IDH1	JAK2	JAK3	IDH2	KDR	KIT
KRAS	MET	MLH1	MPL	NOTCH1	NPM1	NRAS	PDGFRA	PIK3CA	PTEN
PTPN11	RB1	RET	SMAD4	SMARCB1	SMO	SRC	STK11	TP53	VHL

Fig. 2

CLAIMS

1. A method for searching and identifying a prodromal genetic condition at the onset of solid tumors in a healthy subject, characterized by including an evaluation cycle for evaluating a condition of stability or genetic instability and at least a repetition cycle of such evaluation, said repetition cycles being periodically performed on the subject, with each cycle comprising the steps of:
 - taking a sample of biological material of the subject, isolating a DNA from the biological material, amplifying and sequencing the isolated DNA;
 - verifying the presence of selected mutations in a predetermined set of genes of the sample under consideration, said set of genes and said mutations being associated with the onset of solid tumors;
 - the predetermined set of genes including either a subset of the panel of genes or *hotspots* connected to one or more solid tumors, or the entire panel of genes connected to solid tumors;
 - verifying the frequency of mutations detected for each gene and for each evaluation cycle, these mutations being selected from the aforementioned selected mutations;
 - recording the mutations detected for each gene or group of genes and their frequency;
 - defining or updating a genetic instability index of the subject, either an overall genetic instability index (I_T) or a single gene genetic instability index (I_G), for each repetition cycle, based on the frequency of mutations detected and on the basis of the increase in the frequency of mutations;
 - evaluating, in each repetition cycle, the subject's entry into a prodromal genetic condition upon the onset of one or more solid tumors or groups of solid tumors on the basis of a threshold value (I_{TS}, I_{GS}) of said genetic instability index (I_T, I_G), defined for each single gene or group of genes, being exceeded.
2. The method of claim 1, wherein said genetic instability index (I_T, I_G) is also

defined on the basis of the increase in the frequency of mutations with respect to one or more previous evaluation cycles.

3. The method of claim 1, wherein said overall genetic instability index (I_T) is defined as the summation of the relationships between a value (ΔF_k) responsive to the increase in the observed mutations for each gene and the number of genes evaluated, considering the whole group of monitored genes.
4. The method of claim 1, wherein said index of genetic instability for single gene (I_G) is defined as the summation of the relationships between a value (ΔF_j) responsive to the increase in the observed mutations for each *hotspot* and the number of hotspots evaluated, considering the whole group of monitored hotspots.
5. The method of claim 1, wherein the biological sample consists of a liquid biopsy, and the phase of verification of the presence of mutations in the predetermined gene set is performed on a DNA sample isolated from said liquid biopsy and subsequently amplified and sequenced.
6. The method of claim 5, wherein the liquid biopsy is made up of peripheral blood.
7. The method of claim 5, wherein the liquid biopsy is urine.
8. A method according to one of the claims 5 to 7, wherein a fraction of cfDNA is sought in the DNA sample being analyzed and wherein the presence of mutations is verified in said cfDNA fraction.
9. A method according to one of the claims 5 to 7, wherein the ctDNA isolated from the liquid biopsy is also sought in the DNA sample being analyzed.
10. A method according to claim 9, wherein following the identification of circulating ctDNA, an address information is sent to an early detection system ("*Early Detection*").
11. A method according to claim 9, wherein following the identification of ctDNA in said DNA sample being analyzed, the presence of CTC ("*Circulating Tumor Cells*") is sought in said liquid biopsy.
12. The method of claim 1, wherein the predetermined set of genes and

- selected mutations are defined in view of the subject's anamnesis.
13. The method of claim 1, wherein the predetermined set of genes and selected mutations are defined in view of their connection to particular types of tumor.
 14. A method according to claim 1, wherein the repetition period is recalculated after each repetition cycle according to the value of the said instability index (I_T, I_G) calculated in the current cycle and the value of the same as calculated in one or more previous cycles.
 15. A method according to claim 1, wherein a greater analysis sensitivity related to the monitored gene or genetic panel is set in each repetition cycle, following an increase in the calculated value for said instability index (I_T, I_G) with respect to the value of the same index (I_T, I_G) calculated in one or more previous cycles.