

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 961**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/GB2010/052110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073665**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10801235 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2513330**

54 Título: **Métodos de diagnóstico basados en un reordenamiento adquirido somáticamente**

30 Prioridad:

**17.12.2009 GB 0922006**

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

**01.08.2017**

73 Titular/es:

**GENOME RESEARCH LIMITED (100.0%)  
Gibbs Building 215 Euston Road  
London NW1 2BE, GB**

72 Inventor/es:

**CAMPBELL, PETER JOHN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 627 961 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 diagnóstico basados en un reordenamiento adquirido somáticamente

5 La asistencia sanitaria individualizada es un objetivo principal para la medicina en los próximos 5-10 años. Se necesitan numerosos avances para alcanzar este objetivo, incluyendo el desarrollo de biomarcadores sensibles y específicos para medir la carga de enfermedad.

10 A modo de ejemplo, la medicina para el cáncer personalizada depende de la implementación de diagnósticos personalizados. Como el cáncer, en su centro, es dirigido por una mutación somática, es probable que la exploración genómica detallada tenga un papel central facilitando las elecciones terapéuticas individuales. Como la variedad de fármacos y otras terapias del cáncer sigue aumentando, existe la necesidad cada vez más urgente de medidas sensibles y específicas de la carga de enfermedad para guiar los regímenes de tratamiento.

15 En los cánceres hematológicos malignos, hay una rutina de cuantificación de niveles de enfermedad residuales mediante ensayos por reordenamientos genómicos recurrentes. Esto ha sido posible por el descubrimiento de que las leucemias se asocian con reordenamientos genómicos característicos que no necesitan la exploración amplia del genoma ni el desarrollo de ensayos específicos del paciente. En los tumores sólidos, sin embargo, los métodos para  
20 cuantificar la carga de enfermedad son menos sensibles y menos específicos. Las imágenes radiológicas se utilizan de manera rutinaria para estadificar a los pacientes, pero solo se pueden detectar lesiones grandes de > 1 cm de tamaño, que representan ya muchos millones de células cancerosas. Los marcadores séricos, tales como el PSA para el cáncer prostático, pueden ser útiles, pero no están disponibles para muchos tipos de tumor y frecuentemente tienen problemas de falta de especificidad. La detección inmunológica de células tumorales circulantes tiene una sensibilidad por debajo de 1 célula cancerosa en miles de células normales, pero solo detecta las células presentes  
25 en la sangre y puede dar como resultado falsos positivos por las células no malignas que expresan el marcador de interés.

Las células tumorales liberan ADN desnudo en el plasma según se necrosan o sufren apoptosis, y el nivel de ADN libre circulante se correlaciona con la carga de enfermedad. Esto se puede utilizar para controlar los niveles de mutaciones puntuales específicas del tumor o cambios epigenéticos en los oncogenes con algún valor pronóstico. Sin embargo, la fracción de ADN desnudo circulante que deriva de las células tumorales es del 0,01 % o menor en muchos casos, y los métodos actuales para discriminar una única base mutada en su profundidad son inadecuados. Por lo tanto, las estrategias existentes, que se basan en las mutaciones puntuales o los cambios epigenéticos en el ADN plasmático, tienen poca sensibilidad y carecen de especificidad.

35 La presente invención se dirige al problema de detectar y controlar enfermedades para apoyar una estrategia de medicina personalizada.

### Declaraciones de la invención

40 La presente invención se refiere a un método para controlar un cáncer de mama, como se expone en la reivindicación 1.

45 En un aspecto adicional la invención se refiere a un método para evaluar la eficacia de un tratamiento, como se expone en la reivindicación 9.

### Figuras

50 Figura 1 Ilustra la detección cuantitativa de reordenamientos genómicos en el ADN plasmático

Figura 2 Ilustra el análisis de muestras seriadas

### Descripción detallada

55 La presente invención en general se refiere a la detección de reordenamientos en el ácido nucleico que está asociado con un estado del cáncer de mama de un paciente por análisis genómico amplio del ácido nucleico de ese paciente. Actualmente están disponibles tecnologías que permiten el mapeo de muchos puntos de ruptura de ácido nucleico en una muestra tisular, a lo largo de un genoma. Una vez que los biomarcadores de reordenamiento adecuados se han identificado en un paciente, se puede seguir la progresión de la enfermedad controlando el  
60 aumento o disminución de los niveles de ácido nucleico que contiene dichos puntos de ruptura respecto al tiempo en ese paciente. Cuando el ácido nucleico que tiene el reordenamiento es detectable en la sangre o el plasma, entonces se pueden muestrear las muestras de sangre o plasma para controlar fácilmente la progresión de la enfermedad. Los tratamientos de la enfermedad en un paciente pueden pararse una vez que se detiene la progresión de la enfermedad, o se revierte, o no es detectable, según se evalúa mediante los niveles de biomarcador de reordenamiento. Los regímenes de tratamiento se pueden alterar o terminar si la carga de enfermedad no se reduce, según se evalúa mediante los niveles de biomarcadores de reordenamiento. Los efectos,

y por lo tanto la idoneidad, de diferentes tratamientos se pueden evaluar también.

El método de la invención se puede utilizar también para determinar si se ha producido una recaída, para permitir que se reinicie el tratamiento, si fuera necesario.

5 En el ejemplo del cáncer, las exploraciones de reordenamientos son potencialmente aplicables a todos los tipos tumorales en los que se puede acceder a la muestra diagnóstica por exploración genómica. La mayoría de los  
10 pacientes con tumores sólidos se someten a biopsia o resección quirúrgica completa de su cáncer durante el curso de su terapia, lo que significa que el acceso al ADN tumoral habitualmente se puede conseguir. En la experiencia de los inventores hasta ahora, más del 99 % de las muestras analizadas, a lo largo de una amplia variedad de tipos tumorales, han tenido al menos un reordenamiento genómico específico del tumor que se puede identificar.

Por lo tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a un método para controlar un cáncer de mama como se expone en la reivindicación 1.

15 Una enfermedad, como se desvela en el presente documento, puede ser cualquier enfermedad asociada con un reordenamiento somático. Las enfermedades pueden incluir, por ejemplo, cánceres, tales como tumores sólidos, hemoglobinuria paroxística nocturna, neurofibromatosis 1 y 2, de McCune-Albright, incontinencia pigmentaria, y síndrome Proteus.

20 El ácido nucleico que comprende el reordenamiento es detectable en una muestra de fluidos corporales tales como la sangre, el suero o el plasma.

25 Los reordenamientos asociados con estados de enfermedad del presente documento, tales como el cáncer, no necesariamente causan la enfermedad, aunque pueden producir o contribuir al fenotipo de la enfermedad. Sin embargo, solo es necesario que el reordenamiento se asocie con la enfermedad de manera que el control del reordenamiento pueda permitir que se siga la progresión o gravedad de la enfermedad. Se desvela en el presente documento el control que utiliza los reordenamientos que no son los causantes de la enfermedad, o no solamente producen la enfermedad.

30 El ácido nucleico se toma directamente de la sangre o el plasma o el suero, que no se sabe si está enfermo en sí mismo, pero de un paciente que se sabe que tiene la enfermedad. Los reordenamientos genómicos adquiridos somáticamente también son útiles como un marcador de enfermedad en dicho caso, en el que se asume que la mutación se asocia con el estado de enfermedad.

35 El ácido nucleico puede ser un ADN o un ARN.

40 El análisis genómico amplio como se desvela en el presente documento es un análisis de todo o una parte significativa del genoma de un individuo para identificar mutaciones en forma de reordenamientos que se encuentran en el tejido enfermo del individuo, tal como un tumor. El análisis genómico amplio es la identificación de mutaciones de reordenamiento de un individuo que se correlacionan con la enfermedad mediante el análisis de fragmentos o regiones aleatorias de ácido nucleico de ese individuo, adecuadamente sin el uso de sondas o cebadores que se conozca que son específicos del ácido nucleico de ese individuo. Por lo tanto, no es necesario tener una cobertura completa de un genoma, aunque se prefieren las técnicas que permiten el análisis del genoma completo, al menos las que se basan en un análisis estadístico de la cobertura.

50 Los reordenamientos genómicos adquiridos somáticamente pueden incluir eliminaciones, inversiones, translocaciones, y amplificaciones. Los reordenamientos pueden ser detectables por un cambio en la longitud de un fragmento de restricción en el que se localiza la mutación, en comparación con el genoma normal (no mutado) del paciente.

55 En un aspecto el análisis se lleva a cabo por secuenciación del ADN, por ejemplo, la secuenciación de fragmentos generados aleatoriamente del ADN de un individuo. En un aspecto la secuenciación es la secuenciación de una biblioteca de fragmentos de ADN modificados de tamaño tal como de 400-500 pb. En un aspecto la técnica que se utiliza es la secuenciación masiva paralela, como se describe en el presente documento, y también en Campbell et al Nature Genetics, Vol. 40, número 6, Junio de 2008, página 722 - 729.

60 Las plataformas de secuenciación masiva paralela adecuadas incluyen también la plataforma SOLID (Applied Biosystems) y el uso del secuenciador 454 (Roche).

En un aspecto la secuenciación se lleva a cabo utilizando una secuenciación de extremo emparejado. Se generan lecturas emparejadas del orden de 60 millones de fragmentos, que generalmente es suficiente para identificar > 50 % de los reordenamientos genómicos somáticos presentes en la muestra.

65 Los métodos de secuenciación de extremo emparejados se desvelan, por ejemplo, en Genome Res. 2009. 19: 521-532.

Los reordenamientos genómicos pueden priorizarse. La priorización puede ser, por ejemplo, incluyendo 1 o más de las siguientes etapas:

- $\geq 2$  lecturas abarcan el mismo reordenamiento;
- mapeo de alta confianza de ambos extremos;
- mapeo de las lecturas  $< 100$  kb separados en el mismo cromosoma;
- mapeo de ambos extremos a  $100$  kb de un punto de cambio de número de copia identificado por el algoritmo de segmentación.

10 La etapa de control de los cambios de los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico es una estrategia de hibridación PCR. La referencia del presente documento a PCR se refiere en general a tecnologías de amplificación de ADN, incluyendo específicamente la reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizan cebadores diseñados adecuadamente para identificar específicamente el reordenamiento de ácido nucleico en el procedimiento de amplificación.

15 En un aspecto el procedimiento PCR se lleva a cabo en una muestra de ácido nucleico que se obtiene de la sangre, o el suero.

20 En un aspecto, el tamaño del producto de PCR inicial es menor de  $< 200$  pb, preferentemente menor de  $190$  pb,  $180$  pb,  $170$  pb,  $160$  pb,  $150$  pb.

Los ensayos adecuados para controlar el nivel de un reordenamiento específico son preferentemente sustancialmente cuantitativos.

25 Los cambios en los niveles del ácido nucleico se pueden hacer por mediciones absolutas o relativas. Por ejemplo, se puede utilizar la relación del nivel de ADN genómico 'normal' vs ADN genómico mutado. De manera alternativa, se puede medir la cantidad absoluta de ADN mutado, por ejemplo, de ADN por ml de plasma. La medición del cambio de los niveles de ácido nucleico, o la cuantificación de niveles de ácido nucleico, pueden ser mediante la medición de la relación o la concentración absoluta.

30 En un aspecto el ensayo de la invención para controlar los cambios en los niveles de ácido nucleico en un paciente en la etapa linealmente cuantificable hasta un nivel de  $25$  pg de ADN por ensayo.

35 En un aspecto un aumento de un log en la cantidad absoluta de ADN detectado con el reordenamiento se considera que es un aumento significativo en la carga de enfermedad, y puede necesitar tratamiento.

En un aspecto de la invención se controlan múltiples reordenamientos genómicos, para proporcionar una huella genética de un individuo.

40 Se desvela en el presente documento un método de tratamiento médico que comprende el control de la invención, y que comprende adicionalmente la etapa de tratar al paciente cuando sea necesario, o cambiar el tratamiento, o detener el tratamiento si el tratamiento está en curso, dependiendo de la gravedad o progresión de la enfermedad según se indique por el nivel de ácido nucleico que contiene el reordenamiento informativo.

45 Se desvela en el presente documento el uso de un reordenamiento genómico específico del paciente como un biomarcador de la progresión de la enfermedad en el paciente.

50 Se apreciará que la progresión de una enfermedad se puede seguir controlando el cambio de un marcador identificado con el tiempo. La gravedad de una enfermedad se puede evaluar por una medición de un biomarcador en un punto único de tiempo cuya presencia o concentración sean indicativas de la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, la presencia en la sangre de un reordenamiento de ADN somático identificado en un tumor sólido puede indicar la progresión de un cáncer más allá de un cierto estado de enfermedad.

55 Se desvela en el presente documento un método para determinar un estado de enfermedad, comprendiendo el método la identificación de un reordenamiento genómico adquirido somáticamente asociado con un estado de enfermedad en un paciente en el que la identificación se lleva a cabo por análisis genómico amplio del ácido nucleico de ese paciente. El reordenamiento genómico se identifica adecuadamente en un paciente en un tejido o fluido, tal como sangre o plasma o suero. Preferentemente, el reordenamiento genómico se identifica en un sitio, o en un órgano, tejido o fluido, distinto del tejido enfermo primario a partir del cual se lleva a cabo el análisis genómico amplio.

60 Por ejemplo, un tumor sólido puede representar un tejido enfermo primario, y la presencia de un reordenamiento genómico adquirido somáticamente en la sangre u otro fluido corporal puede ser indicativo de una cierta progresión de la enfermedad cancerosa, y permite que se determine un tratamiento terapéutico.

65

Se desvela en el presente documento un método para determinar un régimen de tratamiento para una enfermedad, comprendiendo el método cuantificar el nivel de reordenamiento genómico adquirido somáticamente asociado con un estado de enfermedad en un paciente en un tejido o fluido, preferentemente distinto del tejido enfermo primario, en el que la identificación se lleva a cabo por análisis genómico amplio del ácido nucleico de ese paciente, y seleccionar un régimen de tratamiento basado en el nivel de dicho reordenamiento genómico.

Se desvela en el presente documento un método para evaluar la eficacia de un tratamiento, comprendiendo el método:

- i Identificar un reordenamiento genómico adquirido somáticamente asociado con un estado de enfermedad en un paciente, en el que la identificación se lleva a cabo por análisis genómico amplio del ácido nucleico de ese paciente, y
- ii Controlar los cambios en los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico como un marcador para la progresión de una enfermedad en ese paciente en respuesta a un tratamiento, evaluando de esta manera la eficacia del tratamiento.

El tratamiento puede ser un nuevo tratamiento, en cuyo caso el método de la invención puede utilizarse no solo para controlar el mejor tratamiento para un paciente, se puede utilizar también para determinar en general la eficacia de nuevos regímenes de tratamiento y nuevos fármacos u otros tratamientos terapéuticos. Esta solicitud no se limita a seres humano, sino que se podría aplicar también a animales. Se desvela en el presente documento un método para evaluar la eficacia de un fármaco o régimen de tratamiento, comprendiendo el método el tratamiento de un individuo que lo necesita con un fármaco o régimen de tratamiento y luego controlar la progresión o gravedad de la enfermedad tras el tratamiento midiendo los niveles de ácidos nucleicos con reordenamientos somáticos como un biomarcador de la enfermedad.

Se desvela en el presente documento un método para controlar la destrucción celular, en el que la destrucción de células utilizando un fármaco o régimen de tratamiento se controla por la liberación de ácido nucleico que comprende un reordenamiento somático.

Cancer Res 2007; 67: (19). 1 de octubre de 2007 p 9364 – 9370 desvela el control de destrucción celular en un modelo animal.

Si se está tratando un paciente con un fármaco u otra terapia, por ejemplo, cirugía, o radioterapia o quimioterapia, se puede controlar la eficacia de ese tratamiento buscando los niveles del ácido nucleico que tiene reordenamientos en el paciente.

Los tratamientos adecuados incluyen el uso de cirugía, quimioterapia, radioterapia, anticuerpos monoclonales, terapia hormonal, y terapia direccionada molecularmente o una combinación de los mismos.

Además, cuando un paciente se ha tratado de una enfermedad y está en remisión, entonces se puede controlar el estado de remisión continuo, si el paciente sale de la remisión (recaída), entonces se puede reiniciar el tratamiento. Por lo tanto, controlando la progresión de la enfermedad, como se hace referencia en el presente documento, también incluye el control de recurrencia de la enfermedad después de la remisión, y opcionalmente el tratamiento de la enfermedad después de la recaída. La presente invención se puede utilizar para controlar la recaída después de un periodo, por ejemplo, de horas, días, semanas o meses después de la remisión o el último ciclo de tratamiento.

Se desvela en el presente documento un método para determinar la progresión del cáncer, comprendiendo el método:

- a) identificar un reordenamiento genómico adquirido somáticamente en un ácido nucleico de una muestra tumoral de un paciente por análisis genómico amplio mediante secuenciación de extremos emparejados.
- b) diseñar un ensayo cuantitativo para identificar y medir los reordenamientos genómicos adquiridos somáticamente;
- c) obtener unas o más muestras adicionales del paciente durante futuros estadios de terapia;
- d) utilizar los ensayos para medir los niveles de ácido nucleico con reordenamientos somáticos en las muestras obtenidas durante la etapa (a) y la etapa (c); y opcionalmente
- e) determinar la progresión y/o gravedad de la enfermedad del paciente comparando los niveles de ácidos nucleicos con reordenamiento somático que se mide en la etapa (d).

Como se desvela en el presente documento, se puede explorar una mujer embarazada para determinar si han pasado enfermedades hereditarias a sus hijos. Cuando se conoce que un padre tiene una afección que está asociada con un reordenamiento genómico adquirido somáticamente, la presencia de este reordenamiento se puede evaluar, por ejemplo en la sangre o el suero de la madre. Se desvela en el presente documento un método adecuado para controlar una enfermedad, comprendiendo el método:

a Identificar un reordenamiento genómico adquirido somáticamente asociado con un estado de enfermedad en un paciente, en el que la identificación se lleva a cabo por un análisis genómico amplio del ácido nucleico de ese paciente, y

5 b controlar los cambios en los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico, y/o cuantificar los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico, en una mujer embarazada como un marcador de la progresión o gravedad de una enfermedad en el feto.

10 Para evitar dudas, los términos “que comprende”, “comprender” y “comprende” en el presente documento tienen la intención por los inventores de que sean sustituibles opcionalmente por los términos “que consisten en”, “consistir en”, y “consiste en”, respectivamente, en cada caso. El término “aproximadamente” (o “alrededor” en todos los valores numéricos permite una variación del 5 %, es decir, un valor de aproximadamente un 1,25 % significaría desde entre 1,19 %-1,31 %.

15 Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de la presente invención se pueden emplear en distintas realizaciones sin alejarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más de estudio de rutina, numerosos equivalentes de los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Dichos equivalentes se considera que están en el alcance de la presente invención y están cubiertos por las reivindicaciones. Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica al que pertenece la presente invención.

25 El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza en conjunción con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las reivindicaciones se utiliza para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente que hace referencia a alternativas solamente o alternativas que son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporta una definición que se refiere solamente a las alternativas y “y/o”. A lo largo de la presente solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye una variación inherente de error para la medición, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las expresiones “que comprende” (y cualquier forma de que comprende, tal como “comprender” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de que tiene, tal como “tener” y “tiene”), “que incluye” (cualquier forma de que incluye, tal como “incluye” e “incluir”) o “que contiene” (y cualquier forma de que contiene, tal como “contiene” y “contener”) son inclusive y de extremos abiertos y no excluyen elementos adicionales, no mencionados o etapas del método.

40 La expresión “o combinaciones de los mismos” como se utiliza en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los artículos enumerados que preceden la expresión. Por ejemplo, “A, B, C, o combinaciones de los mismos” tiene la intención de incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC, y si el orden es importante en un contexto en particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC, o CAB. Continuando con este ejemplo, están expresamente incluidas las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más de los artículos o términos, tal como BB, AAA, AAAABCCCC, CBAAAA, CABABB, y así. El experto entenderá que normalmente no hay límite en el número de artículos o términos en cualquier combinación, a menos de que sea aparente otra cosa por el contexto.

45 Todas las composiciones y/o métodos desvelados y reivindicados en el presente documento se pueden fabricar y ejecutar sin experimentación innecesaria a la luz de la presente divulgación. Mientras las composiciones y métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será aparente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones se pueden aplicar a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento.

50 La presente invención se ejemplifica ahora en referencia a los siguientes ejemplos, que no son limitantes de la invención.

55 Métodos

Las siguientes etapas se emplean en el presente ejemplo de la invención

- 60
1. Identificación de reordenamientos genómicos específicos de un tumor por secuenciación masiva paralela.
  2. Mapear los reordenamientos en cuanto a resolución de pares de bases.
  3. Diseñar ensayos basados en PCR para la cuantificación sensible y específica de la carga tumoral.
  4. Extracción de ADN libre del suero y cuantificación de la carga tumoral con controles apropiados.

**Identificación de reordenamientos específicos de un tumor por secuenciación masiva paralela**

El ADN genómico se extrae de la muestra tumoral utilizando la extracción con fenol-cloroformo u otros protocolos convencionales. Se preparan bibliotecas a partir del ADN tumoral de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante de la plataforma de secuenciación masiva paralela que se va a utilizar. Para la plataforma de secuenciación Solexa (Genome Analyzer, Illumina, San Diego CA), el ADN genómico (5 µg) se corta aleatoriamente utilizando el nebulizador suministrado con el instrumento Analizador de Genoma de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN fragmentado se repara en sus extremos utilizando la T4 ADN polimerasa y la Klenow polimerasa con la T4 polinucleótido cinasa para fosforilar los extremos 5'. Se crea una protuberancia A 3' utilizando un fragmento Klenow deficiente en exonucleasa 3'-5', y se ligan los oligonucleótidos adaptadores de finales emparejados a los extremos pegajosos creados de esta manera. La mezcla de unión se somete a electroforesis en un gel de agarosa y se selecciona por tamaño escindiendo los fragmentos de ADN de 400-500 pares de bases de longitud. El ADN se extrae del gel y se enriquece con los fragmentos con los cebadores Solexa en cada extremo por una reacción PCR de ciclo limitado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La celda de flujo del Analizador de Genoma de extremos emparejados se prepara en la estación de agrupamiento que se proporciona de acuerdo con el protocolo del fabricante. Entonces los agrupamientos de colonias de PCR se secuencian en la plataforma del Analizador de Genoma utilizando los protocolos recomendados por el fabricante. La secuenciación de extremos emparejados de al menos 35 pb de cada extremo proporciona la cobertura óptima para identificar reordenamientos, aunque se pueden con lecturas de longitudes más largas, lecturas de extremo único. Las imágenes del aparato se procesan utilizando el software del fabricante para generar archivos de secuencias FASTQ.

La mayoría de la generación actual de plataformas de secuenciación masiva paralela se puede utilizar para identificar reordenamientos genómicos, incluyendo la plataforma SOLiD (Applied Biosystems) y el secuenciador 454 (Roche). El tamaño de las inserciones más grandes aumenta la cobertura, y permite una mayor fiabilidad de reconocimiento de agrupamientos de reordenamientos. Cuando los datos de secuenciación del ADN constitucional (línea germinal) del mismo paciente están disponibles, se pueden utilizar para ayudar a la distinción entre la línea germinal y los reordenamientos somáticos.

Los datos de secuencia se alinean con el genoma humano de referencia, utilizando cualquiera de los paquetes disponibles libremente. Los inventores utilizaron el algoritmo v0.43 MAQ (disponible en <http://maq.sourceforge.net/maq-man.shtml>). Las lecturas en las que falla el alineamiento de los dos extremos con el genoma en la orientación correcta y distancia de separación se exploraron adicionalmente con el algoritmo SSAHA.

*Retirada de artefactos*

Las lecturas en las que los dos externos se mapean a 500 pb entre ellos, pero uno de los dos extremos está en la orientación incorrecta se excluyen del análisis, ya que es probable que sean artefactos debido a su mal cebamiento en la colonia de PCR o reordenamientos intra-moleculares generados durante la amplificación de la biblioteca. Las lecturas que tienen duplicados exactos entre ellos (creados durante la etapa de enriquecimiento por PCR) se identifican por el hecho de que los dos extremos de las secuencias se mapean en localizaciones genómicas idénticas: solo se retiene el fragmento con la mayor calidad de mapeo. El mapeo de ADN engañoso por huecos de secuencia en el genoma de referencia se reduce excluyendo las regiones a 1 Mb de huecos de secuencia centroméricas o teloméricas del análisis del número de copias y el análisis de reordenamiento (véase una lista de los huecos actuales, por ejemplo, en: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>).

*Algoritmo de número de copias*

Para corregir la variación de niveles de singularidad a lo largo del genoma, se lleva a cabo una simulación *in silico* de cortas lecturas de extremos emparejados creando secuencias emparejadas de 35 bases cada extremo, separados 500 pb (o el equivalente si se han utilizado diferentes bibliotecas), con parejas simuladas localizadas cada 35 pb a lo largo del genoma. Estas lecturas simuladas se mapean en el genoma utilizando el algoritmo MAQ. Basándose en esto, el genoma se divide en ventanas de anchura desigual, sin solapamiento que contienen un número constante de lecturas *in silico* mapeadas con alta singularidad. Una vez fijados los límites de la ventana, se cuentan las lecturas de extremos emparejados que se mapean únicamente en cada ventana. Esto forma la entrada bruta en un algoritmo de segmentación circular binario desarrollado originalmente para los datos de micromatriz de hibridación genómica. Este algoritmo, implementado en R como la biblioteca de copias de ADN del proyecto Bioconductor (véase <http://www.bioconductor.org/>), identifica los puntos de cambio en el número de copias por segmentación binaria iterativa. Los inventores utilizaron  $\alpha = 0,01$ , junto con un parámetro de alisado de 2 y 2 desviaciones estándar para eliminar los falsos positivos probables tras la segmentación, aunque el modelado generalmente da resultados similares para diferentes elecciones de parámetros.

**Mapeo de reordenamientos para la resolución de pares de bases**

Se utilizaron los siguientes criterios para priorizar las lecturas de mapeo incorrectas para la exploración de confirmación:

1.  $\geq 2$  lecturas que abarquen el mismo reordenamiento;
2. Mapeo de alta confianza para ambos extremos;
3. Mapeo de lecturas separadas  $< 100$  kb en el mismo cromosoma;
4. Mapeo de ambos extremos a  $100$  kb de un punto de cambio en el número de copias identificado por el algoritmo de segmentación.

Los cebadores se diseñan para abarcar el posible punto de ruptura localizándolos en las lecturas de extremos pareados en el lado exterior de  $1$  kb, para un tamaño del producto máximo de  $1$  kb. Se llevaron a cabo las reacciones PCR en el ADN genómico y tumoral para cada grupo de cebadores. Los productos que producen una banda se secuencian por métodos de capilaridad de Sanger y se comparan con la secuencia de referencia para identificar puntos de ruptura. Los reordenamientos adquiridos somáticamente, específicos de un tumor se definen como las reacciones PCR que dan una banda convincente en el ADN tumoral con una banda no coincidente de ADN normal, que se ve al menos en dos reacciones por separado, junto con los datos de mapeo de secuencia inequívoco que sugieran un reordenamiento.

De manera alternativa, los reordenamientos se pueden mapear por ensamblaje *de novo* a lo largo del punto de ruptura. Esto se consigue extrayendo las lecturas de extremos emparejados en las que uno extremo se mapea en la localización del punto de ruptura. Estas lecturas se pueden ensamblar en contiguas más largas, que se pueden alinear con el genoma de referencia para identificar la localización exacta de las rupturas.

**Diseño de ensayos basados en PCR para la cuantificación de reordenamientos específicos de un tumor**

Los inventores han descubierto que la PCR hibridada es un método sensible y específico para la amplificación de reordenamientos genómicos específicos de un tumor.

Cada reordenamiento somático estructural confirmado se evalúa por su idoneidad como marcador de ADN.

*Cambio del número de copias*

Es importante seleccionar los marcadores de ADN presentes en la mayoría de las células tumorales. Las exploraciones de reordenamientos se llevan a cabo en ADN tumoral derivado de una población de células, por lo que el resultado del experimento de secuenciación es una media de reordenamiento en la población celular tumoral. Los inventores buscaban utilizar los reordenamientos que i) sean prevalentes en los datos de secuenciación y ii) tengan claros cambios del número de copias, ya que estos estarán presentes en la mayoría (o todas) las células tumorales.

*Singularidad del ADN circundante*

Cada ensayo debe ser específico de un reordenamiento particular. La naturaleza repetitiva del genoma significa que las secuencias no únicas repetitivas están localizadas en múltiples posiciones a lo largo del genoma. Con el fin de obtener ensayos altamente específicos, las secuencias repetitivas que rodean cada punto de ruptura se enmascaran utilizando un software de enmascaramiento repetido ([www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)). Esto excluye una proporción de punto de ruptura adquiridos somáticamente de análisis posteriores debido a las repeticiones circundantes cercanamente. Para algunas uniones de punto de ruptura, no se desenmascaran o solamente los tramos cortos de nucleótidos. Esto permite que se diseñen ensayos específicos para estos reordenamientos si se evitan las secuencias repetidas.

*Número de ensayos*

Los inventores tenían como objetivo diseñar sondas para 3-4 reordenamientos específicos de un tumor por paciente. Tener múltiples ensayos por paciente aumenta la confianza en el resultado final, aunque no siempre es posible identificar este número adecuado de reordenamientos en cada paciente. Los ensayos específicos tumorales se llevan a cabo junto con 4 ensayos de control que se diseñan para reconocer las regiones de tipo silvestre del genoma.

*Ensayo I diseño de oligos*

Los inventores utilizan una estrategia de PCR hibridada para identificar reordenamientos específicos de cáncer a partir del alto fondo de ADN circulante derivado de células normales. Los cebadores se diseñan utilizando el cebador 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) para evitar la secuencia repetitiva y abarcar el punto de ruptura del reordenamiento. El tamaño del producto de PCR inicial debería mantenerse en un mínimo ( $< 200$  pb) debido a que el ADN tumoral circulante tiende a ser más abundante en este intervalo de tamaño. La secuencia amplificada en la 1ª ronda de PCR



se utiliza como matriz para diseñar un ensayo de PCR cuantitativa estilo sonda de ADN marcada doblemente ("taqman") utilizando el software Beacon Designer (Premier Biosoft International). Este programa selecciona los cebadores y una sonda de ADN marcada doblemente [5' FAM, 3' BHQ1]. Debido a las restricciones de tamaño estrictas, a veces se necesita el solapamiento entre los cebadores en tiempo real y de la 1ª ronda.

5

## **Extracción del ADN del plasma/suero y cuantificación de la carga tumoral**

### *Extracción de ADN*

10 Los residuos se eliminan del plasma o suero del paciente por centrifugación a 16.000 g durante 10 minutos. El ADN se extrae de los 2-20 ml del sobrenadante resultante utilizando un kit QIAamp MinElute Virus Vacuum (Qiagen). El ADN se eluye en 20 µl del tampón de elución suministrado y se utiliza el volumen completo como matriz de la siguiente PCR.

### 15 *PCR múltiple*

La cantidad de ADN completa extraída de los 2-20 ml de plasma del paciente (o la dilución en serie de 10 veces derivada de este) se combina con todos los cebadores de la 1ª ronda de PCR junto con los cebadores de la 1ª ronda de la región de control y se someten a 20 ciclos en una PCR múltiple. La combinación de todos los cebadores asegura que esté disponible la mayor cantidad de ADN posible para cada grupo de cebadores.

20

### *PCR en tiempo real*

25 Se hicieron diluciones seriadas de 10 veces del producto PCR hibridado y se utilizaron 5 µl como matriz en reacciones PCR en tiempo real individuales utilizando los cebadores y sondas específicos de reordenamiento.

### *Cuantificación*

30 La utilización de diluciones en serie del ADN tumoral del paciente en ADN normal (o agua) permite la producción de una curva de referencia, ya que la cantidad de ADN tumoral (en pg) es conocida. La utilización de la curva de mejor ajuste aplicada a las referencias permite entonces la interpolación de la cantidad de ADN tumoral presente en el volumen de plasma/suero conocido. En la experiencia de los inventores, la PCR en tiempo real hibridada es capaz de detectar hasta 1 copia del reordenamiento diana presente en el volumen completo de plasma analizado.

## 35 **Resultados**

Los inventores investigaron dos pacientes con cáncer de mama metastático. Se utilizó la secuenciación masiva paralela de extremos emparejados para identificar los reordenamientos genómicos adquiridos somáticamente a partir de los genomas de ambos cánceres primarios y se diseñaron los ensayos de PCR para la amplificación a lo largo de múltiples reordenamientos de cada genoma (véase la Figura 1 posteriormente). Los productos de la PCR se secuenciaron para identificar los puntos de ruptura con una resolución de par de bases. Después, los inventores diseñaron los ensayos PCR en tiempo real para amplificar y cuantificar la cantidad de ADN tumoral. Tras confirmar el éxito del diseño de PCR en el ADN del cáncer, los inventores examinaron entonces las muestras de plasma que se tomaron en la primera presentación de la enfermedad en ambos casos. El ADN se extrajo a partir de 2 ml de plasma se analizó por los ensayos en tiempo real específicos del paciente que diseñaron. La Figura 1 muestra los resultados de las reacciones PCR en tiempo real. Las curvas muestran la cantidad de fluorescencia generada por las sondas (Taqman) en tiempo real en el eje y con el número de ciclos de PCR en el eje x. La línea oscura horizontal aproximadamente en la mitad de cada gráfico de la figura 1 marca el nivel de fluorescencia en el que se considera que la reacción alcanza la positividad, de manera que cuanto antes (más a la izquierda) la curva cruce el umbral, mayor es la cantidad de ADN diana en la reacción. Las curvas derivadas del ADN plasmático de individuos normales (el control negativo de la reacción) y las curvas que muestran las diluciones en serie de 10 veces del plasma del paciente en agua se identifican por flechas separadas en la Figura 1. El gráfico de la izquierda de cada paciente muestra los resultados de los reordenamientos específicos del tumor. Claramente, las muestras de plasma del paciente son positivas, mientras que el plasma de control negativo (de un individuo normal) es completamente negativo. El gráfico de la derecha para cada paciente muestra el resultado de una región normal del genoma (control positivo) que, como se esperaba, es positivo tanto en pacientes como en el control normal.

55

Figura 1: Detección cuantitativa de reordenamientos genómicos en el ADN plasmático de pacientes con cáncer de mama: se identificaron los reordenamientos genómicos adquiridos somáticamente se identificaron en los cánceres de mama primarios de los pacientes con enfermedad metastática por secuenciación masiva paralela. El ADN extraído de 2 ml de plasma tomados en el momento del diagnóstico, y las diluciones en serie de 10 veces se exploraron por PCR hibridada con una ronda final de PCR en tiempo real. La detección robusta de los reordenamientos (1 mostrados y 2 otros no mostrados de cada paciente) era posible en ambos pacientes. La comparación de reacciones específicas del tumor y de control en las series de dilución sugieren que en cada paciente la relación de ADN específico del tumor respecto al ADN total en el plasma es de 1:10, la cantidad total del ADN plasmático extraído era ~ 100 x mayor para el paciente PD3722a que para el PD3770a.

65

Los resultados muestran que estos reordenamientos somáticos pueden detectarse cuantitativamente en el ADN plasmático. En particular, se pueden demostrar las siguientes características clave del ensayo a partir de los análisis:

- 5 • El ensayo es altamente sensible, ya que los análisis eran positivos incluso con una dilución del plasma (1:10 de dilución para el primer paciente, y 1:1000 para el segundo paciente, equivalente a la detección de una señal en el ADN a partir de solo 2 µl de plasma, aunque el volumen de partida era de 2 ml).
- El ensayo es altamente específico, ya que el ADN de plasma normal no revelaba señal, incluso con la PCR hibridada.
- 10 • El ensayo es cuantitativo, ya que las diluciones de plasma mostraban aumentos lineales en el  $C_t$ , con una fuerte separación entre las curvas.

Posteriormente los inventores analizaron las muestras en serie de un tercer paciente con cáncer que se había sometido a quimioterapia (Figura 2 posteriormente). Como hicieron los inventores con los dos primeros pacientes, se llevó a cabo la exploración genómica amplia de reordenamientos utilizando secuenciación masiva paralela para identificar los reordenamientos adquirida somáticamente. Dos de estos se seleccionaron para el diseño del ensayo. Las diluciones en serie de ADN tumoral se hicieron en ADN normal.

La Figura 2A muestra el análisis de los reordenamientos 1 y 2 en reacciones duplicadas por medio de una serie de dilución de ADN tumoral en ADN normal. Cuando el  $C_t \leq 27$ , la cantidad absoluta de ADN tumoral se puede estimar a partir de la línea de mejor ajuste. Para el  $C_t > 27$ , la enfermedad solo se puede clasificar como detectable o indetectable. Sin embargo, el ensayo parece capaz de detectar una única copia del reordenamiento presente en la reacción. La Figura 2B muestra la cantidad estimada de ADN tumoral por ml de suero de 6 muestras recolectadas en puntos de tiempo señalados en el curso clínico del paciente.

El panel A de la Figura 2 muestra la comprobación de los ensayos en experimentos replicados de las diluciones en serie. Los resultados demuestran que los análisis son robustos, reproducibles y cuantificables linealmente hasta aproximadamente 25 pg de ADN por reacción. Dado que una célula humana diploide contiene ~ 6,75 pg de ADN, esto es equivalente a ~ 4 genomas por reacción. Con cantidades menores de ADN tumoral en la reacción (5 pg y 10 pg por reacción), los inventores descubrieron que las reacciones son o positivas o negativas (que se muestran como puntos en la parte derecha del gráfico). Esto implica que en las reacciones negativas, no estaban presentes copias de reordenamiento, mientras que en las reacciones positivas estaban presentes 1 o 2 copias. Un hallazgo principal por lo tanto es que el ensayo de PCR en tiempo real hibridada sería capaz de detectar una única copia del reordenamiento presente en muchos mililitros de sangre.

A continuación los inventores exploraron muestras de suero en serie del paciente recolectadas en puntos de tiempo durante su quimioterapia (Figuras 2B y 2C). Desafortunadamente, no había disponibles muestras de antes de comenzar la terapia. Sin embargo desde el punto medio de su quimioterapia de primera línea hasta el final de la quimioterapia de la segunda línea, la enfermedad residual era detectable en el suero en los límites de detección del ensayo. Desafortunadamente ella sufrió la progresión clínico al mes o dos de completar la quimioterapia, y se asoció con un aumento en los niveles de enfermedad detectables en su suero. En el momento de programar la quimioterapia de último recurso, los niveles de enfermedad aumentaron adicionalmente.

Estos análisis en serie demuestran que el ensayo es capaz de detectar la enfermedad incluso cuando está presente en cantidades mínimas clínicamente, y que la cuantificación de la carga de enfermedad se correlaciona con la progresión de la enfermedad.

### Estudios futuros

#### Objetivos:

Los inventores tenían la intención de medir la significación pronóstica de los reordenamientos específicos del tumor cuantificados en el ADN plasmático para:

- 55 1. 100 pacientes con cáncer de mama no metastático tratado en un cuadro de terapia adyuvante;
2. 100 pacientes con un estadio III o estadio II avanzado de carcinoma colorrectal.

#### *Cáncer de mama no metastático*

60 El cáncer de mama es responsable del 16 % de muertes por cáncer en mujeres en el RU. Para los pacientes sin metástasis distal conocida en el momento del diagnóstico, el tratamiento en general se suministra en un intento curativo, pero las tasas de recaída varían entre un 20-40 % a los 5 años dependiendo de la implicación ganglionar localizada, el tamaño del tumor primario y el estado del receptor de estrógenos. Sigue habiendo muchas preguntas sin respuesta respecto al uso de terapia adyuvante en este cuadro clínico, y sería de incalculable valor un método preciso para cuantificar la carga de enfermedad para establecer regímenes de tratamiento personalizado y optimizar la intensidad de tratamiento y la duración.

*Cáncer colorrectal de estadio III y estadio II de alto riesgo*

El cáncer colorrectal es responsable del 10 % de todas las muertes por cáncer en el RU. Casi la mitad de los pacientes presentan una enfermedad en estadio II de alto riesgo o estadio III, y este grupo tiene una supervivencia total en 5 años del 33 %-75 % dependiendo de la extensión en el intestino local y la implicación ganglionar. Por esta razón, los métodos para estadificar los pacientes con precisión en las categorías de riesgo basándose en la persistencia de la enfermedad tras la cirugía debería ser particularmente útil para el manejo clínico.

**Plan de investigación***Inscripción de pacientes y recolección de muestras*

Los pacientes con cáncer de mama en estadio temprano que se van a tratar con cirugía y terapia adyuvante se inscribirán en el ensayo. Dichas mujeres se revisaron en una clínica oncológica pre-quirúrgica, y aquí donde se abordaron, consintieron e inscribieron en el estudio. En la cirugía, se tomará la muestra de cáncer de mama por la enfermera de investigación para el laboratorio de Patología, donde se congeló inmediatamente una parte del tumor que no se necesitaba para fines diagnósticos para la extracción posterior de ADN. Se extraerán muestras en serie de 20 ml y se congelarán en señalizaciones importantes durante la ruta de atención al cáncer del paciente: pre-cirugía; post-cirugía (clínica de planificación de terapia adyuvante); final de la quimioterapia (para pacientes negativos al ER) o durante la terapia hormonal (positivos al ER); cada 6 meses durante el seguimiento; en el momento de la remisión clínica. Las muestras se recolectarán para la evaluación de las células tumorales circulantes por métodos inmunológicos tras la cirugía y al final de la quimioterapia. El ADN normal se extraerá de los leucocitos de sangre completa.

Los pacientes con cáncer colorrectal es estadio III o estadio II de alto riesgo sometidos a resección del tumor primario en un intento curativo se inscribirán en el ensayo. Dichos pacientes se manejan por un equipo multidisciplinario específico, que incluye cirujanos, médicos oncólogos y enfermeras especialistas, para todas las fases de estadificación/diagnóstico, cirugía, terapia adyuvante y seguimiento post-tratamiento. Los pacientes consentirán y se inscribirán en el estudio en la revisión pre-quirúrgica. En el momento de la cirugía, la muestra de cáncer colorrectal se tomará por la enfermera de investigación para el laboratorio de Patología, donde una parte del tumor no necesaria para fines diagnósticos se congelará inmediatamente para la extracción posterior de ADN. Se extraerán muestras en serie de 20 ml de plasma y se congelarán en señalizaciones importantes durante la ruta de atención del cáncer del paciente; pre-cirugía; post-cirugía (clínica de planificación de terapia adyuvante); final de la quimioterapia; cada 6 meses durante el seguimiento; en la remisión clínica. El ADN normal se extraerá de los leucocitos de la sangre completa.

*Secuenciación de extremos emparejados*

En resumen, los protocolos convencionales que se han descrito anteriormente se seguirán para generar bibliotecas de fragmentos de 400-500 pb para iniciar la secuenciación utilizando lecturas de extremos emparejados de 37 pb. Estos se utilizarán para la secuenciación masiva paralela con el fin de generar lecturas emparejadas de 60 millones de fragmentos, lo que es suficiente según la experiencia de los inventores para identificar > 50 % de reordenamientos genómicos somáticos presentes en la muestra. Utilizando algoritmos establecidos, los inventores priorizarán los reordenamientos para la PCR de confirmación y la secuenciación capilar del punto de ruptura – esta etapa incluye la PCR a lo largo de la muestra de ADN normal del paciente para probar que el reordenamiento está adquirido somáticamente.

*Cuantificación de reordenamientos específicos de un tumor en el ADN plasmático*

Inicialmente, se tomarán 4 reordenamientos adquiridos somáticamente directamente para el diseño del ensayo. Estos se escogerán basándose en:

- Presencia en la mayoría de células tumorales – esto se estima mejor tomando los reordenamientos que demarcan cambios integrales en el número de copias (permitiendo la contaminación celular normal).
- Único ADN presente en el punto de ruptura – la ausencia de repeticiones en los amplicones de PCR mejorará la especificidad del ensayo.
- Implicación de genes cancerosos, si es posible – por ejemplo, las eliminaciones de *CDKN2A* o el primer reordenamiento en la amplificación *ERBB2* es más probable que estén presentes en todas las células, incluyendo las que en último término recaen.

Los ensayos se basarán inicialmente en una primera ronda de 20 ciclos de PCR con cebadores diseñados para amplificar un producto no mayor de 200 pb (debido al pequeño tamaño de los fragmentos de ADN tumoral circulante), seguido por una segunda ronda hibridada de PCR en tiempo real con una sonda Taqman. Las series de dilución de ADN tumoral y los amplicones de control se utilizarán para estimar la fracción relativa de ADN plasmático que deriva de las células tumorales, así como la cantidad total (véase la figura para los ejemplos). Los inventores han descubierto que esta estrategia da una cuantificación lineal precisa, reproducible.

5 El ADN se extrajo en lotes de las muestras de plasma congeladas utilizando los protocolos establecidos y se analizan en lotes con las referencias cuantitativas descritas anteriormente. La amplificación de regiones normales de control del genoma se utilizará para estimar la cantidad total de ADN desnudo que está presente en el plasma. Es probable que los inventores expresen la cuantificación del ADN tumoral como una fracción del ADN desnudo del plasma, aunque puede ser posible cuantificar el ADN tumoral circulante como una concentración absoluta.

*Correlación con el resultado clínico y cálculos de potencia*

10 El análisis estadístico se enfocará en tres cuestiones: Significación pronóstica de mediciones individuales en puntos de tiempo señalizados (presentación, post-cirugía, y terminación de la terapia); capacidad para cuantificar la destrucción celular inducida por fármacos por evaluación de los aumentos transitorios y posterior caída del ADN plasmático específico del tumor; y fiabilidad para predecir la recaída latente mediante la identificación de niveles crecientes antes de que se desarrollen complicaciones, clínicas. Los cálculos de potencia muestran que por  
15 comparación de dos grupos de 25 pacientes estadificados en una estimación ctADN, se podría detectar una relación de riesgo de 2,2 con un 80 % de potencia (basándose en un estudio de 60 meses con una mediana de supervivencia libre de enfermedad de 30 meses en el grupo de peor pronóstico). Serán posibles análisis pronósticos adicionales con el grupo de datos, tales como la correlación de marcadores de inestabilidad genómica total con resultado y asociación de patrones particulares del reordenamiento genómico con la supervivencia.

20 **Declaraciones de la invención**

A Un método adecuado para controlar una enfermedad, comprendiendo el método:

25 a) identificar un reordenamiento genómico adquirido somáticamente asociada con un estado de enfermedad en un paciente, en el que la identificación se lleva a cabo por análisis genómico amplio del ácido nucleico del paciente, y

30 b) controlar los cambios en los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico y/o cuantificando los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento, como un marcador de la progresión o gravedad de una enfermedad en ese paciente.

B Un método de acuerdo con la declaración A en el que la enfermedad es un cáncer.

35 C Un método de acuerdo con la declaración B en el que la enfermedad es un tumor sólido.

D Un método de acuerdo con cualquiera de las declaraciones anteriores en el que el análisis de ácido nucleico en (a) se lleva a cabo en tejido tumoral de biopsia o resecado quirúrgicamente.

40 E Un método de acuerdo con cualquiera de las declaraciones anteriores en el que el análisis genómico amplio se lleva a cabo por secuenciación del ADN.

F Un método de acuerdo con cualquiera de las declaraciones anteriores en el que el análisis genómico amplio es un método de secuenciación masivo paralelo.

45 G Un método de acuerdo con la declaración E o la declaración F en el que la secuenciación se lleva a cabo utilizando secuenciación de extremos emparejados.

50 H Un método de acuerdo con cualquiera de las declaraciones anteriores en el que la etapa de control de (b) es un ensayo de PCR.

I Un método de acuerdo con cualquiera de las declaraciones anteriores en el que la etapa de control de (b) se lleva a cabo en el ácido nucleico de un fluido corporal.

55 J Un método de acuerdo con la declaración A que comprende adicionalmente la etapa de tratar el paciente cuando sea necesario, o parar el tratamiento cuando sea necesario, como se indique por el nivel o cambio del nivel de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico.

60 K Un método de acuerdo con la declaración A que comprende adicionalmente la etapa de determinar un régimen de tratamiento para tratar un paciente basándose en el nivel o cambio en los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico.

L El uso de un reordenamiento genómico específico del paciente como un biomarcador de la progresión de la enfermedad en ese paciente.

65 M El uso de un procedimiento de control de acuerdo con la declaración A en la evaluación de la eficacia de un fármaco u otro tratamiento terapéutico.

N El uso de un procedimiento de control de acuerdo con la declaración M en la evaluación de la eficacia de la resección quirúrgica de tejido canceroso.

5 O Un método para controlar una enfermedad, comprendiendo el método el control de los cambios en los niveles de ácido nucleico que contiene un reordenamiento genómico, y/o cuantificar los niveles de ácido nucleico que contienen un reordenamiento genómico, en el que el reordenamiento genómico es una mutación adquirida somáticamente asociada con una progresión o gravedad de la enfermedad de un paciente, y en el que la identificación del reordenamiento se ha llevado a cabo por análisis genómico amplio del ácido nucleico del paciente.

10 P Un método de acuerdo con la declaración A u O en el que el control de cambios en los niveles del ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico, y/o la cuantificación de los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico, se llevan a cabo en una muestra de un paciente en remisión.

15 Q Un método o uso de acuerdo con cualquiera de las declaraciones anteriores en el que se controlan múltiples reordenamientos genómicos adquiridos somáticamente.

20 R Un método de tratamiento médico, comprendiendo el método tratar con un tratamiento adecuado, o cambiar el tratamiento, o parar el tratamiento de un paciente en el que se ha identificado un cambio en el nivel de ácido nucleico que contiene un reordenamiento genómico identificado de acuerdo con las declaraciones A u O.

**REIVINDICACIONES**

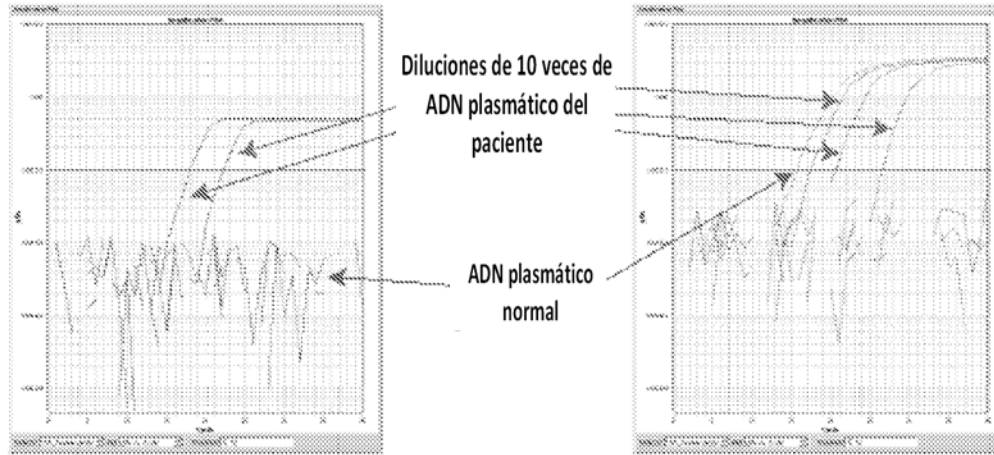
1. Un método para controlar un cáncer de mama, comprendiendo el método:
- 5        controlar los cambios en los niveles de ácido nucleico que contiene un reordenamiento genómico y/o cuantificar los niveles de ácido nucleico que contiene un reordenamiento genómico, en donde el reordenamiento genómico es una mutación adquirida somáticamente asociada a la progresión o la gravedad del cáncer de mama en un paciente, y en donde la identificación del reordenamiento se ha llevado a cabo por análisis genómico amplio del ácido nucleico de ese paciente o se lleva a cabo por análisis genómico amplio del ácido nucleico de ese paciente, y en donde dicho control es un ensayo de PCR hibridada que se lleva a cabo en el ácido nucleico de un fluido corporal, en donde dicho fluido corporal es sangre, suero o plasma.
- 10
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el análisis de ácido nucleico se lleva a cabo en un tejido tumoral de biopsia o resecado quirúrgicamente.
- 15
3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el análisis genómico amplio se lleva a cabo por secuenciación de ADN.
4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el análisis genómico amplio es un método de secuenciación masiva paralela.
- 20
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4 en el que la secuenciación se lleva a cabo utilizando secuenciación de extremos emparejados.
- 25
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de tratar al paciente cuando sea necesario, o parar el tratamiento del paciente cuando sea necesario, según lo indique el nivel o el cambio de nivel de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico.
- 30
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de determinar un régimen de tratamiento para tratar a un paciente basándose en el nivel o el cambio en los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el control del cáncer de mama se controla en cuanto a la progresión del cáncer de mama.
- 35
9. El uso *in vitro* de un método de control de acuerdo con la reivindicación 1 en la evaluación de la eficacia de un fármaco u otro tratamiento terapéutico, tal como en la evaluación de la eficacia de la resección quirúrgica del tejido canceroso.
- 40
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el control de los cambios del ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico, y/o la cuantificación de los niveles de ácido nucleico que contiene el reordenamiento genómico, se llevan a cabo en una muestra de un paciente en remisión.
- 45
11. Un método o un uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que se controlan los reordenamientos genómicos adquiridos somáticamente.

Figura 1

**A** PD3770a

Reordenamiento específico de un tumor

Región de control



**B** PD3772a

Reordenamiento específico de un tumor

Región de control

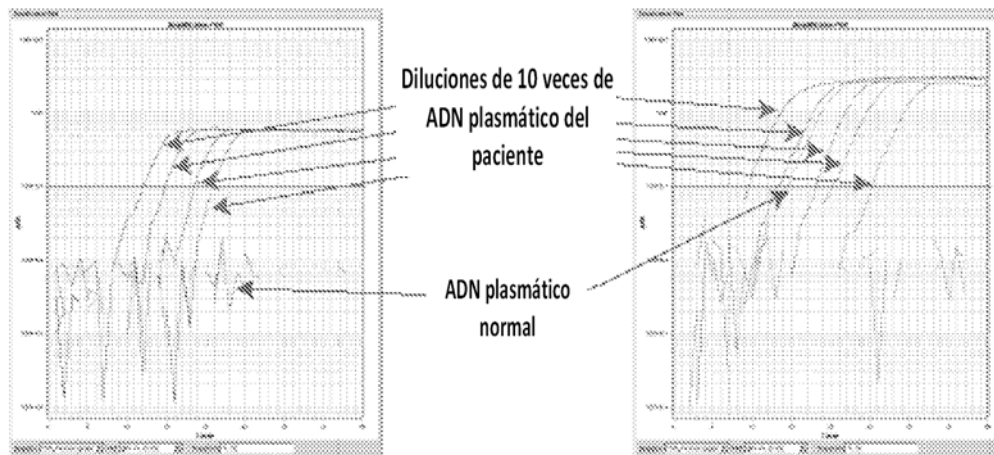


Figura 2

A

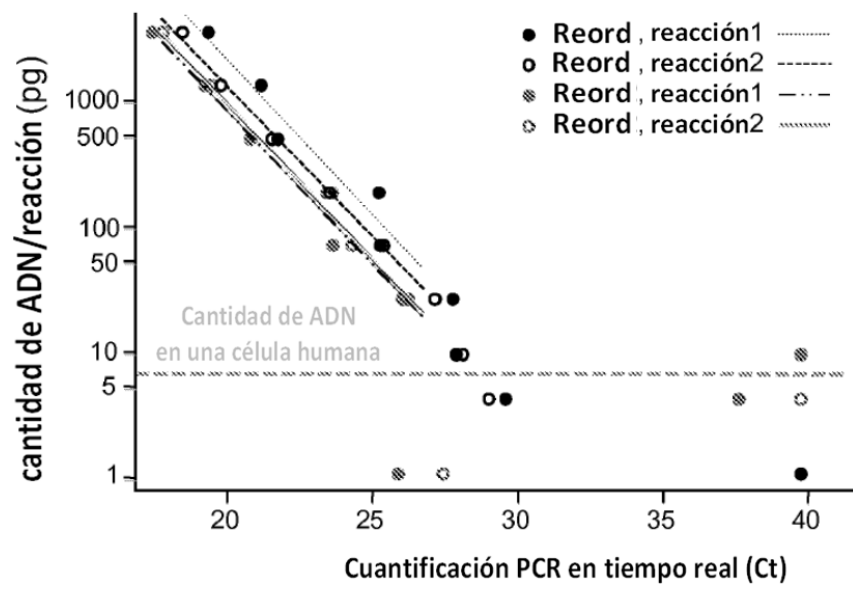




Figura 2

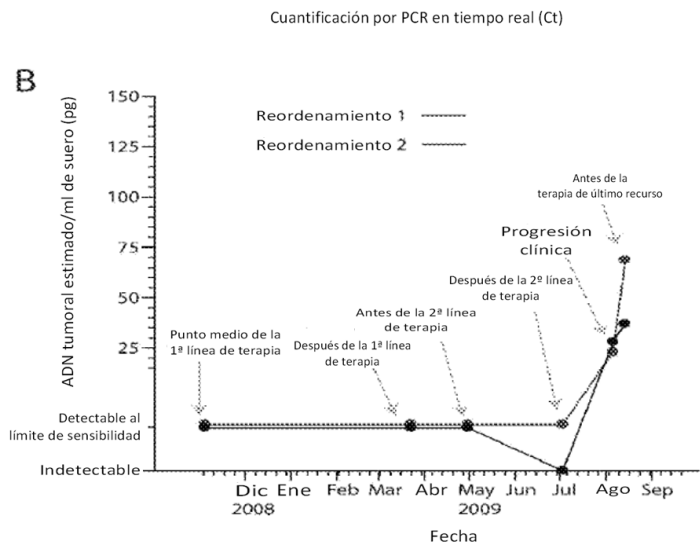


Figura 2

C

