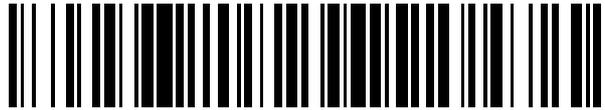


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 500**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2010 E 10784236 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2438197**

54 Título: **Métodos de detección del cáncer**

30 Prioridad:

05.06.2009 US 184685 P

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

01.09.2015

73 Titular/es:

MYRIAD GENETICS, INC. (100.0%)

320 Wakara Way

Salt Lake City, UT 84108, US

72 Inventor/es:

GUTIN, ALEXANDER;

LANCHBURY, JERRY;

WAGNER, SUSANNE y

ABKEVICH, VICTOR

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 544 500 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de detección del cáncer

REMISIÓN A SOLICITUDES AFINES.

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. de Serie 61/184685 (presentada el 5 de junio de 2009).

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere en general a una clasificación molecular de enfermedades, y particularmente a marcadores moleculares para el cáncer y métodos de uso de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 El cáncer es un riesgo fundamental para la salud. Aproximadamente 560.000 personas mueren de cáncer anualmente solo en los Estados Unidos, representando casi el 23% de todos los fallecimientos. A pesar de avances recientes en los diagnósticos moleculares y de imagen, uno de los aspectos más preocupantes del cáncer sigue siendo la detección precoz. De hecho, para ciertos tipos de cáncer - v.g., el adenocarcinoma de páncreas - la detección ocurre a menudo tan tarde que impide prácticamente cualquier pronóstico favorable. Por tanto, existe una
15 necesidad urgente de métodos sensibles para la detección del cáncer.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Las mutaciones en ciertos genes están asociadas con el cáncer en general y con tipos de cáncer específicos. Por ejemplo, mutaciones desactivadoras en el gen *TP53* se encuentran en aproximadamente 50% de todos los tumores sólidos y mutaciones activadoras en los genes *KRAS* o *BRAF* se encuentran a menudo en el cáncer colorrectal. Se
20 ha descubierto que el cribado de pacientes en cuanto a mutaciones en ciertos genes puede detectar y clasificar el cáncer. Más específicamente, se ha determinado que (a) el cribado de ciertos genes (v.g., *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53*) respecto a mutaciones detectará aproximadamente el 95% de todos los cánceres, mientras que (b) el cribado de ciertos genes (v.g., *AIM1*, *APC*, *CDKN2A*, *EGFR*, *FBN2*, *FBXW7*, *FLJ13479*, *IDH1*, *KRAS*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN*, *RB1*, *SMAD4*, *TGFBR2*, *TNN*, y *TP53*) respecto a mutaciones puede clasificar con exactitud el
25 cáncer (v.g., como cáncer de mama, cáncer de colon, glioblastoma, cáncer de páncreas, etc.).

Así pues, la invención proporciona generalmente métodos que comprenden analizar paneles de genes de una muestra obtenida de un paciente (v.g. mRNA o cDNA sintetizado a partir del mismo) y determinar el estatus mutacional de los genes en el panel, en los cuales la presencia de un estatus mutacional particular en genes particulares en el panel indica (a) que el paciente tiene cáncer y/o (b) que el paciente padece un cáncer particular.

30 Un aspecto de la invención proporciona un método de detección de mutaciones que comprende: (1) analizar en una muestra de fluido corporal de un sujeto humano un panel de genes que comprende entre 5 y 5.000 genes, en donde dicho panel comprende al menos 5 genes seleccionados del grupo constituido por los genes enumerados en la Tabla 1; y (2) determinar si cualquiera de los genes de la Tabla 1 alberga una mutación.

35 El panel comprende los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53*. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 2. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 1.

40 Un aspecto de la invención proporciona un método de detección de cáncer que comprende: (1) analizar un panel de genes que comprende los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53* en una muestra de fluido corporal; y (2) determinar si cualquiera de los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* o *TP53* alberga una mutación; en donde dicha mutación indica la presencia de cáncer.

En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 2. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la mutación se selecciona del grupo constituido por las enumeradas en la Tabla 7 y/o Tabla 8.

45 Un aspecto de la invención proporciona un método de determinación de la probabilidad de que un paciente padezca un cáncer c_1 que comprende: (1) analizar en una muestra fluida un panel de genes que comprende los genes enumerados en la Tabla 3; (2) detectar una mutación en al menos uno de dichos genes enumerados en la Tabla 3; y (3) calcular una probabilidad de que dicho paciente padezca un cáncer c_1 utilizando la fórmula: $P(c_1 | g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_1) \prod_i M(g_i | c_1) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i | t)$; en donde el producto se toma para todos los genes en dicho panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), tomándose la suma para todos los tipos de cáncer t , $M(g | c_1)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c_1 , y $P_0(c_1)$ es la probabilidad *a priori* de cáncer c_1 dado que el paciente
50 padece un cáncer.

En algunas realizaciones, dicho método comprende adicionalmente calcular una probabilidad de que dicho paciente tenga un segundo cáncer c_2 utilizando la fórmula: $P(c_2 | g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_2) \prod_i M(g_i | c_2) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i | t)$; en donde el producto se toma para todos los genes en dicho panel mutados en la muestra ($i: 1, 2, \dots, n$), tomándose la suma para todos los tipos de cáncer t , $M(g|c_2)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c_2 , y $P_0(c_2)$ es la probabilidad *a priori* del tipo de cáncer c_2 dado que el paciente padece un cáncer.

Algunas realizaciones comprenden adicionalmente recomendación, prescripción, ordenamiento, o realización de un test respecto a la presencia del cáncer c_1 en dicho paciente. En algunas realizaciones, el test respecto a la presencia del cáncer c_1 se recomienda, prescribe, ordena, o realiza si la probabilidad calculada de que dicho paciente tenga dicho cáncer c_1 es superior a un valor umbral (v.g., 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100%).

En algunas realizaciones, el test respecto a la presencia del cáncer c_1 se recomienda, prescribe, ordena o realiza si la probabilidad calculada de que dicho paciente tenga dicho cáncer c_1 es mayor que la probabilidad calculada de que dicho paciente padezca un cáncer c_2 . En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente recomendar, prescribir, ordenar, o realizar un test respecto a la presencia de cáncer c_2 en dicho paciente si dicho test respecto a la presencia de cáncer c_1 no indica la presencia de cáncer c_1 .

En diversas realizaciones de la invención, dicha muestra de fluido corporal es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, la muestra de sangre es una muestra de plasma. En algunas realizaciones, la muestra de sangre es una muestra de suero.

En algunas realizaciones, la detección de una mutación o determinación de si un gen alberga una mutación comprende analizar una molécula de mRNA a partir de una muestra o analizar una molécula de DNA sintetizada utilizando la molécula de mRNA como molde. En algunas realizaciones, la detección de una mutación o determinación de si un gen alberga una mutación comprende analizar un ácido nucleico de una muestra por una técnica seleccionada de resecuenciación, TaqMan™, análisis de microrredes, y FISH.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos a analizar se derivan de una vesícula extracelular. En algunas realizaciones, dicha vesícula extracelular es un exosoma.

Un aspecto de la invención proporciona un kit que comprende reactivos para analizar un panel de genes constituido por entre 5 y 5.000 genes, comprendiendo dicho kit reactivos para detección de mutaciones en al menos 5 genes seleccionados del grupo constituido por los genes enumerados en la Tabla 1. El kit comprende reactivos para detección de mutaciones en los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53*.E3. En algunas realizaciones, el kit comprende reactivos para detección de mutaciones en los genes enumerados en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el kit comprende reactivos para detección de mutaciones en los genes enumerados en la Tabla 2. En algunas realizaciones, el kit comprende reactivos para detección de mutaciones en los genes enumerados en la Tabla 1.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria en la práctica o ensayos de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, con inclusión de las definiciones. Adicionalmente, los materiales, métodos, y ejemplos son únicamente ilustrativos y no deben entenderse como limitantes.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 ilustra la sensibilidad de un panel de 5 genes para detección del cáncer.

FIG. 2 ilustra una realización de la invención que utiliza diversos biomarcadores para determinar qué cáncer específico está presente en un paciente.

FIG. 3 ilustra ejemplos de frecuencias de mutación en diversos cánceres.

FIG. 4 ilustra ejemplos de tasas de cáncer basados en el sitio y género de cáncer.

FIG. 5 muestra la detección de mutaciones en exosomas de muestras de suero con cáncer.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las mutaciones de ciertos genes están asociadas con el cáncer en general y con tipos de cáncer específicos. Por ejemplo, mutaciones desactivadoras en el gen *TP53* se encuentran en aproximadamente 50% de todos los tumores sólidos y mutaciones activadoras en los genes *KRAS* o *BRAF* se encuentran a menudo en el cáncer colorrectal.

La invención está basada en parte en el descubrimiento de que el análisis de muestras de pacientes respecto a mutaciones en un número relativamente pequeño de genes puede (a) detectar la gran mayoría de cánceres y (b) especificar en qué tejido está localizado el cáncer. De modo más específico, se ha determinado que (a) el cribado de ciertos genes (v.g., los genes enumerados en la Tabla 4 siguiente) respecto a mutaciones detectará cáncer (v.g., aproximadamente el 95% de todos los cánceres), mientras que (b) el cribado de ciertos genes (v.g., los genes enumerados en las Tablas 2 y 3 siguientes) respecto a mutaciones puede clasificar exactamente el cáncer (v.g., cáncer de mama, cáncer de colon, glioblastoma, cáncer de páncreas, etc.).

Así pues, la invención proporciona un método de detección de mutaciones que comprende (1) analizar un panel de genes constituido por entre 5 y 5.000 genes en una muestra de fluido corporal de un individuo humano, en donde dicho panel comprende al menos 5 genes seleccionados del grupo constituido por los genes enumerados en la Tabla 1; y (2) determinar si al menos uno de dichos 5 genes alberga una mutación.

En algunas realizaciones, el panel está constituido por entre 5 y 4.500, entre 5 y 4.000, entre 5 y 3.500, entre 5 y 3.000, entre 5 y 2.500, entre 5 y 2.000, entre 5 y 1.500, entre 5 y 1.000, entre 5 y 500, entre 5 y 400, entre 5 y 300, entre 5 y 200, entre 5 y 150, entre 5 y 100, entre 5 y 75, o entre 5 y 50 genes. En algunas realizaciones, los genes seleccionados de la Tabla 1 comprenden al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% del panel.

Se ha descubierto que el cribado de muestras de pacientes respecto a mutaciones en los genes enumerados en la Tabla 1 siguiente detectará la gran mayoría de los cánceres. En el Ejemplo 2, por ejemplo, se demuestra que el cribado respecto a mutaciones en los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53* detecta aproximadamente el 95% de los cánceres (FIG. 1). El análisis de los genes restantes en la Tabla 1 detectará muchos de los cánceres restantes. Así pues, un aspecto de la invención proporciona un método de detección de cáncer que comprende: (1) analizar un panel de genes de una muestra de fluido corporal de un individuo humano, en donde dicho panel comprende al menos 5 genes seleccionados del grupo constituido por los genes enumerados en la Tabla 1; y (2) determinar si al menos uno de dichos 5 genes alberga una mutación; en donde dicha mutación indica la presencia de cáncer. En algunas realizaciones, la mutación se selecciona de las enumeradas en la Tabla 7 y/o la Tabla 8.

En algunas realizaciones de este aspecto, el panel está constituido por entre 5 y 4.500, entre 5 y 4000, entre 5 y 3.500, entre 5 y 3.000, entre 5 y 2.500, entre 5 y 2.000, entre 5 y 1.500, entre 5 y 1.000, entre 5 y 500, entre 5 y 400, entre 5 y 300, entre 5 y 200, entre 5 y 150, entre 5 y 100, entre 5 y 75, o entre 5 y 50 genes. En algunas realizaciones, los genes seleccionados de la Tabla 1 comprenden al menos 5 %, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35 %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65 %, 70%, 75 %, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% del panel.

Adicionalmente, se ha descubierto que es posible detectar un cáncer particular *c* en un paciente por cribado respecto a mutaciones somáticas en *n* genes g_1, g_2, \dots, g_n en la muestra y a petición de la ecuación siguiente:

$$P(c|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c) \prod_i M(g_i|c) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t) \quad (1)$$

donde el producto se toma para todos los genes mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$) y la suma se toma para todos los tipos de cáncer *t*. Véase el Ejemplo 1 más adelante. $M(g/c)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen *g* en el tipo de cáncer *c*. Véase, v.g., FIG. 3. $P_0(c)$ es la probabilidad *a priori* del tipo de cáncer *c* dado que el paciente padece un cáncer. Véase FIG. 4.

Obsérvese que los valores de referencia expuestos en esta memoria (v.g., la frecuencia de mutaciones en cualquier gen particular en cualquier tipo de cáncer particular y la probabilidad de un tipo de cáncer particular dado que el paciente padece un cáncer) pueden adaptarse para ajustarse a las necesidades del técnico experto. Por ejemplo, las frecuencias de mutación y la prevalencia relativa de tipos de cáncer particulares pueden variar entre, v.g., poblaciones étnicas, países, regiones, etc. Las FIGs. 3 y 4 representan por tanto ejemplos no limitantes del modo en que tales valores pueden obtenerse y utilizarse en los métodos de la invención.

Así, un aspecto de la invención proporciona un método de determinación de la probabilidad de que un paciente padezca un cáncer c_1 particular que comprende:

(1) analizar un panel de genes en una muestra de fluido corporal de un individuo humano, en donde dicho panel comprende los genes enumerados en la Tabla 3;

(2) determinar si los genes enumerados en la Tabla 3 albergan una mutación;

(3) calcular una probabilidad de que dicho paciente padezca un cáncer c_1 utilizando la fórmula $P(c_1|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_1) \prod_i M(g_i|c_1) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t)$; en donde el producto se toma para todos los genes en dicho panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), y la suma se toma para todos los tipos de cáncer *t*, $M(g/c_1)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen *g* en el tipo de cáncer c_1 , y $P_0(c_1)$ es la probabilidad *a priori* del cáncer c_1 dado que el paciente padece un cáncer.

Como se utiliza en esta memoria, la "probabilidad *a priori* del cáncer *c* dado que el paciente padece un cáncer" se refiere a la incidencia general del cáncer particular *c* en la población relevante de pacientes de cáncer (v.g., varones

o mujeres). Dicho de otro modo, ésta es la proporción relativa de todos los cánceres en la población relevante representada por el cáncer particular c . Tales incidencias pueden recopilarse de diversas fuentes - v.g., los informes anuales de la American Cancer Society acerca de incidencia de cáncer (como en el Ejemplo 1, más adelante), que proporcionan a menudo desgloses detallados de la incidencia de cánceres específicos en subpoblaciones relevantes de pacientes tales como varones frente a mujeres, raza o etnicidad, etc.

En algunas realizaciones, se llega a la conclusión de que el paciente padece un cáncer particular c_i únicamente si la probabilidad calculada de que dicho paciente tenga dicho cáncer c_i es superior a un valor umbral. Este valor umbral puede seleccionarse arbitrariamente (v.g., una probabilidad de 95% es bastante satisfactoria) o determinarse empíricamente (v.g., los pacientes con una probabilidad calculada superior al 80% han terminado con el cáncer particular con frecuencia suficiente para validar esto como un umbral satisfactorio). En algunas realizaciones, dicho valor umbral se selecciona del grupo constituido por 35%, 40 %, 45 %, 5 0%, 55%, 60%, 6 5 %, 70%, 75 %, 80%, 85 %, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, y 99%.

Dado que algunos órganos pueden desarrollar cánceres de diferentes tipos (tales como adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas en el pulmón), es posible calcular la probabilidad $P(o)$ de que el cáncer se haya desarrollado en el órgano o :

$$P(o|g_1, g_2, \dots, g_n) = \sum_c P(c|g_1, g_2, \dots, g_n) \quad (2)$$

donde la suma se toma para todos los tipos de cáncer c del órgano o . Utilizando la ecuación (2), las probabilidades se calculan para cada órgano o , y el órgano con la probabilidad máxima es el sitio más probable de cáncer en el paciente. El paciente puede examinarse luego opcionalmente por técnicas adicionales de diagnóstico para confirmar el sitio del cáncer. Si no se confirma el sitio de cáncer más probable, puede examinarse luego el órgano con la segunda probabilidad más alta, y así sucesivamente.

Por tanto, un aspecto de la invención proporciona un método de diagnóstico de cáncer en un órgano particular o_1 que comprende:

(1) determinar el estatus mutacional de un panel de genes;

(2) calcular una probabilidad $P(o_1)$ de que dicho paciente padezca un cáncer en el órgano o_1 , utilizando la fórmula:

$$P(o_1|g_1, g_2, \dots, g_n) = \sum_c P(c|g_1, g_2, \dots, g_n)$$

en donde la suma se toma para todos los tipos de cáncer c del órgano o_1 , y $P(c)$ se calcula utilizando la fórmula:

en donde el producto se toma para todos los genes en dicho panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), la suma se toma para todos los tipos de cáncer t , $M(g|c_i)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c_i , y $P_0(c_i)$ es la probabilidad *a priori* del cáncer c_i , dado que el paciente padece un cáncer.

En el caso de cribado de un paciente por cáncer (v.g., detección precoz), a menudo será deseable calcular las probabilidades de varios cánceres diferentes (v.g., los cánceres más prevalentes en la población relevante del paciente o los cánceres enumerados en las Tablas 3 y 4) a fin de permitir una comparación para determinar cuál de la pluralidad de cánceres es el más probable. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona un método de determinación de la probabilidad que un paciente padezca un cáncer particular c_1 que comprende:

(1) determinar el estatus mutacional de un panel de genes;

(2) calcular una probabilidad $P(c_1)$ de que dicho paciente tenga un primer cáncer en el órgano c_1 , utilizando la fórmula:

$$P(c_1|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_1) \prod_i M(g_i|c_1) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t)$$

en donde el producto se toma para todos los genes en dicho panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), la suma se toma para todos los tipos de cáncer t , $M(g|c_i)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c_i , y $P_0(c_i)$ es la probabilidad *a priori* del tipo de cáncer c_i , dado que el paciente padece un cáncer; y

(3) calcular una probabilidad $P(c_2)$ de que dicho paciente tenga un segundo cáncer c_2 utilizando la fórmula:

$$P(c_2|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_2) \prod_i M(g_i|c_2) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t)$$

en donde el producto se toma para todos los genes en dicho panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), la suma se toma para todos los tipos de cáncer t , $M(g|c_2)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c_2 , y $P_0(c_2)$ es la probabilidad *a priori* del tipo de cáncer c_2 , dado que el paciente padece un cáncer.

5 Esto puede repetirse y las diversas probabilidades compararse para dar la confianza deseada de que el paciente padezca un cáncer particular. En algunas realizaciones, el método comprende además llegar a la conclusión de que el paciente tiene c_1 si $P(c_1)$ es mayor que, donde $P(c_2)$ a $P(c_x)$ representan las probabilidades calculadas de cada $P(c_2), P(c_3), P(c_4), \dots, P(c_x)$ cáncer (v.g., cánceres principales tales como los enumerados en las Tablas 3 y 4) distintos de c_1 .

10 A menudo será útil conocer qué cáncer particular está presente. Así, un aspecto de la invención proporciona un método de diagnosticar un cáncer que comprende:

- (1) determinar el estatus mutacional de un primer panel de genes;
- (2) determinar el estatus mutacional de un segundo panel de genes; y
- (3) calcular una probabilidad $P(c_1)$ de que dicho paciente padezca un cáncer particular c_1 , utilizando la fórmula:

$$P(c_1|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_1) \prod_i M(g_i|c_1) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t)$$

en donde el producto se toma para todos los genes en dicho segundo panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), la suma se toma para todos los tipos de cáncer t , $M(g|c_1)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g de dicho segundo panel en el tipo de cáncer c_1 , y $P_0(c_1)$ es la probabilidad *a priori* del tipo de cáncer c_1 , dado que el paciente padece un cáncer.

Como se ha mencionado arriba, el cribado de los 5 genes de la Tabla 4 puede detectar aproximadamente el 95% de los tipos de tumor sólido y los genes en las Tablas 2 y 3 pueden clasificar el cáncer. Así, en algunas realizaciones, la presencia de una mutación en uno cualquiera de los genes enumerados en la Tabla 4 se utiliza como un cribado de todos los tipos de cáncer a fin de determinar para qué pacientes debería realizarse un análisis adicional en un panel que comprende al menos uno de los genes enumerados en la Tabla 2 ó 3. En algunas realizaciones, una mutación en uno cualquiera de los genes en el primer panel indica que el paciente padece un cáncer y la aplicación del segundo panel clasifica el tipo del mismo.

En algunas circunstancias, las mutaciones somáticas son las mutaciones más informativas (v.g., como en el Ejemplo 1). En tales casos, es posible determinar el estatus mutacional de los genes del panel tanto en tejido de la línea germinal como en tejidos somáticos para confirmar que la mutación detectada en el cribado de mutaciones es de hecho somática. En algunas realizaciones, esto puede hacerse con una sola muestra de sangre del paciente, dado que el estatus mutacional de la línea germinal puede determinarse a partir de células de sangre circulante, mientras que el análisis mutacional somático puede hacerse con, v.g., células tumorales circulantes, exosomas derivados de células tumorales, o ácidos nucleicos circulantes derivados de células tumorales.

El cálculo de la probabilidad de que un paciente padezca un cáncer particular puede ser útil en diversas situaciones clínicas. Por ejemplo, si la probabilidad calculada de que el paciente padezca un cáncer particular es suficientemente grande, es posible diagnosticar el cáncer particular, prescribir un tratamiento para el cáncer específico, etc. Si el paciente presenta un riesgo particularmente alto de un cáncer específico (v.g., portador de la mutación BRCA), entonces incluso una probabilidad menor calculada de cáncer de mama u ovario podría ser suficiente para hacer un diagnóstico. Alternativamente, una probabilidad alta de un cáncer particular puede estimular al doctor a recomendar, prescribir, ordenar, o realizar un test adicional (v.g., biopsia, MRI, escaneo CT, examen rectal digital, mamografía, etc.) para confirmar el cáncer.

Así, en aspectos que comprenden el cálculo de la probabilidad de cáncer c_1 , algunas realizaciones comprenden adicionalmente recomendar, prescribir, ordenar, o realizar un test para confirmar la presencia de cáncer c_1 . En algunas realizaciones, el test se prescribe, ordena, recomienda, o realiza si la probabilidad calculada excede de cierto valor umbral. En aspectos que comprenden calcular la probabilidad de cáncer c_1 y la probabilidad de cáncer c_2 , algunas realizaciones comprenden adicionalmente recomendar, prescribir, ordenar, o realizar un test para confirmar la presencia de cáncer c_1 en dicho paciente si la probabilidad calculada de que dicho paciente tenga dicho cáncer c_1 es mayor que la probabilidad calculada de que dicho paciente padezca un cáncer c_2 . En algunas realizaciones, el test se prescribe, ordena, recomienda, o realiza si la probabilidad calculada de c_1 excede de la de c_2 y excede también de cierto valor umbral.

Como se utiliza en esta memoria, un "panel de genes" es una pluralidad de genes. En algunas realizaciones, el panel está constituido por entre 2 y 500, entre 3 y 500, entre 4 y 500, entre 5 and 500, entre 6 y 500, entre 7 y 5 00, entre 8 y 500, entre 9 y 500, entre 10 y 5 00, entre 11 y 500, entre 12 y 5 00, entre 13 y 500, entre 14 y 500, entre 15 y 5 00, entre 16 y 500, entre 17 y 500, entre 18 y 500, entre 19 y 5 00, entre 20 y 500, entre 25 y 500, entre 30 y

500, entre 3 5 y 500, entre 40 y 500, entre 45 y 500, entre 50 y 5 00, entre 5 5 y 500, entre 60 y 500, entre 65 y 500, entre 70 y 5 00, entre 75 y 500, entre 80 y 500, entre 85 y 500, entre 90 y 500, entre 95 y 500, entre 100 y 500, entre 2 y 400, entre 2 y 350, entre 2 y 300, entre 2 y 250, entre 2 y 200, entre 2 y 150, entre 2 y 100, entre 2 y 90, entre 2 y 80, entre 2 y 70, entre 2 y 60, entre 2 y 50, entre 2 y 45, entre 2 y 40, entre 2 y 35, entre 2 y 30, entre 2 y 25, entre 2 y 20, entre 2 y 19, entre 2 y 18, entre 2 y 17, entre 2 y 16, entre 2 y 15, entre 2 y 14, entre 2 y 13, entre 2 y 12, entre 2 y 11, entre 2 y 10, entre 2 y 9, entre 2 y 8, entre 2 y 7, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4, o entre 2 y 3 genes, y comprende al menos uno de los genes enumerados en la Tabla 1 o un subconjunto de los genes de la Tabla 1. Como se utiliza en el contexto de rangos, "entre" incluye el final del rango (es decir, "entre 2 y 500" incluye tanto 2 como 500).

10 En algunas realizaciones de la invención, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Abrev. del Gen	Entrada del Gen	Abrev. del Gen	Entrada del Gen ID	Abrev. del Gen	Entrada del Gen ID
<i>A/M1</i>	202	<i>IDH1</i>	3417	<i>PMS1</i>	5378
<i>APC</i>	324	<i>KIT</i>	3815	<i>PMS2</i>	5395
<i>ATM</i>	472	<i>KRAS</i>	3845	<i>PTEN</i>	5728
<i>BRAF</i>	673	<i>HRAS</i>	3265	<i>RB1</i>	5925
<i>BRCA1</i>	672	<i>NRAS</i>	4893	<i>RET</i>	5979
<i>BRCA2</i>	675	<i>MAP2K4</i>	6416	<i>SMAD4</i>	4089
<i>CDKN2A</i>	1029	<i>MET</i>	4233	<i>SMO</i>	6608
<i>CD95</i> (conocido también como <i>FAS</i>)	355	<i>MLH1</i>	4292	<i>STK11</i>	6794
<i>CTNNB1</i>	1499	<i>MSH2</i>	4436	<i>TAF1L</i>	138474
<i>EGFR</i>	1956	<i>NF1</i>	4763	<i>TGFBR2</i>	7048
<i>FBN2</i>	2201	<i>NF2</i>	4771	<i>TNN</i>	63923
<i>FBXW7</i>	55294	<i>PIK3CA</i>	5290	<i>TP53</i>	7157
<i>FL113479</i> (conocido también como <i>ZNF668</i>)	79759	<i>PIK3RI</i>	5295	<i>TRRAP</i>	8295
<i>FGFR3</i>	2261	<i>PRKDC</i>	5591	<i>VHL</i>	7428

En algunas realizaciones, el panel comprende subconjuntos (v.g., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más) de los genes en la Tabla 1. En algunas realizaciones, el panel comprende *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN*, y *TP53*. En algunas realizaciones el panel comprende *AIM1*, *APC*, *CDKN2A*, *EGFR*, *FBN2*, *FBXW7*, *FLJ13479*, *IDH1*, *KRAS*, *PJK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN*, *RB1*, *SMAD4*, *TGFBR2*, *TNN*, y *TP53*. En algunas realizaciones el panel comprende *APC*, *ATM*, *BRAF*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *EGFR*, *FBXW7*, *FGFR3*, *KIT*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *MAP2K4*, *MET*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NF1*, *NF2*, *PIK3CA*, *PRKDC*, *PTEN*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *SMO*, *STK11*, *TAF1L*, *TP53*, *TRRAP*, y *VHL*. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 4.

20 En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes enumerados en la Tabla 1.

Las mutaciones útiles en los métodos de la invención incluyen mutaciones sin sentido, deleciones, inserciones, desplazamientos de marco, variaciones en el número de copias, y pérdida de heterocigosidad. Modificaciones deletéreas (es decir, mutaciones que reducen o anulan la función de genes y/o proteínas) son particularmente relevantes en el contexto de supresores de tumores (v.g., *APC*, *TP53*, *PTEN*). Las mutaciones activadoras (es decir, mutaciones que aumentan la función de un gen y/o una proteína) son particularmente relevantes en el contexto de los oncogenes (v.g., *KRAS*, *EGFR*). Los expertos en la técnica están familiarizados con diversas mutaciones deletéreas y activadoras para las regiones enumeradas en las Tablas 1, 3, y 4 (v.g., los codones 12 y 13 en *KRAS*). Los profesionales expertos están familiarizados también con diversas técnicas para determinación de si una mutación particular es de hecho deletérea o activadora. Por ejemplo, se espera generalmente que las mutaciones de desplazamiento de marco que dan como resultado truncación precoz de un gen supresor de tumores sean deletéreas. La Tabla 7 incluye mutaciones encontradas en algunos de los genes enumerados en la Tabla 1. Los

expertos en la técnica están familiarizados con diversas fuentes y bases de datos que catalogan mutaciones en los genes enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, la base de datos COSMIC [Catalogue of Somatic Mutaciones in Cáncer] contiene actualmente más de 26.000 entradas para estos genes. Los expertos en la técnica podrán utilizar estas entradas en los métodos de la invención a fin de detectar y clasificar el cáncer.

- 5 Como se utiliza en esta memoria, de determinación del "estatus mutacional" de un gen significa determinar al menos uno de los aspectos siguientes: (a) si el gen (o cualquiera de sus productos) alberga una mutación de secuencia (con inclusión de mutaciones, deleciones o inserciones puntuales, variantes del número de copias, etc.), (b) la prevalencia de tales mutaciones en una muestra, o (c) si una mutación de secuencia de este tipo es activadora o desactivadora. Así, un estatus mutacional particular incluye, pero sin carácter limitante, la presencia o ausencia de
- 10 una mutación, una prevalencia relativamente alta o relativamente baja de una mutación, una mutación desactivadora, una mutación activadora, etc. En algunas realizaciones, la determinación del estatus mutacional de un gen comprende ensayar algún marcador cuyo estatus propiamente dicho está correlacionado con el estatus mutacional del gen de interés. La determinación del estatus mutacional de un panel de genes significa determinar el estatus mutacional de cada gen en el panel.
- 15 El estatus mutacional de un gen puede determinarse por cualquiera de varios métodos familiares para los expertos en la técnica. Métodos ilustrativos incluyen resecuenciación (sea de regiones seleccionadas del gen o del gen entero), amplificación específica de alelos (v.g., TaqMan™ utilizando sondas alelo-específicas), análisis de microrredes (v.g., redes para CNV o redes que contienen sondas alelo-específicas mutantes), etc. En algunas realizaciones de la invención, el método comprende amplificar y/o aislar físicamente un ácido nucleico de un panel
- 20 de genes a partir de una muestra obtenida de un paciente. Como se utiliza en esta memoria, "amplificación de un ácido nucleico" y "aislamiento de ácido nucleico" tienen sus significados convencionales en la técnica. Así, en algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente amplificar ácido nucleico de un panel de genes (v.g., que comprende los genes enumerados en la Tabla 3) a partir de una mezcla obtenida de un paciente, determinar el estatus mutacional de cada gen en el panel, y calcular la probabilidad de un cáncer particular como se expone
- 25 anteriormente y más adelante.

- "Muestra", como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier espécimen biológico, con inclusión de cualquier tejido o fluido, que puede obtenerse de, o derivarse de un espécimen obtenido de un individuo humano. Tales muestras incluyen, pero sin carácter limitante, tejido sano o tumoral, fluidos corporales (v.g., sangre), material de desecho (v.g., orina, heces), etc. "Muestra de fluido corporal", como se utiliza en esta memoria, significa cualquier
- 30 fluido que puede extraerse o recogerse de un cuerpo humano. En algunas realizaciones de cada aspecto de la invención, la muestra de fluido corporal es sangre o un derivado de sangre. Ejemplos de derivados de sangre incluyen, pero sin carácter limitante, plasma y suero. En algunas realizaciones, la muestra de fluido corporal es orina, heces, efusión pleural, efusión lacrimonal, saliva, esputo, etc. Como se utiliza en esta memoria, "analizar los genes en una muestra" se refiere a analizar ácidos nucleicos correspondientes a dichos genes contenidos en una
- 35 muestra o cualquier sustancia derivada de dicha muestra. Por ejemplo, el análisis de los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53* en sangre incluye analizar porciones amplificadas por PCR™ de estos genes en una muestra de sangre del paciente (con inclusión de plasma o suero), o en DNA o RNA aislados (es decir, derivados) de dicha muestra. En algunas realizaciones, un ácido nucleico de este tipo se selecciona del grupo constituido por DNA genómico (con inclusión de copias amplificadas por PCR™ de DNA genómico), mRNA, cDNA, y una porción de
- 40 cualquiera de éstos.

- Los métodos de cribado y clasificación del cáncer de las invenciones implicarán a menudo analizar ácidos nucleicos de fluidos corporales dado que éstos son con frecuencia las muestras menos invasivas a obtener de los pacientes. Por ejemplo, el método de la invención puede implicar aislar ácidos nucleicos de células tumorales circulantes de la
- 45 sangre. Esto puede implicar la captura de células tumorales circulantes (v.g., utilizando anticuerpos de captura específicos de tumores) y el análisis subsiguiente del DNA o RNA contenido en la célula. Alternativamente, los métodos de la invención pueden aislar y analizar ácidos nucleicos que flotan libremente en el fluido corporal. Como se expone con mayor detalle más adelante, los métodos de la invención pueden aislar también ácidos nucleicos de vesículas extracelulares encontradas en la muestra de fluido corporal.

- Las mutaciones en algunos de los genes están asociadas con tipos de cáncer particulares. Como se utiliza en esta memoria, "tipo canceroso" y "tipo de cáncer" significan un cáncer en u originario de un tejido u órgano particular y/o un cáncer con una característica molecular o clínica particular. A menudo, la especificidad del "tipo de cáncer" varía con la aplicación, con inclusión del tipo de tejido (v.g., escamoso frente a cuboidal), tipo de órgano (v.g., mama frente a pulmón), y subtipo clínico (v.g., cáncer de mama negativo triple). Así, otro aspecto de la invención proporciona un método de clasificación de cáncer que comprende aislar los ácidos nucleicos correspondientes a un
- 55 panel de genes a partir de una muestra obtenida de un paciente y determinar el estatus mutacional de cada uno de dichos ácidos nucleicos, en donde un estatus mutacional particular en genes particulares en el panel indica que el paciente padece un cáncer particular. Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos conforme a este aspecto pueden detectar y clasificar simultáneamente el cáncer. En algunas realizaciones, el panel comprende los genes *AIM1*, *APC*, *CDKN2A*, *EGFR*, *FBN2*, *FBXW7*, *FLJ13479*, *IDH1*, *KRAS*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN*, *RB1*, *SMAD4*, *TGFBR2*, *TNN*, and *TP53* o un subconjunto (v.g. al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15 o más) de los mismos.
- 60 En otras realizaciones el panel comprende los genes *APC*, *ATM*, *BRAF*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *EGFR*, *FBXW7*, *FGFR3*, *KIT*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *MAP2K4*, *MET*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NF1*, *NF2*, *PIK3CA*,

5 *PRKDC, PTEN, RB1, RET, SMAD4, SMO, STK11, TAF1L, TP53, TRRAP, y VHL* o un subconjunto (v.g., al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, o 30 o más) de los mismos. En todavía otras realizaciones, el panel comprende los genes *AIM1, APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CD95, CTNNB1, EGFR, FBN2, FBXW7, FLJ13479, FGFR3, IDH1, KIT, KRAS, HRAS, NRAS, MAP2K4, MET, MLH1, MLH2, MSH1, MSH2, NF1, NF2, PIK3CA, PIK3R1,*

10 *PRKDC, PTEN, PMS1, PMS2, RB1, RET, SMAD4, SMO, STK11, TAF1L, TGFBR2, TNN, TP53, TRRAP, y VHL* o un subconjunto (v.g., al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más) de los mismos.

10 Como se utiliza en esta memoria, "clasificar un cáncer" y "clasificación del cáncer" se refiere a la determinación de una o más características clínicamente relevantes de un cáncer. Así, "clasificar un cáncer" incluye, pero sin carácter limitante: (i) determinar el tipo de tejido u órgano de origen del cáncer (v.g., tipo de cáncer); (ii) determinar el subtipo clínico del cáncer (v.g., amplificado en *EGFR*); (iii) evaluar el potencial metastásico, potencial para producir metástasis en órganos específicos, riesgo de recurrencia, y/o curso del tumor; (iv) evaluar la fase del tumor; (v) determinar el pronóstico del paciente en ausencia de tratamiento del cáncer; (vi) determinar el pronóstico de respuesta del paciente (v.g., contracción del tumor o supervivencia exenta de progreso) al tratamiento (v.g., quimioterapia, terapia de radiación, cirugía para extirpación del tumor, etc.); (vii) diagnóstico de la respuesta real del paciente al tratamiento actual y/o anterior; (viii) determinar un curso preferido de tratamiento para el paciente; (ix) prognosis para relapso del paciente después del tratamiento (sea tratamiento en general o algún tratamiento particular); (x) prognosis de esperanza de vida del paciente (v.g., prognosis para supervivencia total), etc. Los métodos de la invención son particularmente adecuados para determinar el origen del tumor.

20 Los aspectos de cribado del cáncer y clasificación del cáncer de la invención pueden combinarse también para proporcionar un método para diagnóstico de tipos de cáncer específicos. Esto implicará a menudo cribado de un paciente respecto a la presencia de cáncer generalmente y, si está presente el mismo, clasificación del cáncer. Así, este aspecto de la invención proporciona un método de diagnóstico del cáncer que comprende (1) aislar ácidos nucleicos correspondientes a un primer panel de genes a partir de una muestra obtenida de un paciente; y (2) determinar el estatus mutacional de cada ácido nucleico correspondiente a un gen en el primer panel, en donde un estatus mutacional particular en genes particulares en el primer panel indica que el paciente padece un cáncer; (3) aislar ácidos nucleicos correspondientes a un segundo panel de genes a partir de la muestra; (4) determinar el estatus mutacional de cada ácido nucleico correspondiente a un gen en el segundo panel, en donde un estatus mutacional particular de genes particulares en el segundo panel indica que el paciente tiene un tipo de cáncer particular. Como se utiliza en esta memoria, "tipo de cáncer" se refiere a un tejido, tipo de tejido u órgano de origen para un cáncer.

35 En algunas realizaciones, los pasos de aislamiento (1) y (3) se realizan secuencialmente. Esto permite una evaluación inicial relativamente menos costosa y más rápida de la presencia general del cáncer que puede, en caso necesario, ir seguida por análisis ulterior de más genes a fin de determinar el tipo de cáncer. Alternativamente, en otras realizaciones, los pasos de aislamiento (1) y (3) se realizan al mismo tiempo - es decir, se colapsan esencialmente en un solo paso que aísla y/o analiza ácidos nucleicos de ambos paneles simultáneamente. El aislamiento y el análisis pueden realizarse sobre la misma muestra del paciente o sobre muestras diferentes.

40 En algunas realizaciones, el primer panel comprende los genes *APC, GFR, KRAS, PTEN, y TP53* y el segundo panel comprende los genes *AIM1, APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CD95, CTNNB1, EGFR, FBN2, FBXW7, FLJ13479, FGFR3, IDH1, KIT, KRAS, HRAS, NRAS, MAP2K4, MET, MLH1, MLH2, MSH1, MSH2, NF1, NF2, PIK3CA, PIK3R1, PRKDC, PTEN, PMS1, PMS2, RB1, RET, SMAD4, SMO, STK11, TAF1L, TGFBR2, TNN, TP53, RRAP, y VHL* o subconjuntos de los mismos (v.g., *AIM1, APC, CDKN2A, EGFR, FBN2, FBXW7, FLJ13479, IDH1, KRAS, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RB1, SMAD4, TGFBR2, TNN, y TP53* o *APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, TNNB1, EGFR, FBXW7, FGFR3, KIT, KRAS, HRAS, NRAS, MAP2K4, MET, LH1, MSH2, MSH6, NF1, NF2, PIK3CA, PRKDC, PTEN, RB1, RET, SMAD4, SMO, STK11, TAF1L, TP53, TRRAP, y VHL*).

45 El conocimiento de que un paciente padece un cáncer puede ser valioso en diversas situaciones clínicas más allá del diagnóstico. Así, otros aspectos de la invención proporcionan métodos de detección de cáncer en un paciente identificado por presentar un riesgo elevado de padecer o desarrollar un cáncer, métodos de monitorización de terapia del cáncer (v.g., respecto a recurrencia o progresión), métodos de determinación si un paciente es candidato para biopsia u otro test ulterior, métodos de determinación de la respuesta de fármacos, etc. Estos métodos comprenderán generalmente aislar ácidos nucleicos correspondientes a un panel de genes de una muestra de paciente y determinar el estatus mutacional de cada uno de tales ácidos nucleicos, en donde un estatus mutacional particular en genes particulares en el panel indicará cierta característica clínica particular (v.g., conveniencia de biopsia, conveniencia de un tratamiento particular, etc.). Por ejemplo, un panel de genes que comprende *KRAS* puede testarse para determinar que un paciente tiene cáncer de colon, indicando adicionalmente el conocimiento de una mutación activadora en *KRAS* una probabilidad disminuida de respuesta a la terapia anti-*EGFR*.

60 Así, un aspecto de la invención proporciona un método de cribado para cáncer en un paciente que comprende identificar un paciente que se encuentra en riesgo de padecer, o en necesidad de someterse a cribado respecto a cáncer, y determinar el estatus mutacional de un panel de genes en una muestra obtenida del paciente, en donde un estatus mutacional particular en la muestra indica la presencia de cáncer. Los pacientes se pueden identificar por presentar riesgo de padecer, o precisar someterse a cribado respecto a cáncer de diversas maneras y basados en numerosas características clínicas y/o moleculares. Una clase de pacientes con riesgo de padecer cáncer y que

precisan someterse a cribado son aquellos pacientes que se sabe son portadores de una mutación deletérea en la línea germinal en un gen supresor de tumores. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante, *BRCA1* (cáncer de ovario), *BRCA2* (cáncer de ovario), *PTEN* (glioma), *P16* (melanoma), *MLH1* (colorrectal), *MSH6* (colorrectal), *APC* (colorrectal), *MYH* (colorrectal), etc. En tales pacientes, la especificidad de tipo de cáncer es a menudo menos crucial dado que, por ejemplo, un paciente con *BRCA1* mutante cuyo estatus mutacional en un panel de genes predictivos (v.g., *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53*) indica cáncer, sería de esperar que padeciera cáncer de mama u ovario en lugar de cualquier otro tipo de cáncer. La naturaleza relativamente no invasiva de la detección en suero (es decir, extracción simple de sangre) hace que dicho cribado generalizado sea atractivo y práctico.

Así, en algunas realizaciones, la invención proporciona un método de detección de cáncer que comprende identificar un paciente que tiene una mutación en un gen seleccionado del grupo constituido por *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *p16*, *MLH1*, *MSH6*, *APC*, y *MYH*; y determinar el estatus mutacional de un panel de genes en una muestra obtenida del paciente; en donde un estatus mutacional particular indica la presencia de cáncer. En algunas de tales realizaciones, el método comprende adicionalmente tests adicionales para determinar/confirmar qué tipo de cáncer está presente.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de detección de la recurrencia en un paciente de cáncer que comprende determinar el estatus mutacional de un panel de genes en una muestra obtenida de un paciente, en donde un estatus mutacional particular indica recurrencia. Dado que es difícil eliminar o destruir todas las células cancerosas, uno de los desafíos principales en el tratamiento del cáncer es asegurarse que un cáncer eliminado por cirugía y/o tratado con fármacos no ha reaparecido. Así, este aspecto de la invención es particularmente útil en la monitorización de pacientes de cáncer después del tratamiento. De modo muy análogo a los pacientes de riesgo arriba expuestos, la especificidad de tipo de cáncer a menudo no es crucial: si se encuentra que un paciente de cáncer de pulmón tiene un estatus mutacional particular en su suero, varios meses o años después del tratamiento, entonces el nuevo cáncer es probable que sea una reaparición del antiguo cáncer de pulmón. Como anteriormente, en algunas realizaciones el ensayo ulterior (v.g., la obtención de imágenes) para confirmar el tipo de cáncer o caracterizar el cáncer (v.g., la fase) está abarcado por la invención. En algunas realizaciones, el estatus mutacional se mide poco tiempo después del tratamiento (v.g., a fin de determinar una línea base posterior al tratamiento) y se monitoriza luego a intervalos regulares posteriormente a fin de captar cualquier cambio significativo (v.g., respecto a esta línea base).

Otra vía prometedora adicional en la cual puede utilizarse clínicamente la invención es la identificación de pacientes que precisan tests ulteriores para confirmar la existencia, localización, y/o carácter de un cáncer. Las biopsias, por ejemplo, son generalmente muy invasivas, implicando incomodidad sustancial y riesgo (v.g., infección). Los tests de obtención de imágenes (v.g., MRI, escaneo CT, etc.) son generalmente menos invasivos, pero son muy caros y generalmente se necesita cierta idea *a priori* de la localización del tumor. Por indicación de qué pacientes tienen probabilidad de padecer cáncer en un órgano o tejido particular, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para identificar pacientes que son buenos candidatos para biopsia u obtención de imágenes. Por ejemplo, la invención proporciona un método de diagnóstico de cáncer que comprende aislar ácidos nucleicos correspondientes a un panel de genes a partir de una muestra obtenida de un paciente; determinar el estatus mutacional de cada uno de tales ácidos nucleicos, en donde un estatus mutacional particular en genes particulares del primer panel indica que el paciente padece un cáncer particular; y recomendar, prescribir o realizar ensayos ulteriores para confirmar la presencia, localización o carácter del cáncer. En algunas realizaciones, el test ulterior comprende una biopsia o un test de obtención de imágenes. En algunas realizaciones, especialmente si el cribado genético indica cáncer en un órgano de mayor tamaño como el pulmón, la realización de tests ulteriores puede implicar un test de obtención de imágenes para indicar con precisión la localización de cualquier masa seguido por biopsia para analizar ulteriormente la masa (v.g., para confirmar la malignidad). En el caso de pacientes ya identificados como de riesgo para cánceres particulares (v.g., portadores mutacional *BRCA*), un solo cribado pan-cáncer conforme a la presente invención puede proporcionar la información necesaria para sugerir una prueba ulterior del área de riesgo (v.g., mamas u ovarios).

Los ácidos nucleicos (v.g., mRNA) para análisis conforme a la presente invención pueden proceder de cualquier fuente adecuada, en especial las que estén probablemente enriquecidas en ácidos nucleicos tumorales. Un ejemplo puede ser el tejido del tumor propiamente dicho (v.g., metástasis desconocida cuyo origen se desconoce). En otro ejemplo, la sangre (o suero, o plasma) de un paciente puede tratarse para aislar mRNA o DNA respecto a análisis mutacional dado que tales fluidos corporales son portadores de mRNA y DNA circulantes. Este ácido nucleico puede proceder de células tumorales circulantes o puede ser ácido nucleico circulante libre. Métodos para aislamiento y análisis de ácidos nucleicos de sangre y derivados de sangre son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, v.g., la Patente U.S. No. 7.442.507. Así, en algunas realizaciones de la invención, la muestra es un fluido corporal (v.g., sangre, fluido pleural, orina, etc.). En algunas realizaciones, el fluido corporal es sangre. En algunas realizaciones, la muestra es un derivado de sangre tal como suero o plasma.

Una fuente adicional de ácidos nucleicos está constituida por vesículas extracelulares pequeñas, que incluyen exosomas, que son abundantes en la sangre (y en suero y plasma) de los pacientes de cáncer debido a producción incrementada por las células tumorales. Esto es especialmente cierto de los cánceres epiteliales (v.g., los de pulmón, colon, mama, próstata, ovarios, endometrio, etc.). Los exosomas llevan biomoléculas importantes en su superficie (v.g., proteína) y en su interior (v.g., mRNA). Dado que los exosomas se derivan a menudo de células tumorales, las biomoléculas que llevan los mismos pueden proporcionar información valiosa respecto a las células

tumorales de las cuales se derivan. Así, los exosomas circulantes, por producir generalmente una concentración relativamente alta de mRNA derivado de un tumor, pueden proporcionar una fotografía o "biopsia virtual" no invasiva enriquecida en células tumorales. Esto es especialmente útil en el cribado del cáncer en general, en el que es particularmente ventajosa una invasividad mínima. El mRNA de los exosomas puede aislarse y analizarse para determinar el estatus mutacional de los genes.

Así, en algunas realizaciones de la invención, se aíslan ácidos nucleicos de exosomas obtenidos de una muestra de sangre (o derivado de sangre) de un paciente. Varios métodos para aislamiento de ácidos nucleicos de exosomas y para aislamiento de exosomas propiamente dichos se conocen en la técnica. Véase, v.g., la Patente de Estados Unidos No. 7.198.923. Ejemplos incluyen centrifugación diferencial, inmunoseparación, centrifugación asistida por cuentas, clasificación de células asistida por fluorescencia (FACS), cromatografía de afinidad, etc. A veces será deseable diferenciar exosomas derivados de tumores de exosomas derivados de cualquier otra célula, debido especialmente a que las células inmunes normales en la sangre liberan exosomas. Esto puede hacerse, v.g., por FACS o inmunocentrifugación utilizando un marcador de superficie específico para cáncer o un marcador específico para células no inmunes (v.g., antígeno de la membrana epitelial [EMA] o EpCAM).

Otra información puede combinarse con estatus mutacional en algunos aspectos de la invención. Por ejemplo, los niveles de expresión de ciertos genes se diferencian a menudo entre cáncer y no-cáncer y entre tipos y subtipos de cáncer diferentes. Así, algunas realizaciones proporcionan métodos como se describen más adelante que comprenden adicionalmente determinar el nivel de expresión de un gen, en donde un estatus mutacional particular y un nivel de expresión alto indican cáncer, un tipo de cáncer particular, etc. Ejemplos de tales genes cuyo nivel de expresión es a menudo informativo incluyen, pero sin carácter limitante, *EGFR*, *HER2*, *PSA*, *CA125*, *CEA*, etc. La determinación del nivel de expresión de un gen puede incluir determinar la cantidad de mRNA y/o productos proteínicos del gen. En algunas realizaciones, el nivel (con inclusión de presencia, ausencia, o cantidad cualitativa) de un marcador se utiliza no tanto para indicar el cáncer o tipo de cáncer, sino más bien simplemente para indicar tipo de tejido u órgano del que se deriva el ácido nucleico (v.g., por medio de un exosoma). Ejemplos incluyen EpCAM, 34βE12, Ae1/3, AFP, B72.3, CA-125, Calcitonina, Calretinina, CAM 5.2, CD10, CD15, CD56, CEA, Cromogranina, CK19, CK5/6, citoqueratina 20, citoqueratina 7, EMA, GCD FP -15, HBM E-1, Hep Par 1, HER2, Leu, Leu7, M1, Mesotelina, Mucicarmina, NCAM, PSA, PSAP, PSMA, RCC, Sinaptofisina, Tiroglobulina, UroplaquinIII, Villina, Vimentina, etc.

En algunas realizaciones, el panel de marcadores tisulares comprende dos o más marcadores representados en FIG. 2, en donde la presencia o ausencia (o el estatus anormal) de marcadores específicos indica, conforme a los diagramas de flujo que se muestran en FIG. 2, que el paciente padece un cáncer de un tipo específico.

En realizaciones adicionales, el estatus de marcadores individuales en el panel se ensaya en cierto orden a fin de delimitar con mayor precisión qué tipo específico de cáncer está presente. Un ejemplo se ilustra en FIG. 2A-2D. Específicamente, cuando se encuentra un estatus mutacional particular en una muestra de un paciente, puede testarse también la muestra respecto al estatus de citoqueratina 7 (CK7) y citoqueratina 20 (CK20) seguidas por varios otros marcadores. Si tanto CK7 como CK20 están ausentes como en FIG. 2A [110], entonces pueden testarse PSA, PSAP, PSMA, Hep Par 1, AFP, CAM 5.2, CD10, Vimentina, RCC, y EMA (o cualquier combinación de los mismos o cualquier marcador simple [210] para determinar el órgano/tejido específico de origen. Si se encuentran PSA, PSAP, y/o PSMA, entonces el cáncer es adenocarcinoma de próstata [310]. Si están presentes Hep Par 1, AFP, y/o CAM 5.2, entonces el cáncer es carcinoma hepatocelular [311]. Si están presentes CD10, Vimentina, RCC, y/o EMA, entonces el cáncer es carcinoma de células renales (tipo de células claras) [312].

Si está ausente CK7 y está presente CK20 como en FIG. 2B [120], entonces pueden testarse Ae1/3, CAM 5.2, CK19, CEA (policlonal), y EMA (o cualquier combinación de los mismos o cualquier marcador simple) [220] para confirmar que el cáncer es adenocarcinoma de colon. Si se encuentra cualquiera de estos marcadores, entonces el cáncer es adenocarcinoma de colon [320]. Pueden realizarse obtención de imágenes y/o endoscopia [420] en lugar de los ensayos de marcadores adicionales [320] o como confirmación adicional.

Si está presente CK7 y está ausente CK20 como en FIG. 2C [130], entonces pueden testarse PSA, PSAP, PSMA, Tiroglobulina, Calcitonina, HER2, GCDFP-15, Cromogranina, Sinaptofisina, CD56, (NCAM), Leu7, CK5/6, CEA, Mucicarmina, B72.3, Leu, M1, (CD15), Calretinina, HBME-1, Mesotelina y Vimentina (o cualquier combinación de los mismos o cualquier marcador simple [230] para determinar el órgano o tejido específico de origen. Si se encuentran PSA, BSAP, y/o PSMA, entonces el cáncer es cáncer de próstata [330]. Si están presentes tiroglobulina y/o calcitonina, entonces el cáncer es cáncer de tiroides [331]. Si se encuentran HER2 y/o GCDFP-15, entonces el cáncer es cáncer de mama [332]. Si se encuentran Cromogranina, Sinaptofisina, CD56, (NCAM), y/o Leu7, entonces el cáncer es carcinoma de pulmón microcítico/neuroendocrino [336]. Si se encuentra CK5/6, entonces el cáncer puede ser carcinoma de células escamosas del pulmón [337] (el diagnóstico puede confirmarse por obtención de imágenes [430]). Si se encuentran CEA, Mucicarmina, B72.3, y/o Leu M1 (CD15), entonces el cáncer puede ser adenocarcinoma de pulmón [338] (el diagnóstico puede confirmarse por obtención de imágenes [430]). Si se encuentran Calretinina, HBME-1, CK5/6, y/o Mesotelina, entonces el cáncer puede ser mesotelioma [333] (si el único marcador encontrado es CK5/6, puede ser necesaria obtención de imágenes [430]). Si se encuentra Vimentina, entonces el cáncer es cáncer endometrial [334]. Si se encuentran CK5/6 y/o CEA, entonces el cáncer puede ser cáncer cervical [332] (puede ser necesaria confirmación, v.g., por frotis Pap, dado que estos marcadores son expresados también por otros tipos de tejido CK7+/CK20-).

Si CK7 y CK20 están presentes ambos como en FIG.2D [140], entonces pueden testarse CA-125, Mesotelina, 34βE12, Villina, Uroplaquina III, y/o CD10 (o cualquier combinación de los mismos o cualquier marcador simple) [240] para determinar el órgano/tejido específico de origen. Si se encuentran CA-125 y/o Mesotelina, entonces el cáncer puede ser carcinoma de ovario [340] (puede ser necesaria confirmación, v.g., por obtención de imágenes, dado que CA-125 se expresa también en otros tejidos CK7+/CK20+). Si están presentes 34βE12, Villina, y/o CA-125, entonces el cáncer puede ser colangiocarcinoma (cáncer de los conductos biliares) [341] (puede ser necesaria confirmación por obtención de imágenes, dado que CA-125 se expresa también en otros tejidos CK7+/CK20+). Si se encuentra Uroplaquina III, entonces el cáncer es carcinoma urotelial [342]. Si se encuentra CD10, entonces el cáncer es carcinoma de tipo papilar de células renales [343]. Si no se encuentra marcador alguno, entonces el cáncer puede ser carcinoma cromóforo de células renales [344] (la diagnosis puede confirmarse microscópicamente).

Como se ha mencionado arriba, algunas realizaciones de la invención implican análisis mutacional combinado con técnicas de diagnóstico más tradicionales. Por ejemplo, pueden utilizarse examen físico (v.g., examen digital rectal para cáncer de próstata), obtención de imágenes (v.g., mamografía), y/o biopsia para confirmar una diagnosis indicada por análisis mutacional conforme a la invención. Alternativamente, tales técnicas pueden combinarse con análisis mutacional (y opcionalmente análisis de marcadores de superficie de exosomas) para proporcionar una diagnosis exhaustiva. Como ejemplo ilustrativo, un cribado mutacional puede indicar la presencia de cáncer en un paciente y pueden encontrarse exosomas que sean CK7+/CK20- y tengan el marcador CK5/6 asociado con ellos. Puede no ser posible lograr una determinación concluyente basándose exclusivamente en esta información, si el cáncer es carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer cervical, o mesotelioma en algún órgano desconocido (véase FIG. 2C). Así, un médico puede dar el paso adicional de obtener imágenes para señalar la localización del cáncer (v.g., en o cerca del pulmón). El médico puede realizar posteriormente una biopsia para determinar si el cáncer es carcinoma de células escamosas del pulmón o cáncer del revestimiento mesotelial del pulmón.

Como se utiliza en esta memoria en el contexto de biomarcadores y su expresión, el "nivel" de algo en una muestra tiene su significado convencional en la técnica. La determinación de un "nivel" en este caso indica determinaciones cuantitativas - v.g., mg/ml, ratio de multiplicidad, etc. La determinación de un "nivel" en este caso incluye también determinaciones cualitativas - v.g., determinación de la presencia o ausencia de un marcador o determinación de si el nivel del marcador es "alto", "bajo" o incluso "presente" con relación a cierto valor índice.

En una realización, en la determinación del nivel de expresión conforme a la presente invención, la cantidad de expresión se mide en una o más muestras y se compara con algún valor índice. El valor índice puede representar el nivel medio de expresión de un marcador en una pluralidad de pacientes de adiestramiento (v.g., tanto pacientes enfermos como pacientes sanos). Por ejemplo, un "valor índice de cáncer" puede generarse a partir de una pluralidad de pacientes de adiestramiento caracterizados por padecer cáncer. Puede generarse un "valor índice exento de cáncer" a partir de una pluralidad de pacientes de adiestramiento definidos que no padecen cáncer. Así, un valor de expresión índice de cáncer puede representar el nivel medio de expresión en pacientes que padecen cáncer, mientras que un valor de expresión índice exento de cáncer puede representar el nivel medio de expresión en pacientes que no tienen cáncer. Así, cuando el nivel de expresión es más similar al valor índice de cáncer que al valor índice exento de cáncer, puede deducirse que el paciente tiene o es probable que tenga cáncer. Por el contrario, si el nivel de expresión es más similar al valor índice exento de cáncer que al valor índice de cáncer, entonces puede deducirse que el paciente no padece o no tiene una probabilidad aumentada de padecer cáncer. Los resultados de estos y otros análisis conforme a la invención se comunicarán a menudo a médicos, asesores genéticos y/o pacientes (u otras partes interesadas tales como investigadores) en una forma transmisible que puede ser comunicada o transmitida a cualquiera de las partes anteriores. Un formato de este tipo puede variar y puede ser tangible o intangible. Los resultados pueden materializarse en expresiones descriptivas, diagramas, fotografías, gráficos, imágenes o cualesquiera otras formas visuales. Por ejemplo, pueden utilizarse gráficos que muestran información de estatus mutacional para diversos genes en la explicación de los resultados. Diagramas que muestran dicha información para uno o más genes diana adicionales son también útiles en la indicación de los resultados de algunos ensayos. Los informes y formas visuales pueden registrarse en un medio tangible tal como papel, medios legibles por computadora tales como discos flexibles, discos compactos, etc., o un medio intangible, v.g., un medio electrónico en forma de correo electrónico o página web en internet o intranet. Adicionalmente, los resultados pueden registrarse también en una forma sonora y transmitirse por cualquier medio adecuado, v.g., líneas de cable analógicas o digitales, cables de fibra óptica, etc., por teléfono, facsímil, teléfono móvil inalámbrico, teléfono de internet y análogos.

Así pues, la información y los datos acerca de un resultado de test pueden producirse en cualquier parte del mundo y transmitirse a un lugar diferente. Como ejemplo ilustrativo, cuando se realiza un ensayo fuera de los Estados Unidos, la información y los datos de un resultado de test pueden generarse, transformarse en una forma transmisible como se ha descrito arriba, e importarse luego a los Estados Unidos. Conforme a ello, la presente invención abarca también un método para producir una forma transmisible de información en un estatus al menos mutacional respecto a un panel de genes para al menos una muestra de paciente. El método comprende los pasos de (1) determinar el estatus mutacional como se ha descrito arriba conforme a los métodos de la presente invención; y (2) materializar el resultado del paso de determinación en una forma transmisible. La forma transmisible es el producto de dicho método. Así, el procesamiento de muestras físicas puede estar separado temporal y físicamente

de su análisis en los métodos de la invención. De hecho, el estatus mutacional puede determinarse en una muestra de sangre para algún otro propósito, y los datos mutacionales almacenados procedentes de un ensayo previo pueden aplicarse a los métodos de la invención en el diagnóstico del cáncer.

5 Las técnicas para analizar el estatus mutacional o la expresión (de hecho cualesquiera datos obtenidos conforme a la invención) se implementarán a menudo utilizando hardware, software, o una combinación de los mismos en uno o más sistemas de computadora u otros sistemas de procesamiento capaces de efectuar tal análisis. La función de análisis basada en computadora puede implementarse en cualquier lenguaje y/o navegadores adecuados. Por ejemplo, aquélla puede implementarse con lenguaje C y preferiblemente utilizando lenguajes de programación de alto nivel orientados al objeto tales como Visual Basic, SmallTalk, C++, y análogos. La aplicación puede escribirse para adaptarse a entornos tales como el entorno Microsoft Windows™ con inclusión de Windows™ 98, Windows™ 2000, Windows™ NT, y análogos. Adicionalmente, los pasos funcionales pueden implementarse también utilizando un lenguaje de programación universal o independiente de la plataforma. Ejemplos de tales lenguajes de programación multi-plataforma incluyen, pero sin carácter limitante, el lenguaje de marcación de hipertexto (HTML), JAVA™, JavaScript™, lenguaje de programación Flash, interfaz de compuerta común/lenguaje estructurado de consultas (CG I/SQL), lenguaje práctico de extracción e informes (PERL), AppleScript™ y otros lenguajes de Script de sistemas, lenguaje de programación/lenguaje estructurado de consultas (PL/SQL), y análogos. Pueden utilizarse navegadores permitidos en Java™ o JavaScript™ tales como HotJava™, Microsoft™ Explorer™, o Netscape™. Cuando se utilizan páginas web de contenido activo, las mismas pueden incluir Java™ “applets” o controles ActiveX™ u otras tecnologías de contenido activo.

20 La función de análisis puede materializarse también en productos de programas de computadora y utilizarse en los sistemas arriba descritos u otros sistemas basados en computadora o en internet. De acuerdo con ello, otro aspecto de la presente invención se refiere a un producto de programa de computadora que comprende un medio utilizable por computadora que tiene códigos o instrucciones de programas legibles por computadora materializados en el mismo para permitir que un procesador realice el análisis del estatus de los genes. Estas instrucciones de programas de computadora pueden cargarse en una computadora u otro aparato programable para producir una máquina, de tal modo que las instrucciones que se ejecutan en la computadora u otro aparato programable creen medios para implementar las funciones o pasos arriba descritos. Estas instrucciones de programas de computadora pueden almacenarse también en una memoria o medio legible por computadora que puede dirigir una computadora u otro aparato programable a funcionar de una manera particular, de tal modo que las instrucciones almacenadas en la memoria o medio legible por la computadora produzcan un artículo de fabricación que incluye medios de instrucción que implementan el análisis. Las instrucciones de los programas de computadora pueden cargarse también en una computadora u otro aparato programable para hacer que se realicen en el mismo una serie de pasos operativos a fin de realizar un proceso implementado por computadora tal que las instrucciones que se ejecutan en la computadora u otro aparato programable proporcionen pasos para implementar las funciones o pasos arriba descritos.

Así, en algunas realizaciones, la invención proporciona un método que comprende: acceder a la información de estatus mutacional derivada de una muestra de paciente y almacenada en un medio legible por computadora; consultar esta información para determinar si el paciente tiene un estatus mutacional particular respecto a un panel de genes; calcular la probabilidad de que el paciente tenga un tipo de cáncer particular basado en el estatus mutacional del panel; imprimir [o presentar] la probabilidad de que el paciente tenga un tipo de cáncer particular basado en el estatus mutacional del panel. Un método de diagnóstico similar implementado por computadora puede utilizar un panel de genes para indicar la probabilidad de la presencia de cáncer en general. Sin embargo, otro método puede combinar el cribado pan-cáncer y el cribado específico de tipo de cáncer arriba descrito. Por ejemplo, una realización proporciona un método que comprende: acceder a la información del estatus mutacional en un primer panel de genes derivados de una muestra de paciente y almacenados en un medio legible por computadora; consultar esta información para determinar si el paciente tiene un estatus mutacional particular para el primer panel; calcular la probabilidad de que el paciente padezca un cáncer basándose en el estatus mutacional del primer panel; acceder a la información del estatus mutacional en un segundo panel de genes derivados de una muestra del paciente y almacenado en un medio legible por computadora; consultar esta información para determinar si el paciente tiene un estatus mutacional particular para el segundo panel; calcular la probabilidad de que el paciente padezca un cáncer particular basado en el estatus mutacional del segundo panel; imprimir [o presentar] la probabilidad de que el paciente tenga un tipo de cáncer particular basado en el estatus mutacional del segundo panel. Opcionalmente, puede imprimirse [o presentarse] también la probabilidad de que el paciente padezca un cáncer en general, sea antes de analizar la información del estatus mutacional para el segundo panel o junto con la impresión de la probabilidad de que el paciente tenga un tipo de cáncer particular. Algunas realizaciones comprenden adicionalmente presentar la información del estatus mutacional.

Como se utiliza en esta memoria en el contexto de las realizaciones de la invención implementadas por computadora, “presentación” significa comunicación de cualquier información por cualquier medio sensorial. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante, presentaciones visuales, v.g., en una pantalla de computadora o en una hoja de papel impresa mandada por una computadora, y presentaciones auditivas, v.g., expresión auditiva del genotipo de un paciente generada o registrada en computadora. La práctica de la presente invención puede emplear también métodos, software y sistemas de biología convencionales. Productos de software de computadora de la invención incluyen típicamente medios legibles por computadora que tienen instrucciones ejecutables por

computadora para realización de los pasos lógicos del método de la invención. Medios adecuados legibles por computadora incluyen discos flexibles, CD-ROM/DVD/DVD-ROM, unidad de disco duro, memoria flash, ROM/RAM, cintas magnéticas etc. Métodos básicos de biología computacional se describen, por ejemplo, en Setubal *et al.*, INTRODUCTION TO COMPUTATIONAL BIOLOGY METHODS (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg *et al.* (Ed.), COMPUTATIONAL METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi & Buehler, BIOINFORMATICS BASICS: APPLICATION IN BIOLOGICAL SCIENCE AND MEDICINE (CRC Press, Londres, 2000); y Ouelette & Bzevanis, BIOINFORMATICS: A PRACTICAL GUIDE FOR ANALYSIS OF GENE AND PROTEINS (Wiley & Sons, Inc., 2ª edición 2001); véase también U.S. Pat. No. 6.420.108.

La presente invención puede hacer uso también de diversos productos de programas de computadora y software para una diversidad de propósitos, tales como diseño de sondas, tratamiento de los datos, análisis, y operación del instrumento. Véanse las Patentes U.S. Núms. 5.593.839; 5.795.716; 5.733.729; 5.974.164; 6.066.454; 6.090.555; 6.185.561; 6.188.783; 6.223.127; 6.229.911 y 6.308.170. Adicionalmente, la presente invención puede tener realizaciones que incluyen métodos para proporcionar información genética acerca de redes tales como la Internet como se muestra en las Solicitudes U. S. Núms. de Serie 10/197,621 (Publicación U.S. No. 20030097222); 10/063,559 (Publicación U.S. No. 20020183936), 10/065,856 (Publicación U.S. No. 20030100995); 10/065,868 (Publicación U.S. No. 20030120432); 10/423,403 (Publicación U.S. No. 20040049354).

Otro aspecto de la invención proporciona microrredes y kits (con inclusión de un kit de microrredes) para la práctica de los métodos de la invención. El kit puede incluir un soporte para sus diversos componentes. El portador puede ser un recipiente o soporte, en la forma de, *v.g.*, bolsa, caja, tubo, bandeja, y está dividido opcionalmente en compartimientos. El portador puede definir un confinamiento encerrado por razones de seguridad durante el transporte y el almacenamiento.

Microrredes y kits (con inclusión de kits de microrredes) de la invención pueden comprender reactivos para determinar el estatus mutacional de un panel de genes constituido por entre 5 y 5.000 genes y que comprende al menos un gen seleccionado del grupo constituido por: *AIM1, APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CD95, CTNNB1, EGFR, FBN2, FBXW7, FLJ13479, FGFR3, IDH1, KIT, KRAS, HRAS, NRAS, MAP2K4, MET, MLH1, MLH2, MSH1, MSH2, NF1, NF2, PIK3CA, PIK3R1, PRKDC, PTEN, PMS1, PMS2, RB1, RET, SMAD4, SMO, STK11, TAF1L, TGFBR2, TNN, TP53, TRRAP, y VHL*. En algunas realizaciones, el panel comprende subconjuntos de estos genes, *v.g.*, *APC, EGFR, KRAS, PTEN, y TP53*; o *AIM1, APC, CDKN2A, EGFR, FBN2, FBXW7, FL113479, IDH1, KRAS, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RB1, SMAD4, TGFBR2, TNN, y TP53*; o *APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CTNNB1, EGFR, FBXW7, FGFR3, KIT, KRAS, HRAS, NRAS, MAP2K4, MET, MLH1, MSH2, MSH6, NF1, NF2, PIK3CA, PRKDC, PTEN, RB1, RET, SMAD4, SMO, STK11, TAF1L, TP53, TRRAP, y VHL*.

Los expertos en la técnica están familiarizados con diversos reactivos que pueden utilizarse para determinar si un gen particular alberga una mutación. Por ejemplo, pueden utilizarse sondas oligonucleotídicas (*v.g.*, sondas específicas para un alelo mutante) y/o cebadores (*v.g.*, cebadores PCR en reacciones RT-PCR) a fin de determinar el estatus mutacional. En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de tales reactivos para la fabricación de un kit de diagnóstico *in vitro*.

Los kits de la invención pueden comprender adicionalmente reactivos (*v.g.*, anticuerpos) para evaluación del estatus (*v.g.*, presencia, ausencia, nivel) de diversos marcadores adicionales, *v.g.*, los dados en FIG. 2. Estos reactivos y los aparatos incluidos opcionalmente pueden ser útiles en ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA), inmunohistoquímica (IHC), cromatografía de afinidad, etc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Utilización de Mutaciones Somáticas para Determinar el Sitio del Tumor

Métodos

Considérese una muestra de un paciente con algún tipo de cáncer. El cribado de mutaciones de esta muestra identifica mutaciones somáticas en n genes g_1, g_2, \dots, g_n . Suponiendo que las mutaciones somáticas ocurren independientemente, la probabilidad de que este paciente padezca un tipo de cáncer c viene dada por la ecuación siguiente:

$$P(c|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c) \prod_i M(g_i|c) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t) \quad (1)$$

donde el producto se toma para todos los genes mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$) y la suma se toma para todos los tipos de cáncer t . $M(g|c)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c . Véase FIG. 3 (con frecuencias mutacional basadas en datos de la base de datos COSMIC [Catalogue of Somatic Mutaciones in Cáncer]). $P_0(c)$ es la probabilidad *a priori* del tipo de cáncer c , dado que el paciente padece un cáncer. Véase FIG. 4 (con estas probabilidades *a priori* basadas en las incidencias de cáncer publicadas por la American Cancer Society). Debe indicarse que para algunos cánceres (tales como los cánceres de ovario y de próstata) las incidencias son

drásticamente diferentes en varones y mujeres, por lo que la Ecuación 1) puede utilizarse en algunos casos por separado para varones y mujeres.

Utilizando la Ecuación (1), se calcularon las probabilidades para cada tipo de cáncer c , y el cáncer con la máxima probabilidad se designó como el tipo de cáncer más probable en el paciente. Dicho paciente puede ser examinado por técnicas de diagnóstico disponibles para este tipo de cáncer. Si el tipo de cáncer más probable no se confirma, se examinaría el tipo de cáncer con la segunda probabilidad más alta, y así sucesivamente.

Dado que algunos órganos pueden desarrollar cánceres de tipos diferentes (tales como adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas en el pulmón), es posible calcular la probabilidad $P(o)$ de que se haya desarrollado el cáncer en el órgano o :

$$P(o|g_1, g_2, \dots, g_n) = \sum_c P(c|g_1, g_2, \dots, g_n) \quad (2)$$

donde la suma se toma para todos los tipos de cáncer c del órgano o . Utilizando la Ecuación (2), se calculan las probabilidades para cada órgano o , y el órgano con la probabilidad máxima es el sitio más probable de cáncer en el paciente. El paciente puede examinarse opcionalmente por técnicas de diagnóstico adicionales a fin de confirmar este sitio de cáncer. Si el sitio de cáncer más probable no se confirma, puede examinarse luego el órgano con la segunda probabilidad máxima, y así sucesivamente.

Resultados

Con objeto de evaluar la potencia de la utilización de mutaciones para determinar el sitio de un tumor, se utilizaron 3 estudios publicados (PMID: 17932254, PMID: 18772397, PM ID: 18772396) en los cuales se secuenciaron más de 20.000 genes en muestras representativas de 4 cánceres. Once muestras de carcinoma ductal de mama, 11 muestras de adenocarcinoma de colon, 22 muestras de glioblastoma, y 24 muestras de carcinoma ductal pancreático. Se utilizaron estos conjuntos de datos como serie de datos para la validación del enfoque de los inventores. Con objeto de calcular las probabilidades dadas por la Ecuación (1) para estas muestras, se utilizaron dos series de genes.

La primera serie de genes representa todos los genes con frecuencia mutacional superior a 5% en uno de 29 tipos de cáncer comunes. Utilizando la base de datos COSMIC se identificaron 33 de tales genes:

Tabla 2

<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>PRKDC</i>
<i>ATM</i>	<i>HRAS</i>	<i>PTEN</i>
<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>RB1</i>
<i>BRCA1</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>RET</i>
<i>BRCA2</i>	<i>MET</i>	<i>SMAD4</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>MLH1</i>	<i>SMO</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>MSH2</i>	<i>STK11</i>
<i>EGFR</i>	<i>MSH6</i>	<i>TAF1L</i>
<i>FBXW7</i>	<i>NF1</i>	<i>TP53</i>
<i>FGFR3</i>	<i>NF2</i>	<i>TRRAP</i>
<i>KIT</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>VHL</i>

Utilizando esta serie de genes, se obtuvieron los resultados siguientes:

Tipo de Cáncer	Porcentaje Correcto 1	Porcentaje Correcto 2	Porcentaje Equivocado
Mama	91	9	0
Colon	55	45	0
Glioblastoma	0	0	100
Pancreático	42	29	29

El "Porcentaje Correcto 1" es el porcentaje de muestras para las cuales el tipo de cáncer con la probabilidad máxima predicha coincidía con el tipo de cáncer real de la muestra, "Porcentaje Correcto 2" es el porcentaje de muestras

para las cuales el tipo de cáncer con la segunda probabilidad máxima predicha coincidía con el tipo de cáncer real de la muestra, y "Porcentaje Equivocado" es el porcentaje de muestras para las cuales los tipos de cáncer con probabilidades predichas máxima ni máxima segunda predichas coincidían con el tipo de cáncer real de la muestra.

5 La segunda serie de genes estaba basada en la serie de datos de validación. La serie estaba compuesta de genes que satisfacían las condiciones siguientes:

1. El gen debería tener dos o más mutaciones somáticas observadas en las muestras de al menos un tipo de cáncer.
2. La frecuencia de mutaciones somáticas en el gen debería ser mayor que 5% en las muestras de prevalencia.
- 10 3. Debería conocerse que el gen está relacionado con el cáncer.

17 genes satisfacían estas condiciones:

Tabla 3

<i>AIM1</i>	<i>FLJ13479</i>	<i>RB1</i>
<i>APC</i>	<i>IDH1</i>	<i>SMAD4</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>KRAS</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>EGFR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TNN</i>
<i>FBN2</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TP53</i>
<i>FBXW7</i>	<i>PTEN</i>	

15 La utilización de esta lista de genes proporcionó así mejor exactitud de predicción, como se muestra en la tabla siguiente:

Tipo de Cáncer	% Correcto 11	% Correcto 2	% Equivocado
Mama	91	9	0
Colon	100	0	0
Glioblastoma	41	50	9
Pancreático	88	12	0

Variaciones del método

Algunas modificaciones del enfoque anterior pueden aplicarse individualmente o en combinación a fin de mejorar los resultados o en ciertas circunstancias.

- 20 1. En la Ecuación (1), en lugar de utilizar frecuencias de mutaciones somáticas de genes individuales, se pueden utilizar frecuencias de mutaciones somáticas en ciertas combinaciones de genes. Por ejemplo, en lugar de utilizar frecuencias de mutaciones individuales para los genes TP53 y KRAS, pueden utilizarse frecuencias de eventos en los que están mutados ambos genes o en los que está mutado cualquiera de ellos.
- 25 2. La Ecuación (1) está basada en la presencia de mutaciones somáticas en una serie de genes. Es posible utilizar también la ausencia de mutaciones además de utilizar la presencia de mutaciones. En este caso, en lugar de la Ecuación (1) se utilizaría la ecuación siguiente:

$$P(c|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c) \prod_i M(g_i|c) \prod_j (1-M(g_i|c)) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t) \prod_j (1-M(g_i|t))$$

donde el producto para *j* se toma para todos los genes no mutados en la serie.

- 30 3. Muchos genes relacionados con el cáncer tienen los denominados 'puntos calientes mutacional' que son pequeñas áreas en las que ocurren la mayoría de las mutaciones somáticas. Estas áreas pueden ser identificadas fácilmente a partir de la base de datos COSMIC. En lugar de utilizar cualesquiera mutaciones somáticas en un gen, es posible restringir el método a 'puntos calientes mutacional' únicamente.

4. Las probabilidades $P_o(c)$ en la Ecuación (1) pueden incorporar información personal del paciente que se sabe afecta al riesgo de cáncer. Por ejemplo, las mujeres con mutaciones de la línea germinal en los genes BRCA1 o BRCA 2 presentan alto riesgo de desarrollar cánceres de mama y ovario.

Ejemplo 2: Utilización de las Mutaciones Somáticas para Detectar la Presencia de Cáncer

5 **Método**

Dado que las mutaciones somáticas son muy específicas para condiciones cancerosas o precancerosas, la medida principal de la eficiencia de la utilización del cribado de mutaciones de una serie de genes es su sensibilidad. La sensibilidad del cribado para cualquier cáncer depende de las sensibilidades dentro de cánceres individuales así como de las incidencias de los cánceres. La sensibilidad se definió por la ecuación siguiente:

$$S = \sum_t P_o(t)S(t) \quad (4)$$

10 donde $S(t)$ es la sensibilidad dentro del tipo de cáncer t . $S(t)$ se definió como el porcentaje de pacientes con mutaciones somáticas en uno o más genes dentro de una serie predefinida de uno o más genes.

Se utilizó el algoritmo siguiente para definir una pequeña serie de genes con sensibilidad alta:

1. Se comenzó con todas las muestras disponibles y una lista vacía de genes.
- 15 2. Dentro de la serie de muestras actual, se encontró el gen con sensibilidad máxima calculada conforme a la Ecuación (4). Este gen se añadió a la lista de genes.
3. Se repitieron los pasos 1 y 2 hasta que la sensibilidad combinada de la lista de genes resultante era suficientemente alta. Si se desea más sensibilidad, puede pasarse al paso 4.
- 20 4. Se reduce la serie de muestras por eliminación de todas las muestras que tienen mutaciones en cualquiera de los genes de la lista actual.
5. Se vuelve al paso 2 para aumentar adicionalmente la sensibilidad.

Resultados

25 Se utilizó la misma serie de datos de validación arriba descrita. A continuación se muestra la lista de genes en el orden en que fueron definidos los mismos por el algoritmo anterior, con la sensibilidad acumulativa como función del número de los genes en la lista presentada en FIG. 1:

Tabla 4

<i>TP53</i>
<i>KRAS</i>
<i>APC</i>
<i>EGFR</i>
<i>PTEN</i>

Variaciones del método

30 Pueden aplicarse ciertas modificaciones del enfoque anterior, individualmente o en combinación, para mejorar los resultados o en ciertas circunstancias.

1. En lugar de basarse en cualesquiera mutaciones somáticas en un gen, es posible restringir el enfoque a puntos calientes de protección únicamente.
2. El enfoque puede utilizarse no sólo para detectar cualquier cáncer, sino para detectar ciertos grupos de cánceres que incluyen tipos de cánceres individuales (v.g., cribado de individuos con alto riesgo de ciertos cánceres).
- 35 3. Si es necesario distinguir entre tumores precancerosos benignos y cánceres malignos, se pueden utilizar sólo genes con mutaciones en cánceres pero no en tumores benignos.

Ejemplo 3: Detección de Mutaciones en Exosomas

Método

Para confirmar la posibilidad de detectar mutaciones relacionadas con el cáncer en exosomas de suero, se utilizaron sobrenadantes de cultivo de células (1-10 ml de líneas de células de cáncer de ovario y de colon) o muestras de suero de pacientes con cáncer de ovario y de colon (1-3 ml) a fin de preparar exosomas para centrifugación a alta velocidad. Se extrajo el RNA total de los sedimentos de exosomas y se convirtió en cDNA por métodos estándar. Se diseñaron amplicones PCR para una serie de puntos calientes mutacionales en *TP53*, *KRAS*, *EGFR*, y *APC*, y se optimizaron para multiplexado. El cDNA exosómico se preamplificó con un multiplex de todos los amplicones. El producto de pre-amplificación se dividió en reacciones separadas y se re-amplificó con los amplicones diana individuales. Los cebadores de re-amplificación se sintetizaron con colas para secuenciación tinte-cebador. Los productos PCR individuales se secuenciaron por química tinte-cebador a fin de identificar mutaciones particulares.

Resultados

Se encontraron mutaciones en exosomas cosechados de líneas de células como sigue:

Tabla 5

Gen	Línea de Células	Mutación del DNA	RNA de la Línea de Células	RNA Exosómico (no preamp)	RNA Exosómico (preamp)
TP53	T47D	L194F	L194F	na	L194F
TP53	OVCA5	WT	Variante de remodelación del Exón 6/7	na	Variante de remodelación del Exón 6/7
TP53	HT29	R273H	nd	nd	R273H
KRAS	OVCA5	G12V	G12V	na	G12V
KRAS	HCT15	G13D	nd	nd	G13D

na = secuencia no disponible, nd = no realizado

Se encontraron mutaciones en las muestras de suero cancerosas como sigue (los genes que presentan mutaciones en suero de cáncer de ovario se representan en FIG. 5):

Tabla 6

Cáncer	Ovárico	de Colon	Todos
Muestras testadas	9	54	65
Amplificación positiva	24 (53%)	81 (30%)	105 (33%)
Secuencia positiva	100%	89%	91%
# Mutaciones	1	10	11
# muestras mutantes	1 (11%)	8 (15%)	9 (14%)

20

Ejemplos de mutaciones importantes en los genes listados en la Tabla 1 se representan a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7

Gen	Punto Caliente	Cambio de Aminoácidos	cDNA pos.
<i>TP53</i>	1	R1 75H/L;C1 76F N	c.524;C527
<i>TP53</i>	2	R248W/G	c742;c743
<i>TP53</i>	3	R273C;R273H/L	c817;c818
<i>APC</i>		R1450*	c.4348
<i>KRAS</i>		G12C/S/R;G12DN/A	c.34;c35
<i>BRAF</i>		V800E	c.1799
<i>EGFR</i>		L858R	no publicado

- 5 Ejemplos de mutaciones importantes encontradas en exosomas de suero canceroso en los genes de la Tabla 1 se muestran a continuación en la Tabla 8:

Tabla 8

Gen (punto caliente)	Mutaciones	aa	Cambio de aa	Cambio de Codón	Tejidos	ID de la Muestra Myr
TP53 hs2 y 3	G>A(homo)			CTG->CTA		
TP53 hs2 y 3	L265L	265	L265L		Hígado, Estómago	1
TP53 hs2 y 3	A>G(homo)			AAC->AGC		
TP53 hs2 y 3	N239S	239	N239S		Colon	1
TP53 hs2 y 3	G>T(homo)			AGG->AGT		
TP53 hs2 y 3	R249S	249.	R249S		Colorrectal	1,2
TP53 hs2 y 3						2
TP53 hs2 y 3	G>A (Homo)			CGT->CAT		
TP53 hs2 y 3						

ES 2 544 500 T3

TP53 hs2 y 3						
TP53 hs2 y 3	R273H	273	R273H		Colon	1
TP53 hs2 y 3					-	
TP53 hs2 y 3						
TP53 hs2 y 3	G>A (homo)			GGC->AGC		3
TP53 hs2 y 3						
TP53 hs2 y 3	G245S	245	G245S		Colon	
TP53 hs2 y 3	A>G(homo)			ACA->GCA	Vejiga, Mama, Hematopoyético, Pulmón y Piel	4
TP53 hs2 y 3	T256A	256 ,	T256A			
TP53 hs2 y 3	A>G(homo)			AGA->AGG	Órgano urinario no especificado; pelvis renal	5
TP53 hs2 y 3	R280R	280	R280R			
TP53 hs2 y 3	T>C(homo)			CCT->CCC	Mama, Esófago, Piel	5
TP53 hs2 y 3	P278P	278	P278P			
TP53 hs1	C>A het			CCC->CAC	Colon	2
TP53 hs1	P151H	151	P151H			
TP53 hs1	C>T(homo)			CTT->TTT		6
TP53 hs1	L194F	194	L194F		Colon	7
APC	A>G (homo)			CGA->CGG		8
APC	R1450R	1450	R1450R			

ES 2 544 500 T3

APC	C>T Het			GAT->GAC		9
APC	D1425D	1425	D1425D			
KRAS	T>C (het)			CTT->CTC		10
KRAS	L6L	6	L6L			
TP53hs2-3F3R3	G>A			GGC->GAC	Colon	11
		245	G245D			
KRAS4R4	G>A(het) y (homo)			GGT->GAT		12
		12	G12D			
TP53hs2-3F3R3	G>A(het)			CTG->CTA		13
		265	L265L			

Aunque la invención que antecede se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, estará claro para los expertos en la técnica que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación de la probabilidad de que un paciente padezca un cáncer particular que comprende:

- 5 (1) analizar en una muestra de fluido corporal un panel de genes que comprende los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN*, y *TP53*;
- (2) determinar si cada gen de dicho panel tiene una mutación;
- (3) calcular una probabilidad de que dicho paciente padezca un cáncer c_1 utilizando la fórmula

$$P(c_1|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_1) \prod_i M(g_i|c_1) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t);$$

10 en donde el producto se toma para todos los genes de dicho panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), la suma se toma para todos los tipos de cáncer t , $M(g|c_1)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c_1 , y $P_0(c_1)$ es la probabilidad a priori del cáncer c_1 dado que el paciente padece un cáncer.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente calcular una probabilidad de que dicho paciente tenga un segundo cáncer c_2 utilizando la fórmula: $P(c_2|g_1, g_2, \dots, g_n) = P_0(c_2) \prod_i M(g_i|c_2) / \sum_t P_0(t) \prod_i M(g_i|t)$; en donde el producto se toma para todos los genes en dicho panel mutados en la muestra ($i = 1, 2, \dots, n$), la suma toma para todos los tipos de cáncer t , $M(g|c_2)$ es la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen g en el tipo de cáncer c_2 , y $P_0(c_2)$ es la probabilidad a priori del tipo de cáncer c_2 dado que el paciente padece un cáncer.

15

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente recomendar, prescribir, ordenar, o realizar un test respecto a la presencia del cáncer c_1 en dicho paciente.

20 4. El método de la reivindicación 3, en el cual dicho test respecto a la presencia del cáncer c_1 es recomendado, prescrito, ordenado, o realizado si la probabilidad calculada de que dicho paciente tenga dicho cáncer c_1 es superior a un valor umbral.

5. El método de la reivindicación 3, en el que dicho test respecto a la presencia del cáncer c_1 se recomienda, prescribe, ordena, o realiza si la probabilidad calculada de que dicho paciente tenga dicho cáncer c_1 es mayor que la probabilidad calculada de que dicho paciente tenga el cáncer c_2 .

25

6. El método de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente recomendar, prescribir, ordenar, o realizar un test respecto a la presencia de cáncer c_2 en dicho paciente si dicho test respecto a la presencia de cáncer c_1 no indica la presencia del cáncer c_1 .

7. Un método para detección de mutaciones que comprende:

- 30 (1) analizar en una muestra de fluido corporal de un individuo humano un panel de genes constituido por entre 5 y 5.000 genes, en el cual dicho panel comprende al menos 5 genes seleccionados del grupo constituido por los genes enumerados en la Tabla 1 y al menos los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53*; y
- (2) determinar si cualquiera de los genes de dicho panel alberga una mutación.

35 8. El método de la reivindicación 7, en el cual dicho panel comprende los genes enumerados en la Tabla 3, los genes enumerados en la Tabla 2 o los genes enumerados en la Tabla 1.

9. El método de la reivindicación 7, en el cual dichos genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53* constituyen al menos 10% de dicho panel.

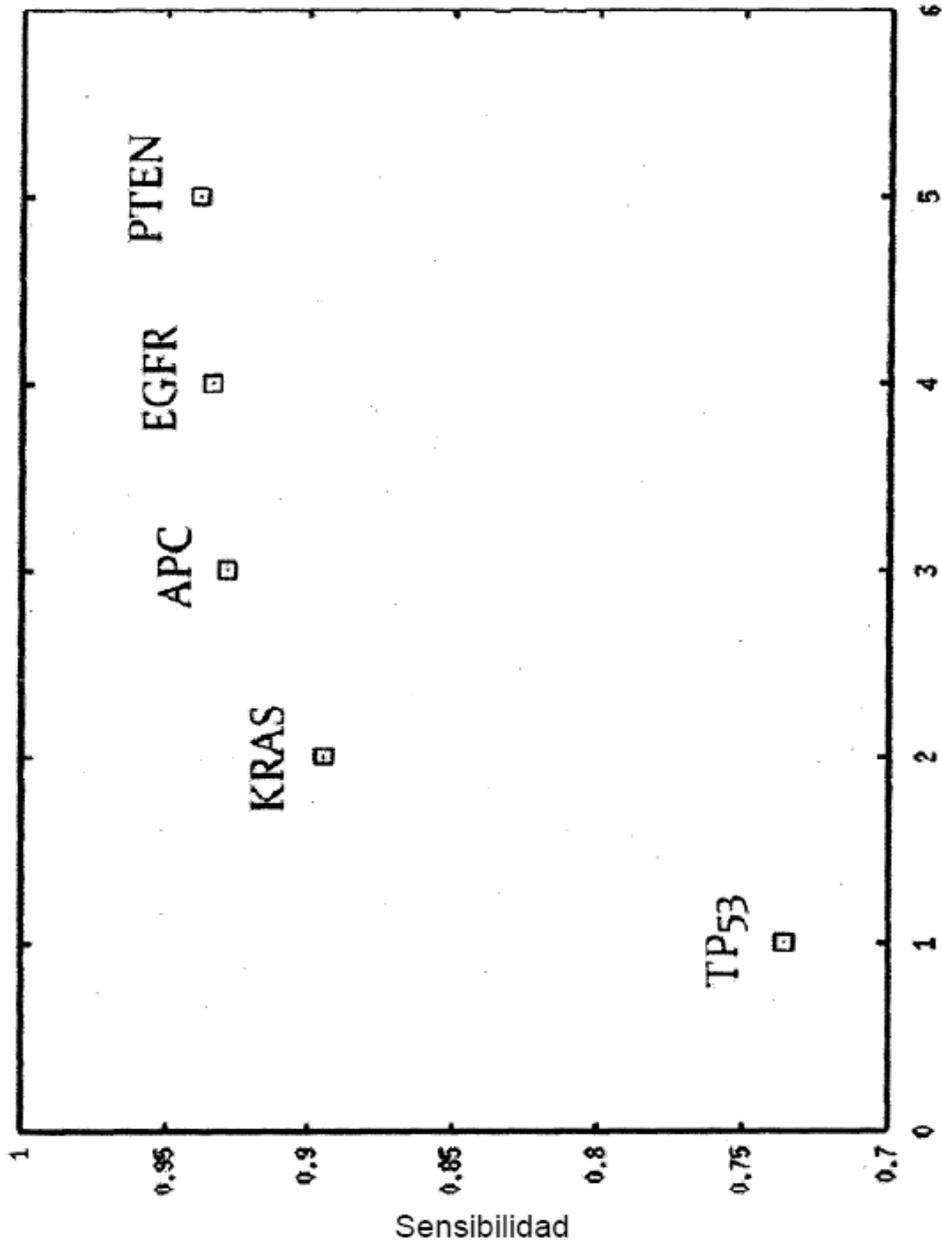
10. Un método de detección del cáncer que comprende:

- 40 (1) analizar un panel de genes que comprende los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53* en una muestra de fluido corporal; y
- (2) determinar si cualquiera de los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* o *TP53* alberga una mutación; en el cual dicha mutación indica la presencia de cáncer.

45 11. El método de la reivindicación 10, en el cual dicha mutación se selecciona del grupo constituido por los enumerados en la Tabla 7 y/o la Tabla 8.

12. El método de la reivindicación 10 ó 11, en el cual dicho panel comprende los genes enumerados en la Tabla 3, los genes enumerados en la Tabla 2 o los genes enumerados en la Tabla 1.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el cual dicha muestra de fluido corporal es una muestra de sangre.
14. El método de la reivindicación 13, en el cual dicha muestra de sangre es una muestra de plasma o una muestra de suero.
- 5 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el cual la detección de una mutación o la determinación de si un gen alberga una mutación comprende
- (i) analizar una molécula de mRNA de dicha muestra o analizar una molécula de DNA sintetizada utilizando dicha molécula de mRNA como molde;
 - 10 (ii) analizar un ácido nucleico procedente de dicha muestra por una técnica seleccionada de resecuenciación, TaqMan™, análisis de microrredes, y FISH; o
 - (iii) analizar un ácido nucleico procedente de una vesícula extracelular.
16. Un kit que comprende reactivos para analizar un panel de genes constituido por entre 5 y 5.000 genes, en el cual dicho kit comprende sondas oligonucleotídicas y/o cebadores que detectan mutaciones en al menos los genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53*.
- 15 17. El kit de la reivindicación 16, en el cual dichos genes son los genes enumerados en la Tabla 3, los genes enumerados en la Tabla 2 o los genes enumerados en la Tabla 1.
18. El kit de la reivindicación 16, en el cual dichos genes *APC*, *EGFR*, *KRAS*, *PTEN* y *TP53* constituyen al menos 10% de los genes que pueden analizarse en dicho kit.



Número de genes

Figura 1

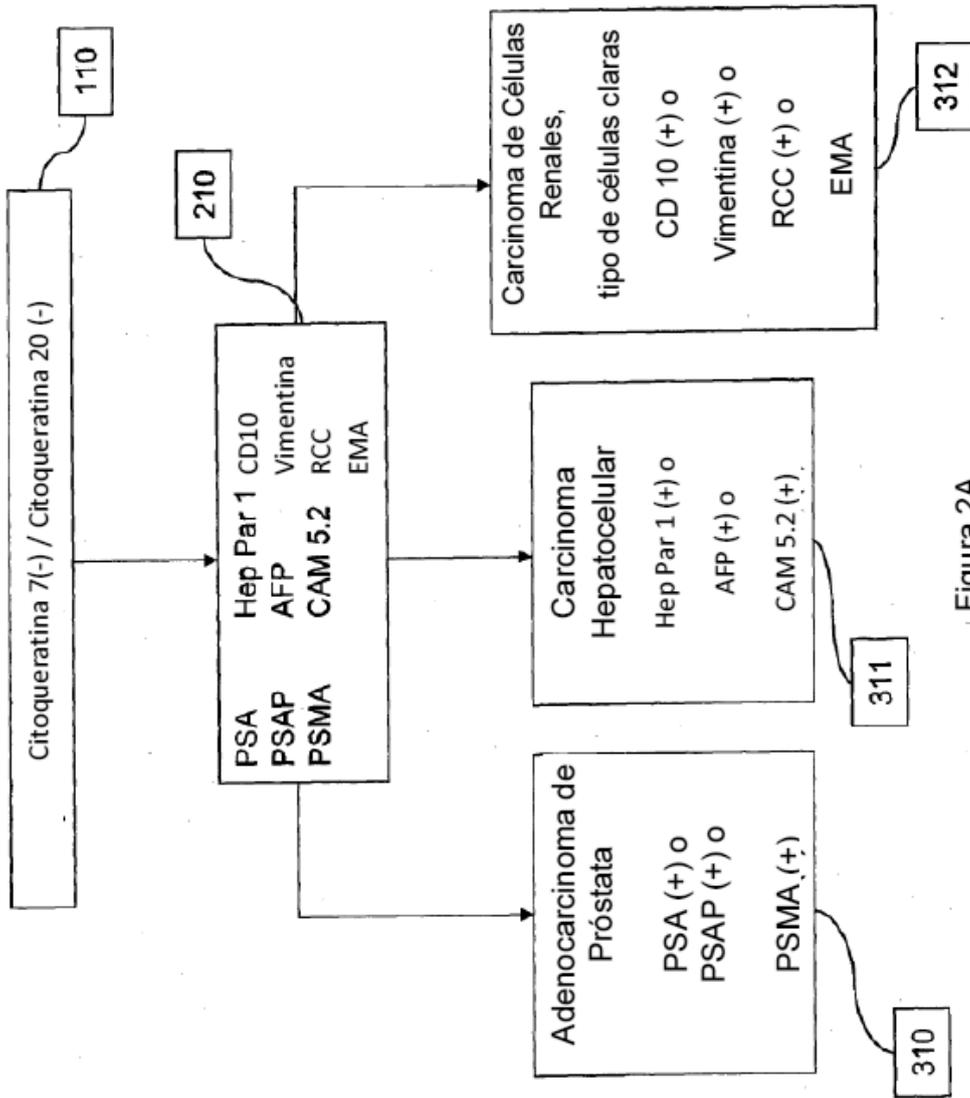


Figura 2A

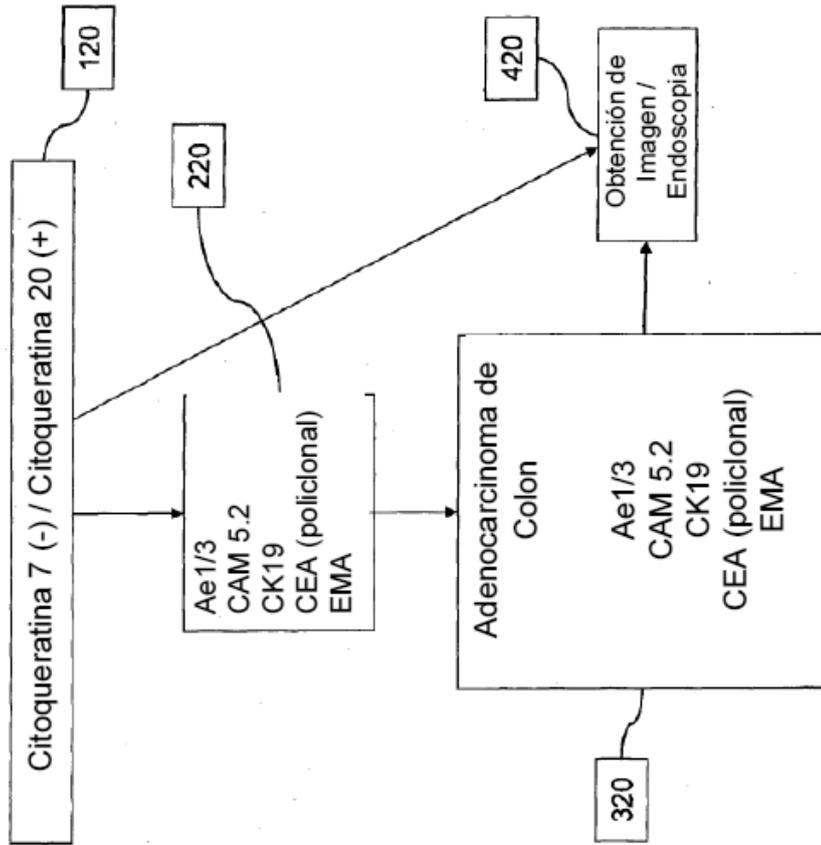


Figura 2B

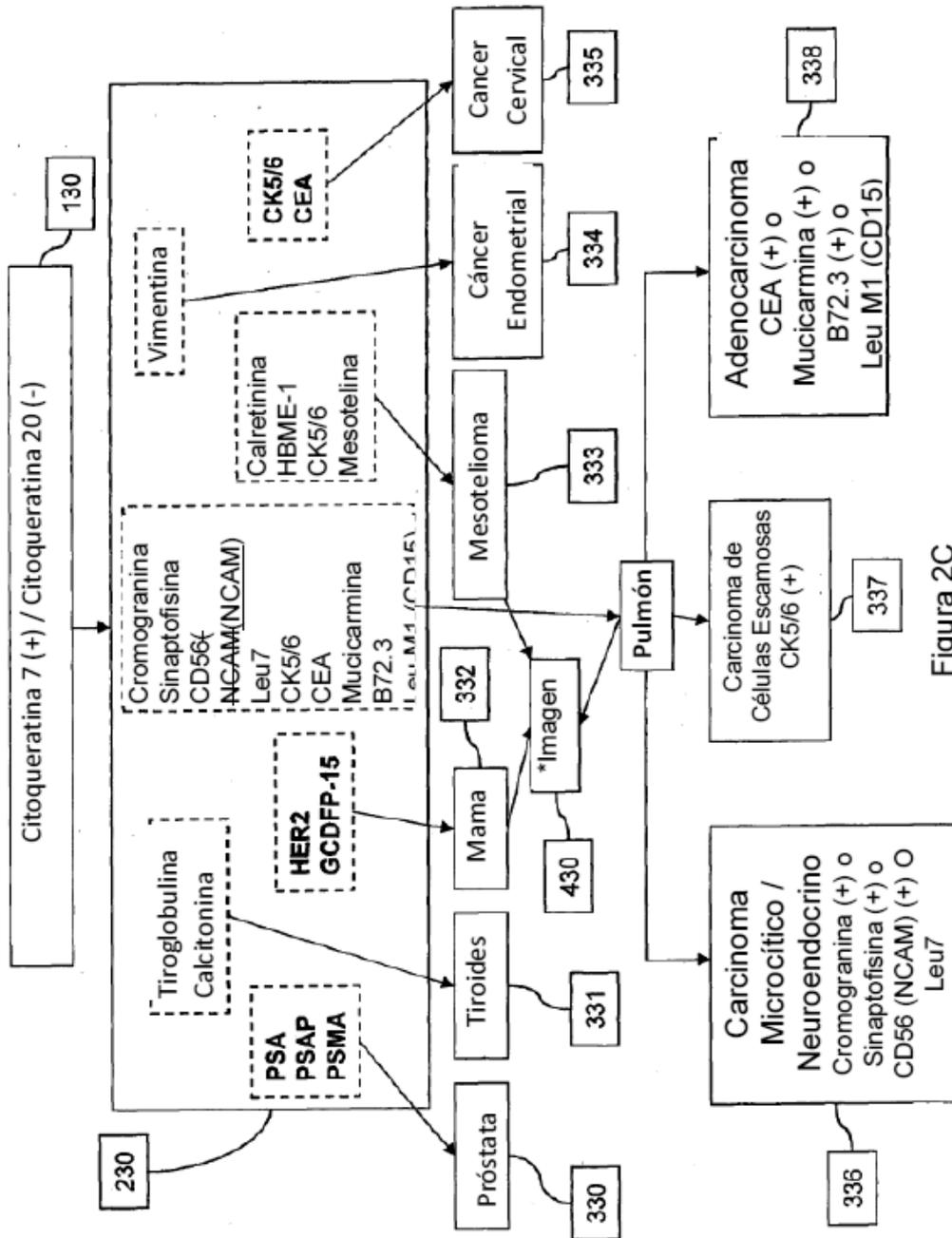


Figura 2C

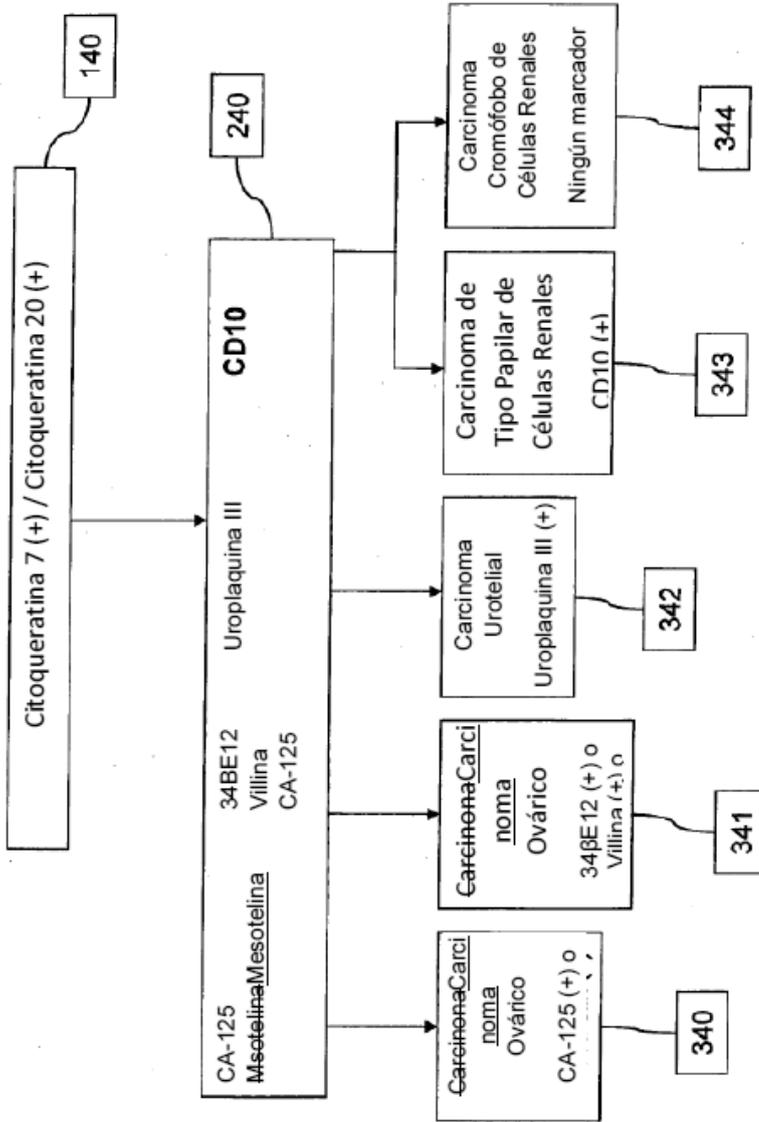


Figura 2D

Frecuencias de Mutación COSMIC

Abrev. del Gen	Pulmón				Ovario				Próst. Colon				Cereb.		Mama		Riñón	
	ADC	SCC	SCLC	Lg	Ser.	Muc.	Cél. Clar.	Endo.	ADC	ADC	ADC	Glio.	Melan.	Duct.	Cél. Clar.	Papil.		
APC	1	4	1	15	1	1	1	8	7	29*	1	2	12	1	0.5	1		
ATM	13	0.5	0.5	6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	7	9	0.5	0.4	2	0.5			
BRAF	3	3	1	1	2	2	2	9	7	14	4	44*	1	1	1			
BRCA1	0.5	0.5	0.5	0.5	4	0.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	15	0.5	0.5			
BRCA2	0.5	0.5	0.5	0.5	9	0.5	0.5	0.5	0.5	4	0.5	2	5	1	0.5			
CDKN2A	22	23	2	25	6	20	21	16	4	2	23	29	11	7	6.5			
CTNNB1	5	1	1	0.5	0.3	2	0.5	25	7	7	0.5	6	0.3	1	0.5			
EGFR	39*	4	5	4	0.2	0.5	0.5	0.5	6	0.2	4	1	1	2	0.5			
FBXW7	0.5	0.5	1	0.5	4	0.5	0.5	3	1	6	0.5	2	0.5	0.1	0.5			
FGFR3	1	0.5	0.5	6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5			
HRAS	0.2	1	0.3	4	0.5	0.5	0.5	0.5	6	0.5	0.2	1	0.5	0.3	0.5			
KIT	0.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.3	9	0.5	0.5	68*			
KRAS	22	5	1	21	8	43	8	7	8	37	1	2	3	0.2	2			
MAP2K4	3	3	3	4	5	2	2	2	2	12	1	2	4	2	2			
MET	2	2	8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.5	1	5	4			
MLH1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	7	0.5	3	0.5	0.5	0.5			
MSH2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	12	0.5	2	3	0.5	0.5			
MSH6	0.5	0.5	0.5	8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	15	3	0.5	0.5	0.5			
NF1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	15	0.4	2	0.5	1	0.5			
NF2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	6	5	0.5	0.5			
NRAS	1	0.3	0.2	7	0.5	0.5	0.5	0.5	2	2	1	21	0.5	0.2	0.5			
PIK3CA	3	3	8	8	2	6	25	10	2	21	5	3	24	3	3			
PRKDC	11	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	57*	0.5	0.5	0.5			
PTEN	1	8	13	12	3	16	3	19	13	14	20	18	4	4	2			
RB1	4	6	51	1	1	1	1	1	11	2	10	10	12	4	1			
RET	2	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5			
SMAD4	7	5	1	0.5	4	0.5	5	0.5	0.5	7	0.5	0.5	3	0.5	0.5			
SMO	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	21	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5			
STK11	14	4	1	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	15	0.5	10	0.5	0.5	0.5			
TAFIL	12	0.5	0.5	0.5	5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	22	0.5	0.5	0.5	0.5			
TP53	59	55	74	38	5	30	30	30	30	70	55	27	50	3	30			
TTRAP	0.5	0.5	0.5	0.5	10	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5			
VHL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5			

*Indica cáncer en el que este gen es particularmente predictivo (es decir, está mutado particularmente con frecuencia)

Figura 3-A

Frecuencias de Mutación COSMIC																							
Abrev. del Gen	Hígado		Páncreas		Tiroides		Vejiga		Oral		Estóm.		Esóf.		Testis		Cérvix		Laringe Vesic Biliar		Endomet.		
	HCC	Duct.	Medul.	Papil.	TCC	SCC	ADC	SCC	ADC	SCC	ADC	SCC	ADC	SCC	ADC	SCC	ADC	SCC	ADC	SCC	ADC	SCC	ADC
APC	5	13	1	15	1	0.9	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATM	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	5	0.5	0.5	5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
BRAF	2	2	25*	47*	1	0.3	1	2	1	0.3	3	1	1	0.3	3	1	11	1	1	1	1	1	1
BRCA1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
BRCA2	1	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	6	6	0.5	0.5	6	6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CDKN2A	14	37	6.5	9	17	18	8	21	1.5	12	2.5	17	31	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CTNNB1	17	4	0.5	14	2	0.4	6	1	0.5	5	8	0.5	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
EGFR	1	1	0.5	3	0.5	3	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
FBXW7	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
FGFR3	0.5	0.5	0.5	0.5	50*	32	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
HRAS	0.3	0.5	1	1	7	13	4	1	0.5	7	18	2	0.5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
KIT	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
KRAS	3	71	0.7	2	3	2	6	4	5	2	13	2	28	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
MAP2K4	2	5	2	2	12	2	0.4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
MET	12	0.5	0.5	1	0.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
MLH1	0.5	24	0.5	0.5	0.5	0.5	5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
MSH2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
MSH6	0.5	0.5	0.5	0.5	14	0.5	8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
NF1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
NF2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
NRAS	5	1	0.5	4	3	0.3	2	0.3	3	0.5	3	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
PIK3CA	6	8	3	3	23	12	8	5	3	23	3	23	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
PRKDC	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
PTEN	5	2	2	2	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7
RBI	10	1	1	1	26	1	10	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
RET	0.5	0.5	40*	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
SMAD4	2	28	0.5	18	0.5	20	4	3	8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
SMO	4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
STK11	0.5	4	0.5	0.5	0.5	0.5	2	4	2	5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
TAFIL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
TP53	70	60	30	30	80	96.6	33	96	6	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
TRRAP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	10	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
VHL	0.5	3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	

*Indica cáncer en el que este gen es particularmente predictivo (es decir, está mutado particularmente con frecuencia)

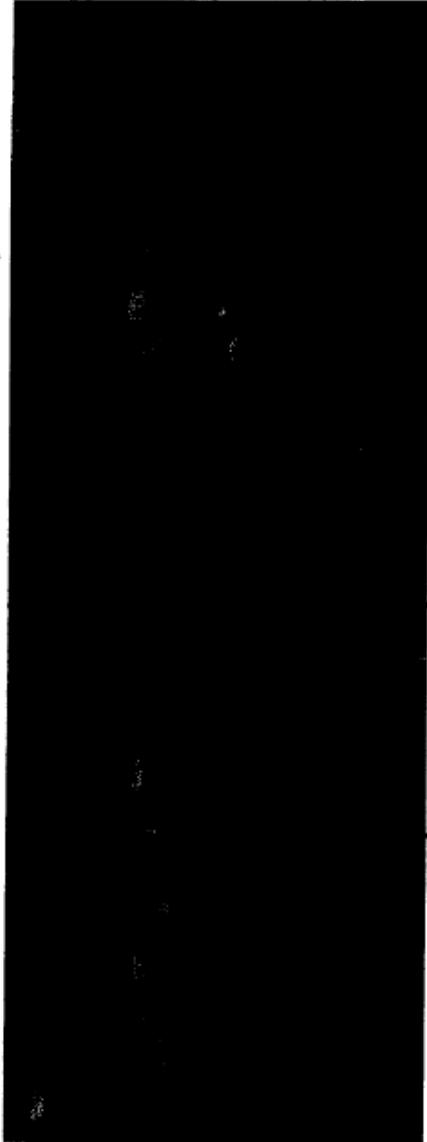
Figura 3-B

	Todos	Varón	Mujer		Varón (%)	Mujer (%)
Pulmón	215020	114690	100330	14.96	15.39	14.50
Mama	184450	1990	182460	12.83	0.27	26.37
Próstata	186320	186320	0	12.96	25.00	0.00
Colorrectal	148810	77250	71560	10.35	10.37	10.34
Páncreas	37680	18770	18910	2.62	2.52	2.73
Vejiga	68810	51230	17580	4.79	6.87	2.54
Vejiga	54390	33130	21260	3.78	4.45	3.07
Riñón	37340	8930	28410	2.60	1.20	4.11
Tiroides	21810	11780	10030	1.52	1.58	1.45
Cerebro	21650	0	21650	1.51	0.00	3.13
Ovario	62480	34950	27530	4.35	4.69	3.98
Melanoma	35310	25310	10000	2.46	3.40	1.45
Oral	21370	15190	6180	1.49	2.04	0.89
Hígado	21500	13190	8310	1.50	1.77	1.20
Estómago	16470	12970	3500	1.15	1.74	0.51
Esófago	74340	39850	34490	5.17	5.35	4.98
Linfoma	19920	11190	8730	1.39	1.50	1.26
Mieloma	44270	25180	19090	3.08	3.38	2.76
Leucemia	8090	8090	0	0.56	1.09	0.00
Testículos	40100	0	40100	2.79	0.00	5.79
Endometrio	11070	0	11070	0.77	0.00	1.60
Cérvix	12250	9680	2570	0.85	1.30	0.37
Laringe	9520	4500	5020	0.66	0.60	0.73
Vesícula biliar	1437180	745180	692000	94.14	94.50	93.75
Totales						

Figura 4

Muestra 1 Muestra 2 Muestra 3 Muestra 4

4



Muestra	1	2	3	4
TP53.1	+	+	-	+
TP53.2	+	+	-	+
TP53.3	+	-	-	+
APC	+	-	-	-
KRAS	+	+	-	+

Figura 5