

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 598**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/EP2014/054409**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14135669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14708273 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2964781**

54 Título: **Análisis de sangre para la detección de mutaciones de EGFR**

30 Prioridad:

08.03.2013 US 201361774946 P
03.10.2013 US 201361886619 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KLUGHAMMER, BARBARA;
MELDGAARD, PETER;
SORENSEN, BOE;
TSAI, JULIE;
WEN, WEI y
WU, LIN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 662 598 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

Análisis de sangre para la detección de mutaciones de EGFR

5 Se proporcionan procedimientos mejorados de evaluación del estado de un cáncer con tumores sólidos (por ejemplo, CPNM) en un sujeto que implican la detección de mutaciones asociadas a tumor, que están, por ejemplo, en la secuencia de ácido nucleico de EGFR, en la sangre del sujeto. La invención proporciona además un procedimiento de identificación de un paciente con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) candidato para un tratamiento farmacológico dirigido, que comprende: detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutadas en la sangre del paciente; evaluar el estado metastásico del paciente con CPNM como M1a o M1b; e identificar al paciente como candidato para el tratamiento farmacológico dirigido en base a al menos la presencia detectada de las una o más secuencias de EGFR mutadas en la sangre del paciente y el estado metastásico del CPNM en el paciente.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las mutaciones de líneas germinales y somáticas que afectan a diversas vías de proliferación celular pueden influir en el desarrollo de cáncer en pacientes. Por ejemplo, la adquisición de mutaciones somáticas que confieren una ventaja en el crecimiento sobre las células que poseen dichas mutaciones se considera un factor importante en la aparición y progresión de tumores cancerosos. A medida que se identificaron varias de dichas mutaciones, se desarrollaron tratamientos que se dirigen a las proteínas codificadas por los genes mutados, así como tratamientos que se dirigen a las vías de señalización en las que están implicados estos genes mutados. A medida que se implementaron en la práctica clínica estos tratamientos dirigidos, se descubrió que las mutaciones que conferían resistencia a los tratamientos dirigidos se desarrollan y se acumulan en los tumores cancerosos de los pacientes, lo que hace que con el tiempo el tratamiento sea ineficaz y sea necesario cambiar la tanda del tratamiento.

Un ejemplo de un cáncer con tumores sólidos en el que se sabe que las mutaciones tumorales somáticas desempeñan un papel importante es el cáncer de pulmón, que es la causa principal de mortalidad relacionada con cáncer en muchos países, incluyendo los Estados Unidos. Aproximadamente un 75 % de los casos de cáncer de pulmón pertenecen al carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), que tiene una tasa de supervivencia global en 5 años de aproximadamente un 12 %. El tratamiento quirúrgico estándar, así como la quimioterapia y las radioterapias, están disponibles en el campo del CPNM. Sin embargo, la mayoría de los casos de CPNM se diagnostican inicialmente en el estadio tardío inoperable, y la recaída es común después de la intervención quirúrgica, quimioterapia, radioterapia y otros tratamientos. Por consiguiente, el tratamiento y diagnóstico de CPNM es un problema médico que representa un reto. Un intento de abordar el problema fue el desarrollo de los tratamientos farmacológicos dirigidos que interfieren con la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR, que es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de las tirosina cinasas, afecta a las vías de señalización relacionadas con la división celular y está implicado en el desarrollo y progresión del CPNM.

Los fármacos con moléculas bien caracterizadas erlotinib y gefitinib, que inhiben la actividad tirosina cinasa del EGFR, se valoraron y se aprobaron para el tratamiento de CPNM en estadio tardío. Se descubrió, sin embargo, que estos fármacos no fueron eficaces en la mayoría de los pacientes con CPNM, pero son más eficaces en un subconjunto de pacientes con tumores que contienen mutaciones de EGFR somáticas que dan lugar a un incremento en la actividad tirosina cinasa del EGFR. Este tipo de mutaciones a menudo se denominan "activadoras". También se descubrieron mutaciones de EGFR somáticas que dan lugar a resistencia al tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas en pacientes con CPNM. Este tipo de mutaciones a menudo se denominan "de resistencia". Las mutaciones de resistencia en el EGFR tienden a surgir en pacientes con CPNM durante la tanda de tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas. En los casos de CPNM que no se pueden tratar eficazmente por tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas, tal como erlotinib y gefitinib, se puede usar quimioterapia o, posiblemente, otros tratamientos dirigidos para prolongar la supervivencia. Para mejorar las posibilidades de selección de un tratamiento eficaz para pacientes con CPNM, es importante, por lo tanto, determinar si los tumores de CPNM de los pacientes contienen mutaciones de EGFR somáticas que confieren sensibilidad o resistencia al tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas.

El documento WO2012/085229 describe procedimientos de seguimiento de mutaciones de EGFR en muestras de plasma de pacientes que tienen cáncer de pulmón. Sin embargo, no queda claro en el documento de qué modo se clasifican las muestras sometidas a PCR en tiempo real como positivas o negativas. Además, el documento WO2012/085229 no divulga ningún procedimiento de detección basado en PCR cuantitativa que tenga en cuenta la cantidad de secuencias de ADN genómico no mutadas presentes en la muestra de sangre.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se describen procedimientos mejorados de evaluación del estado de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos, que comprenden detectar la presencia o ausencia de una o más mutaciones en ácidos

nucleicos tumorales en sangre del sujeto con el cáncer con tumores sólidos; y, evaluar el estado del sujeto con el cáncer con tumores sólidos en base a la presencia o ausencia detectada de las una o más mutaciones en ácidos nucleicos tumorales. Los procedimientos mejorados pueden implicar la detección de las una o más mutaciones en ácidos nucleicos tumorales realizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en una muestra de sangre o en un ADN genómico total aislado de una muestra de sangre, donde se obtiene la muestra de sangre de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos. En el presente documento también se describen procedimientos mejorados de detección de la presencia o ausencia de una mutación tumoral en una muestra de sangre obtenida de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos, que comprenden realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en la muestra de sangre usando cebadores específicos para una secuencia nucleica mutada para generar un valor umbral de los ciclos de PCR. En los procedimientos mejorados descritos en el presente documento, se puede tener en cuenta un estado metastásico de los sujetos con un cáncer con tumores sólidos para mejorar la sensibilidad de la detección de las secuencias de ácido nucleico tumorales mutadas en las muestras de sangre obtenidas de los sujetos. La detección de la presencia o ausencia de las una o más mutaciones en ácidos nucleicos tumorales en las muestras de sangre obtenidas de los sujetos con cánceres con tumores sólidos puede implicar determinar la cantidad de secuencias mutadas que circulan en la sangre y realizar un seguimiento del estado del cáncer del sujeto en base a la cantidad detectada.

En el presente documento se describen procedimientos de evaluación del estado de un sujeto con CPNM con metástasis a distancia, que comprenden: detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias de ácido nucleico de EGFR mutadas en la sangre del sujeto con CPNM en estadio de metástasis a distancia; y evaluar el estado del sujeto con CPNM en estadio de metástasis a distancia en base a la presencia o ausencia detectada de las una o más secuencias de ácido nucleico de EGFR mutadas. En el presente documento también se describen procedimientos de evaluación del estado de un sujeto con CPNM, que comprenden: detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias de ácido nucleico de EGFR mutadas en la sangre del sujeto; y evaluar el estado del sujeto en base a la presencia o ausencia detectada de las una o más secuencias de EGFR mutadas. En el presente documento también se describen procedimientos de identificación de un paciente con CPNM candidato para un tratamiento farmacológico dirigido, que comprenden: detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias de EGFR mutadas en la sangre del paciente; evaluar el estado metastásico del paciente con CPNM como M1a o M1b; e identificar al paciente como candidato para el tratamiento farmacológico dirigido en base a al menos la presencia detectada de las una o más secuencias de EGFR mutadas en la sangre del paciente y el estado metastásico del CPNM en el paciente. En el presente documento también se divulgan procedimientos de evaluación del estado de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos, que comprenden: detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor en sangre del sujeto con el cáncer con tumores sólidos; y evaluar el estado del sujeto con cáncer con tumores sólidos con metástasis a distancia en base a la presencia o ausencia detectada de las una o más secuencias de ácido nucleico asociadas a tumor mutadas. Además, en el presente documento se divulgan procedimientos de detección de la presencia o ausencia de una mutación asociada a tumor en una muestra de sangre, comprendiendo los procedimientos: realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en la muestra de sangre usando cebadores específicos para una secuencia nucleica mutada para generar un valor umbral de los ciclos de PCR; y comparar el valor umbral de los ciclos con un valor de control, en los que el valor de control tiene en cuenta la concentración de ADN genómico en la muestra, y en los que si el valor umbral de los ciclos está por debajo del valor de control la mutación asociada a tumor está presente en la muestra y si el valor umbral de los ciclos está por encima del valor de control la mutación asociada a tumor está ausente de la muestra. También se prevén procedimientos de tratamiento de pacientes o sujetos con cánceres con tumores sólidos, tales como CPNM, y se incluyen dentro del alcance de los procedimientos descritos en el presente documento.

La presente invención se refiere en particular a procedimientos de evaluación del estado de un sujeto humano con un cáncer con tumores sólidos, que comprenden: cuantificar una cantidad de una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en una secuencia de ácido nucleico en una muestra obtenida del sujeto con el cáncer con tumores sólidos, en los que el sujeto ha completado uno o más ciclos de tratamiento, el tratamiento comprende la administración de inhibidor de las tirosina cinasas y la muestra es una muestra de plasma obtenida antes de la administración del tratamiento y al final del tercer ciclo de tratamiento, en los que cuantificar comprende realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos para una secuencia de ácido nucleico mutada para generar un valor umbral de los ciclos de PCR; y comparar el valor umbral de los ciclos con un valor de control, en los que el valor de control tiene en cuenta la concentración de ADN genómico en la muestra, y en los que si el valor umbral de los ciclos está por debajo del valor de control la mutación asociada a tumor está presente en la muestra y si el valor umbral de los ciclos está por encima del valor de control la mutación asociada a tumor está ausente de la muestra. En algunos ejemplos, el inhibidor de las tirosina cinasas es erlotinib o gefitinib. La presente invención se refiere además a procedimientos de evaluación del estado de un sujeto humano con un cáncer con tumores sólidos, que comprenden: cuantificar una cantidad de una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en una secuencia de ácido nucleico en una muestra obtenida del sujeto con el cáncer con tumores sólidos antes de que el sujeto se haya sometido a tratamiento del cáncer. Estos y otros ejemplos se pueden combinar en los procedimientos de la presente invención. Un modo de realización de los procedimientos anteriores comprende además valorar una consecuencia del cáncer con tumores sólidos en el sujeto en base a la cantidad de las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido

nucleico en la muestra. La consecuencia puede ser la supervivencia global o la supervivencia sin progresión. En un modo de realización más de los procedimientos descritos, la cantidad de la mutación somática asociada a cáncer está por encima de un nivel umbral, y el procedimiento comprende además el tratamiento adicional del sujeto. El tratamiento adicional puede comprender intervención quirúrgica, quimioterapia, tratamiento farmacológico dirigido o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el tratamiento adicional puede comprender la administración de un fármaco antineoplásico al sujeto. De acuerdo con un modo de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico comprenden una mutación activadora. De acuerdo con un modo de realización más de los procedimientos analizados en el presente documento, las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico comprenden una mutación de resistencia. La invención descrita en el presente documento se refiere a procedimientos en los que la evaluación comprende realizar un seguimiento del cáncer con tumores sólidos en el sujeto. Un modo de realización de la invención analizada en el presente documento es el procedimiento en el que evaluar comprende administrar un tratamiento farmacológico dirigido al sujeto si la cantidad de la al menos una de las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico en la muestra excede un valor umbral. Las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico pueden ser una mutación activadora, y el tratamiento farmacológico dirigido un inhibidor de las tirosina cinasas. La evaluación puede comprender además incrementar una dosis del tratamiento farmacológico dirigido administrado al sujeto si se detecta un incremento en la cantidad de las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico. En los modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, la detección puede comprender realizar una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. Un modo de realización de los procedimientos descritos en el presente documento comprende además realizar un procedimiento de diagnóstico del sujeto. Un ejemplo del procedimiento de diagnóstico es una valoración radiológica. La cuantificación de una cantidad de una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en una secuencia de ácido nucleico se puede realizar en la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en secuencia de EGFR, secuencia de KRAS, secuencia de ALK, secuencia de fusión con ALK, ROS1, secuencia de fusión con ROS1, secuencia de c-MET, secuencia de PIK3CA, secuencia de NRF2, secuencia de FGFR1-3, secuencia de AKT1, secuencia de fusión con AKT1, secuencia de BRAF, secuencia que comprende la sustitución V600E, secuencia de NRAS, secuencia de fusión TMPRSS2:ERG, secuencia de SPOP, secuencia de RET, secuencia de fusión, secuencia de PPAR-gamma, secuencia de fusión con PPAR-gamma, secuencia de IDH-1, secuencia de IDH-2 y secuencia de FGFR3. En un modo de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer son una o más mutaciones somáticas en la secuencia de ácido nucleico de EGFR. En un modo de realización más de los procedimientos descritos en el presente documento, el cáncer con tumores sólidos es cáncer de pulmón. En un modo de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, el cáncer con tumores sólidos es CPNM y la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de EGFR. La una o más mutaciones somáticas en la secuencia de ácido nucleico de EGFR se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en una delección en el exón 19 sin cambio de pauta de lectura, L858R, L861Q, G719X, T790M, S678I e inserción en el exón 20 sin cambio de pauta de lectura.

La presente invención se refiere además a procedimientos de identificación de un paciente con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) candidato para un tratamiento farmacológico dirigido, que comprenden: detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutadas en la sangre del paciente antes, durante o después de la quimioterapia, antes o después de la intervención quirúrgica o cualquier combinación de las mismas; evaluar el estado metastásico del paciente con CPNM como M1b que comprende modificar el tratamiento farmacológico dirigido si se detecta la presencia de una mutación de EGFR de resistencia; e identificar al paciente como candidato para el tratamiento farmacológico dirigido en base a al menos la presencia detectada de las una o más secuencias de EGFR mutadas en la sangre del paciente, y el estado metastásico del CPNM en el paciente, en los que la detección comprende analizar la sangre del paciente para detectar las una o más secuencias de EGFR mutadas por una técnica analítica, en los que la técnica analítica comprende una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos para una secuencia de ácido nucleico mutada para generar un valor umbral de los ciclos de PCR; y comparar el valor umbral de los ciclos con un valor de control, en los que el valor de control tiene en cuenta la concentración de ADN genómico en la muestra, y en los que si el valor umbral de los ciclos está por debajo del valor de control la mutación asociada a tumor está presente en la muestra y si el valor umbral de los ciclos está por encima del valor de control la mutación asociada a tumor está ausente de la muestra.

DEFINICIONES

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere típicamente a un sujeto, tal como, pero sin limitarse a, un ser humano, que tiene un cáncer con tumores sólidos, tal como CPNM. Se debe entender que un sujeto que tiene un cáncer con tumores sólidos puede ser un paciente con un cáncer conocido, es decir, el cáncer que se detectó antes de la realización de los modos de realización de los procedimientos de la presente invención. Un paciente con cáncer puede ser un paciente con cáncer con recaída. Por ejemplo, un sujeto que tiene CPNM puede ser un paciente al que se le detectó CPNM antes de la realización de los modos de realización de los procedimientos de la presente invención. El paciente con CPNM puede ser un paciente con recaída.

Los términos "recidiva", "recidivante", "recaída" y términos relacionados se usan para referirse al cáncer que reaparece después del tratamiento y a los pacientes que experimentan la reaparición del cáncer.

El término "cáncer con tumores sólidos" se usa en el presente documento para indicar los cánceres que se caracterizan por la formación de tumores cancerosos, o masas cohesionadas de células con proliferación anómala, en tejidos y órganos. Se debe entender que algunos tumores formados por los cánceres con tumores sólidos pueden ser quistes, es decir, sacos de tejido llenos de líquido. El término "cáncer con tumores sólidos" se usa en el presente documento para distinguir cánceres formadores de tumores de las denominadas neoplasias hemáticas o neoplasias hemolinfáticas que se forman a partir de células hematopoyéticas (de formación de la sangre) y afectan a la sangre, médula ósea y ganglios linfáticos. Los ejemplos de cánceres con tumores sólidos son carcinomas, o cánceres derivados de células epiteliales, sarcomas o cánceres que surgen del tejido conjuntivo, tumores de células germinales, tales como seminomas y disgerminomas, blastomas, o cánceres que derivan de células precursoras o tejido embrionario. Algunos ejemplos no limitantes de cánceres con tumores sólidos son cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, tal como glioblastoma y cáncer de vejiga. Los ejemplos de neoplasias hemáticas son linfomas, leucemias, mielomas, síndromes mielodisplásicos y enfermedades mieloproliferativas.

El término "tratamiento" se usa en el presente documento como sinónimo del término "terapia". El término "tratamiento del cáncer" como se usa en el presente documento engloba diversos tipos de terapia o tratamiento del cáncer, incluyendo intervención quirúrgica, radioterapia, quimioterapia y tratamiento farmacológico dirigido. Un tratamiento puede incluir uno o más tipos de tratamiento. Por ejemplo, un tratamiento puede incluir una combinación de quimioterapia y tratamiento farmacológico dirigido. Los términos "tratamiento" y "terapia" se pueden usar conjuntamente con los términos "ciclo" o "período". Un tratamiento o terapia se puede administrar una o más veces durante un período de tiempo determinado, seguido de un período durante el que no se administra ningún tratamiento o terapia. Un ciclo de tratamiento puede durar días o semanas (en un ejemplo, cuatro semanas). Se pueden administrar uno o más ciclos de tratamiento o terapia. Por ejemplo, se pueden administrar uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez ciclos de tratamiento o terapia. El tratamiento puede ser el mismo o variado durante diferentes ciclos. Por ejemplo, los tipos y/o las dosis de tratamiento pueden variar de ciclo a ciclo. Durante un ciclo de tratamiento, los tratamientos se pueden administrar en un solo día, varios días consecutivos o de forma continua como paciente ambulatorio o como paciente hospitalizado. Un tratamiento puede durar minutos, horas o días, dependiendo del protocolo específico. El ciclo de tratamiento se puede repetir de forma semanal, quincenal o mensual. Un ciclo de tratamiento puede incluir una o más sesiones de tratamiento. Por ejemplo, un ciclo de tratamiento se puede definir en intervalos mensuales, con dos sesiones de quimioterapia quincenales clasificadas como un ciclo. Uno o más ciclos de tratamiento se pueden denominar conjuntamente como "tanda" de tratamiento.

"Tratamiento dirigido" o "tratamiento farmacológico dirigido" se refiere al tratamiento farmacológico que interfiere con el crecimiento de células cancerosas al interferir con moléculas específicas necesarias para la carcinogénesis y el crecimiento tumoral, en lugar de simplemente interferir con todas las células que se dividen rápidamente, como lo hace la quimioterapia. Un ejemplo de tratamiento farmacológico dirigido es el tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas (TKI), que usa inhibidores de las tirosina cinasas reversibles para inhibir la actividad de las tirosina cinasas que promueven la proliferación celular en determinados tipos de cáncer. Por ejemplo, erlotinib, también conocido como Tarceva®, o gefitinib, también conocido como Iressa®, dirigen la actividad tirosina cinasa del EGFR y se usan como tratamiento dirigido para el CPNM. Otro ejemplo de tratamiento dirigido es el tratamiento con inhibidores de la cinasa del linfoma anaplásico (ALK).

El término "tratamiento farmacológico dirigido", como se usa en el presente documento, no se limita a los tratamientos anteriores, sino que puede englobar cualquier tratamiento farmacológico que interfiera con una diana específica, tal como tratamientos que interfieren con la señalización de EGFR. Los tratamientos farmacológicos dirigidos incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas reversibles, tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas irreversibles, tratamiento con anticuerpos o cualquier forma de tratamiento basado en moléculas pequeñas, moléculas grandes o ácidos nucleicos, como el tratamiento génico o tratamiento con ARN interferentes pequeños.

El término "mutación asociada a tumor" se usa en el presente documento para indicar mutaciones en secuencias de ácido nucleico que afectan al desarrollo de un cáncer con tumores sólidos en un sujeto. Por ejemplo, una mutación asociada a tumor puede activar la proliferación celular, dando lugar de este modo a la aparición de un tumor maligno o intensificación del crecimiento tumoral. Una mutación asociada a tumor puede conferir propiedades a un tumor que faciliten su diseminación a través del cuerpo del sujeto, conocida como metástasis. Una mutación asociada a tumor también se puede asociar con la sensibilidad o resistencia de un cáncer a los tratamientos del cáncer. El término "asociado a tumor" se puede usar en referencia a ácidos nucleicos o secuencias de ácido nucleico que comprenden una o más mutaciones asociadas a tumor, tales como en una expresión "secuencia de ácido nucleico mutada asociada a tumor". El término "mutación asociada a cáncer" se puede usar de manera intercambiable con el término "mutación asociada a tumor", por ejemplo, en referencia a ácidos nucleicos o secuencias de ácido nucleico que contienen dichas mutaciones, como en una expresión "mutación somática asociada a cáncer en una secuencia de ácido nucleico". Se debe entender que las mutaciones asociadas

a tumor o asociadas a cáncer se pueden encontrar en ácidos nucleicos extracelulares circulantes, así como en los ácidos nucleicos dentro de varios tipos de células, incluyendo, pero sin limitarse a, células tumorales, células metastásicas y células infiltrantes. Una mutación asociada a tumor o una mutación asociada a cáncer puede ser una mutación somática.

5

Los términos "evaluar", "evaluación" y los términos relacionados se usan en el presente documento en referencia a cáncer, estado del cáncer o estado de un sujeto con cáncer, y en algunos otros contextos. Estos términos pueden indicar, pero no se limitan a, deducir la presencia o ausencia de mutaciones asociadas a cáncer en tumores cancerosos en base a la presencia o ausencia detectada de secuencias de ácido nucleico mutadas en la sangre del sujeto. Los términos "evaluar", "evaluación" y los términos relacionados también pueden englobar, dependiendo del contexto, recomendar o realizar cualquier procedimiento de diagnóstico adicional relacionado con valorar la presencia o ausencia de mutaciones asociadas a cáncer en los tumores del sujeto, valorar la eficacia potencial de los tratamientos para el cáncer del sujeto, así como recomendar o realizar dichos tratamientos, realizar un seguimiento del cáncer del sujeto o cualquier otra etapa o procedimiento relacionado con el tratamiento o diagnóstico de un cáncer. Por ejemplo, valorar el pronóstico de un cáncer en un sujeto o valorar el pronóstico de un sujeto con cáncer entra dentro del alcance de los términos "evaluar", "evaluación" y los términos relacionados. Estos términos también engloban recomendar o no recomendar y realizar o no realizar procedimientos de tratamiento o diagnóstico en base a los resultados de la detección de mutaciones asociadas a cáncer en los tumores del sujeto, así como recomendar o no recomendar y realizar o no realizar cuidados paliativos o de atenuación.

10

15

20

El término "pronóstico", "pronosticar", "predicción", "predecir", "predictivo" y términos relacionados se usan en el presente documento en referencia a cáncer y pacientes con cáncer para indicar procedimientos y resultados de la estimación de las consecuencias del desarrollo del cáncer y del tratamiento del cáncer en sujetos, incluyendo la probabilidad de metástasis, remisión y recaída, así como probabilidades de supervivencia de sujetos con cáncer. El término "pronóstico", "pronosticar", "predicción", "predecir", "predictivo" y términos relacionados se incluyen en el alcance de los términos "evaluar", "evaluación" y los términos relacionados. Se debe entender que se pueden usar varias medidas de pronóstico de cáncer y predicción de consecuencias, tales como la probabilidad de supervivencia, y que un pronóstico y/o predicciones a menudo se expresan como estimaciones o probabilidades, y no siempre son precisos.

25

30

Los términos "factor pronóstico" o "factor predictivo" se pueden usar de manera intercambiable en los campos de la investigación y la medicina sobre el cáncer, pero también se pueden asignar significados al menos parcialmente distintos. Los factores pronósticos o predictivos empleados en el campo del diagnóstico y tratamiento del cáncer son generalmente los factores que afectan al desarrollo del cáncer, tratamientos del cáncer y supervivencia de pacientes con cáncer. Una definición de "factor pronóstico" es una situación o condición, o una característica de un paciente, que se puede usar para estimar la posibilidad de recuperación del cáncer o la posibilidad de recidiva de la enfermedad. Un factor pronóstico también se puede definir como un factor asociado con una consecuencia sin tratamiento o con la aplicación de tratamiento estándar. En otras palabras, el factor puede ser (pero no tiene que serlo) el pronóstico de una consecuencia del cáncer se aplique o no un tratamiento. Algunos ejemplos no limitantes de factores pronósticos del cáncer son estadio, grado, diseminación de la enfermedad, así como la edad y la salud del sujeto. Una definición de un "factor predictivo" es una condición o hallazgo que se puede usar para predecir el beneficio clínico de un tratamiento particular, o de si un cáncer en un sujeto responderá a un tratamiento específico. El factor predictivo también puede describir algo que incrementa el riesgo de una persona de desarrollar cáncer o recidiva del cáncer. Un factor predictivo se puede definir como un factor asociado con la respuesta o la falta de respuesta a un tratamiento particular e implica una respuesta diferencial al tratamiento particular, dependiendo del estado del biomarcador. En un contexto de ensayo clínico, los factores pronósticos se pueden valorar comparando las consecuencias en el grupo de control, mientras que los factores predictivos se pueden valorar prediciendo las consecuencias en el grupo de tratamiento. Se debe entender que las consecuencias se pueden valorar usando diferentes criterios, y el carácter pronóstico y/o predictivo de un factor que se valora puede variar dependiendo de los criterios sobre las consecuencias usados en la valoración. El análisis de los factores pronósticos y predictivos se proporciona, por ejemplo, en Clark, "Prognostic factors versus predictive factors: Examples from a clinical trial of erlotinib" *Molecular Oncology* 1:406-412 (2008).

35

40

45

50

55

El término "consecuencia" o "consecuencias" y los términos y expresiones relacionados se usan en el presente documento en el contexto del diagnóstico y tratamiento del cáncer en general para indicar cualquier resultado o efecto específico que se puede medir y se relacione con el cáncer. Los ejemplos de consecuencias incluyen, pero no se limitan a, disminución del dolor, reducción del tamaño del tumor y mejora de la enfermedad. Un ejemplo más de consecuencia es la "supervivencia". La supervivencia, más en general, es el período de tiempo que vive un paciente o que vive en un determinado estado (por ejemplo, en remisión) después del diagnóstico o tratamiento del cáncer. En el contexto de grupos de pacientes, tal como los observados durante ensayos clínicos, se puede usar la "tasa de supervivencia" de los pacientes con cáncer como medida de supervivencia. La tasa de supervivencia se puede expresar como el porcentaje de personas en un grupo de estudio o de tratamiento que todavía están vivas durante un cierto período de tiempo después de que se les diagnosticara o de que iniciaran el tratamiento de una enfermedad, tal como cáncer. La "tasa de supervivencia" anterior también se puede denominar "tasa de supervivencia global" (TSG). La tasa de supervivencia a menudo se establece como una tasa de

60

65

supervivencia en cinco años, que es el porcentaje de personas en un grupo de estudio o de tratamiento que están vivos cinco años después de su diagnóstico o del inicio del tratamiento. La supervivencia también se puede calcular como un promedio del período de tiempo durante el que sobrevive un 50 % de los pacientes. Se pueden usar varios tipos de medidas de supervivencia además de la SG, siendo los ejemplos la supervivencia sin progresión (SSP) o la supervivencia sin la enfermedad (SSE). La SSE se puede definir como el período de tiempo después de que finalice un tratamiento para un cáncer que el paciente sobrevive sin ningún signo o síntoma de ese cáncer. La SSE también se puede llamar supervivencia sin recaída y SSR. La SSP se puede definir como el período de tiempo durante y después del tratamiento del cáncer, que un paciente vive con la enfermedad pero esta no empeora o no progresa. SSE, SSP y SG, así como otras medidas de supervivencia se pueden expresar como "tasas", como se analiza anteriormente, cuando se aplica a grupos, y también se pueden expresar como probabilidades. Los criterios bajo los que se determina típicamente la "progresión" del cáncer con tumores sólidos en un paciente son los *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST), que es un conjunto de normas publicadas que definen cuándo los pacientes con cáncer mejoran ("responder"), permanecen igual ("estabilizarse"), o empeoran ("progresar") durante los tratamientos. Los criterios RECIST se analizan, por ejemplo, en Therasse H.P. *et al.*, "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors" *Journal of the National Cancer Institute*, 92:206-216 (2000). Se debe entender, sin embargo, que se pueden emplear criterios RECIST modificados u otros criterios en algunos modos de realización descritos en el presente documento.

Las expresiones "detectar en sangre", "detección en sangre", y las expresiones relacionadas, como se usa en el presente documento, se refieren al acto o al resultado de hallar o descubrir secuencias de ácido nucleico en una muestra de la fracción líquida de sangre, como plasma o suero.

El término "metástasis local" se refiere a un proceso o resultado de un proceso, en el que las células cancerosas que se originan de un tumor canceroso penetran y se infiltran en los tejidos normales circundantes en el área local, típicamente en el mismo órgano u órganos adyacentes, formando un nuevo tumor. Por ejemplo, el estadio metastásico de "metástasis local" del CPNM significa que la metástasis está presente, pero no se detecta metástasis en órganos extratorácicos. En referencia al CPNM, el término "metástasis local" engloba el estadio metastásico "M1a".

El término "metástasis a distancia" se refiere a un proceso o resultado de un proceso, en el que el cáncer se disemina a tejidos y órganos que están lejos del sitio del tumor primario. Por ejemplo, el término "metástasis a distancia" usado en el contexto del CPNM significa que la metástasis está presente y se detecta en órganos extratorácicos. En referencia al CPNM, el término "metástasis a distancia" engloba el estadio metastásico "M1b".

Los términos "detectar", "detección" y términos similares se usan en este documento para referirse ampliamente a un procedimiento para descubrir o determinar la presencia o ausencia, así como un grado, cantidad o nivel, o probabilidad de aparición de algo. Los términos implican necesariamente una transformación física de materia tal como la amplificación de ácido nucleico. Por ejemplo, el término "detectar" cuando se usa en referencia a la mutación de EGFR, puede indicar el descubrimiento o determinación de la presencia, ausencia, nivel o cantidad, así como una probabilidad o verosimilitud de la presencia o ausencia de la mutación de EGFR. Se debe entender que las expresiones "detectar la presencia o ausencia", "detección de la presencia o ausencia" y expresiones relacionadas, cuando se usan en referencia a mutaciones asociadas a tumor, incluyen detección cualitativa y cuantitativa. La detección cuantitativa incluye la determinación del nivel, cantidad o cantidades de secuencias de ácido nucleico mutadas en la muestra, en la que se realiza el procedimiento de detección.

El término "mutación" o "secuencia mutada", cuando se usa en referencia a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos, se puede usar de manera intercambiable con los términos "variante", "variante alélica", "variación" o "polimorfismo". Por ejemplo, las expresiones "detectar una mutación", "detectar una secuencia mutada", "detectar polimorfismo" o "detectar una variación de secuencia" se pueden usar de manera intercambiable cuando se analizan los procedimientos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es una ilustración esquemática de algunas mutaciones de EGFR conocidas halladas en el dominio tirosina-cinasa del EGFR, adaptada de Sharma *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 7:169 (2007).

La FIGURA 2 es un gráfico que ilustra datos experimentales de valores del punto de corte (C_p) de la PCR en tiempo real obtenidos con el kit COBAS® EGFR Mutation Test usando las mezclas de reacción MMX1, MMX2 y MMX3 en presencia de diferentes niveles de ADN genómico. El eje X representa el nivel de ADN genómico (ng por reacción) y el eje Y representa el número de ciclos correspondiente al C_p logrado en una reacción.

La FIGURA 3 es un gráfico que muestra esquemáticamente una curva de calibración ejemplar para la cuantificación de un ácido nucleico diana.

La FIGURA 4 es una representación esquemática del desarrollo cronológico del tratamiento de CPNM y la obtención de muestras.

- 5 La FIGURA 5 es un gráfico que ilustra la detección de mutaciones de EGFR en las muestras de plasma de dos pacientes con CPNM ejemplares. La semana 0 en el eje X corresponde al punto temporal CP₀ antes del inicio del tratamiento con erlotinib en la figura 3.
- 10 La FIGURA 6 es una representación esquemática del procedimiento de toma de decisiones para el tratamiento y diagnóstico de pacientes que son pacientes que presentan CPNM en base al análisis de sangre para detectar mutaciones activadoras de EGFR.
- 15 La FIGURA 7 es una representación esquemática del procedimiento de toma de decisiones para el tratamiento y diagnóstico de pacientes con CPNM recidivante en base al análisis de sangre para detectar mutaciones activadoras de EGFR.
- La FIGURA 8 es una representación esquemática del procedimiento de toma de decisiones para el tratamiento y diagnóstico de pacientes con CPNM.
- 20 La FIGURA 9 es una representación esquemática del diseño del estudio clínico relacionado con la investigación de las consecuencias del tratamiento de pacientes con CPNM.
- 25 La FIGURA 10 es una representación esquemática del resumen de las muestras obtenidas durante el transcurso del estudio clínico ilustrado en la FIGURA 9.
- La FIGURA 11 son los gráficos que representan las curvas de calibración usadas para la cuantificación de ácidos nucleicos diana en las muestras de PCR: panel A - diana de control interno; panel B - diana Ex19Del; panel C - diana L858R; panel D - diana T7890M.
- 30 La FIGURA 12 es un gráfico de puntos de todos los puntos de datos obtenidos en los puntos temporales inicial, C3 y PE, que ilustra los datos sobre la distribución del ADN extracelular circulante (cf) en las muestras de plasma sometidas a prueba para detectar mutaciones sensibles a TKI; las cantidades de ADN detectadas en las muestras (copia por ml de plasma) se representan en el eje Y; representadas por separado en el eje X están todas las muestras agrupadas conjuntamente ("TODAS"), las muestras sin mutación ("pMut-") y las muestras con mutación ("pMut+").
- 35 La FIGURA 13 es un gráfico de puntos de todos los puntos de datos obtenidos en los puntos temporales inicial, C3 y PE, que ilustra los datos sobre la distribución del ADNcf y las secuencias de ADN de EGFR mutadas en las muestras sometidas a prueba para detectar mutaciones sensibles a TKI; las cantidades de ADN detectadas en las muestras (copia por ml de plasma) se representan en el eje Y; representados por separado en el eje X están los datos para el ADNcf (ADN-cf); la delección Ex19Del y las sustituciones L858R y T790M.
- 40 La FIGURA 14 es un gráfico de puntos de todos los puntos de datos obtenidos en los puntos temporales inicial, C3 y PE, que ilustra los datos sobre la distribución de ADN de EGFR mutado en las muestras sometidas a prueba para detectar mutaciones sensibles a TKI; las cantidades de ADN detectadas en las muestras (copia por ml de plasma) se representan en el eje Y; representados por separado en el eje X están los datos para los resultados de la detección de Ex19Del, L858R y T790M, con las muestras con mutación y muestras sin mutación (marcadas con -) agrupadas por separado.
- 45 La FIGURA 15 es un gráfico de puntos de todos los puntos de datos obtenidos en los puntos temporales inicial, C3 y PE, que ilustra los datos sobre la distribución de ADN de EGFR mutado en las muestras sometidas a prueba para detectar mutaciones sensibles a TKI; la proporción de ADN mutante detectado frente a ADN genómico total detectado en las muestras (Mut %) se representa en el eje Y; representados por separado en el eje X están los datos para los resultados de la detección de Ex19Del, L858R y T790M, con las muestras con mutación y muestras sin mutación (marcadas con -) agrupadas por separado.
- 50 La FIGURA 16 es un gráfico que ilustra los datos sobre las cantidades de ADN mutado (copia/ml) detectadas para las mutaciones Ex19Del y L858R en las muestras obtenidas en tres puntos temporales diferentes: situación inicial (rombos), C3 ("Ciclo3" - cuadrados) y PE (triángulos) y representados para pacientes individuales (los números de identificación del paciente se muestran en el eje X); los datos se agrupan en dos paneles para los pacientes tratados solo con quimioterapia ("Solo quimio" - panel A) y la combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI ("Quimio + Tarceva" - panel B); las cantidades de ADN mutado detectadas en cada muestra (copia/ml) se representan en el eje Y.
- 55 La FIGURA 17 es un gráfico que ilustra los datos sobre las cantidades de ADN mutado (copia/ml) detectadas para la mutación Ex19Del en las muestras obtenidas en tres puntos temporales diferentes: situación inicial (rombos), C3 ("Ciclo3" - cuadrados) y PE (triángulos) y representados para pacientes individuales (los números de identificación del paciente se muestran en el eje X); los datos se agrupan en dos paneles para los pacientes tratados solo con quimioterapia ("Solo quimio" - panel A) y la combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI
- 60
- 65

("Quimio + Tarceva" - panel B); las cantidades de ADN mutado detectadas en cada muestra (copia/ml) se representan en el eje Y.

5 La FIGURA 18 es un gráfico que ilustra los datos sobre las cantidades de ADN mutado (copia/ml) para la mutación L858R detectada en las muestras obtenidas en tres puntos temporales diferentes: situación inicial (rombos), C3 ("Ciclo3" - cuadrados) y PE (triángulos) y representados para pacientes individuales (los números de identificación del paciente se muestran en el eje X); los datos se agrupan en dos paneles para los pacientes tratados solo con quimioterapia ("Solo quimio" - panel A) y la combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI ("Quimio + Tarceva" - panel B); las cantidades de ADN mutado detectadas en cada muestra (copia/ml) se representan en el eje Y.

15 La FIGURA 19 es un gráfico de puntos que ilustra los datos sobre el ADN extracelular circulante (cf) total obtenido en tres puntos temporales diferentes ("inicial", C3 y PE, la explicación se proporciona adicionalmente en el texto) durante el estudio clínico; las cantidades de ADN detectado (copia/ml) se representan en el eje Y, y se agrupan en el eje X para los diferentes puntos temporales y para los pacientes incluidos en los dos brazos del estudio clínico (brazo de tratamiento solo con quimioterapia "solo C"; combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI - "brazo C+T").

20 La FIGURA 20 es un gráfico de puntos que ilustra los datos sobre el ADN mutado obtenido en tres puntos temporales diferentes ("inicial", C3 y PE, la explicación se proporciona adicionalmente en el texto) durante el estudio clínico; las cantidades de ADN detectadas (copia/ml) se representan en el eje X y se agrupan en el eje Y para los tres puntos temporales y para los pacientes incluidos en los dos brazos del estudio clínico (brazo de tratamiento solo con quimioterapia - "solo C"; combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI - "brazo C+T").

25 La FIGURA 21 es un gráfico de puntos que ilustra los datos del ADN mutado para la mutación Ex19Del (panel A) y la mutación L858R (panel B) obtenidos en tres puntos temporales diferentes ("inicial", C3 y PE, la explicación se proporciona adicionalmente en el texto) durante el estudio clínico; los datos para las cantidades de ADN detectadas (copia/ml) se representan en el eje Y y se agrupan en el eje X para los pacientes incluidos en los dos brazos del estudio clínico (brazo de tratamiento solo con quimioterapia - "solo C"; combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI - "C+T").

35 La FIGURA 22 muestra los gráficos de líneas que ilustran la probabilidad comparativa de supervivencia sin progresión (SSP) de los pacientes clasificados como con mutación en base a las muestras de plasma (panel A) y muestras de tejido (panel B) iniciales. Los gráficos que se muestran son para los pacientes incluidos en los dos brazos del estudio clínico (brazo solo con quimioterapia - "GC-placebo", brazo de combinación de quimioterapia + tratamiento con TKI - "GC-erlotinib").

40 La FIGURA 23 muestra los gráficos de líneas que ilustran la probabilidad comparativa de supervivencia sin progresión (SSP) de los pacientes clasificados como sin mutación en base a las muestras de plasma (panel A) y muestras de tejido (panel B) iniciales. Los gráficos mostrados son para los pacientes de los dos brazos del estudio clínico (brazo solo con quimioterapia - "GC-placebo", brazo de combinación de quimioterapia + tratamiento con TKI - "GC-erlotinib").

45 La FIGURA 24 muestra los gráficos de líneas que ilustran la probabilidad comparativa de supervivencia global (SG) de los pacientes clasificados como con mutación en base a las muestras de plasma (panel A) y muestras de tejido (panel B) iniciales. Los gráficos mostrados son para los pacientes incluidos en los dos brazos del estudio (brazo solo con quimioterapia - "GC-placebo", brazo de combinación de quimioterapia + tratamiento con TKI - "GC-erlotinib").

50 La FIGURA 25 muestra los gráficos de líneas que ilustran la probabilidad comparativa de supervivencia global (SG) de los pacientes clasificados como sin mutación en base a las muestras de plasma (panel A) y muestras de tejido (panel B) iniciales. Los gráficos mostrados son para los pacientes incluidos en los dos brazos del estudio clínico (brazo solo con quimioterapia - "GC-placebo", brazo de combinación de quimioterapia + tratamiento con TKI - "GC-erlotinib").

55 La FIGURA 26 muestra los gráficos de líneas que ilustran la probabilidad comparativa de supervivencia sin progresión (C3 mut+) y supervivencia global (C3 mut-) de los pacientes clasificados como con mutación (línea de puntos) y sin mutación (línea continua) en base a las muestras de plasma tomadas en el punto temporal C3.

60 La FIGURA 27 muestra los gráficos de líneas que ilustran la probabilidad comparativa de supervivencia sin progresión (panel A) y supervivencia global (panel B) de los pacientes clasificados como con mutación (C3 mut+) y sin mutación (C3 mut-) en base a las muestras de plasma tomadas en el punto temporal C3 en el brazo de combinación de quimioterapia + tratamiento con TKI.

65 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La materia objeto de los modos de realización de la presente invención se describe en las reivindicaciones.

Las mutaciones somáticas en células tumorales pueden afectar al desarrollo y las consecuencias del cáncer. Una forma de detectar dichas mutaciones somáticas es someter a prueba muestras tumorales obtenidas a través de biopsia o intervención quirúrgica para detectar la presencia de secuencias mutantes asociadas con el desarrollo del cáncer. Sin embargo, puede que las muestras de tejido tumoral no estén disponibles de inmediato para las pruebas. Para evitar retrasos en la detección de las mutaciones asociadas a cáncer y selección del tratamiento apropiado, así como para reducir la invasividad, es beneficioso desarrollar procedimientos más ventajosos y menos invasivos para detectar mutaciones en los tumores de los pacientes con cáncer. Las células tumorales circulan en la sangre de los pacientes con cánceres con tumores sólidos. Es posible detectar mutaciones tumorales somáticas en las muestras de sangre de los pacientes con cáncer, incluyendo la detección de mutaciones de EGFR en pacientes con CPNM. Sin embargo, es difícil adaptar de manera fiable dicha detección para un uso clínico y diagnóstico significativo debido a la pequeña cantidad de secuencias mutadas circulantes, fondo de secuencias no mutadas y niveles altos de ADN genómico (ADNg) circulante en la sangre, el ADNg que se origina de leucocitos rotos (WBC). La detección de secuencias de ácido nucleico mutadas que se originan de células tumorales en muestras de sangre, tales como la detección de mutaciones de EGFR en pacientes con CPNM, se ve afectada por inexactitudes, como tasas de detección de falsos negativos relativamente altas, y puede requerir técnicas analíticas engorrosas que pueden implicar, por ejemplo, el aislamiento de células tumorales que circulan en sangre antes de la detección, o el enriquecimiento del contenido de secuencias de ADN mutadas en la muestra antes de la detección. La detección cuantitativa puede ser incluso más difícil, debido a los altos niveles de ADN de fondo, entre otras cosas. En el presente documento se describen procedimientos mejorados de detección de secuencias de ácido nucleico tumorales mutadas en la sangre de pacientes con cáncer, tales como la detección de secuencias de ácido nucleico de EGFR mutadas en la sangre de pacientes con CPNM, para hacer que dichos procedimientos de detección sean útiles para la evaluación del cáncer en la práctica clínica y de diagnóstico.

Los inventores descubrieron que la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor que circulan en la sangre de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos se puede realizar de forma rápida y exacta realizando una PCR cuantitativa en tiempo real en la muestra de sangre o en el ADN genómico aislado de una muestra de sangre obtenida del sujeto con el cáncer con tumores sólidos. Al mejorar los procedimientos de procesamiento y análisis de datos de PCR cuantitativa, los inventores lograron una validez inesperadamente mejorada de las mediciones de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor que circulan en la sangre de los sujetos con cánceres con tumores sólidos. Los inventores descubrieron que un estado de un cáncer con tumores sólidos en un sujeto se puede evaluar de manera ventajosa midiendo el tipo y la cantidad de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor que circulan en la sangre del sujeto. Los inventores también descubrieron que la detección de mutaciones asociadas a tumor en sujetos con cánceres con tumores sólidos se basa en la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas que circulan en la sangre de los sujetos con cánceres con tumores sólidos. Los inventores descubrieron que un estado de un cáncer con tumores sólidos en un sujeto se puede evaluar de manera ventajosa midiendo el tipo y la cantidad de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor que circulan en la sangre del sujeto. Los inventores también descubrieron que la detección de mutaciones asociadas a tumor en sujetos con cánceres con tumores sólidos basada en la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas que circulan en la sangre de los sujetos se puede mejorar significativamente si se tiene en cuenta el estado metastásico del cáncer en dichos sujetos.

Además, los inventores descubrieron que los resultados de la detección de mutaciones asociadas a tumor en sujetos con cánceres con tumores sólidos, por ejemplo, los resultados de la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor en la sangre de los sujetos, se pueden emplear como factor pronóstico y/o predictivo para la evaluación del cáncer con tumores sólidos en los sujetos, incluyendo la evaluación de la respuesta terapéutica y las consecuencias del cáncer. En un ejemplo, los inventores descubrieron que la detección de la presencia o aparición de mutaciones somáticas que dan lugar a la resistencia al tratamiento farmacológico dirigido en pacientes con cáncer es útil para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento antineoplásico y evaluar la progresión de la enfermedad. En otro ejemplo, los inventores descubrieron que la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor en la sangre de los sujetos una o más veces durante y/o después del tratamiento antineoplásico, por ejemplo, después de que el sujeto haya completado un ciclo de quimioterapia, se puede usar para evaluar el estado del cáncer con tumores sólidos en los sujetos y para elegir el tratamiento del cáncer apropiado en base a los resultados de la detección.

Los inventores aplicaron sus descubrimientos en el contexto ejemplar de la detección de secuencias mutadas de EGFR que circulan en la sangre de los pacientes con CPNM y la aplicación clínica de los datos experimentales relevantes para el diagnóstico y tratamiento de CPNM. Para aplicar la información sobre las secuencias de EGFR mutadas detectadas en sangre al tratamiento y diagnóstico de pacientes con CPNM, los inventores distinguieron las correlaciones entre diversos aspectos de los datos experimentales sobre la aparición de secuencias de ácido nucleico de EGFR mutadas en la sangre del paciente, tales como los tipos de presencia, ausencia detectadas o las cantidades de las secuencias de ácido nucleico de EGFR mutadas en las muestras de sangre del paciente, y los criterios de pronóstico y las medidas de las consecuencias clínicas usados en el campo del tratamiento y diagnóstico de CPNM. La información experimental sobre las secuencias de ácido nucleico de EGFR mutadas se aplicó a continuación como un factor pronóstico o predictivo para el desarrollo de la enfermedad y las

consecuencias del tratamiento, así como para guiar las elecciones sobre tratamiento, diagnóstico y comportamiento de los pacientes con CPNM. Los descubrimientos de los inventores también se aplican en general a mutaciones asociadas a tumores sólidos que afectan al desarrollo de diversos cánceres con tumores sólidos en los sujetos. La detección exacta y sensible de secuencias mutadas asociadas a tumor que circulan en la sangre de los sujetos con cánceres con tumores sólidos y la aplicación de datos experimentales así generados a la práctica médica y diagnóstica mejoran la atención médica de los pacientes con cáncer con tumores sólidos mejorando la evaluación del cáncer, en algunos casos reduciendo la invasividad de los procedimientos de diagnóstico, ayudando a seleccionar los tratamientos más eficaces para cada paciente, y también reduciendo las cantidades de tratamiento innecesario y los procedimientos de diagnóstico.

Detección de mutaciones asociadas a tumor en sangre que tiene en cuenta el estado metastásico de un sujeto

En un ejemplo, los inventores han descubierto que la detección de mutaciones de EGFR en sujetos con CPNM en base a la detección de secuencias de EGFR mutadas que circulan en la sangre de los sujetos se puede mejorar significativamente si se tiene en cuenta el estado metastásico de los sujetos con CPNM. En particular, los inventores han descubierto que en un subconjunto de sujetos con CPNM, los sujetos que tienen CPNM con metástasis a distancia, la presencia o ausencia de mutaciones EGFR detectadas por amplificación del ácido nucleico presente en sangre predice con exactitud la presencia o ausencia de mutaciones de EGFR en los tumores de CPNM de los sujetos. En vista del descubrimiento de que los análisis de sangre son fiables para sujetos con metástasis a distancia, un resultado negativo, es decir, un hallazgo de que no hay mutaciones de EGFR en una muestra de sangre, es suficiente para determinar que el sujeto no porta la mutación de EGFR y por lo tanto no requiere una biopsia invasiva para confirmar los resultados negativos. Por el contrario, en sujetos con CPNM sin metástasis a distancia, aunque la presencia de mutaciones de EGFR detectables en sangre sirve como factor predisponente exacto de la presencia de mutaciones de EGFR en los tumores de CPNM de los sujetos, la ausencia de mutaciones detectables de EGFR en sangre no puede servir como factor predisponente exacto de la ausencia de mutaciones de EGFR en los tumores de CPNM de los sujetos.

El descubrimiento anterior se puede aplicar en general a la detección de mutaciones asociadas a tumor en la sangre de los sujetos con cánceres con tumores sólidos. La detección de una ausencia de mutación asociada a tumor en una muestra de sangre obtenida de un sujeto con cáncer con tumores sólidos con metástasis a distancia es suficiente para determinar que el sujeto no porta la mutación y por lo tanto no requiere ningún procedimiento adicional, tal como una biopsia invasiva, para confirmar los resultados negativos. Por el contrario, si un sujeto tiene un cáncer con tumores sólidos sin metástasis a distancia, la detección de una presencia de mutación asociada a tumor en sangre sirve como factor predisponente exacto de la presencia de mutaciones en los tumores de los sujetos, mientras que la detección de la ausencia de mutación detectable en la sangre no puede servir como factor predisponente exacto de la ausencia de la mutación en los tumores de los sujetos. Por consiguiente, en el presente documento se describen procedimientos que detectan la presencia o ausencia de mutaciones asociadas a tumor en la sangre de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos, para evaluar el estado del sujeto. Un modo de realización de los procedimientos anteriores es el procedimiento que detecta la presencia o ausencia de mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la sangre de un sujeto con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), para evaluar el estado del sujeto.

Las mutaciones asociadas a tumor pueden afectar a la eficacia de los tratamientos del cáncer. Por ejemplo, las mutaciones de EGFR tumorales influyen en la eficacia de ciertos tratamientos de CPNM, tales como tratamientos que se dirigen a EGFR, por ejemplo, tratamientos con inhibidores de las tirosina cinasas, que incluyen, pero no se limitan a, erlotinib y gefitinib. Al usar los procedimientos descritos en las reivindicaciones, el estado de mutación de los tumores cancerosos en el sujeto se puede evaluar con exactitud y aplicar al procedimiento de toma de decisiones sobre la selección y administración del tratamiento apropiado, si existe, o procedimientos de diagnóstico adicionales.

Antes de que estuvieran disponibles los procedimientos descritos en las reivindicaciones, la alta tasa de errores por falsos negativos limitó la aplicación de la detección basada en sangre de las mutaciones asociadas a tumor en un contexto clínico y diagnóstico, puesto que necesitaba de pruebas adicionales de tejido tumoral de los pacientes que dieron negativo para la mutación en base a las muestras de sangre. Un modo de realización de los procedimientos descritos en el presente documento puede abordar el problema anterior discriminando los sujetos con cáncer con tumores sólidos en base a su estado metastásico. En particular, los procedimientos descritos en el presente documento incorporan y aplican el descubrimiento de que la alta tasa de falsos negativos observada en los procedimientos de diagnóstico basados en sangre descritos previamente no se observa entre los sujetos con metástasis a distancia de CPNM metastásico (por ejemplo, estado metastásico M1b). Por lo tanto, la detección en sangre de mutaciones de EGFR en sujetos con CPNM con estado metastásico M1b se puede usar como procedimiento de diagnóstico fiable para el seguimiento de CPNM y para determinar la dirección adicional del diagnóstico y tratamiento de CPNM.

De acuerdo con un modo de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, también se puede evaluar el estado del cáncer con tumores sólidos en el sujeto sin metástasis a distancia. La evaluación

implica deducir si el tejido tumoral de los sujetos contiene o no mutaciones detectadas en la sangre usando los siguientes criterios. La presencia de la secuencia mutada en la sangre del sujeto con un cáncer con tumores sólidos pero sin metástasis a distancia indica una verosimilitud alta de que el tejido tumoral del sujeto contenga las mutaciones detectadas en la sangre. Por lo tanto, si se detectan secuencias mutantes en la sangre de un sujeto sin metástasis a distancia (tal como en un sujeto sin metástasis o metástasis solo local), se pueden tomar decisiones sobre diagnóstico y tratamiento adicionales en base a la verosimilitud alta de la presencia de las mutaciones en el tumor del sujeto. Sin embargo, la ausencia de la secuencia en la sangre del sujeto con cáncer con tumores sólidos pero sin metástasis a distancia no indica de manera fiable que el tejido tumoral del sujeto no contenga las mutaciones detectadas en la sangre. Si no se detectan secuencias mutantes en la sangre de dicho sujeto, entonces se justifican los procedimientos de diagnóstico adicionales para determinar la presencia de mutaciones en los tumores del sujeto.

Por ejemplo, cuando los modos de realización anteriores de los procedimientos de evaluación de un estado de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos se aplican a sujetos con CPNM, se puede realizar el siguiente procedimiento de toma de decisiones. La presencia de la secuencia de EGFR mutada en la sangre del sujeto con CPNM pero sin metástasis a distancia indica una verosimilitud alta de que el tejido tumoral de CPNM del sujeto contenga las mutaciones de EGFR detectadas en la sangre. Por lo tanto, si se detectan secuencias mutantes de EGFR en la sangre de un sujeto sin CPNM metastásico de estadio M1b, se pueden tomar decisiones sobre diagnóstico y tratamiento adicionales en base a la verosimilitud alta de la presencia de las mutaciones de EGFR en el tumor del sujeto. Sin embargo, la ausencia de la secuencia en la sangre del sujeto con CPNM sin metástasis a distancia no indica de manera fiable que el tejido tumoral de CPNM del sujeto no contenga las mutaciones de EGFR detectadas en la sangre. Si las secuencias mutantes de EGFR no se detectan en la sangre de dicho sujeto, entonces se justifican los procedimientos de diagnóstico adicionales para determinar la presencia de mutaciones en los tumores de CPNM del sujeto.

Procedimientos de seguimiento de un cáncer con tumores sólidos en un sujeto por detección de secuencias mutadas asociadas a tumor en la sangre del sujeto

Los procedimientos de evaluación del estado de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos descritos en el presente documento incluyen procedimientos de diagnóstico que usan la detección de mutaciones asociadas a tumor en la sangre de un sujeto para realizar un seguimiento del estado y la progresión del cáncer con tumores sólidos en el sujeto. Dentro de los modos de realización de los procedimientos anteriores se incluyen los procedimientos de diagnóstico que usan la detección de mutaciones de EGFR en la sangre de un sujeto con CPNM para realizar un seguimiento del estado y la progresión de CPNM en el sujeto.

La determinación de acuerdo con los procedimientos anteriores puede ser una determinación *in vitro* realizada en una muestra de sangre o plasma extraída del sujeto. La determinación puede ser útil para realizar un seguimiento de los efectos del tratamiento del cáncer y tomar decisiones sobre la selección del tratamiento del cáncer. Por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento se pueden usar antes, durante y/o después de la extirpación quirúrgica del tumor en un sujeto, para realizar un seguimiento de la eficacia de la intervención quirúrgica. Los procedimientos también se pueden usar antes, durante o después de cualquier tratamiento del cáncer. Por ejemplo, los procedimientos se pueden usar antes de un tratamiento del cáncer para determinar la verosimilitud de la eficacia del tratamiento en un sujeto particular, o para identificar a un sujeto como candidato adecuado para un tratamiento del cáncer. Los procedimientos se pueden usar durante o después del tratamiento del cáncer para determinar la eficacia del tratamiento así como para realizar un seguimiento de la aparición de resistencia al tratamiento del cáncer. Los procedimientos también se pueden usar durante la remisión del cáncer para realizar un seguimiento de la recidiva y la progresión del cáncer.

En algunos modos de realización, los procedimientos emplean la detección cualitativa de mutaciones asociadas a tumor para determinar la presencia o ausencia, o la naturaleza de las mutaciones asociadas a tumor en la sangre de los sujetos. En algunos modos de realización, los procedimientos emplean la determinación cuantitativa de mutaciones asociadas a tumor para determinar la cantidad de secuencias mutadas presentes en la sangre del sujeto. La determinación cualitativa o cuantitativa, o una combinación de las mismas, se puede denominar determinación o detección de una "carga de mutación" y se puede usar para evaluar el estado de un cáncer con tumores sólidos en el sujeto, incluyendo la gravedad del cáncer. La carga de mutación asociada a tumor en la sangre de un sujeto se puede caracterizar por el número de mutaciones asociadas a tumor en la sangre del sujeto (es decir, cuántas mutaciones diferentes se detectan), la cantidad de mutaciones asociadas a tumor detectadas en el sangre del sujeto (cantidad de ácidos nucleicos asociados a tumor mutados que circulan en la sangre del sujeto), o una combinación de los anteriores. Se debe entender que, en algunos casos, una carga de mutación de mutaciones asociadas a tumor detectadas en la sangre de un sujeto con un cáncer asociado a tumor se correlaciona con la gravedad y/o progresión del cáncer en un sujeto. La carga de mutación también se puede correlacionar con la eficacia o la falta de la misma de tratamientos del cáncer administrados al sujeto.

En un modo de realización de los procedimientos de seguimiento de un cáncer con tumores sólidos descrito en el presente documento, la carga de mutación que se detecta es la cantidad de al menos una mutación activadora asociada a tumor y al menos una mutación asociada a tumor de resistencia en una muestra de sangre obtenida

de un paciente con cáncer sólido. La carga de mutación se detecta con el tiempo, por ejemplo, durante una tanda de tratamiento o tratamientos del cáncer. Por tanto, se pueden determinar cambios con el tiempo en la carga de mutación de un sujeto con cáncer. La cantidad detectada o el cambio en la cantidad de al menos una mutación asociada a tumor activadora pueden servir como indicador de la progresión, gravedad del cáncer y/o un éxito o falta del mismo del tratamiento o tratamientos administrados al paciente. El procedimiento de toma de decisiones sobre el tratamiento del cáncer con tumores sólidos en el paciente se puede realizar en base a la carga de mutación que se detecta.

De forma inesperada, al aplicar los procedimientos descritos en el presente documento, la progresión, gravedad o estadio de un cáncer con tumores sólidos en un paciente, así como la sensibilidad del cáncer a ciertos tratamientos, se pueden reconocer o determinar de manera fiable antes de la aparición de signos o síntomas clínicos en el sujeto, o antes de que los signos o síntomas sean detectables por otras técnicas y procedimientos de detección. En algunos casos, el estado de un cáncer con tumores sólidos en un sujeto se puede evaluar una o más (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o cualquier intervalo delimitado por estos números enteros) semanas o meses antes de la aparición de signos o síntomas clínicos de cáncer con tumores sólidos en el sujeto. Por lo tanto, las decisiones clínicas se pueden tomar en base a la carga de mutación asociada a tumor hallada en la sangre del sujeto. Por ejemplo, un tratamiento del cáncer se puede iniciar, detener o cambiar en base a la carga de mutación detectada del sujeto. En otro ejemplo, se puede ajustar una dosis de tratamiento del cáncer, tal como incrementar o disminuir, en base a la carga de mutación asociada a tumor del sujeto.

En un ejemplo ilustrativo, la carga de mutación de las mutaciones de EGFR en la sangre de un sujeto con CPNM se determina y se usa en un procedimiento de toma de decisiones clínico. En otro ejemplo ilustrativo, se usan mediciones cuantitativas de una carga de mutación para realizar un seguimiento de cambios dinámicos cuantitativos de mutaciones de EGFR en pacientes con CPNM, y estos cambios cuantitativos se usan para guiar las decisiones clínicas. Los tratamientos, tales como el tratamiento de EGFR dirigido, se pueden indicar y administrar al sujeto en base a los cambios cuantitativos detectados de una o más mutaciones de EGFR activadoras en la sangre del sujeto. Por ejemplo, si una cantidad detectada de una o más mutaciones de EGFR está por encima de un nivel umbral, entonces se puede indicar y administrar un tratamiento al sujeto. En otro ejemplo, si una cantidad detectada de una o más mutaciones activadoras de EGFR está por encima de un nivel umbral, entonces la dosis del tratamiento de EGFR dirigido se determina en base a la carga de mutación de EGFR activadora. Por ejemplo, se puede recomendar una dosis mayor del tratamiento de EGFR dirigido con un inhibidor de las tirosina cinasas reversible ("tratamiento con TKI reversible") en base a la mayor carga de mutación detectada de las mutaciones de EGFR. Se realiza un seguimiento del estado del sujeto con CPNM durante la tanda del tratamiento con TKI reversible. La disminución o, en algunos casos, el mantenimiento de la carga de mutación de EGFR activadora indica un éxito del tratamiento con TKI reversible, lo que indica que se puede continuar o, en algunos casos, detener. El incremento en la carga de mutación de EGFR indica una disminución en la eficacia del tratamiento con TKI reversible. La aparición de las mutaciones de EGFR de resistencia o el incremento de la carga de mutación de EGFR de resistencia también indica una disminución o una disminución potencial en la eficacia del tratamiento con TKI reversible. Cuando se detecta una disminución o una disminución potencial en la eficacia del tratamiento con TKI, se pueden tomar varias decisiones clínicas, tales como incrementar la dosificación del tratamiento con TKI reversible, administrar un tratamiento diferente, tal como quimioterapia y/o radioterapia, administrar un tratamiento dirigido diferente, tal como un tratamiento con TKI irreversible, o cualquier combinación de los anteriores. Las decisiones clínicas pueden incluir la decisión de iniciar, detener o elegir no realizar un tratamiento o un procedimiento de diagnóstico, una decisión de comenzar cuidados paliativos o de atenuación, o una decisión de detener todos los tratamientos y procedimientos.

En un modo de realización de los procedimientos de evaluación del estado de un cáncer con tumores sólidos, la carga de mutación de las mutaciones de EGFR en la sangre de un sujeto con CPNM se detecta y se cuantifica, y los resultados de detección y cuantificación se usan para estudiar, evaluar o realizar un seguimiento de pacientes con CPNM. En este contexto, los resultados de la detección y cuantificación se usan para tomar decisiones clínicas con respecto a los pacientes con CPNM, incluyendo las decisiones sobre tratamiento y decisiones sobre diagnóstico. En algunos casos, se puede usar la detección y cuantificación de la carga de mutación de EGFR en lugar de otros procedimientos de diagnóstico, tal como TAC y evaluación radiológica, para evaluar, estudiar o realizar un seguimiento del CPNM en los pacientes. En algunos otros casos, la evaluación de la carga de mutación de EGFR se puede usar conjuntamente con otros procedimientos de diagnóstico para evaluar, estudiar o realizar un seguimiento del CPNM en los pacientes. En comparación con otras técnicas y procedimientos de diagnóstico usados en el seguimiento del CPNM, tales como biopsias, evaluación radiológica u otras técnicas de imagen, tales como TAC, la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas de EGFR en la sangre de sujetos con CPNM puede tener un menor riesgo para el paciente, menor invasividad o menores costes, o una combinación de estas ventajas. Por consiguiente, la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de sujetos con CPNM se puede realizar con más frecuencia que al menos algunas otras técnicas y procedimientos de diagnóstico, lo que puede permitir una detección más temprana de la progresión del cáncer y una administración más temprana de tratamientos al sujeto, en comparación con una situación en la que no se realiza ninguna detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de sujetos con CPNM. La detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de sujetos con CPNM se puede realizar en diversos puntos temporales ("puntos temporales de detección"), de los que sus ejemplos se analizan en la sección "Mutaciones asociadas a tumor como factor

pronóstico o predictivo de evaluación de cáncer con tumores sólidos" de este documento. Las situaciones ejemplares analizadas a continuación ilustran algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento.

5 Se puede usar la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM para realizar un seguimiento del CPNM en los pacientes, en lugar de o en combinación con otras técnicas de diagnóstico, tales como radiología (radiografías) o técnicas de imagen, tales como TAC. Los resultados de la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM se pueden usar para guiar las decisiones sobre diagnóstico. Por ejemplo, si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR en un paciente durante un ciclo de tratamiento o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, en comparación con un punto temporal de detección más temprano, entonces se puede tomar la decisión de realizar procedimientos de diagnóstico adicionales, alterar los procedimientos de diagnóstico, o ambos. Por ejemplo, si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR en un paciente durante un ciclo de tratamiento o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, en comparación con un punto temporal de detección más temprano, entonces se toma la decisión de realizar un seguimiento más riguroso del paciente. Se puede tomar la decisión anterior incluso si la evaluación radiológica o de imagen no se realiza o si se realiza pero no confirma la progresión de la enfermedad. Una situación en la que puede surgir el ejemplo anterior es cuando se realiza un seguimiento de la progresión de la enfermedad en un paciente después de finalizar el tratamiento con el inhibidor TKI para detectar el denominado "efecto de llamarada", lo que quiere decir que el tumor comienza a crecer muy rápido después de que se detenga el tratamiento con inhibidor TKI.

Realizar un seguimiento más riguroso del paciente, o realizar un seguimiento riguroso, en este y otros ejemplos, puede querer decir que se puede someter al paciente a procedimientos de diagnóstico adicionales, tales como evaluaciones radiológicas (radiografías) u otras evaluaciones de imagen (por ejemplo, TAC), que no se realizarían si no se detectara un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR. Realizar un seguimiento más riguroso del paciente también puede querer decir que se puede someter al paciente a procedimientos de diagnóstico más frecuentes, tales como detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR, evaluaciones radiológicas (radiografías) u otras evaluaciones de imagen (por ejemplo, por TAC), que con la frecuencia con la que se realizaría uno o más de estos procedimientos de diagnóstico si no se detectara el incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR. Un seguimiento más riguroso puede permitir al médico captar la progresión de la enfermedad en su punto temporal más temprano.

Cuando se usa la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM para realizar un seguimiento del CPNM en los pacientes, los resultados de la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM también se pueden usar para guiar las decisiones sobre tratamiento. Por ejemplo, si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR en un paciente durante un ciclo de tratamiento o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, en comparación con un punto temporal de detección más temprano, entonces se puede tomar la decisión de continuar el tratamiento, tal como administrar otro ciclo del mismo tratamiento, o modificar el tratamiento administrado en el ciclo siguiente, en comparación con el ciclo de tratamiento anterior. Las decisiones anteriores se pueden tomar incluso si la progresión del CPNM no se detecta por otros procedimientos de diagnóstico. Si se detecta una disminución en los ácidos nucleicos mutados de EGFR en un paciente durante un ciclo de tratamiento o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, en comparación con un punto temporal de detección más temprano, se puede tomar la decisión de no administrar otro ciclo del mismo tratamiento o modificar el tratamiento administrado en el ciclo siguiente, en comparación con el ciclo de tratamiento anterior. Por ejemplo, si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR, y solo se administra quimioterapia en el ciclo de tratamiento durante o después del que se detectó el incremento en el ácido nucleico mutado de EGFR, entonces se puede tomar la decisión de administrar tratamiento con inhibidor TKI, tal como tratamiento con erlotinib, en lugar de o además de la quimioterapia en el ciclo siguiente. En otro ejemplo, si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR, y solo se administra tratamiento con TKI en el ciclo de tratamiento durante o después del que se detectó el incremento en el ácido nucleico mutado de EGFR, entonces se puede tomar la decisión de administrar quimioterapia además del tratamiento con TKI en el ciclo siguiente. En un ejemplo más, si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR y se administra una combinación de tratamiento con TKI y quimioterapia en el ciclo de tratamiento durante o después del que se detecta el incremento en el ácido nucleico mutado de EGFR, se puede tomar la decisión de incrementar una dosis de quimioterapia, de tratamiento con TKI o la dosis de ambos tratamientos, en el ciclo siguiente. Si se detecta una disminución en los ácidos nucleicos mutados de EGFR, y se administra una combinación de tratamiento con TKI y quimioterapia en el ciclo de tratamiento durante o después del que se detecta la disminución en el ácido nucleico mutado de EGFR, entonces se puede tomar la decisión de disminuir una dosis de quimioterapia, de tratamiento con TKI o ambas en el ciclo siguiente. Si se detecta una disminución en los ácidos nucleicos mutados de EGFR durante un ciclo de tratamiento o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, en comparación con un punto de detección más temprano, se puede tomar la decisión de no administrar el ciclo de tratamiento siguiente o administrar el ciclo de tratamiento siguiente más tarde que en una situación en la que no se detecta disminución en los ácidos nucleicos mutados de EGFR. Aún en otro ejemplo, si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR en un paciente durante un ciclo de tratamiento o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, en comparación con un punto temporal de detección más temprano, entonces se puede tomar la decisión de iniciar el ciclo de tratamiento siguiente antes que en una situación en la

que no se detecta incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR. Una situación en la que puede surgir el ejemplo anterior es cuando se realiza un seguimiento de la progresión de la enfermedad en un paciente después de que se finalice el tratamiento con inhibidor TKI para detectar el "efecto de llamarada". Si se detecta un incremento en los ácidos nucleicos mutados de EGFR mutado después de que finalizara el ciclo de tratamiento con el tratamiento con TKI, se puede tomar una decisión de reanudar el tratamiento con TKI de inmediato.

Se puede usar la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM para evaluar o estudiar el CPNM en los pacientes, en lugar de o en combinación con otras técnicas de diagnóstico, como radiología (radiografías) o técnicas de imagen, tales como TAC. Los resultados de la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM se pueden usar para guiar las decisiones sobre diagnóstico. Por ejemplo, si se determina que un nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente está por encima de un nivel umbral en un punto temporal de detección particular, entonces se puede tomar la decisión de realizar procedimientos de diagnóstico adicionales, alterar procedimientos de diagnóstico o ambos. Por ejemplo, si se determina que un nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente está por encima de un nivel umbral después de que finalizara un ciclo de tratamiento, entonces se toma la decisión de realizar un seguimiento más riguroso del paciente. Una situación en la que puede surgir el ejemplo anterior es cuando se realiza un seguimiento de la progresión de la enfermedad en un paciente después de que se finalice el tratamiento con inhibidor TKI para detectar el "efecto de llamarada".

Cuando se usa la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM para estudiar o evaluar el CPNM en los pacientes, los resultados de la detección de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM también se pueden usar para guiar las decisiones sobre tratamiento. Por ejemplo, si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por encima de un nivel umbral en un punto temporal de detección particular, tal como durante un ciclo de tratamiento o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, se puede tomar la decisión de continuar el tratamiento, tal como administrar otro ciclo del mismo tratamiento, o modificar el tratamiento administrado en el ciclo siguiente, en comparación con el ciclo de tratamiento anterior. Las decisiones anteriores se pueden tomar incluso si la progresión del CPNM no se detecta por otros procedimientos de diagnóstico. Si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por debajo de un nivel umbral en un punto temporal de detección particular, tal como durante o tras la finalización de un ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de no administrar otro ciclo de tratamiento, o modificar el tratamiento o tratamientos administrados en el ciclo siguiente, en comparación con el ciclo de tratamiento anterior. Por ejemplo, si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por encima de un nivel umbral en un punto temporal de detección durante o después de un ciclo de tratamiento, y solo se administró quimioterapia en el ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de administrar el tratamiento con inhibidor TKI, como tratamiento con erlotinib, en lugar de o además de la quimioterapia en el ciclo siguiente. En otro ejemplo, si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por encima de un nivel umbral en un punto temporal de detección durante o después de un ciclo de tratamiento, y solo se administró el tratamiento con TKI en el ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de administrar quimioterapia además del tratamiento con TKI en el ciclo siguiente. En un ejemplo más, si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por encima de un nivel umbral en un punto temporal de detección durante o después de un ciclo de tratamiento, y se administra una combinación de tratamiento con TKI y quimioterapia en el ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de incrementar una dosis de quimioterapia, de tratamiento con TKI o ambas en el ciclo siguiente. Si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por debajo de un nivel umbral en un punto temporal de detección durante o después de un ciclo de tratamiento, y se administra una combinación de tratamiento con TKI y quimioterapia en el ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de disminuir una dosis de quimioterapia, de tratamiento con TKI o ambas en el ciclo siguiente. Aún en otro ejemplo, si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por encima de un nivel umbral en un punto temporal de detección durante o después de un ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de reanudar el tratamiento con TKI de inmediato. Si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por debajo de un nivel umbral en un punto temporal de detección durante o después de un ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de iniciar el ciclo de tratamiento siguiente antes que en una situación en la que no se detectó un nivel por encima del umbral en ácidos nucleicos mutados de EGFR. Una situación en la que puede surgir el ejemplo anterior es cuando se realiza un seguimiento de la progresión de la enfermedad en un paciente después de que se finalice el tratamiento con inhibidor TKI para detectar el "efecto de llamarada". Si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por encima de un nivel umbral en un punto temporal de detección después de un ciclo de tratamiento con TKI, entonces se puede tomar la decisión de reanudar el tratamiento con TKI de inmediato. Si se determina que el nivel de ácidos nucleicos mutados de EGFR en la sangre de un paciente con CPNM está por debajo de un nivel umbral en un punto temporal de detección durante o después de un ciclo de tratamiento, entonces se puede tomar la decisión de no administrar el ciclo de tratamiento siguiente o administrar el ciclo de tratamiento siguiente más tarde que en una situación en la que no se detectó un nivel por debajo del umbral en ácidos nucleicos mutados de EGFR.

Mutaciones asociadas a tumor como factor pronóstico o predictivo de evaluación de cáncer con tumores sólidos

De acuerdo con algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, los resultados de la detección de mutación o mutaciones asociadas a tumor en sujetos con cánceres con tumores sólidos se usan como factores pronósticos y/o predictivos para las consecuencias de cáncer con tumores sólidos en los sujetos. Los resultados de la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor se correlacionan con las consecuencias de cáncer con tumores sólidos de los sujetos, incluyendo las respuestas al tratamiento del cáncer. Los inventores aplicaron su descubrimiento al tratamiento y diagnóstico de cáncer con tumores sólidos incorporando la detección de secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor en muestras de plasma obtenidas de sujetos con cáncer en procedimientos relacionados con el diagnóstico y tratamiento de cánceres con tumores sólidos. Algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento incorporan la detección y/o cuantificación de mutaciones asociadas a tumor en la sangre de pacientes sometiendo a prueba muestras de plasma de pacientes para detectar secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor. La detección de acuerdo con los procedimientos anteriores puede ser una detección *in vitro* realizada en una muestra de sangre o plasma extraída del sujeto. La carga de mutación detectada en la sangre de los sujetos con cánceres con tumores sólidos se puede usar como factor pronóstico y/o factor predictivo con respecto al desarrollo y consecuencias del cáncer. De acuerdo con los procedimientos de tratamiento y diagnóstico que incorporan la aplicación útil del descubrimiento de los inventores, los resultados de la detección se pueden usar en las etapas posteriores a la detección para predecir el desarrollo de cáncer sólido, consecuencias para el paciente, efectos de los tratamientos del cáncer así como para elegir procedimientos de tratamiento y diagnóstico y guiar las elecciones de comportamiento de pacientes con cáncer con tumores sólidos.

Se divulga adicionalmente la aplicación de la invención al tratamiento y diagnóstico de CPNM incorporando la detección y/o cuantificación de secuencias de EGFR mutadas en la sangre de pacientes con CPNM en los procedimientos relacionados con el diagnóstico y tratamiento de CPNM, usando así mutaciones de EGFR como factor pronóstico o predictivo de evaluación del cáncer CPNM. La detección de secuencias de EGFR se puede realizar sometiendo a prueba la muestra para detectar secuencias de EGFR mutadas por una técnica analítica adecuada. Un ejemplo de dicha técnica es la PCR cuantitativa, tal como PCR cuantitativa en tiempo real, que se puede emplear adecuadamente en los diversos procedimientos de tratamiento y diagnóstico descritos en el presente documento, y puede incorporar una o más de las técnicas mejoradas descritas en la sección "Detección mejorada de mutaciones adecuadas a tumor" de este documento.

De acuerdo con los modos de realización de los procedimientos de la presente invención, que aplican útilmente los descubrimientos de los inventores para los procedimientos relacionados con el tratamiento y diagnóstico de cánceres con tumores sólidos, tales como CPNM, el tratamiento y diagnóstico, presencia, ausencia, cantidad o tipos de secuencias mutadas detectadas en las muestras de plasma pueden servir, por separado o en combinación, como un factor pronóstico y/o predictivo con respecto a las consecuencias de cáncer con tumores sólidos y las respuestas al tratamiento, incluyendo quimioterapia y tratamiento farmacológico dirigido (por ejemplo, tratamiento con TKI). Los procedimientos de acuerdo con los modos de realización de la presente invención pueden emplear la detección cuantitativa y/o cualitativa de mutaciones asociadas a tumor para determinar la presencia o ausencia, o la naturaleza de las mutaciones asociadas a tumor en la sangre de los sujetos. La determinación cualitativa o cuantitativa, o una combinación de las mismas, se puede denominar determinación o detección de una "carga de mutación", que es un término y un concepto descritos en otra parte de este documento con ejemplos explicativos. Los principios y los ejemplos de la determinación de "carga de mutación" descritos en otra parte de este documento también se pueden aplicar a los procedimientos descritos en esta sección. Por ejemplo, la carga de mutación de secuencias de EGFR detectadas en un sujeto con CPNM, por ejemplo, en una muestra de plasma obtenida de un sujeto con CPNM, puede servir como factor pronóstico y/o predictivo con respecto a las consecuencias del cáncer CPNM y a las respuestas al tratamiento, incluyendo quimioterapia y tratamiento farmacológico dirigido

La carga de mutación se puede detectar en uno o más puntos temporales, por ejemplo, en uno o más puntos antes, durante o después de una tanda de tratamiento o tratamientos del cáncer. Por ejemplo, la carga de mutación se puede detectar al o cerca del inicio del diagnóstico de cáncer, pero antes del inicio de cualquier terapia o tratamiento. La carga de mutación se puede detectar durante el ciclo de tratamiento, después del final del ciclo de tratamiento o entre los ciclos de tratamiento. La carga de mutación se puede detectar en uno o más puntos durante la remisión o en uno o más puntos durante la recaída. Se debe entender que, en algunos casos, la carga de mutación detectada en solo un punto, tal como durante un ciclo de tratamiento, puede servir como factor pronóstico y/o predictivo de consecuencia del cáncer con tumores sólidos. En otros casos, las cargas de mutación detectadas en dos o más puntos temporales valorados en combinación pueden servir como factor de pronóstico y/o predictivo con respecto a la consecuencia del cáncer con tumores sólidos. La detección en dos o más puntos temporales se puede usar para realizar un seguimiento del progreso del cáncer o éxito de tratamientos particulares y tomar decisiones clínicas apropiadas, como se analiza en la sección "Procedimientos de seguimiento de un cáncer con tumores sólidos en un sujeto por detección de secuencias mutadas asociadas a tumor en la sangre del sujeto" de este documento.

El punto temporal en el que se lleva a cabo la detección se puede seleccionar en base al valor predictivo y/o pronóstico de los resultados obtenidos en ese punto, o, en algunas circunstancias, se puede elegir por conveniencia, por ejemplo, para coincidir con otro procedimiento o procedimientos de diagnóstico o tratamiento. Por ejemplo, la detección de mutación en muestras de tejido se puede llevar a cabo necesariamente en el punto

temporal de la biopsia, puesto que es cuando se extraen las muestras de tejido tumoral usando un procedimiento de la invención. La detección de la carga de mutación en sangre o plasma se puede llevar a cabo en diferentes puntos temporales y se puede llevar a cabo con frecuencia, ya que existe poco riesgo para el paciente. Un ejemplo del punto temporal en el que se obtienen las muestras para la detección para realizar las etapas de detección de acuerdo con los modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento ("punto temporal de detección") es el punto temporal en el que se llevan a cabo los procedimientos de diagnóstico iniciales en un sujeto. Este punto temporal puede coincidir con el punto temporal en el que se realizan la biopsia inicial, la evaluación radiológica u otros procedimientos de diagnóstico, tales como TAC. Los niveles de ácidos nucleicos mutados de EGFR mutados detectados en este punto temporal pueden servir como niveles "iniciales" contra frente a los que se mide la progresión de un cáncer (o la falta de progresión). Un ejemplo más del punto temporal de detección es el punto temporal antes de iniciar un tratamiento del cáncer. Otros ejemplos de puntos temporales de detección son el punto temporal durante un ciclo de tratamiento, un punto temporal después del final de un ciclo de tratamiento y un punto temporal después del final de una tanda de tratamiento.

Por ejemplo, cuando se administra a un paciente con cáncer con tumores sólidos varios ciclos de tratamiento, un punto temporal de detección puede ser durante el primer ciclo de tratamiento, después del final del primer ciclo de tratamiento pero antes del inicio del segundo ciclo de tratamiento (si se administra el segundo ciclo de tratamiento), durante el segundo ciclo de tratamiento, después del final del segundo ciclo de tratamiento pero antes del inicio del tercer ciclo de tratamiento (si se va a administrar el tercer ciclo), durante el tercer ciclo de tratamiento, después del final del tercer ciclo de tratamiento pero antes del inicio del cuarto ciclo de tratamiento (si se administra el cuarto ciclo de tratamiento, y así sucesivamente con respecto a los ciclos de tratamiento siguientes, tales como el cuarto, el quinto, el sexto o los ciclos siguientes). Se debe entender que se puede realizar la detección y uno o más de los puntos temporales anteriores.

En algunos modos de realización de los procedimientos de seguimiento de un cáncer con tumores sólidos descrito en el presente documento, la carga de mutación que se detecta es la presencia, ausencia o cantidad de al menos una mutación asociada a tumor activadora en una muestra de sangre obtenida de un paciente con cáncer sólido. La carga de mutación detectada, tal como la presencia, ausencia o cantidad de al menos una mutación asociada a tumor activadora, sirve como factor pronóstico y/o predictivo con respecto a una o más consecuencias del cáncer con tumores sólidos. Los ejemplos no limitantes de las consecuencias son tamaño tumoral, metástasis tumoral, éxito de un tratamiento, lo que puede dar como resultado que un paciente presente remisión, supervivencia del paciente (incluyendo, pero sin limitarse a, supervivencia global, supervivencia sin enfermedad y supervivencia sin progresión), lo que se puede medir como la probabilidad de supervivencia durante un período de tiempo específico, recaída del cáncer, "llamarada" del tumor o muerte del paciente. Se realizan una o más decisiones sobre acciones adicionales con respecto al paciente con cáncer con tumores sólidos en base a la carga de mutación que se detecta. Los ejemplos de decisiones sobre dichas acciones adicionales son las decisiones de elegir un tratamiento dirigido alternativo, iniciar, detener o elegir no realizar un tratamiento o procedimiento de diagnóstico, una decisión de comenzar cuidados paliativos o de atenuación, o una decisión de detener todos los tratamientos y procedimientos.

Por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento usan la detección de la carga de mutación antes, durante y/o después de la extirpación quirúrgica del tumor en un sujeto, como factor pronóstico y/o predictivo de la eficacia de la intervención quirúrgica. Los procedimientos también se pueden usar antes, durante o después de cualquier tratamiento del cáncer como factor pronóstico y/o predictivo de la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, los procedimientos se pueden usar para determinar la probabilidad de supervivencia, incluyendo OSS y PS, después de realizar un tratamiento, tal como quimioterapia, tratamiento con TKI o su combinación, en un sujeto particular. Los procedimientos también se pueden usar para identificar a un sujeto como candidato adecuado para un tratamiento del cáncer, por ejemplo, determinando, en base a los resultados de detección de una carga de mutación, si una consecuencia del cáncer se vería o no favorablemente afectada por una terapia o tratamiento. Los procedimientos se pueden usar para determinar la tanda futura de tratamiento, lo que puede implicar, por ejemplo, administrar ciclos de tratamiento adicionales o modificar la pauta de tratamiento. Las probabilidades de consecuencia en base a la carga de mutación detectada se pueden determinar más de una vez en un paciente particular y se pueden usar para realizar un seguimiento del progreso del cáncer con tumores sólidos y la eficacia del tratamiento. Los procedimientos también se pueden usar durante o después del tratamiento del cáncer para determinar las opciones y desarrollos cronológicos adecuados para la atención posterior al tratamiento. Por ejemplo, si se determina la duración probable de la supervivencia, se puede recomendar a un paciente que solicite cuidados paliativos o de atenuación en base a la determinación.

Inesperadamente, usando la detección cuantitativa de mutaciones asociadas a tumor de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, se puede determinar la probabilidad de una consecuencia de un cáncer con tumores sólidos en un paciente. Por lo tanto, se pueden tomar decisiones clínicas en base a la cuantificación de una cantidad de una o más secuencias de ácido nucleico mutadas asociadas a tumor. Los procedimientos descritos en el presente documento, en algunos casos, pueden reducir o minimizar ventajosamente el número de procedimientos de diagnóstico y tratamiento complejos, caros o invasivos realizados en un paciente con cáncer con tumores sólidos, mientras que al mismo tiempo proporcionan datos de diagnóstico para el procedimiento de toma de decisiones clínicas fundadas. Los procedimientos descritos en el presente documento

pueden reducir el coste del tratamiento y diagnóstico del cáncer, disminuir la incomodidad y la carga del paciente y dar lugar a un procedimiento de toma de decisiones clínicas más fundadas. En algunos otros casos, los procedimientos descritos en el presente documento pueden detectar la progresión del cáncer antes que otros procedimientos, permitiendo así que los médicos tomen decisiones más tempranas sobre los procedimientos de tratamiento y diagnóstico que se van a emplear en un paciente con cáncer particular, mejorando potencialmente la consecuencia del cáncer.

En un ejemplo ilustrativo, la carga de mutación de las mutaciones activadoras de EGFR en un sujeto con CPNM se determina antes o durante uno de los ciclos de tratamiento, lo que puede incluir quimioterapia, tratamiento con TKI o una combinación de estos tratamientos. La carga de mutación de las mutaciones de EGFR activadoras detectadas durante un ciclo de tratamiento, por ejemplo, durante un tercer ciclo de los seis ciclos, se usa como hecho predictivo con respecto al éxito del tratamiento con TKI y, en algunos casos, como factor pronóstico con respecto a la supervivencia del paciente se use o no tratamiento con TKI. En otro ejemplo, la carga de mutación de las mutaciones activadoras de EGFR en un sujeto con CPNM se determina en la situación inicial, o antes del inicio de cualquier tratamiento, lo que puede incluir quimioterapia, tratamiento con TKI o una combinación de estos tratamientos. La carga de mutación de las mutaciones de EGFR activadoras detectadas en la situación inicial se usa como factor predictivo para pacientes con mutación de EGFR con respecto al éxito del tratamiento con TKI, medido por SSP, SG o ambos. En base a las pruebas disponibles, tales como los resultados de los ensayos clínicos, los datos experimentales sobre la carga de mutación detectada se interpretan y se usan como factor pronóstico y/o predictivo para determinar las consecuencias de CPNM en un paciente. Por ejemplo, los datos experimentales sobre la carga de mutación detectada en un punto temporal particular se pueden usar como factor pronóstico para una consecuencia probable de un paciente particular o para predecir una respuesta a un tratamiento. En un ejemplo, una carga de mutación de las mutaciones activadoras de EGFR detectadas durante un ciclo de tratamiento sirve como factor pronóstico de SG de un paciente particular, lo que se valora como más largo para los pacientes con carga de mutación detectada de las mutaciones activadoras de EGFR, se use o no quimioterapia sola o conjuntamente con tratamiento con TKI para el tratamiento del paciente. En otro ejemplo, una carga de mutación de las mutaciones activadoras de EGFR detectadas en un paciente durante un ciclo de tratamiento de combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI sirve como factor predictivo del éxito del tratamiento con TKI en el paciente con CPNM expresado como un incremento en SSP y SG. Después de que se valore la consecuencia probable en un paciente particular, se pueden tomar decisiones clínicas de acuerdo con las guías clínicas ejemplares analizadas en la sección "Procedimientos de seguimiento de un cáncer con tumores sólidos en un sujeto por detección de secuencias mutadas asociadas a tumor en la sangre del sujeto" de este documento.

Detección mejorada de mutaciones asociadas a tumor

En los modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, se detectan secuencias de ácido nucleico por procedimientos adecuados, tales como amplificación cuantitativa o secuenciación de ácido nucleico. Los procedimientos de amplificación cuantitativa se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.210.015; 5.804.375; 6.127.155; 6.180.349; 6.033.854; y 5.972.602, así como, por ejemplo, en Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7276-7280 (1991), Gibson *et al.*, *Genome Research* 6:995-1001 (1996); DeGraves, *et al.*, *Biotechniques* 34(1):106-10, 112-5 (2003); Deiman B, *et al.*, *Mol Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002). Se puede realizar un seguimiento de las amplificaciones en "tiempo real". Aunque se puede usar el procedimiento de secuenciación de dideoxinucleótidos estándar u otros procedimientos de secuenciación de nucleótidos más antiguos, la secuenciación puede ser particularmente eficaz cuando se usa secuenciación de alto rendimiento, por ejemplo, procedimientos de "secuenciación de última generación" tales como HiSeq™, MiSeq™, o Genome Analyzer (cada uno disponible de Illumina), SOLiD™ o Ion Torrent™ (cada uno disponible de Life Technologies) y secuenciación 454™ (de Roche Diagnostics). Por ejemplo, en la secuenciación de alto rendimiento, las reacciones de secuenciación paralelas que usan múltiples plantillas y múltiples cebadores permiten la secuenciación rápida de genomas o grandes porciones de genomas. Véanse por ejemplo, los documentos WO 03/004690, WO 03/054142, WO 2004/069849, WO 2004/070005, WO 2004/070007, WO 2005/003375, WO 00/06770, WO 00/27521, WO 00/58507, WO 01/23610, WO 01/57248, WO 01/57249, WO 02/061127, WO 03/016565, WO 03/048387, WO 2004/018497, WO 2004/018493, WO 2004/050915, WO 2004/076692, WO 2005/021786, WO 2005/047301, WO 2005/065814, WO 2005/068656, WO 2005/068089, WO 2005/078130, y Seo, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101: 5488-5493. En algunos modos de realización, los amplicones se secuencian por uno de los procedimientos seleccionados a partir de un procedimiento de incorporación de bases, por ejemplo, un procedimiento de pirosecuenciación (patentes de EE. UU. n.º 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891); un procedimiento de detección de iones hidrógeno (ISFET) (por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 8.262.900), o un procedimiento de detección de terminación con colorante (patentes de EE.UU. n.º 7.835.871, 8.244.479, 8.315.817 y 8.412.467). También se pueden emplear tecnología e instrumentos de secuenciación profunda (es decir, tecnología e instrumento con capacidad para lectura de secuencia digital). Sin limitación, los ejemplos de instrumentos incluyen la familia de instrumentos GS (454 Life Sciences, Branford, Conn.); ION PROTON® and PGM™ (Life Technologies, Grand Island, N.Y.); HISEQ® y MISEQ® (Illumina, San Diego, Cal.) o cualquier mejora y modificación de los mismos.

En algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, se emplea PCR cuantitativa. PCR cuantitativa se refiere en general a un procedimiento que permite la cuantificación de las

cantidades de la secuencia de ácido nucleico diana usada al inicio en la reacción PCR. Las técnicas de PCR cuantitativa usan varios enfoques para la cuantificación. Un ejemplo de un procedimiento de PCR cuantitativa es la "PCR en tiempo real", que también se puede denominar "PCR cuantitativa en tiempo real". Aunque algunas fuentes usan los términos "PCR en tiempo real" y "PCR cuantitativa" como sinónimos, este no es el caso para el presente documento. Aquí, el término "PCR cuantitativa" engloba todas las técnicas basadas en PCR que permiten la cuantificación de las secuencias de ácido nucleico diana presentes inicialmente. El término "PCR en tiempo real" se usa para indicar un subconjunto de técnicas de PCR cuantitativa que permiten la detección del producto de PCR a lo largo de la reacción PCR, o en tiempo real. Los principios de la PCR en tiempo real se describen en general en Holland *et al.* (1991) y Held *et al.* "Real Time Quantitative PCR" *Genome Research* 6:986-994 (1996). En general, la PCR en tiempo real mide una señal en cada ciclo de amplificación. Las técnicas de PCR en tiempo real convencionales se basan en fluoróforos que emiten una señal en la finalización de cada ciclo de multiplicación. Los ejemplos de dichos fluoróforos son colorantes de fluorescencia que emiten fluorescencia a una longitud de onda definida tras la unión a ADN bicatenario, tal como SYBR verde. Un incremento en el ADN bicatenario durante cada ciclo de amplificación da lugar así a un incremento en la intensidad de fluorescencia debido a la acumulación de producto de PCR. Otro ejemplo de fluoróforos usados en la PCR en tiempo real son las sondas indicadoras fluorescentes específicas de secuencia. Los ejemplos de dichas sondas son las sondas TaqMan[®] y las sondas FRET. Las sondas TaqMan[®] contienen un fluoróforo y un extintor de fluorescencia, lo que reduce la fluorescencia emitida por el fluoróforo. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda se escinde por la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa, liberando el fluoróforo. La liberación del fluoróforo da como resultado un incremento en la señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad del producto de PCR. Las sondas FRET emplean transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Se diseñan dos sondas específicas de secuencia marcadas para unirse al producto de PCR durante la fase de hibridación de la PCR, lo que da como resultado una transferencia de energía de un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor. Esto da como resultado un incremento en la fluorescencia durante la fase de hibridación, que es proporcional a la cantidad del producto de PCR.

El uso de la sonda indicadora específica de secuencia proporciona la detección de una secuencia diana con alta especificidad y permite la cuantificación incluso en presencia de amplificación de ADN no específica. Las sondas fluorescentes también se pueden usar en ensayos múltiples para la detección de varios genes en la misma reacción basada en sondas específicas con marcadores de diferentes colores. Por ejemplo, un ensayo múltiple puede usar varias sondas específicas de secuencia, marcadas con una variedad de fluoróforos, incluyendo, pero sin limitarse a, FAM, JA270, CY5.5 y HEX, en la misma mezcla de reacción PCR.

Un ejemplo de un ensayo múltiple que se puede emplear adecuadamente para la detección de secuencias de EGFR mutadas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención es PCR específica de alelo, de modo que el ensayo se puede realizar con el kit COBAS[®] EGFR Mutation Test (Roche Molecular Diagnostics, Indianápolis, IN), que emplea cebadores de EGFR específicos de alelo para detectar mutaciones en secuencias de ácido nucleico en presencia de variantes naturales de las secuencias. La PCR específica de alelo es una técnica en la que la variante de la secuencia de ácido nucleico presente en la mezcla de reacción PCR se amplifica y se detecta selectivamente. La PCR específica de alelo emplea al menos un "cebador específico de alelo". El término cebador "específico de alelo" se refiere en general a un cebador cuya extensión se produce en una reacción PCR solo cuando está presente una variante específica de una secuencia de ácido nucleico en la mezcla de reacción. En otras palabras, los cebadores específicos de alelo se diseñan de tal manera que discriminan entre variantes de ácidos nucleicos y multiplican selectivamente plantillas de ácido nucleico que incluyen una variante que se va a detectar.

Algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento emplean procedimientos de detección mejorados de mutaciones asociadas a tumor en muestras de sangre obtenidas de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos. En un ejemplo, la etapa de detectar una o más mutaciones de EGFR en la sangre de un sujeto con CPNM comprende la detección de una o más secuencias de ácido nucleico de CPNM mutadas en una muestra obtenida del sujeto. La detección puede comprender poner en contacto la muestra o ácidos nucleicos aislados de la muestra, tales como ADN genómico total, con uno más cebadores específicos de alelo y otros componentes de una PCR, tales como enzimas y nucleótidos, incubar la mezcla de reacción resultante en las condiciones que permitan la amplificación selectiva de las secuencias de ácido nucleico mutadas y detectar la presencia del producto amplificado. La PCR específica de alelo se puede combinar con PCR cuantitativa en tiempo real en los modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento para mejorar la detección de las secuencias de ácido nucleico asociadas a tumor mutadas.

Los procedimientos convencionales de detección de mutaciones asociadas a tumor en muestras de sangre emplean típicamente etapas adicionales para incrementar el contenido de las secuencias mutadas en la muestra antes de realizar la amplificación por PCR de las secuencias mutantes. Por ejemplo, en un procedimiento convencional, el aislamiento de células tumorales de la muestra de sangre del sujeto antes de la amplificación por PCR se realiza para mejorar la sensibilidad de la detección de mutaciones asociadas a tumor. En otro procedimiento convencional, las secuencias de ADN no mutadas correspondientes a las secuencias asociadas a tumor mutadas se someten a digestión con nucleasas antes de la amplificación por PCR para minimizar el fondo de las secuencias no mutadas. En el presente documento se divulgan procedimientos de detección mejorados que emplean PCR cuantitativa y pueden detectar mutaciones asociadas a tumor en muestras de sangre obtenidas de

los sujetos con cánceres con tumores sólidos y, de forma ventajosa, no requieren etapas adicionales para aislar células tumorales, ADN tumoral o incrementar el contenido de las secuencias mutadas en la muestra antes de realizar la PCR cuantitativa en tiempo real.

5 Como se analiza anteriormente, la PCR en tiempo real se basa en la detección de un parámetro medible, tal como la fluorescencia, durante el transcurso de la reacción PCR. La cantidad del parámetro medible es proporcional a la cantidad del producto de PCR, lo que permite observar el incremento del producto de PCR "en tiempo real". Algunos procedimientos de PCR en tiempo real permiten la cuantificación de la plantilla de ADN de entrada en base al progreso observable de la reacción PCR. El análisis y procesamiento de los datos implicados se analiza a
 10 continuación. Una "curva de crecimiento" o "curva de amplificación" en el contexto de un ensayo de amplificación de ácido nucleico es un gráfico de una función, donde una variable independiente es el número de ciclos de amplificación y una variable dependiente es un parámetro medible dependiente de la amplificación medido en cada ciclo de amplificación, tal como fluorescencia emitida por un fluoróforo. Típicamente, el parámetro medible dependiente de la amplificación es la cantidad de fluorescencia emitida por la sonda tras la hibridación, o tras la hidrólisis de la sonda por la actividad nucleasa de la ácido nucleico polimerasa, véase Holland *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7276-7280 y la patente de EE. UU. n.º 5.210.015. En una reacción en cadena de la polimerasa típica, una curva de crecimiento comprende un segmento de crecimiento exponencial seguido de una meseta, dando como resultado una curva de amplificación sigmoidea cuando se usa una escala lineal. Una curva de crecimiento se caracteriza por un valor de "punto de corte" o valor " C_p ", que también se puede denominar "valor umbral" (o valor C_t) que es un número de ciclos donde se logra una magnitud predeterminada del parámetro medible. Un valor C_p menor representa una finalización más rápida de la amplificación, mientras que el valor C_p mayor representa una finalización más lenta de la amplificación. Cuando la eficacia de la amplificación es similar, el valor C_p menor es reflejo de una cantidad de partida mayor del ácido nucleico diana, mientras que el valor C_p mayor es reflejo de una cantidad de partida menor del ácido nucleico diana. Cuando se usa un ácido nucleico de control de concentración conocida para generar una "curva estándar", o un conjunto de valores C_p de "control" a diversas concentraciones conocidas de un ácido nucleico de control, se hace posible determinar la cantidad absoluta del ácido nucleico diana en la muestra al comparar los valores C_p de los ácidos nucleicos diana y de control.

30 La exactitud de la detección por PCR cuantitativa en tiempo real depende, por lo tanto, de la selección correcta de una serie de parámetros. Un parámetro que necesita determinarse correctamente es el intervalo en el que los valores C_p tienen una correlación lineal con la cantidad de partida del ácido nucleico, expresada como logaritmo del número de copias. Este intervalo se puede denominar "intervalo válido" o "intervalo de linealidad de ensayo" del ensayo de PCR en tiempo real.

35 Los inventores han descubierto que una muestra de sangre que contiene ADN genómico que en general no se sabe que contiene una mutación asociada a tumor puede generar, no obstante, una señal de amplificación a algunas concentraciones de ADN genómico. En algunos modos de realización, este nivel de fondo de la señal es, por lo tanto, un valor de corte por debajo del que debe estar una señal para que sea válida, es decir, para considerarse diferente del fondo. Como se indica anteriormente, el nivel de amplificación de fondo cambia con la concentración de ADN genómico. Por consiguiente, la determinación de la presencia o ausencia de una mutación asociada a tumor comprende la comparación de un valor umbral con un valor de control, en la que el valor de control es dependiente, y varía en base a la concentración de ADN genómico en la muestra. Por tanto, si el valor umbral de los ciclos para la muestra está por debajo del valor de control, entonces se considera que la muestra contiene la mutación asociada a tumor y si el valor umbral de los ciclos de la muestra es igual a o mayor que el valor de control, el resultado no indica la presencia de la mutación asociada a tumor, y se puede denominar "resultado negativo"). En un modo de realización, tal como las pruebas de pacientes en estadio metastásico pM1b de CPNM para una mutación de EGFR, dicho resultado negativo es indicativo, con verosimilitud alta, de la ausencia de una mutación de EGFR en los tumores de los pacientes. En algunos otros modos de realización, tales como las pruebas de pacientes con CPNM de un estadio metastásico diferente de pM1b (tal como M0 o pM1a), para una mutación de EGFR, dicho resultado negativo puede no ser indicativo de la ausencia de una mutación de EGFR en los tumores de los pacientes, y se debe considerar repetir las pruebas del tejido tumoral de los pacientes.

55 El valor de control es el mayor valor o intervalo de C_p en el que se produce la amplificación no específica en ausencia del ADN diana, y se puede denominar valor "liminar". En un modo de realización, el valor de control es de hecho un intervalo de valores, dentro del que debe caer un valor positivo de una muestra para que se considere. Dicho de otro modo, el intervalo representa niveles de señal posibles fuera del intervalo típico de la señal de fondo. El intervalo de control está entre el valor liminar descrito anteriormente y el valor de umbral de los ciclos de un control positivo. El valor de control se basa en la amplificación de un control interno, por ejemplo, otra región del locus mutado que no se muta con frecuencia.

60 Los procedimientos de PCR cuantitativa en tiempo real mejorados descritos en el presente documento establecen el intervalo umbral de ciclo (C_t) válido generando curvas estándar para el ADN de control a diversos niveles de ADN genómico en la mezcla de reacción PCR en tiempo real y seleccionando el intervalo umbral de ciclo válido en base al intervalo en el que se observa la linealidad del ensayo. Se determina un valor de control o de corte para la reacción PCR cuantitativa en tiempo real de acuerdo con algunos otros modos de realización de los

procedimientos mejorados descritos en el presente documento, por debajo del que la amplificación no específica en ausencia del ADN diana probablemente no interfiere con la detección cuantitativa del ADN diana presente en la mezcla de reacción. Los procedimientos mejorados descritos en el presente documento emplean una curva de calibración para la cuantificación de un ADN diana presente en la mezcla de reacción que tiene en cuenta diversas cantidades de ADN genómico presente en la muestra. Se pueden incorporar diversas combinaciones de mejoras de los ensayos de PCR en tiempo real analizadas anteriormente en los procedimientos mejorados de detección de mutaciones asociadas a tumor en muestras de sangre u otro locus diana en ADN genómico, dando lugar así a una exactitud inesperadamente incrementada de dicha detección.

10 **Cálculos y comparaciones**

Los cálculos y las comparaciones (por ejemplo, de una señal de muestra con un valor o intervalo de control) para los procedimientos descritos en el presente documento pueden implicar herramientas y cálculos informatizados. Se pueden proporcionar de forma ventajosa herramientas en forma de programas informáticos que son ejecutables por un sistema informático de propósito general (denominado en el presente documento "ordenador central") de diseño convencional. El ordenador central se puede configurar con muchos componentes físicos diferentes y se puede fabricar en muchas dimensiones y estilos (por ejemplo, ordenador de escritorio, ordenador portátil, tableta, ordenador de bolsillo, servidor, estación de trabajo, ordenador principal). Se pueden incluir componentes estándar, tales como monitores, teclados, unidades de disco, unidades de CD y/o DVD, y similares. Cuando el ordenador central se conecta a una red, las conexiones se pueden proporcionar por medio de cualquier medio de transporte adecuado (por ejemplo, medio cableado, óptico y/o inalámbrico) y cualquier protocolo de comunicación adecuado (por ejemplo, TCP/IP); el ordenador central puede incluir un soporte físico de red adecuado (por ejemplo, módem, tarjeta Ethernet, tarjeta wifi). El ordenador central puede implementar cualquiera de una variedad de sistemas operativos, incluyendo UNIX, Linux, Microsoft Windows, MacOS o cualquier otro sistema operativo.

El código informático para implementar aspectos de la presente invención se puede escribir en una variedad de lenguajes, incluyendo PERL, C, C++, Java, JavaScript, VBScript, AWK o cualquier otro lenguaje de programación o escritura que se pueda ejecutar en el ordenador central o que se pueda compilar para ejecutar en el ordenador central. El código también se puede escribir o distribuir en lenguajes de bajo nivel tales como lenguajes ensambladores o de máquinas.

El sistema de ordenador central proporciona de forma ventajosa una interfaz por medio de la que el usuario controla el funcionamiento de las herramientas. En los ejemplos descritos en el presente documento, las herramientas informáticas se implementan como comandos (por ejemplo, usando PERL), con una ejecución que se puede iniciar por un usuario desde una interfaz con línea de comandos estándar de un sistema operativo tal como Linux o UNIX. Los expertos en la materia apreciarán que los comandos se pueden adaptar al sistema operativo según sea apropiado. En otros modos de realización, se puede proporcionar una interfaz gráfica de usuario, permitiendo que el usuario controle las operaciones usando un dispositivo señalador. Por tanto, la presente invención no se limita a ninguna interfaz de usuario particular.

Los comandos o programas que incorporan diversas características de la presente invención se pueden codificar en diversos medios legibles por ordenador para almacenamiento y/o transmisión. Los ejemplos de medios adecuados incluyen discos o cintas magnéticas, medios de almacenamiento óptico como discos compactos (CD) o DVD (discos versátiles digitales), memoria *flash* y señales portadoras adaptadas para transmisión por medio de redes cableadas, ópticas y/o inalámbricas conforme a una variedad de protocolos, incluyendo Internet.

Consideraciones generales aplicables a los modos de realización de la presente invención

Un sujeto que tiene un cáncer con tumores sólidos, tal como CPNM, puede tener el cáncer con tumores sólidos no diagnosticado antes de la realización de los procedimientos de acuerdo con los modos de realización de la presente invención. Por ejemplo, un sujeto se puede someter a prueba para detectar la presencia de una mutación asociada a tumor, tal como secuencias mutantes de EGFR, en sangre antes o durante la finalización de otros procedimientos de diagnóstico destinados a diagnosticar el cáncer con tumores sólidos. Los ejemplos de dichos procedimientos de diagnóstico son diversas técnicas de imagen o análisis histológico de muestras obtenidas durante la biopsia. Se aplican consideraciones similares al estado metastásico y la estadificación del cáncer de los sujetos con cáncer con tumores sólidos. El estado metastásico, tal como el estado M1a o M1b del CPNM, y la estadificación del cáncer se pueden determinar antes, al mismo tiempo o posteriormente a los procedimientos de acuerdo con los modos de realización de la presente invención, que no se limitan por el orden de diversas etapas de diagnóstico y procedimientos realizados en el sujeto.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden emplear procedimientos de diagnóstico adecuados además de la detección de secuencias asociadas a tumor mutadas en la sangre del sujeto, para evaluar con exactitud el estado del cáncer con tumores sólidos en el sujeto. Se seleccionan adecuadamente procedimientos de diagnóstico adicionales para mejorar la exactitud de la evaluación del cáncer con tumores sólidos en el sujeto, y pueden incluir, pero no se limitan a, diversas técnicas de imagen, biopsias, análisis histológico, análisis de secuencia y otros procedimientos.

Los procedimientos descritos en el presente documento no están limitados a procedimientos puramente diagnósticos, sino que también pueden incorporar diversas etapas de tratamiento, incorporando así la aplicación y uso de los descubrimientos diagnósticos descritos en el presente documento a procedimientos mejorados de tratamiento de cánceres con tumores sólidos, de los que un ejemplo es el CPNM. En un modo de realización, los tratamientos y procedimientos de diagnóstico del cáncer apropiados se seleccionan y se administran o realizan adecuadamente en base a la presencia o ausencia de mutaciones asociadas a tumor en la sangre de un sujeto con un cáncer con tumores sólidos, tal como la presencia o ausencia de mutaciones de EGFR asociadas a tumor detectadas en la sangre del sujeto con CPNM. Los tratamientos del cáncer descritos en el presente documento pueden incluir tratamientos quirúrgicos o no invasivos, tales como tratamientos farmacológicos o radioterapias.

Mutaciones asociadas a tumor

Las mutaciones asociadas a tumor que se detectan de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento son mutaciones que se encuentran en tumores de sujetos con cánceres con tumores sólidos y afectan al desarrollo de los cánceres con tumores sólidos en los sujetos. Por ejemplo, las mutaciones asociadas a tumor pueden afectar a la aparición, progresión o recidiva del cáncer, así como al grado de respuesta o sensibilidad del cáncer a un tratamiento del cáncer. Un ejemplo de mutaciones asociadas a tumor que se pueden detectar de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento son las mutaciones en protooncogenes que los convierten en oncogenes. Otro ejemplo son las mutaciones en el gen supresor tumoral que dan como resultado la pérdida o disminución de su función. Las mutaciones que se pueden detectar de acuerdo con los procedimientos de la presente invención no se limitan a las mutaciones en genes que codifican proteínas, sino que también pueden incluir las mutaciones en secuencias de ácido nucleico no codificantes, tales como elementos reguladores, secuencias que codifican ARN no codificante y otras secuencias no codificantes. Las mutaciones asociadas a tumor de las secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas pueden ser deleciones o inserciones sin cambio de pauta de lectura, así como sustituciones. Por ejemplo, las secuencias de EGFR mutadas que se detectan son típicamente secuencias de ácido nucleico que contienen una o más deleciones o inserciones de nucleótidos sin cambio de pauta de lectura, así como sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una secuencia de aminoácidos mutada de EGFR. Las mutaciones asociadas a tumor pueden dar como resultado fusiones de proteínas. Algunos ejemplos de mutaciones asociadas a tumor que se pueden detectar en la sangre del paciente y se pueden usar para realizar un seguimiento de la aparición, progresión, recidiva del cáncer, así como para realizar un seguimiento del tratamiento del cáncer, incluyen, sin limitación, las siguientes mutaciones: mutaciones EGFR, mutaciones KRAS, incluyendo mutaciones en los codones 12, 13, 61 y 146 KRAS, mutaciones ALK, incluyendo fusiones con ALK, ROS1, incluyendo fusiones con ROS1, mutaciones c-MET, mutaciones PIK3CA (PI3K-CA), mutaciones NRF2, mutaciones FGFR1-3, mutaciones AKT1, incluyendo fusiones con AKT1, mutaciones BRAF, incluyendo sustitución V600E, mutaciones NRAS, fusión Tmprss2:ERG, mutaciones SPOP, fusiones RET, fusiones PPAR-gamma, mutaciones IDH-1 y mutaciones IDH-2. Se debe entender que algunas de las mutaciones anteriores están asociadas con algunos, pero no necesariamente todos, los cánceres con tumores sólidos. Por consiguiente, la detección de algunas de las mutaciones asociadas a tumor anteriores puede ser más adecuada para la evaluación de ciertos cánceres. Por ejemplo, la detección de las siguientes mutaciones puede ser adecuada para la evaluación del cáncer de pulmón: mutaciones EGFR, mutaciones KRAS, fusiones con ALK, fusiones con ROS1, mutaciones c-MET, mutaciones PIK3CA (PI3K-CA), mutaciones NRF2 y mutaciones FGFR1-3. En otro ejemplo, la detección de mutaciones AKT1, incluyendo fusiones, puede ser adecuada para la evaluación del cáncer de mama. En un ejemplo más, se puede usar la detección de mutaciones KRAS, tales como mutaciones de los codones 12, 13, 61 y 146, BRAF con sustitución V600E, mutaciones NRAS, PIK3CA (PI3K-CA), mutaciones de punto caliente del dominio extracelular de EGFR, para la evaluación del cáncer colorrectal. Se puede usar la detección de la fusión Tmprss2:ERG y mutaciones SPOP para la evaluación del cáncer de próstata. Se puede usar la detección de mutaciones BRAF, mutaciones NRAS, fusión con RET y fusión con PPAR gamma para la evaluación del cáncer de tiroides. Se puede usar la detección de mutaciones en IDH-1 e IDH-2 para la evaluación del glioblastoma, mientras que se puede usar la detección de mutaciones en FGFR3 para la detección del cáncer de vejiga.

Carcinoma de pulmón no microcítico

El cáncer de pulmón es un cáncer con tumores sólidos que se forma en el tejido pulmonar. La mayoría del cáncer de pulmón comienza en las células epiteliales que recubren las vías respiratorias. Este tipo de cáncer se denomina "carcinoma de pulmón no microcítico" (CPNM). El otro tipo de cáncer de pulmón, menos frecuente, se denomina "carcinoma de pulmón microcítico", que comienza en las células pulmonares no epiteliales, tales como células nerviosas o células productoras de hormonas. La clasificación del cáncer de pulmón en CPNM y microcítico es importante para determinar un tratamiento apropiado. El cáncer de pulmón también se describe en términos de estadificación, que describe la extensión del cáncer en el cuerpo de un paciente. En la práctica clínica actual, el cáncer de pulmón se estadifica en general de acuerdo con la Clasificación de tumores malignos (TNM), desarrollada y mantenida por la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC). La clasificación TNM tiene en cuenta el tamaño del tumor y si ha invadido tejido cercano, afectación de ganglios linfáticos regionales y metástasis a distancia, o diseminación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. De acuerdo con la clasificación TNM actual del cáncer de pulmón se divide en cinco estadios. El estadio 0 también se llama cáncer de pulmón *in situ*, lo que

quiere decir que el cáncer no invadió tejidos fuera del pulmón. El cáncer de pulmón de estadio I es un tumor pequeño que no se ha diseminado a ningún ganglio linfático y se puede extirpar quirúrgicamente por completo. El estadio I se divide en dos subestadios, A y B, en base al tamaño del tumor. Los tumores pequeños, tales como los de menos de 3 cm, se clasifican como estadio IA. Los tumores de estadio I entre 3 y 5 cm se clasifican típicamente como cáncer de pulmón de estadio IB. El estadio II se refiere típicamente a tumores más grandes, describiendo el subestadio IIA los tumores más grandes (más de 5 cm pero menos de 7 cm de ancho) que se han diseminado a los ganglios linfáticos o un tumor más grande (más de 7 cm de ancho) que puede o no haber invadido las estructuras cercanas en el pulmón, pero que no se ha diseminado a los ganglios linfáticos.

Cuando el cáncer de pulmón metastatiza, se disemina a través de la sangre o los vasos linfáticos después de separarse de un tumor pulmonar. El estadio III describe los tumores cancerosos que son difíciles de extirpar porque se diseminan a los tejidos fuera del pulmón. Los cánceres de estadio III se clasifican como estadio IIIA o bien IIIB. Para muchos cánceres de estadio IIIA y casi todos los cánceres de estadio IIIB, el tumor es difícil, y a veces imposible, de extirpar. Por ejemplo, el cáncer de pulmón de estadio IIIB se puede diseminar a los ganglios linfáticos situados en el centro del tórax o invadir estructuras cercanas en el pulmón. El estadio IV describe típicamente el cáncer de pulmón que se ha diseminado a más de un área en el otro pulmón, el líquido que rodea el pulmón o el corazón, o partes distantes del cuerpo por el proceso de metástasis. Los términos "estadio IVA" se pueden usar para describir el cáncer de pulmón que se disemina dentro del tórax, mientras que el término "etapa IVB" cuando se ha diseminado fuera del tórax. En general, la intervención quirúrgica no es exitosa para la mayoría de los cánceres de pulmón de estadio III o IV. El cáncer de pulmón también puede ser imposible de extirpar si se ha diseminado a los ganglios linfáticos por encima de la clavícula, o si el cáncer ha proliferado en estructuras vitales dentro del tórax, tales como el corazón, vasos sanguíneos grandes o bronquios principales que conducen a los pulmones. El cáncer de pulmón de estadio III y IV se puede describir como "cáncer de pulmón en estadio tardío" o "cáncer de pulmón avanzado".

El cáncer de pulmón en estadio tardío o avanzado se puede caracterizar en términos de su estado metastásico o estadio metastásico. Por ejemplo, se pueden usar los estadios metastásicos llamados M0 y M1 para referirse al estado metastásico del cáncer. El estado metastásico M0 indica típicamente que no se detecta metástasis de un tumor pulmonar en un paciente. El estado M1 indica típicamente que se detecta metástasis. El estado metastásico M1 se puede subdividir adicionalmente en los estadios M1a y M1b. El estadio metastásico M1a se usa típicamente para describir el cáncer de pulmón metastásico en el que aparecen un nódulo o nódulos tumorales separados en un lóbulo pulmonar contralateral, tumores de cáncer de pulmón con nódulos pleurales o derrames pleurales o pericárdicos malignos. El estado metastásico del cáncer CPNM en un sujeto se puede determinar por diversos procedimientos de diagnóstico, incluyendo técnicas de imagen, tal como TEP, o exámenes histológicos de muestras de tejido obtenidas por biopsia. La etapa metastásica M1b se usa típicamente para describir el cáncer de pulmón con metástasis a distancia en órganos extratorácicos.

Receptor del factor de crecimiento epidérmico

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que también es conocido como HER-1 o Erb-B1, es un oncogén implicado en el desarrollo y la progresión del CPNM en algunos pacientes. El EGFR es una proteína receptora unida a la membrana de la familia Erb. El EGFR comprende un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranario y un dominio intracelular que posee actividad tirosina cinasa. El EGFR es inactivo en su estado monomérico. La unión de un ligando da lugar a homo y heterodimerización del EGFR con otros miembros de la familia HER, seguido de fosforilación de tirosina intermolecular. Las moléculas adaptadoras o de señalización se unen al EGFR fosforilado, que activa cascadas de señalización intracelular posteriores. Los ejemplos de las cascadas de señalización activadas por EGFR son cascadas Akt, STAT y MAPK. El EGFR promueve el crecimiento de diversos cánceres por varios mecanismos, incluyendo, pero sin limitarse a, amplificación de EGFR y la activación mutacional de EGFR.

Se desarrollaron fármacos terapéuticos antineoplásicos que inhiben la actividad inhibidora de las tirosina cinasas del EGFR. Dos de dichos fármacos son las moléculas bien caracterizadas gefitinib y erlotinib, que pertenecen a la clase de derivados de quinazolina. Se ha demostrado que ambos gefitinib y erlotinib inhiben la fosforilación de tirosina de EGFR. En los estudios clínicos que llevaron a la aprobación de gefitinib y erlotinib, se demostró que los fármacos prolongan la supervivencia en un subconjunto relativamente pequeño de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) después de la quimioterapia. Los estudios posteriores revelaron que las mutaciones en el dominio tirosina-cinasa del EGFR estaban presentes en una parte de los pacientes con CPNM, y que estas mutaciones estaban asociadas con el grado de respuesta clínica a gefitinib y erlotinib. También se identificaron mutaciones de EGFR que estaban asociadas con la resistencia a gefitinib y erlotinib. Se encuentra un análisis de los primeros desarrollos en el área de las mutaciones de EGFR en pacientes con CPNM y su conexión con tratamientos con gefitinib y erlotinib, por ejemplo, en Pao y Miller, *Journal of Clinical Oncology*, 23:2556-2568 (2005) y Rosell *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 12:7222-7231. La presencia o ausencia de mutaciones de EGFR en pacientes con CPNM puede servir, por lo tanto, como marcador adecuado para evaluar el estado del CPNM en pacientes, tal como determinar si el CPNM de un paciente particular es potencialmente sensible al tratamiento dirigido a EGFR.

Las mutaciones de EGFR conocidas asociadas con la sensibilidad a fármacos o la resistencia a tratamientos farmacológicos dirigidos conocidos se localizan en general en el dominio tirosina-cinasa del EGFR. Algunas de las mutaciones conocidas se ilustran en la figura 1 y en la tabla 1. Algunas de estas mutaciones se clasifican en "mutaciones activadoras", que potencian la señalización de EGFR. Algunas de las mutaciones de EGFR activadoras están asociadas con la sensibilidad a los tratamientos farmacológicos dirigidos, tales como tratamientos con inhibidores de las tirosina cinasas, y a veces se denominan mutaciones "sensibilizantes". Los ejemplos de dichas mutaciones son delecciones sin cambio de pauta de lectura en el exón 19 de EGFR y algunas sustituciones de aminoácidos, tales como L858R, L861Q y sustituciones en G719, a veces denominadas G719X, que incluyen, pero no se limitan a, G719A, G719C y G719S.

Otras mutaciones de EGFR están asociadas con la resistencia a los tratamientos con inhibidores de las tirosina cinasas, y a menudo surgen en la tanda del tratamiento. Dichas mutaciones se pueden denominar mutaciones de "resistencia", de las que sus ejemplos son inserciones en el exón 20 de EGFR sin cambio de pauta de lectura y sustituciones de aminoácidos T790M y S678I. Los procedimientos descritos en el presente documento emplean la detección de mutaciones de EGFR, incluyendo mutaciones activadoras y de resistencia, en la sangre de un sujeto con CPNM.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Aislamiento de ácidos nucleicos y amplificación por PCR

Se adquirieron todas las muestras de pacientes con cáncer de pulmón (CPNM). Se realizó el aislamiento de ácidos nucleicos usando el kit COBAS[®] DNA Sample Preparation Kit (Roche Molecular Diagnostics, Indianápolis, Ind.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la amplificación por PCR específica de alelo en tiempo real en un instrumento COBAS[®] usando el kit COBAS[®] EGFR Mutation Test kit (Roche Molecular Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, el kit COBAS[®] contiene tres mezclas de reacción, MMX1, MMX2 y MMX3, para PCR en tiempo real específica de alelo que detecta diversas mutaciones en el gen EGFR humano. MMX1 comprende cebadores y sondas marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM) para delecciones múltiples en el exón 19 del gen EGFR humano (denominadas Ex19Del) y la mutación de sustitución S768I (señal JA270). MMX2 comprende cebadores y sondas para la mutación de sustitución L858R (señal FAM) y la mutación T790M (señal JA270). MMX3 comprende cebadores y sondas para la mutación de sustitución L861Q (señal FAM), un conjunto de mutaciones de sustitución G719X (señal HEX) e inserciones múltiples en el exón 20 del gen EGFR humano (Ex20Ins) (señal JA270). Cada reacción comprende además cebadores y sondas de control interno (CI) que se dirigen al exón 28 del gen EGFR humano (señal Cy5.5).

Ejemplo 2

Establecimiento de una curva de calibración para la cuantificación de dianas de ADN

Para calibrar el ensayo, se sometieron cantidades variables de ADN genómico a amplificación por PCR en tiempo real usando el kit COBAS[®] EGFR Mutation Test. Se sometieron a prueba doce niveles de ADN genómico: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250 y 500 ng/reacción. A cada nivel de ADN genómico, se realizaron 120 ensayos de PCR replicados con cebadores y sondas de control interno (CI) en tres mezclas de reacción PCR múltiples diferentes incluidas en el kit (MMX1, 2 y 3, véase el ejemplo 1). La curva estándar resultante se muestra en la figura 2. En la figura 2, el eje X representa el nivel de ADN genómico y el eje Y representa el número de ciclos correspondiente al punto de cruce (C_p) logrado en la reacción. En base a los datos experimentales ilustrados por la figura 2, el intervalo válido de los valores de control interno (intervalo CI de C_p) se estableció en 20-32. En el intervalo de C_p válido seleccionado, se observó linealidad de ensayo para todas las mezclas de reacción sometidas a prueba.

Ejemplo 3

Establecimiento de un límite de corte para el ensayo de PCR cuantitativa

Para cada mezcla de reacción, se estableció un intervalo medible dentro del intervalo de C_p para CI válido usando los datos de la amplificación no específica en ausencia de la verdadera diana que se producen en ciclos posteriores de PCR, lo que se denominó "amplificación liminar". Para cada mezcla de reacción, se observó amplificación liminar con al menos un conjunto de cebadores y sondas. Para cada diana dentro de cada mezcla de reacción, se determinó el valor C_{pR} , que fue la diferencia entre la señal de control interno y la señal liminar, calculada como la diferencia entre C_p liminar y C_p de control interno observados en la misma reacción. Por ejemplo, para la diana Ex19del (ilustrada en la tabla 2), el valor liminar se produjo en los niveles mayores de ADN genómico sometido a prueba, pero C_{pR} fue consistentemente alto en esos niveles. El C_{pR} mínimo observado se seleccionó como valor de corte. La señal de Ex19del diana se consideró positiva (mutación detectada) solo si el valor de CI C_p estuvo en

el intervalo válido, como se analiza en el ejemplo 2, y el valor C_pR (la diferencia entre la señal diana y de control) entró dentro del valor de corte de 17,7.

De forma alternativa, el punto de corte se puede ajustar simplemente como el menor C_p liminar observado en el ejemplo de calibración. Como se ilustra en la tabla 2, para la diana S768I, la señal diana se consideró positiva (mutación detectada) solo si el valor de CI estuvo en el intervalo válido y el valor C_p diana estuvo por debajo del valor umbral liminar de 34 ciclos.

Ejemplo 4

Establecimiento de una curva de calibración para la cuantificación de una diana mutante en presencia de una diana de ADN genómico natural

Para aproximar las muestras de pacientes que contienen células cancerosas y células normales, así como ADN genómico, se combinaron diversas cantidades de cada diana mutante detectable por el ensayo (véase el ejemplo 1) con diversas cantidades de ADN genómico natural. Se combinaron diferentes cantidades del ácido nucleico diana que contenía la mutación T790M (2, 4, 8, 50, 100 o 200 ng/reacción) con diferentes cantidades de ADN genómico natural de fondo (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,9, 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250 y 500 ng/reacción). El C_p específico de diana obtenido en el experimento se representó a continuación frente a la cantidad de ADN diana de entrada. Se promedió la señal para la sonda específica de T790M (C_p JA270) obtenida en diferentes niveles de ADN diana y se representó frente al logaritmo del número de copias de la diana mutante T790M presente en la muestra. La curva de calibración resultante se muestra en la figura 3.

Ejemplo 5

Detección de ADN de EGFR mutante en la sangre de pacientes con cáncer de pulmón (CPNM)

Se obtuvieron muestras de plasma sanguíneo de pacientes con CPNM después de que se sometieran a quimioterapia y antes y durante el tratamiento dirigido con erlotinib. El desarrollo cronológico de la obtención de muestras se ilustra esquemáticamente en la figura 4. Las muestras se obtuvieron cada cuatro semanas en los puntos temporales indicados como CP_{0-4} en la figura 4. La obtención de muestras no se detuvo necesariamente en el punto temporal CP_4 . Se aisló el ADN de las muestras de plasma sanguíneo obtenidas y se sometió a amplificación por PCR en tiempo real usando los kits COBAS® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase el ejemplo 1). Con propósitos ilustrativos, la figura 5 muestra esquemáticamente niveles medidos de una delección en el exón 10 activadora (Ex19Del) y la sustitución activadora T790M de EGFR en el plasma sanguíneo de dos pacientes ejemplares ("Caso A" y "Caso B"). En ambos pacientes, se había determinado previamente que las muestras tumorales de tejido obtenidas en el diagnóstico inicial contenían una mutación de EGFR activadora (Ex19del) pero no una mutación de resistencia (T790M). Se midió la cantidad de secuencias de ADN mutante, expresadas en número de copias y representadas en el eje Y del gráfico mostrado en la figura 5, usando las curvas de calibración descritas en el ejemplo 5. En ambos casos A y B, el incremento en la cantidad de ADN mutante en la sangre se correlacionó con la progresión del CPNM detectada por técnicas de imagen adecuadas y también indicó el aumento de la resistencia al tratamiento con erlotinib.

Ejemplo 6

Detección de mutaciones de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM con diferentes estados metastásicos

Se realizaron dos estudios que correlacionaron la detección de mutaciones de EGFR en el plasma sanguíneo de pacientes con CPNM con el estado metastásico del paciente. En el primer estudio (estudio I), se obtuvieron muestras de plasma y muestras de tejido complementarias de veintiocho pacientes con CPNM en estadio IV. Se determinó el estado de mutación de las muestras de tejido y sangre. Se compararon los datos sobre las mutaciones detectadas con el estado metastásico de los pacientes. Los datos experimentales del estudio I se resumen en las tablas 3 y 4.

En el segundo estudio (estudio II), se obtuvieron muestras de plasma y muestras de tejido complementarias de diecisiete pacientes con CPNM en estadio IV. Se determinó el estado de mutación de las muestras de tejido y sangre. Se compararon los datos sobre las mutaciones detectadas con el estado metastásico de los pacientes. Los datos experimentales del estudio II se resumen en las tablas 5-I, 5-II y 6.

Tanto en el estudio I como en el estudio II, se observó que la concordancia positiva entre la detección de mutaciones de EGFR en muestras de tejido y plasma era significativamente mayor para los pacientes con metástasis a distancia (estado metastásico pM1b) que para el paciente sin metástasis a distancia (estado metastásico pM1a). El resumen de los datos del estudio I y del estudio II sobre la detección de mutaciones de EGFR activadoras en la sangre de pacientes con CPNM de diferente estado metastásico se muestra esquemáticamente en la tabla 7.

Ejemplo 7

Beneficios de la detección de mutaciones de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM diagnosticado inicialmente

5 Se detectan mutaciones activadoras de EGFR en la sangre de 200 pacientes con CPNM en estadio IIIB a estadio IV diagnosticado inicialmente. En general, la detección se realiza de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores. Se detectan mutaciones de EGFR activadoras en la sangre de un 20 % de los pacientes. Se detectan mutaciones de EGFR de resistencia en un subconjunto de los pacientes que portan mutaciones de EGFR activadoras. El estado metastásico de estos pacientes se determina por TEP. Se determina que un 50 % de los pacientes tienen el estado metastásico pM1a, y se determina que un 50 % tienen el estado metastásico pM1b. En base al conocimiento de la alta concordancia positiva entre la detección de mutaciones de EGFR activadoras en sangre y su presencia en tejido tumoral en pacientes pM1b pero no en un paciente pM1a, se recomienda el tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas (TKI) dirigido y se administra a pacientes pM1b y pM1a con mutaciones activadoras de EGFR detectables en sangre sin procedimientos de diagnóstico adicionales. No se recomienda tratamiento con TKI dirigido para pacientes pM1b sin mutaciones activadoras de EGFR detectables o con mutaciones de resistencia detectables en sangre (no se consideran necesarios procedimientos de diagnóstico adicionales). A los pacientes pM1a sin mutaciones activadoras de EGFR detectables en la sangre se les practica biopsia del tejido tumoral con posterior detección de mutación en las muestras de biopsia para determinar si estos pacientes son o no candidatos para el tratamiento de EGFR. El procedimiento de toma de decisiones anterior para 200 pacientes se ilustra esquemáticamente en la figura 6. Bajo este procedimiento de toma de decisiones, solo 94 pacientes de 200 necesitan una biopsia seguida de pruebas de mutación tisular para determinar si son o no candidatos para el tratamiento dirigido con TKI.

Ejemplo 8

Beneficios de la detección de mutaciones de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM recidivante

30 Se detectan mutaciones activadoras de EGFR en la sangre de 200 pacientes con recaída con CPNM en estadio IIIB a estadio IV. En general, la detección se realiza de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores. Se detectan mutaciones de EGFR activadoras en la sangre de un 20 % de los pacientes. El estado metastásico de estos pacientes se determina por TEP. Se determina que un 40 % de los pacientes tienen el estado metastásico pM1a, y se determina que un 60 % tienen el estado metastásico pM1b. En base al conocimiento de la alta concordancia positiva entre la detección de mutaciones de EGFR activadoras en sangre y su presencia en tejido tumoral en pacientes pM1b pero no en un paciente pM1a, se recomienda el tratamiento con inhibidores de las tirosina cinasas (TKI) dirigido y se administra a pacientes pM1b y pM1a con mutaciones activadoras de EGFR detectables en sangre sin procedimientos de diagnóstico adicionales. No se recomienda tratamiento con TKI dirigido para pacientes pM1b sin mutaciones activadoras de EGFR detectables en sangre (no se consideran necesarios procedimientos de diagnóstico adicionales). A los pacientes pM1a sin mutaciones activadoras de EGFR detectables en la sangre se les practica biopsia del tejido tumoral con posterior detección de mutación en las muestras de biopsia para determinar si estos pacientes son o no candidatos para el tratamiento de EGFR. El procedimiento de toma de decisiones anterior para 200 pacientes se ilustra esquemáticamente en la figura 7. Bajo este procedimiento de toma de decisiones, solo 74 pacientes de 200 necesitan una biopsia seguida de pruebas de mutación tisular para determinar si son o no candidatos para el tratamiento dirigido con TKI.

Ejemplo 9

Beneficios de la detección de mutaciones de EGFR en la sangre de pacientes con CPNM

50 Se detectan mutaciones activadoras de EGFR en la sangre de 200 pacientes con recaída con CPNM en estadio IIIB a estadio IV. En general, la detección se realiza de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores. El procedimiento de toma de decisiones se ilustra esquemáticamente en la figura 8.

Tabla 1: Ejemplos de mutaciones de EGFR.

Mutación	Modificación de aminoácidos	Exón
2155 G>A	G719S	18
2155 G>T	G719C	18
2156 G>C	G719A	18
2233_2247del15	K745_E749del	19
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	19
2235_2249del15	E746_A750del	19
2235_2251>AATTC	E746_T751>IP	19

ES 2 662 598 T3

2235_2252>AAT	E746_T751>I	19
2235_2255>AAT	E746_S752>I	19
2236_2250del15	E746_A750del	19
2236_2253del18	E746_T751del	19
2237_2251del15	E746_T751>A	19
2237_2252>T	E746_T751>V	19
2237_2253>TTGCT	E746_T751>VA	19
2237_2254del18	E746_S752>A	19
2237_2255>T	E746_S752>V	19
2237_2257>TCT	E746_P753>VS	19
2238_2248>GC	L747_A750>P	19
2238_2252del15	L747_T751del	19
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	19
2238_2255del18	E746_S752>D	19
2239_2247del9	L747_E749del	19
2239_2248>C	L747_A750>P	19
2239_2251>C	L747_T751>P	19
2239_2253del15	L747_T751del	19
2239_2256del18	L747_S752del	19
2239_2256>CAA	L747_S752>Q	19
2239_2258>CA	L747_P753>Q	19
2240_2251del12	L747_T751>S	19
2240_2254del15	L747_T751del	19
2240_2257del18	L747_P753>S	19
2253_2276del24	S752_I759del	19
2303 G>T	S768I	20
2307_2308 ins 9(GCCAGCGTG)	V769_D770insASV	20
2309_2310(AC>CCAGCGTGGAT)	V769_D770insASV	20
2310_2311 ins GGT	D770_N771insG	20
2311_2312 ins 9(GCGTGGACA)	D770_N771insSVD	20
2319_2320 ins CAC	H773_V774insH	20
2369 C>T	T790M	20
2573 T>G	L858R	21
2573-2574TG>GT	L858R	21

Tabla 2: Resumen de los datos experimentales ejemplares usados para establecer límites de corte para un intervalo medible de ensayos de PCR cuantitativa.

ADN genómico, ng por reacción	N.º de reacciones	Promedio de C _p DE CI,	Datos liminares									
			Delección Ex19					S768I				
			N.º de reacciones con valor liminar observado	Promedio de C _p liminar	C _p mínimo liminar	Promedio DE C _p R	C _p R MÍNIMO	N.º de reacciones con valor liminar observado	Promedio de C _p liminar	C _p mínimo liminar	Promedio DE C _p R	C _p R MÍNIMO
500	120	19,89	1	40	40	20,19	20,19	4	39,01	38	19,06	17,82
250	120	20,81	3	40,42	38,79	19,65	18,16	0	NA	NA	NA	NA
125	120	21,72	0	NA*	NA	NA	NA	1	34,01	34,01	12,27	12,27
62,5	120	22,67	1	40,37	40,37	17,7	17,7	1	39,02	39,02	16,18	16,18
31,3	120	23,65	0	NA	NA	NA	NA	2	34,53	34,19	10,84	10,56
15,6	120	24,67	0	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA
7,8	119	25,74	0	NA	NA	NA	NA	2	34,36	34,29	8,44	8,41
3,9	119	26,87	0	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA
2	119	28,05	0	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA
1	120	29,28	0	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA
0,5	107	30,50	0	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA
0,25	107	31,61	0	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA

* NA quiere decir no aplicable"

5

Tabla 3: Resumen de los datos experimentales del estudio I

Mutaciones activadoras de EGFR	MUT+* plasma		MUT-** plasma	
MUT+ tejido	13 (estado metastásico de 2 muestras no conocido)		3	
	pM1a 2	pM1b*** 9	pM1a 3	pM1b 0

*MUT+ = mutación activadora detectada

**MUT- = mutación activadora no detectada

***El estado metastásico de alguno de los pacientes no era conocido

10

Tabla 4: Resumen de los datos experimentales del estudio I para los pacientes con mutaciones detectables en muestras de tejido.

ID del paciente	Mutaciones detectadas en muestra de tejido	Mutaciones detectadas en muestra de plasma	Estado metastásico
1	L858R y T790M	L858R y T790M	N/D*
2	Ex19Del	Ex19Del	N/D
3	L858R	L858R	pM1b
4	S768I, G719X	S768I y G719X	pM1b
5	L858R	L858R	pM1b
6	Ex19Del	Ex19Del	pM1a
7	Ex19Del	Ex19Del y T790M	pM1b

8	Ex19Del	Ex19Del	pM1b
9	Ex19Del	Ex19Del	pM1b
10	Ex19Del	Ex19Del	pM1b
11	Ex19Del	Ex19Del	pM1b
12	Ex19Del	Ex19Del	pM1b
13	L858R	L858R	pM1a
14	L858R y Ex20Ins	-	pM1a
15	L858R y T790M	-	pM1a
16	Ex19Del y T70M	-	pM1a

* N/D = no determinado

Tabla 5-I: Resumen de los datos experimentales del estudio II

Mutaciones activadoras de EGFR	MUT+* plasma		MUT-** plasma	
MUT+ tejido	11		4	
	pM1a*** 1	pM1b 9	pM1a 3	pM1b 1

5 *MUT+ = mutación activadora detectada

**MUT- = mutación activadora no detectada

***El estado metastásico de alguno de los pacientes no era conocido

10 Tabla 5-II: Resumen de los datos experimentales del estudio II

Mutación de resistencia de EGFR T790M	MUT+* plasma		MUT-** plasma	
MUT+ tejido	6		3	
	pM1a 1	pM1b 5	pM1a 2	pM1b 1

*MUT+ = mutación activadora detectada

**MUT- = mutación activadora no detectada

***El estado metastásico de alguno de los pacientes no era conocido

15 Tabla 6: Resumen de los datos experimentales del estudio II

ID del paciente	Mutaciones detectadas en muestra de tejido	Mutaciones detectadas en muestra de plasma	Estado metastásico
1	Ex19Del	Ex19Del	pM1b
2	L861Q y G719X y T790M	L861Q y G719X y T790M	pM1b
3	Ex19Del	Ex19Del	pM1b
4	L858R	L858R	pM1b*
5	L858R y T790M	L858R y T790M	pM1b
6	L858R y T790M	L858R y T790M	pM1b
7	Ex19Del y T790M	Ex19Del y T790M	pM1b
8	Ex19Del y T790M	Ex19Del y T790M	pM1b
9	L858R	L858R	pM1b
10	Ex19Del y T790M	Ex19Del y T790M	pM1a
11	Ex19Del y T790M	Ex19Del y T790M	N/D
12	(Ex19Del)	-	pM1a
13	Ex19Del y T790M	-	pM1a
14	Ex19Del y T790M	-	pM1b

15	Ex19De	-	pM1b
16	-	Ex19Del	pM1b
17	-	Ex19Del	pM1b

* N/D = no determinado

Tabla 7: Resumen de los datos del estudio I y del estudio II sobre la detección de mutaciones de EGFR activadoras en la sangre de pacientes con CPNM de diferente estado metastásico.

5

Estudio	Estado metastásico	Concordancia positiva	Concordancia negativa	Concordancia global
I	Global*	81 %	100 %	89 %
	pM1a	40 %		
	pM1b	100 %		
II	Global*	73 %	0 %	65 %
	pM1a	25 %		
	pM1b	90 %		

* Incluye pacientes con pM1a, pM1b y estado metastásico no determinado

Ejemplo 10

10 Estudio clínico

Se llevó a cabo un estudio clínico para valorar las consecuencias del tratamiento en pacientes con CPNM. El diseño del estudio se ilustra esquemáticamente en la figura 9. Se incluyeron en el estudio 451 pacientes con CPNM en estadio IIIB/IV sin tratamiento previo. Se dividió a los pacientes en dos grupos aproximadamente iguales, estratificados por estadio de cáncer, histología, estado de tabaquismo y se les asignó una pauta de tratamiento. Se usaron tres pautas de tratamiento, como se analiza con más detalle a continuación: gemcitabina + carboplatino, cisplatino + erlotinib o cisplatino + placebo. Se asignaron los dos grupos de pacientes a dos brazos diferentes del estudio: un brazo de tratamiento de combinación, que quiere decir una combinación de quimioterapia y tratamiento con TKI, y un brazo de quimioterapia. En la etapa de tratamiento de cuatro semanas, a los pacientes incluidos en el brazo de tratamiento de combinación ("brazo CE") se les administraron 1.250 mg/m² de gemcitabina los días 1 y 8 de cada ciclo de tratamiento, más 75 mg/m² de carboplatino ABC = 5 o cisplatino el día 1, más 150 mg/día de erlotinib (Tarceva®) los días 15-28. A los pacientes del brazo de quimioterapia ("brazo C") se les administraron 1.250 mg/m² de gemcitabina los días 1 y 8 de cada ciclo de tratamiento, más 75 mg/m² de carboplatino ABC = 5 o cisplatino el día 1, más placebo los días 15-28. Se repitieron los tratamientos anteriores durante 6 ciclos de tratamiento para cada uno de los grupos ("fase de tratamiento"). En la fase de mantenimiento, a los pacientes incluidos en el brazo de tratamiento de combinación se les administraron 150 mg/día de erlotinib hasta la aparición de progresión de la enfermedad. A los pacientes del brazo de quimioterapia se les administró placebo hasta la aparición de progresión de la enfermedad, punto en el que se inició la administración de erlotinib a 150 mg/día. La progresión de la enfermedad (PE) se definió de acuerdo con RECIST.

Se obtuvieron muestras de tejido y plasma iniciales de varios participantes del estudio al comienzo del estudio ("valor inicial") antes de la administración del tratamiento. También se obtuvieron muestras de plasma de varios pacientes al final del ciclo de tratamiento 3 ("C3") y en el estadio de progresión de la enfermedad ("PE"). Las cantidades y tipos de las muestras que estuvieron disponibles durante el estudio se resumen en la FIGURA 10. Las muestras analizables en la situación inicial, C3 y PE estuvieron disponibles para 305 de los 451 pacientes que otorgaron su consentimiento para la obtención y análisis de sus muestras de plasma (67,6 %).

Se llevó a cabo la detección de ADN diana mutante en muestras de plasma por qPCR en general de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos 1-4. Las muestras de tejido fueron muestras de tejido incluido en parafina fijado con formol (FFPET) preparadas y almacenadas de acuerdo con procedimientos convencionales. Las muestras de sangre fueron muestras de plasma preparadas y almacenadas de acuerdo con procedimientos convencionales. Se usó una sección de FFPET para cada análisis de tejido, y se usó una muestra de plasma de 2 ml para cada análisis de sangre. Se llevaron a cabo el aislamiento de ácido nucleico de las muestras de tejido y sangre y las pruebas esencialmente como se describe en los ejemplos 1-4. Se llevaron a cabo las pruebas usando los kits COBAS® EGFR Mutation Test Kits adaptados para los análisis de FFPET y de sangre, respectivamente.

Ejemplo 11

50 Incidencia de la mutación de EGFR

Se determinó la incidencia en muestras de tejido y plasma con mutación de EGFR en plasma. Para las muestras de plasma, la incidencia global de muestras con mutación fue de un 35 % (106/305) en los puntos de obtención de muestras inicial, 15 % (47/305) en C3 y 27 % (81/305) en PE, también denominados "puntos temporales". La distribución detallada de las secuencias mutadas de EGFR detectadas entre los pacientes se muestra en la tabla 8. Para las mutaciones sensibilizantes de TKI, la incidencia fue de un 40,2 % para muestras de tejido, 32,2 % para muestras de plasma iniciales, 13,0 % para muestras de plasma C3 y 23,9 % para muestras de plasma PE. Para las mutaciones de resistencia de TKI, la incidencia fue de un 5,4 % para muestras de tejido, 2,0 % para muestras de plasma iniciales, 1,4 % para muestras de plasma C3 y 3,7 % para muestras de plasma PE.

10 Tabla 8: Distribución de mutación de EGFR (número de muestras)

Mutación	Valor inicial - muestras de tejido	Muestras de plasma		
		Valor inicial	C3	PE
Ex19Del	56	92	33	54
Ex19Del + G719X	0	1	0	0
Ex19Del + L858R	1	0	1	0
Ex19Del + L858R + T790M	0	0	0	1
Ex19Del + T790M	0	0	0	4
L858R	33	43	11	25
L858R + T790M	2	1	1	2
L858R + S768I	1	0	0	0
L858R + Ex20Ins	1	1	0	0
L858R + T790M + Ex20Ins	0	1	0	0
L861Q	1	2	0	2
G719X	1	2	1	1
G719X + S768I	1	1	0	1
T790M	1	0	0	0
S768I	1	0	1	2
Ex20Ins	6	5	3	4
Mutaciones no detectadas	136	298	311	280
Número total de muestras	241	447	362	376

Ejemplo 12

15 Concordancia entre muestras de tumor y plasma

Para 238 pacientes incluidos en el estudio clínico, los resultados del análisis de EGFR estuvieron disponibles tanto para muestras de tumor como de plasma iniciales ("pares emparejados"). Las medidas de concordancia para la detección de mutaciones sensibilizantes de TKI de EGFR entre las muestras de tumor y plasma iniciales fueron las siguientes: sensibilidad: 75 % (72/96 pacientes); especificidad: 96 % (137/142 pacientes); valor predictivo positivo: 94 % (72/77 pacientes); valor predictivo negativo: 85 % (137/161 pacientes); concordancia global: 88 % (209/238 pacientes). Los datos de concordancia para mutaciones sensibilizantes de TKI se resumen en la tabla 9.

25 Tabla 9: Datos de concordancia para mutaciones sensibilizantes de TKI para muestras de tumor y plasma

Estado de mutación del paciente	Pacientes con MUT+ plasma - mutaciones sensibilizantes de TKI (pMUT+)	Pacientes con MUT- plasma - mutaciones sensibilizantes de TKI (pMUT-)	N.º de pares emparejados disponibles
Pacientes con mutación en tejido - mutaciones sensibilizantes de TKI (tMUT+)	72	24	96

Pacientes sin mutación en tejido - mutaciones sensibilizantes de TKI (tMUT-)	5	137	142
Total	77	161	238

Ejemplo 13

Concordancia entre muestras de tumor y plasma en pacientes con diferente estado metastásico

5 Se determinó que la concordancia entre muestras de tumor y plasma para mutaciones sensibilizantes de TKI fue mayor en los pacientes con metástasis a distancia, en comparación con los pacientes sin metástasis a distancia. El estado metastásico estuvo disponible para 233 pacientes con muestras de tejido y plasma iniciales disponibles. Se determinó el estado metastásico en el punto temporal inicial. La tabla 10 (A-C) muestra el resumen de los datos de concordancia para las muestras de tejido y de plasma iniciales en base al estado metastásico. La sensibilidad de la determinación de mutación de EGFR en plasma en el subgrupo de pacientes M1b fue de un 91 % (41/45 pacientes), la especificidad fue de un 98 % (47/48 pacientes) y la concordancia global fue de un 95 % (88/93 pacientes). En el subgrupo de pacientes M1a, la sensibilidad de la determinación de mutación de EGFR en plasma fue de un 60 % (29/48 pacientes), la especificidad fue de un 95 % (83/87 pacientes) y la concordancia global fue de un 83 % (112/135 pacientes).

Tabla 10: Datos de concordancia entre muestras de tumor y plasma y el estado metastásico para mutaciones sensibilizantes de TKI

20 A. Resumen de los datos en base al estado metastásico del paciente

Estado metastásico del paciente	N.º de pares emparejados disponibles	tMUT+
CPNM avanzado sin metástasis: estadio III y etapa a distancia IV M1a	135	36 % (48/135)
CPNM avanzado con cualquier metástasis: estadio IV M1b a distancia	98	48 % (47/98)

B. Concordancia entre muestras de tumor y tejido en pacientes con estado metastásico M1a

Estado de mutación del paciente	Pacientes pMUT+	Pacientes pMUT-
Pacientes tMUT+	29	19
Pacientes tMUT-	4	83

25 C. Concordancia entre muestras de tumor y tejido en pacientes con estado metastásico M1a

Estado de mutación del paciente	Pacientes pMUT+	Pacientes pMUT-
Pacientes tMUT+	43	4
Pacientes tMUT-	1	50

Ejemplo 14

Detección de ADN diana en muestras de plasma

30 Las curvas estándar usadas para la cuantificación de dianas de ADN se muestran en la figura 11. La distribución de ADN extracelular circulante (cf) en pacientes con mutación en plasma de EGFR y sin mutación en plasma se ilustra por la FIGURA 12 y la tabla 11. Los resultados experimentales analizados en este ejemplo muestran que la detección fue lineal en el intervalo de detección. Se debe entender que se puede usar C_p en lugar del número de copias de ADN en las curvas estándar para la cuantificación de dianas de ADN.

Tabla 11: Distribución de ADN extracelular circulante total (copia/ml) detectado por COBAS® en pacientes (el conjunto de datos se muestra en la FIGURA 12)

Estado de mutación del paciente	Cantidad detectada de ADNcf (copia/ml)		
	Mínimo	Mediana	Máximo
pMUT-(n=904)	1130	11518	1438351

pMUT+ (n=281)	2025	17192	265835
---------------	------	-------	--------

Los datos sobre los niveles de ADN detectado por muestras de plasma con COBAS® de pacientes pMUT+ se ilustra en la FIGURA 13 y la tabla 12. Los datos ilustran el intervalo de detección para cada mutante en la población de ensayo clínico FASTACT-2.

5 Los datos comparativos que ilustran los niveles de ADN mutado detectado por la prueba de COBAS® en el plasma de pacientes con mutación y sin mutación se muestran en las FIGURAS 14 y 15 y en las tablas 13 y 14. La figura 14 y la tabla 13 representan los datos como niveles de ADN (copia/ml), mientras que la figura 15 y la tabla 14 representan los datos como cantidad relativa de ADN diana detectado en la muestra con respecto a ADN natural (Mut%) Proporción Mut% de ADN mutante detectado frente al ADN genómico total (ADNg) detectado. Los datos muestran el intervalo de detección, como se expresa en Mut%, en la población de ensayo clínico FASTACT-2 para cada mutante.

15 Tabla 12: Niveles detectados de ADN (copia/ml) en las muestras de plasma de pacientes MUT+ (el conjunto de datos correspondiente se ilustra en la FIGURA 13)

Estado de mutación del paciente	Cantidad detectada de ADNcf (copia/ml)		
	Mínimo	Mediana	Máximo
ADNcf total (n=1185)	1130	12396	1438351
Ex19Del (n=187)	<1	62	92998
L858R (n=146)	<1	61	54495
T790M (N=92)	4	6	1069

20 Tabla 13: Niveles detectados de ADN (copia/ml) en las muestras de plasma de pacientes con mutación ("positivo") y sin mutación ("negativo") (el conjunto de datos correspondiente se ilustra en la FIGURA 14)

Estado de muestra (n es el número de muestras disponibles en cada subgrupo)	Cantidad detectada de ADN mutado (copia/ml)		
	Mínimo	Mediana	Máximo
Ex19Del positivo (n=186)	0,5	62,1	52998,3
Ex19Del negativo (n=1)	0,5	0,5	0,5
L858R positivo (n=86)	2,7	95,5	54494,8
L858R negativo (n=60)	0,4	2,7	93,6
T790M positivo (n=10)	5,8	67,3	1069,1
T790M negativo (n=82)	3,5	5,7	15,0

25 Tabla 14: Niveles detectados de ADN (% de ADN mutante detectado con relación al ADN total detectado) en las muestras de plasma de pacientes con mutación ("positivo") y sin mutación ("negativo") (el conjunto de datos correspondiente se muestra en la FIGURA 15).

Estado de muestra (n es el número de muestras disponibles en cada subgrupo)	Cantidad detectada relativa de ADN mutado (%)		
	Mínimo	Mediana	Máximo
Ex19Del positivo (n=186)	0,0041	0,4955	76,1088
Ex19Del negativo (n=1)	0,0015	0,0015	0,0015
L858R positivo (n=86)	0,0679	0,7510	44,3351
L858R negativo (n=60)	0,0002	0,0062	0,0500
T790M positivo (n=10)	0,1212	1,1968	3,0433
T790M negativo (n=82)	0,0010	0,0048	0,1373

Ejemplo 15

Análisis de muestras de plasma en diferentes puntos temporales

30

Las muestras de plasma analizables en cada uno de los puntos temporales inicial, C3 y PE, estuvieron disponibles para 305 de 451 pacientes (67,6 %). La incidencia de muestras con mutación de EGFR en plasma en la situación inicial, C3 y PE fue de un 35 % (106/305), 15 % (47/305) y 27 % (81/305), respectivamente. Se demostró que 98 de 10 pacientes con mutación albergan la delección en el exón 19 (Ex19Del) o la sustitución L858R en el punto temporal inicial (brazo C - 51, brazo CE - 47). En el punto temporal C3, 21 (41 %) de los pacientes del brazo C perdieron la positividad de la mutación de EGFR, y 39 (83 %) de los pacientes del brazo CE perdieron la positividad de la mutación. En el punto temporal PE, 8 de los 21 pacientes del brazo C y 18 de los 39 pacientes del brazo CE recuperaron la positividad de la mutación. Estos datos mostraron que la carga de mutación del paciente estaba cambiando durante el tratamiento.

199 pacientes no presentaron mutación en la situación inicial (103 pacientes del brazo C y 96 pacientes del brazo CE). De estos pacientes, 12 pacientes presentaron mutación en el punto temporal PE en base a los resultados en plasma. Para 6 de estos 12 pacientes, los resultados de tejido estuvieron disponibles e indicaron que los 6 pacientes albergaban la misma mutación o mutaciones en la muestra de tejido que las detectadas en la muestra de plasma obtenida en el punto temporal PE. Estos datos mostraron que la carga de mutación del paciente fue dinámica durante el tratamiento y la progresión de la enfermedad. Los resultados del análisis de datos se ilustran por las FIGURAS 16-18 y las tablas 15-20.

Tabla 15: Resumen de los datos sobre la incidencia de diferentes mutaciones en muestras de plasma en tres puntos temporales

Mutación/Mutaciones detectada(s)	Valor inicial	C3	PE
Ex19Del	66	31	46
Ex19Del + G719X	1	0	0
Ex19Del + L858R	0	1	0
Ex19Del + L858R + T790M	0	0	1
Ex19Del + T790M	0	0	3
L858R	30	10	22
L858R + T790M	1	0	2
L861Q	1	0	1
G719X	2	1	1
S768I	0	1	2
Ex20Ins	5	3	3
MND	199	258	224
Total	305	305	305

Tabla 16: Resumen de los datos sobre la incidencia de pacientes con mutación y sin mutación en plasma en los tres puntos temporales

Brazo de estudio	Valor inicial MUT+/MUT-	C3 MUT+/MUT-	PE MUT+/MUT-
C	0 (0 %)/103 (100 %)	4(4 %)/99 (96 %)	9 (9 %)/94(91 %)
CE	0 (0 %)/96 (100 %)	0(0 %)/96(100 %)	3(3 %)/93 (97 %)

Tabla 17: Resumen de los datos sobre las mutaciones detectadas en seis de los pacientes a los que se les detectó con mutación en el estadio EP

Paciente	Mutaciones detectadas en la muestra de tejido	Mutaciones detectadas en las muestras de plasma		
		Valor inicial	C3	PE
1	L858R	MUT-	MUT-	L858R
2	G719X y S768I	MUT-	MUT-	S768I
3	L858R	MUT-	MUT-	L858R
4	Ex19 Del	MUT-	MUT-	Ex19Del
5	S768I	MUT-	MUT-	S768I
6	L858R	MUT-	MUT-	L858R

Tabla 18: Resumen de los datos sobre los pacientes que dieron positivo para Ex19Del y/o L858R en plasma en el punto temporal inicial

Brazo de estudio	Valor inicial MUT+/MUT- para Ex19Del y/o L858R	C3 MUT+/MUT- para Ex19Del y/o L858R	PE MUT+/MUT- para Ex19Del y/o L858R
C	51 (100 %)/0 (0 %)	30(59 %)/21(41 %)	38 (75 %)/13 (25 %)
CE	47 (100 %)/0 (0 %)	8(17 %)/39 (83 %)	26(55 %)/21 (45 %)

Tabla 19: Resumen de los datos sobre los pacientes que dieron positivo para Ex19Del en la situación inicial

Brazo de estudio	Valor inicial MUT+/MUT- para Ex19Del y/o L858R	C3 MUT+/MUT- para Ex19Del y/o L858R	PE MUT+/MUT- para Ex19Del y/o L858R
C	34 (100 %)/0 (0 %)	22(65 %)/12 (35 %)	25 (74 %)/9 (26 %)
C+E	33 (100 %)/0 (0 %)	6 (18 %)/27 (82 %)	19(58 %)/14 (42 %)

- 5 Tabla 20: Resumen de los datos sobre los pacientes que dieron positivo para L858R en la situación inicial (se estimó que cuatro muestras en el punto temporal C3 y una muestra en el punto temporal PE dieron positivo para L858R pero no se incluyeron en el resumen debido al alto fondo de ADNcf presente en estas muestras).

Brazo de estudio	Valor inicial MUT+/MUT- para L858R	C3 MUT+/MUT- para L858R	PE MUT+/MUT- para L858R
C	17 (100 %)/0 (0 %)	8(47 %)/9 (53 %)	13 (76 %)/4 (24 %)
CE	14 (100 %)/0 (0 %)	2(14 %)/12 (86 %)	7(50 %)/7 (50 %)

10 Ejemplo 16

Cambios cuantitativos dinámicos de los niveles de ADN detectados en muestras de plasma durante el transcurso del estudio clínico

- 15 Se valoraron los cambios cuantitativos dinámicos de los niveles de ADN detectados en muestras de plasma durante el transcurso del estudio. La FIGURA 19 y la tabla 21 ilustran un cambio cuantitativo dinámico en el ADNcf de plasma total durante el transcurso del estudio. La FIGURA 20 y la tabla 22 ilustran un cambio cuantitativo dinámico en los niveles totales de ADN diana mutado durante el transcurso del estudio. La FIGURA 21 y la tabla 23 ilustran el cambio cuantitativo dinámico en ADN mutado diana en los exones de EGFR 19 y 21 durante el transcurso del estudio. Durante el transcurso del estudio, se observó una disminución considerable en los niveles totales de secuencias diana de EGFR en plasma en ambos brazos C y CE del estudio clínico. Sin embargo, los niveles detectados de ADN mutado de EGFR en plasma se recuperaron a un nivel alto en PE en el brazo C y permanecieron bajos en el brazo CE. Los datos analizados en este ejemplo mostraron que la carga de mutación del paciente fue dinámica durante el tratamiento. También mostró que el TKI fue más eficaz en el tratamiento de
- 20
- 25 pacientes con tumores con EGFR positivo.

Tabla 21: Niveles de ADNcf en plasma total detectado en tres puntos temporales durante el estudio clínico

Brazo de estudio	Mediana de ADNcf (copia/ml)		
	Valor inicial	C3	PE
CE	27550	5975	8554
C	26225	6389	9528

- 30 Tabla 22: Niveles de ADN mutado de EGFR total detectado en tres puntos temporales

Brazo de estudio (n = número de pacientes con muestras analizables en cada punto temporal)	Mediana de ADN mutado de EGFR (copia/ml)		
	Valor inicial	C3	PE
CE (n = 47)	94	0	6
C (n = 51)	78	5	83

Tabla 23: Niveles de ADN mutado de EGFR total en los exones 19 y 21 detectado en tres puntos temporales

Brazo de estudio y locus de mutación	Mediana de ADN mutado de EGFR (copia/ml)		
	Valor inicial	C3	PE
C (exón 19)	55,5	5,0	71,5
CE (exón 19)	86,0	0,0	5,0
C (exón 21)	82,0	5,0	128,0
CE (exón 21)	174,5	0,0	7,0

Ejemplo 17

5

Correlación entre el estado de mutación y las consecuencias del tratamiento

Se llevó a cabo un análisis de los datos para detectar correlaciones entre la detección de mutaciones de EGFR en muestras de plasma y tejido de pacientes con CPNM con las consecuencias del tratamiento. Se realizó el análisis de subgrupos sobre la tasa de respuesta global (TRG), supervivencia sin progresión (SSP) y supervivencia general (SG) de 138 pacientes con mutación en plasma (en base a muestras iniciales) y 289 pacientes sin mutación en plasma, así como pacientes con mutación en tejido y sin mutación en tejido. La mediana de la SSP de pacientes con mutación en plasma fue de 13,8 en el brazo CE del estudio, frente a 5,9 meses en el brazo C (cociente de riesgos instantáneos (CRI) > 0,21), en comparación con 16,8 para el brazo CE frente a 6,9 meses en el brazo C (CRI 0,25) en pacientes con mutación en tejido. La mediana de la SSP de pacientes sin mutación en plasma fue de 6,7 en el brazo CE frente a 6,0 meses en el brazo C del estudio (CRI 0,80), en comparación con 6,7 meses en el brazo CE frente a 5,9 meses en el brazo C (CRI 0,97) en pacientes sin mutación en tejido. La mediana de la SG de pacientes con mutación en plasma fue de 32,4 meses en el brazo CE frente a 18,6 en el brazo C (CRI 0,50), en comparación con 31,4 meses en el brazo CE frente a 20,6 en el brazo C (CRI 0,48) en pacientes con mutación en tejido. La mediana de la SG de pacientes sin mutación en plasma fue de 16,1 meses en el brazo CE frente a 13,3 en el brazo C (CRI 0,90), en comparación con 14,9 meses en el brazo CE frente a 12,2 en el brazo C (CRI 0,77) en pacientes sin mutación en tejido.

Las consecuencias del tratamiento de acuerdo con el estado de mutación de EGFR en plasma inicial se resumen en la tabla 24 y las FIGURAS 22-25. Los datos comparativos sobre las consecuencias del tratamiento en base a las muestras de plasma C3 y muestras de tejido se ilustran en las FIGURAS 26-27 y las tablas 25 y 26. Los análisis anteriores de las consecuencias del tratamiento en pacientes con diferente estado de mutación revelaron que el estado de mutación de EGFR en plasma puede predecir la consecuencia del tratamiento, tal como la duración de la supervivencia sin progresión y/o la supervivencia global de un paciente particular. Las figuras 22A (SSP) y 24A (SG) ilustran la comparación entre pacientes con mutación en plasma (en la situación inicial) en dos brazos de tratamiento (138 pacientes en total). La comparación indicó que una combinación de quimioterapia y tratamiento con erlotinib fue una opción de tratamiento mejor para los pacientes que se determinó que tenían mutación en plasma en el punto temporal inicial. Las figuras 22B (SSP) y 24B (SG) ilustran la comparación entre pacientes con mutación de EGFR en tejido (sometidos a prueba en la situación inicial) en dos brazos de tratamiento (97 pacientes en total). La comparación indicó que una combinación de quimioterapia y erlotinib fue una opción de tratamiento mejor para pacientes con mutación de EGFR en tejido. Las figuras 22 y 24 muestran que la detección de carga de mutación en plasma o tejido en la situación inicial predijo consecuencias similares para pacientes con mutación. Las figuras 23 y 25 ilustran la comparación entre pacientes sin mutación en la situación inicial (sin mutación en plasma - figuras 23A y 25A, sin mutación en tejido - figuras 23B y 25B) en dos brazos de tratamiento. La detección de carga de mutación en plasma o tejido en la situación inicial predijo consecuencias similares para pacientes sin mutación. La figura 26 ilustra el análisis de los pacientes que dieron positivo para mutación de EGFR en plasma en la situación inicial y que se volvieron a analizar además en el punto temporal C3 (122 pacientes en total). Se agruparon estos 122 pacientes en base a su estado de mutación de EGFR C3 (positivo o negativo) y al brazo de tratamiento. Si los pacientes dieron negativo para mutación en plasma en el punto temporal C3 (lo que posiblemente indicaba que los pacientes respondieron al tratamiento), tenían mejor SSP y SG en ambos grupos de tratamiento. El estado con mutación en la situación inicial seguido del estado sin mutación en el punto temporal C3 se asoció con una mejora de las consecuencias; los pacientes que dieron positivo en la situación inicial y dieron todavía positivo en el punto temporal C3 experimentaron peores consecuencias. La figura 27 ilustra el análisis de los pacientes en el brazo de quimioterapia + tratamiento con erlotinib que dieron positivo para mutación de EGFR en plasma en la situación inicial y que se volvieron a analizar además en el punto temporal C3 (122 pacientes en total). Se agruparon estos 122 pacientes en base a su estado de mutación de EGFR C3 (positivo o negativo). Se observó la mejor consecuencia con respecto a la SSP para los pacientes sin mutación en el punto temporal C3 y se les administró quimioterapia + tratamiento con erlotinib. El estado con mutación en la situación inicial seguido del estado sin mutación en el punto temporal C3 se asoció con una mejora en las consecuencias; los pacientes que dieron positivo en la situación inicial y dieron todavía positivo en C3 experimentaron peores consecuencias.

Tabla 24: Consecuencias del tratamiento de acuerdo con el estado de mutación de EGFR en plasma en el punto temporal inicial; A - resumen de datos para pacientes con mutación en plasma (138 pacientes); B - resumen de datos para pacientes sin mutación en plasma (289 pacientes)

5 A.

Brazo de estudio	TRG, %	SSP, meses	SG, meses
CE	74,6	13,8	32,4
C	19,7	5,9	18,6
Parámetros estadísticos		CRI: 0,21 (intervalo de confianza (IC) del 95 % 0,14-0,32)	CRI: 0,50 (IC 95 % 0,32-0,78)

B.

Brazo de estudio	TRG, %	SSP, meses	SG, meses
CE	28,6	6,7	16,1
C	17,6	6,0	13,3
Parámetros estadísticos		CRI: 0,80 (IC 95 % 0,63-1,02)	CRI: 0,90 (IC 95 % 0,69-1,18)

10 Tabla 25: Correlación entre el estado de mutación C3 en plasma y las consecuencias del tratamiento en pacientes con mutación y sin mutación (un total de 122 pacientes)

Tipo de consecuencia del tratamiento	TRG	SSP	SG
Pacientes pMUT+ en C3	14/42 = 33,3 %	Mediana = 7,2 meses IC 95 % = (6,0, 7,8)	Mediana = 18,2 meses IC 95 % = (14,2, 27,4)
Pacientes pMUT- en C3	53/80 = 66,3 %	Mediana = 12,0 meses IC 95 % = (9,6, 16,5)	Mediana = 31,9 meses IC 95 % = (23,5, no definido)
Parámetros estadísticos	Cociente de probabilidades (CP): 3,93 IC 95 %: (1,78, 8,66) p = 0,0007	CRI: 0,32 IC 95 %: (0,21, 0,48) p<0,0001	CRI: 0,51 IC 95 %: (0,31, 0,84) p = 0,0066

15 Tabla 26: Correlación entre el estado de mutación C3 en plasma y las consecuencias del tratamiento en pacientes con mutación y sin mutación en los dos brazos del estudio clínico (un total de 122 pacientes)

Subgrupo de pacientes	Tipo de consecuencia del tratamiento	TRG	Mediana SSP (meses)	Mediana SG (meses)
Pacientes pMUT+ en C3	Brazo C	24,2 %	6,8	18,8
	Brazo CE	66,7 %	7,8	17,7
	Parámetros estadísticos del brazo CE	CP: 6,25 IC 95 %:(1,26, 30,90)	CRI: 0,38 IC 95 % (0,17, 0,90)	CRI: 0,98 IC 95 % (0,40, 2,42)
Pacientes pMUT- en C3	Brazo C	26,1 %	7,8	26,3
	Brazo CE	82,5 %	16,6	32,4
	Parámetros estadísticos del brazo CE	CP: 13,32 IC 95 %:(4,20, 42,23)	CRI: 0,23 IC 95 % (0,13, 0,41)	CRI: 0,61 IC 95 % (0,31, 1,21)

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de evaluación del estado de un sujeto humano con un cáncer con tumores sólidos, que comprende: cuantificar una cantidad de una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en una secuencia de ácido nucleico en una muestra obtenida del sujeto con el cáncer con tumores sólidos y realizar un seguimiento del cáncer con tumores sólidos en el sujeto, en el que el sujeto ha completado uno o más ciclos de tratamiento, el tratamiento comprende la administración de inhibidor de las tirosina cinasas y la muestra es una muestra de plasma obtenida antes de la administración del tratamiento y al final del tercer ciclo de tratamiento, en el que cuantificar comprende realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos para una secuencia de ácido nucleico mutada para generar un valor umbral de los ciclos de PCR; y comparar el valor umbral de los ciclos con un valor de control, en el que el valor de control tiene en cuenta la concentración de ADN genómico en la muestra, y en el que si el valor umbral de los ciclos está por debajo del valor de control la mutación asociada a tumor está presente en la muestra y si el valor umbral de los ciclos está por encima del valor de control la mutación asociada a tumor está ausente de la muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de las tirosina cinasas es erlotinib o gefitinib.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad de la mutación somática asociada a cáncer está por encima de un nivel umbral, y en el que el procedimiento comprende además el tratamiento adicional del sujeto, en el que el tratamiento adicional es intervención quirúrgica, quimioterapia, tratamiento farmacológico dirigido o cualquier combinación de los mismos.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico comprenden una mutación activadora en un oncogén.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la evaluación comprende administrar un tratamiento farmacológico dirigido al sujeto si la cantidad de la al menos una de las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico en la muestra excede un valor de umbral.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la evaluación comprende además incrementar una dosis del tratamiento farmacológico dirigido administrada al sujeto si se detecta un incremento en la cantidad de las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer en la secuencia de ácido nucleico.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las una o más mutaciones somáticas asociadas a cáncer son una o más mutaciones somáticas en la secuencia de ácido nucleico de EGFR.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el cáncer con tumores sólidos es cáncer de pulmón.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el cáncer con tumores sólidos es CPNM y la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de EGFR.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las una o más mutaciones somáticas en la secuencia de ácido nucleico de EGFR se seleccionan del grupo que consiste en una delección en el exón 19 sin cambio de pauta de lectura, L858R, L861Q, G719X, T790M, S678I e inserción en el exón 20 sin cambio de pauta de lectura.
11. Un procedimiento de identificación de un paciente con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) candidato para un tratamiento farmacológico dirigido, que comprende:
 - detectar la presencia o ausencia de una o más secuencias del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutadas en la sangre del paciente antes, durante o después de la quimioterapia, antes o después de la intervención quirúrgica o cualquier combinación de las mismas;
 - evaluar el estado metastásico del paciente con CPNM como M1b que comprende modificar el tratamiento farmacológico dirigido si se detecta la presencia de una mutación de EGFR de resistencia; e identificar al paciente como candidato para el tratamiento farmacológico dirigido en base a al menos la presencia detectada de las una o más secuencias de EGFR mutadas en la sangre del paciente y el estado metastásico del CPNM en el paciente, en el que la detección comprende analizar la sangre del paciente para detectar las una o más secuencias de EGFR mutadas por una técnica analítica, en el que la técnica analítica comprende una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos para una secuencia de ácido nucleico mutada para generar un valor umbral de los ciclos de PCR; y comparar

el valor umbral de los ciclos con un valor de control, en el que el valor de control tiene en cuenta la concentración de ADN genómico en la muestra, y en el que si el valor umbral de los ciclos está por debajo del valor de control la mutación asociada a tumor está presente en la muestra y si el valor umbral de los ciclos está por encima del valor de control la mutación asociada a tumor está ausente de la muestra.

- 5
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las una o más secuencias de EGFR mutadas comprenden una mutación de EGFR activadora.
- 10
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la mutación de EGFR activadora se selecciona del grupo que consiste en una delección en el exón 19, L858R, L861Q y G719X.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que las una o más secuencias de EGFR mutadas comprenden una mutación de EGFR de resistencia.
- 15
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la mutación de EGFR de resistencia se selecciona del grupo que consiste en T790M, S678I y una inserción en el exón 20.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el tratamiento farmacológico dirigido es un inhibidor de las tirosina cinasas.
- 20
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el inhibidor de las tirosina cinasas es erlotinib o gefitinib.
18. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la detección comprende detectar una o más veces la presencia o ausencia de una o más secuencias de EGFR mutadas en la sangre del paciente antes, durante o después del tratamiento farmacológico dirigido o cualquier combinación de los mismos.
- 25
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que se detecta la presencia de al menos una o más secuencias de EGFR mutadas que contienen una mutación de EGFR activadora y la evaluación comprende además incrementar una dosis de un inhibidor de las tirosina cinasas administrado al paciente si se detecta un incremento en la cantidad de la secuencia de EGFR mutada.
- 30

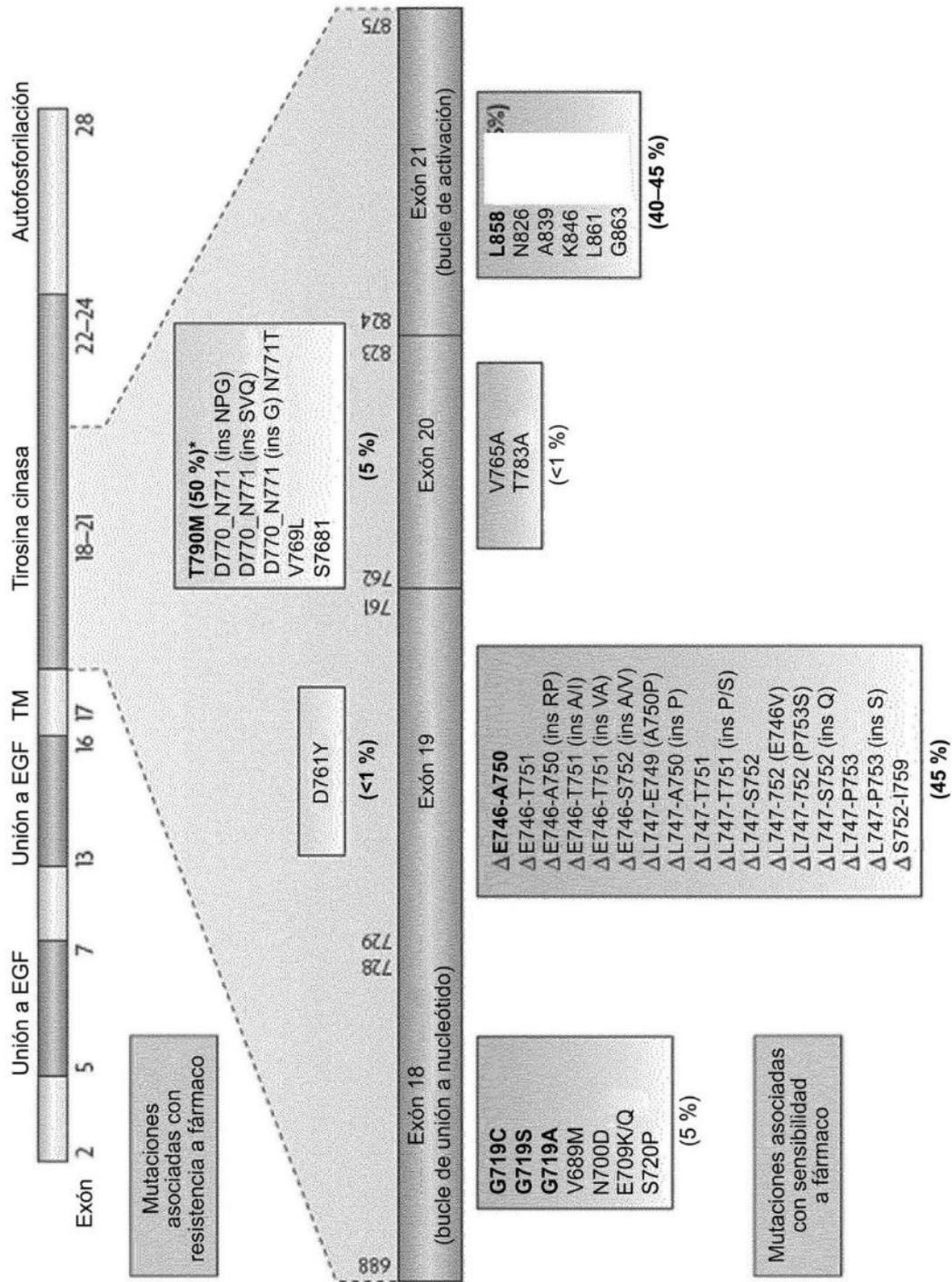


Figura 1

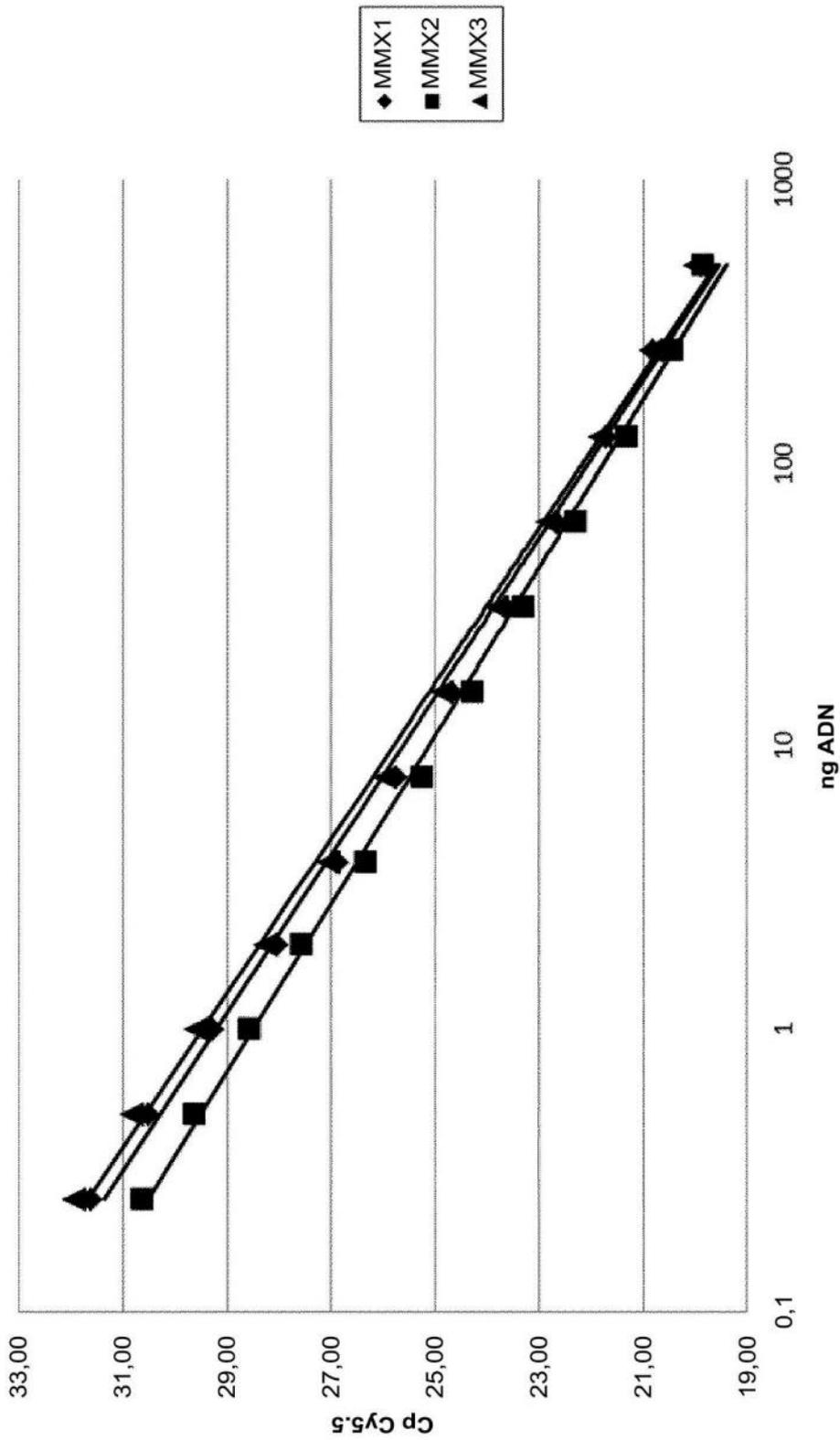


Figura 2

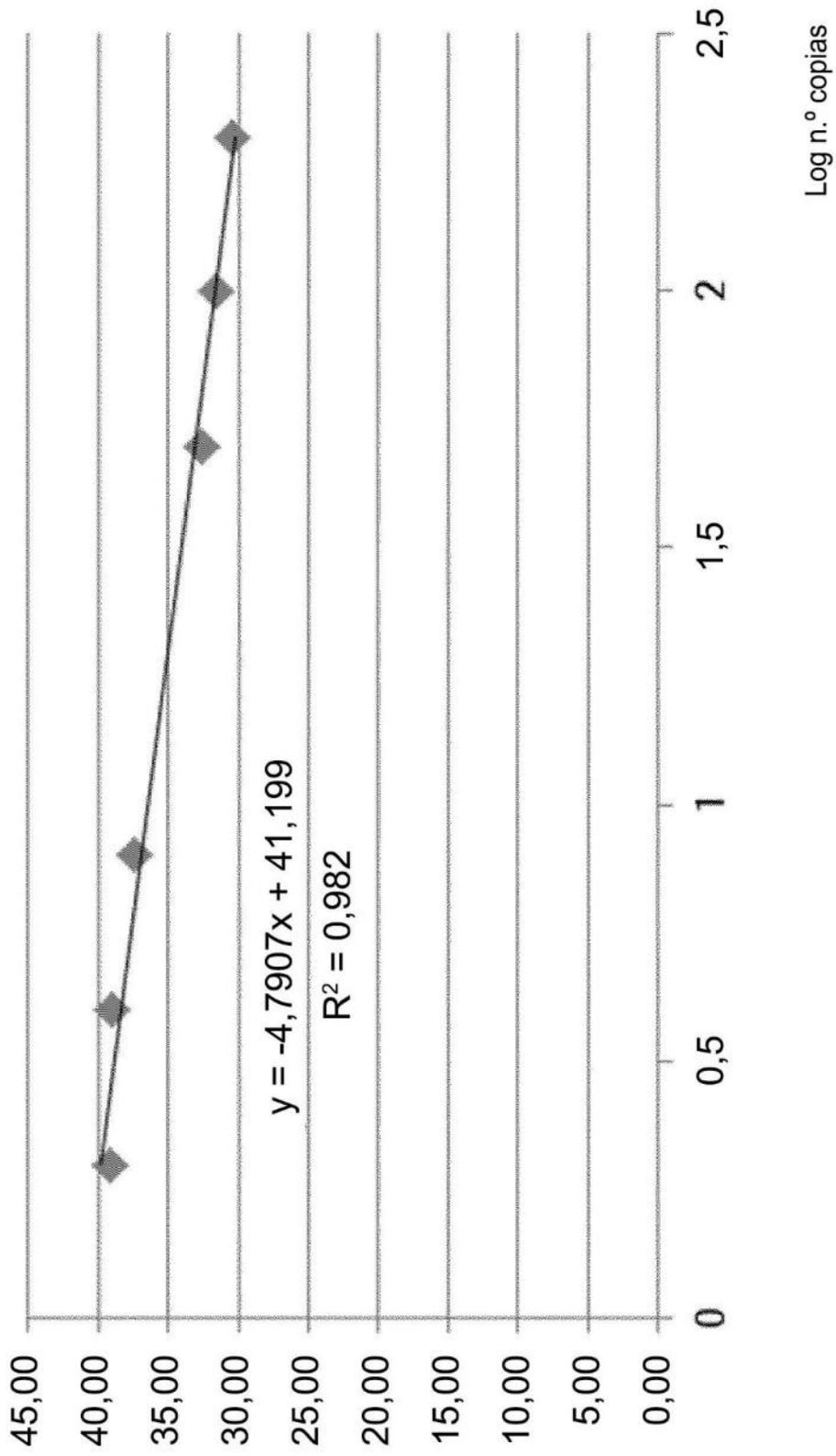


Figura 3

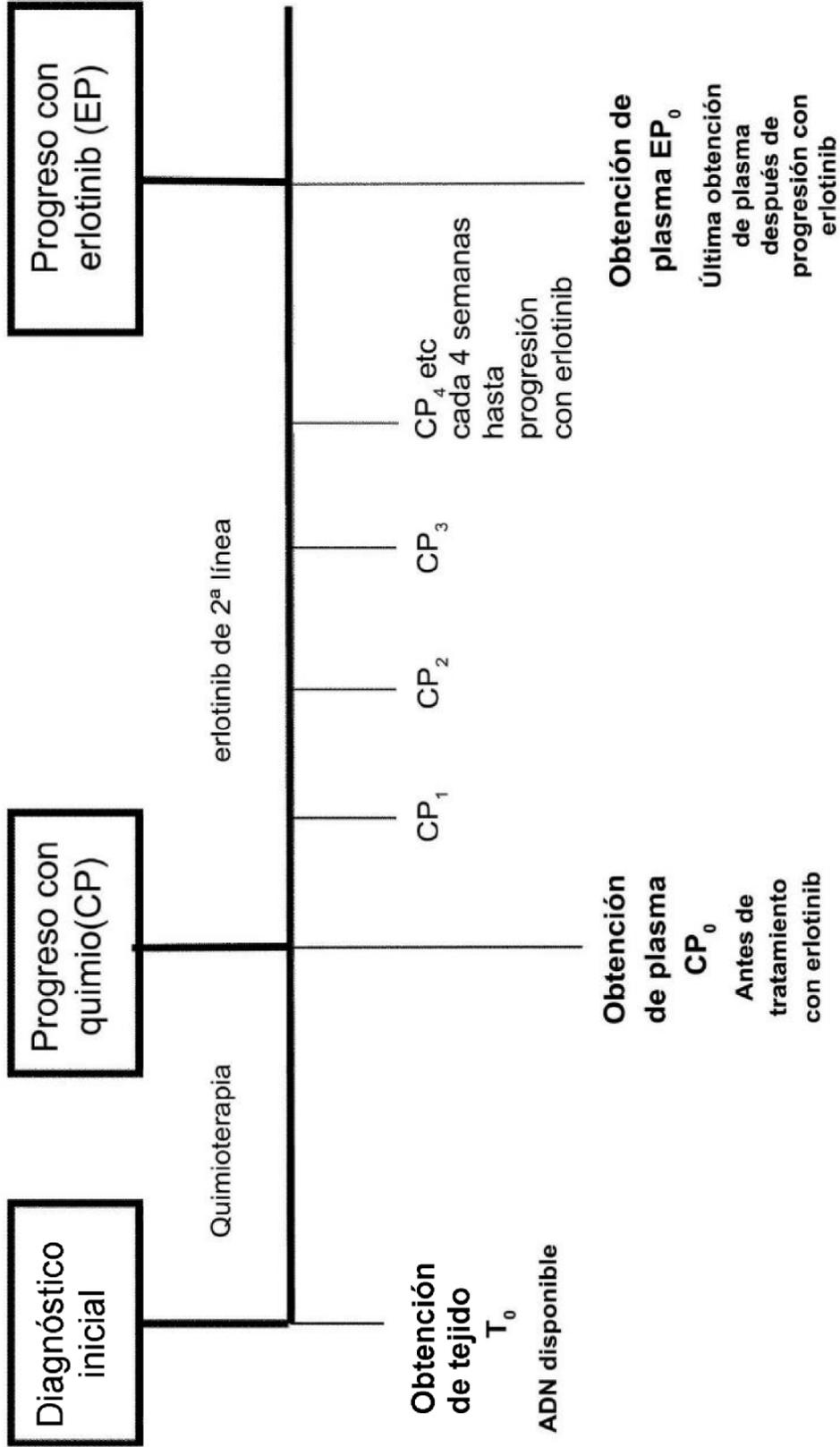


Figura 4

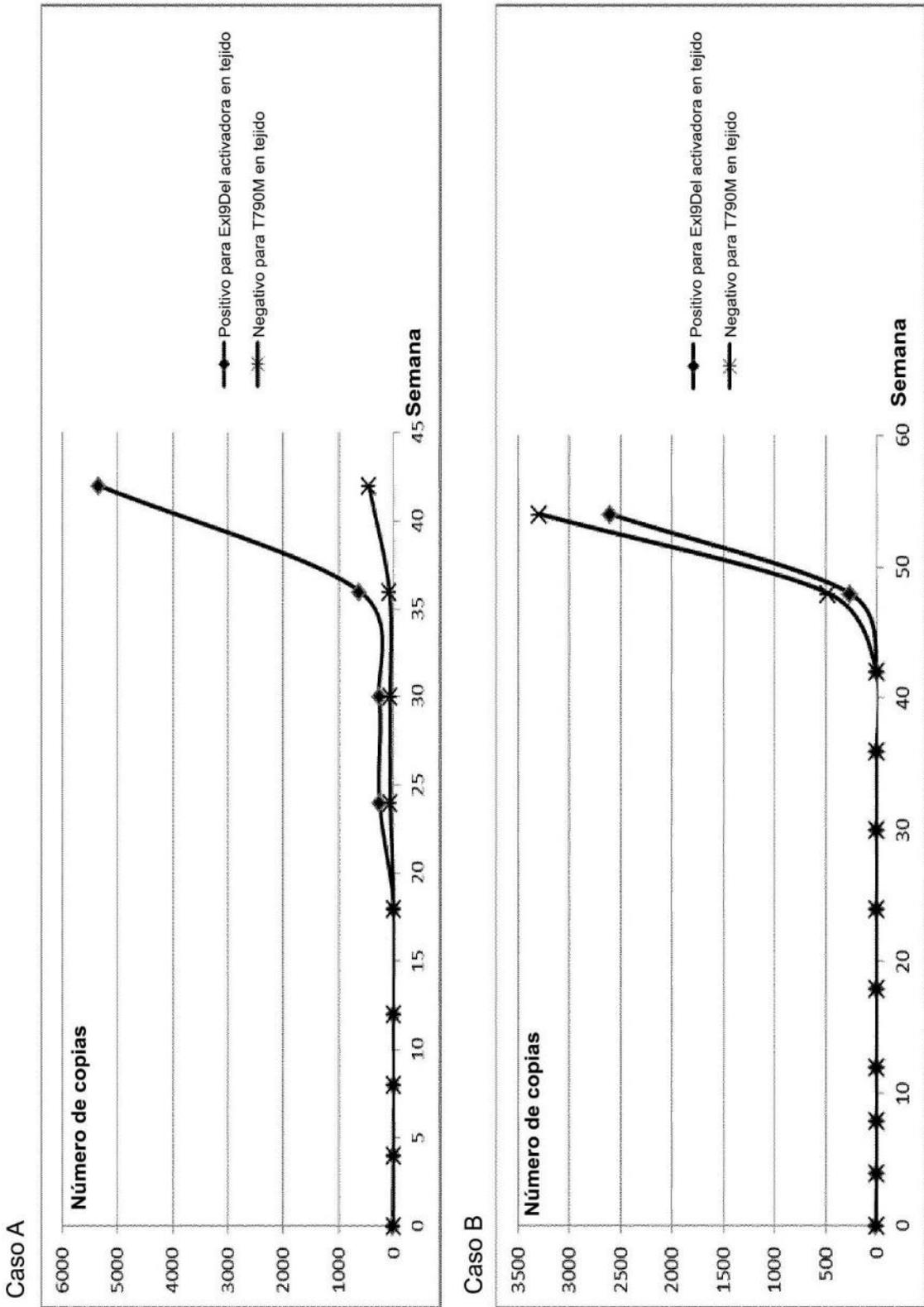


Figura 5

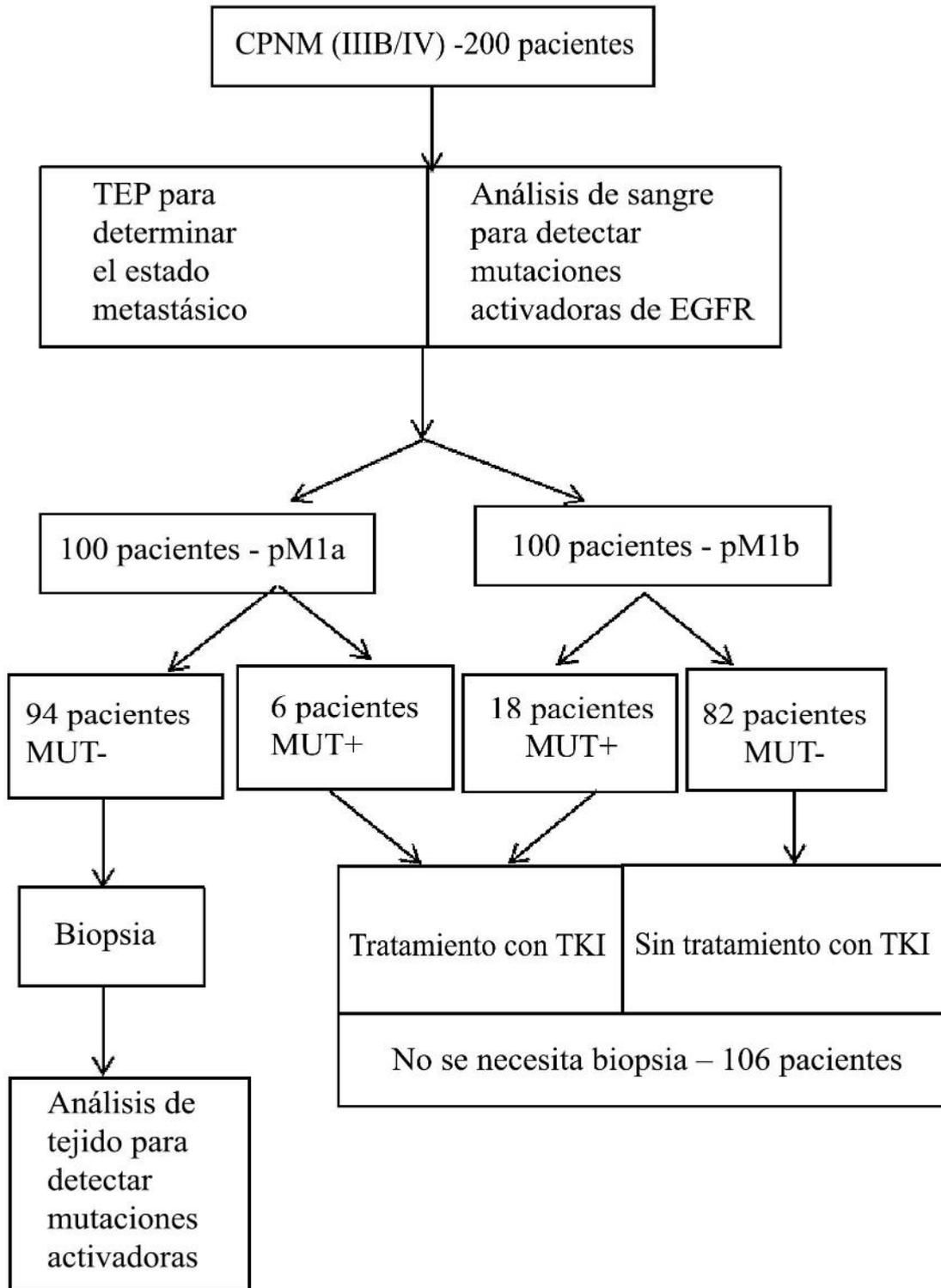


Figura 6

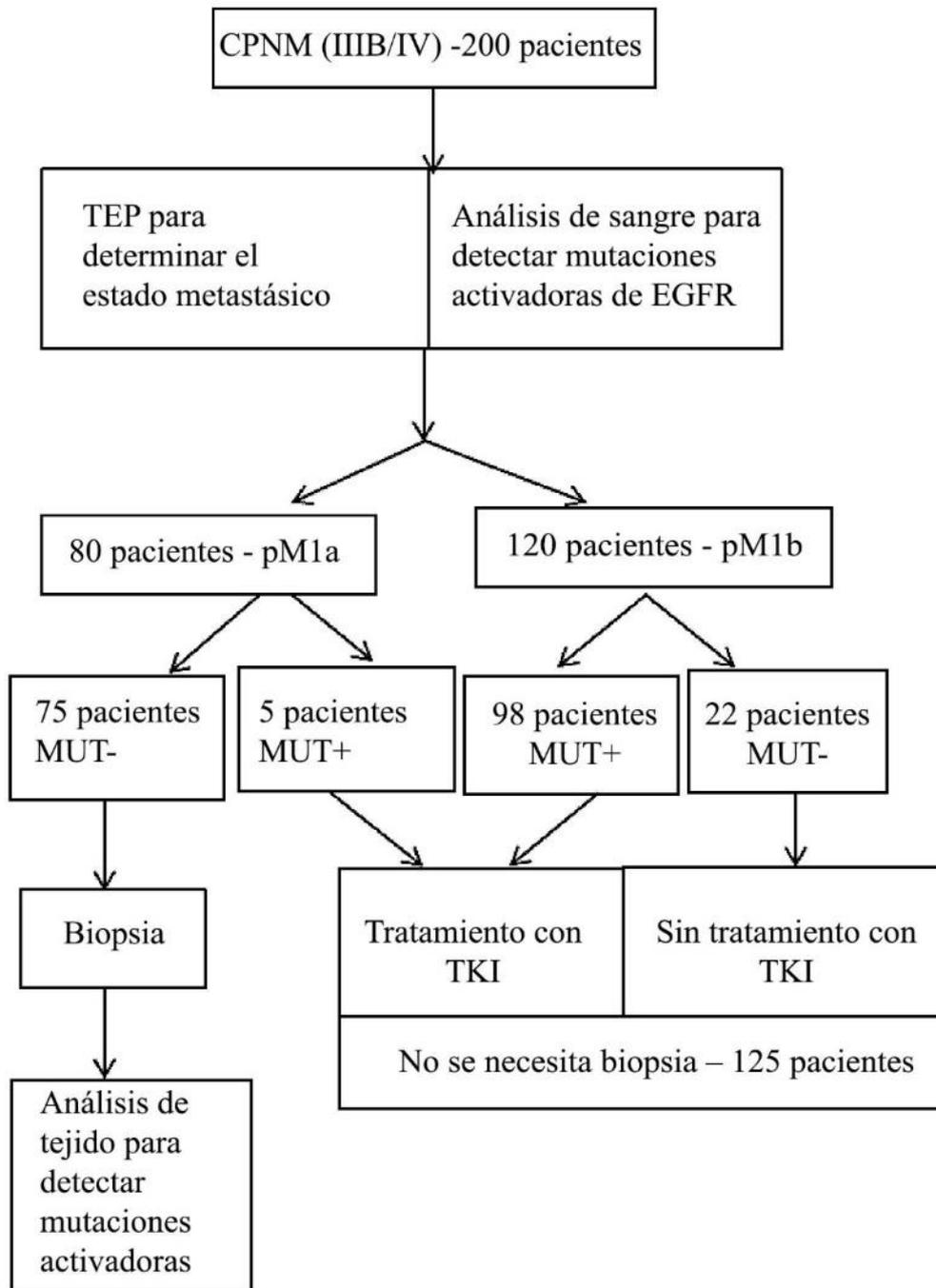


Figura 7

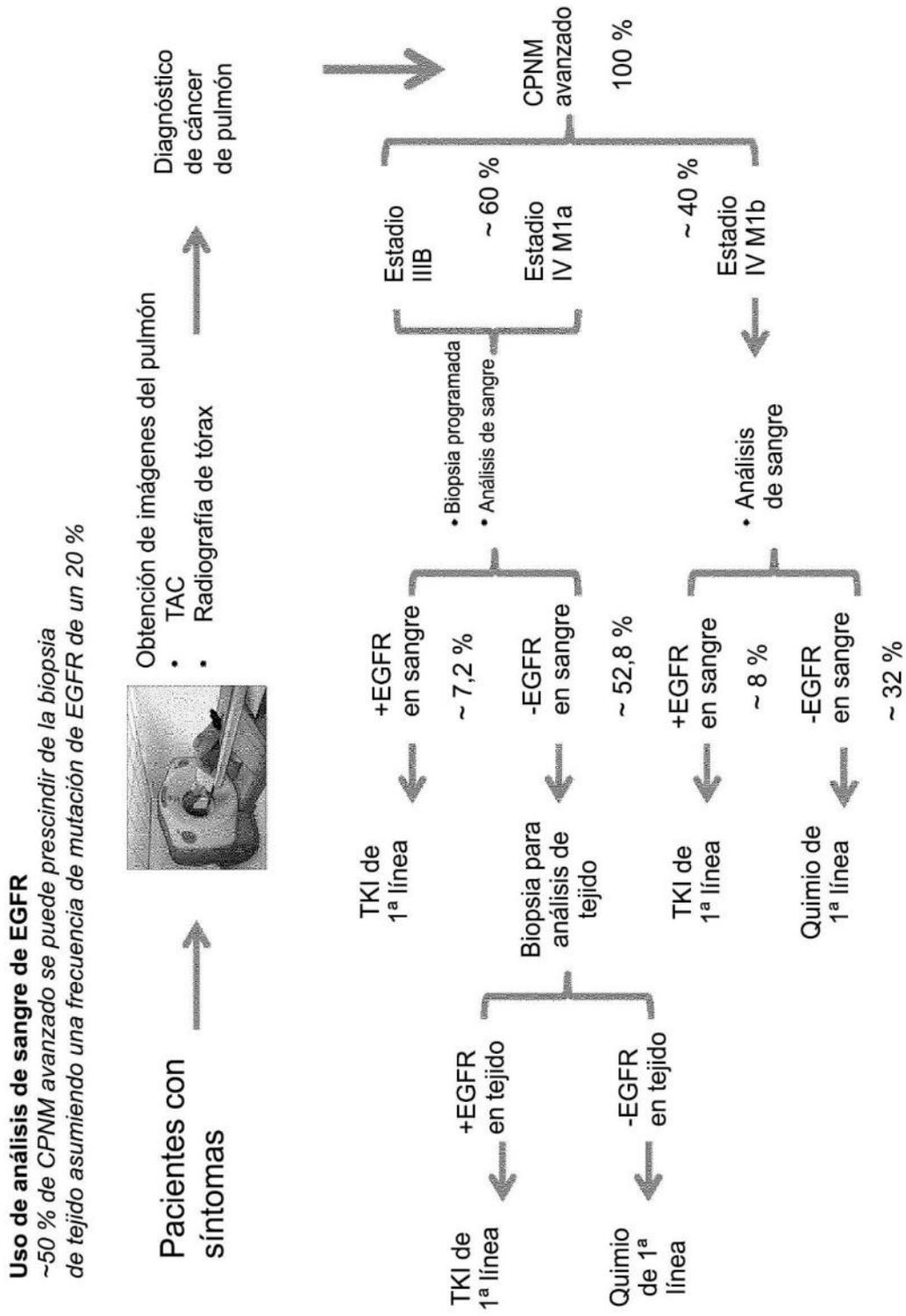


Figura 8

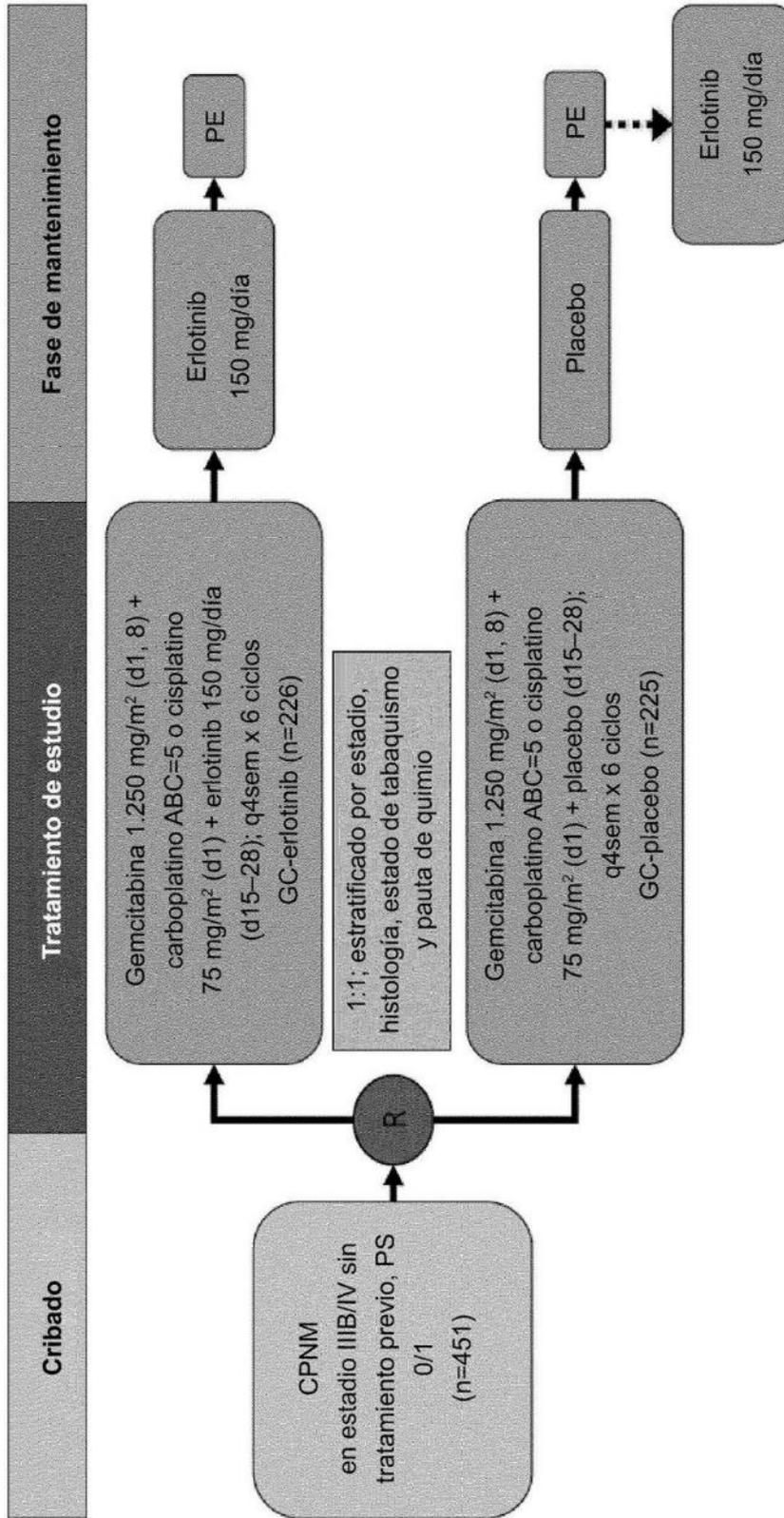


Figura 9

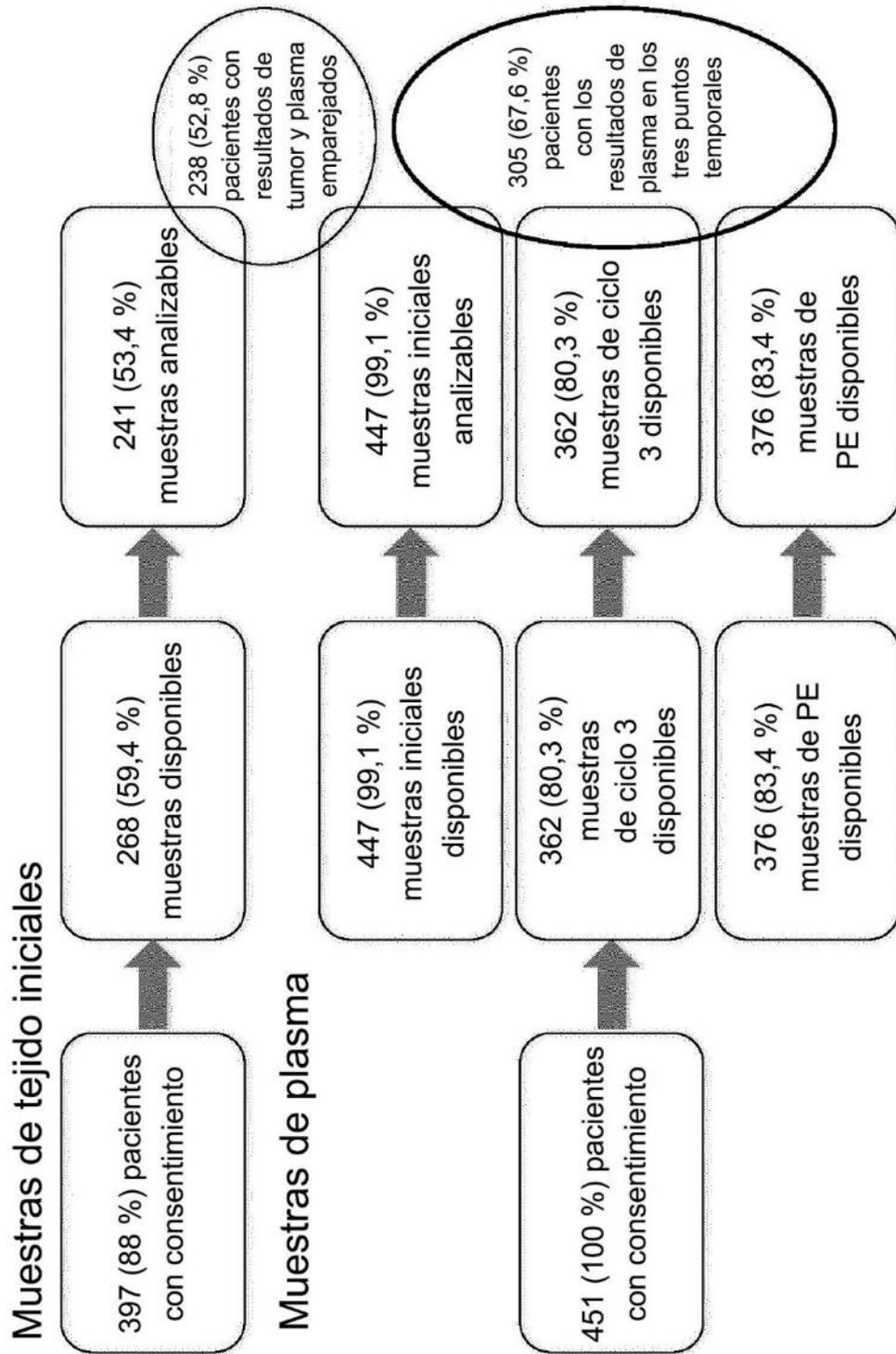


Figura 10

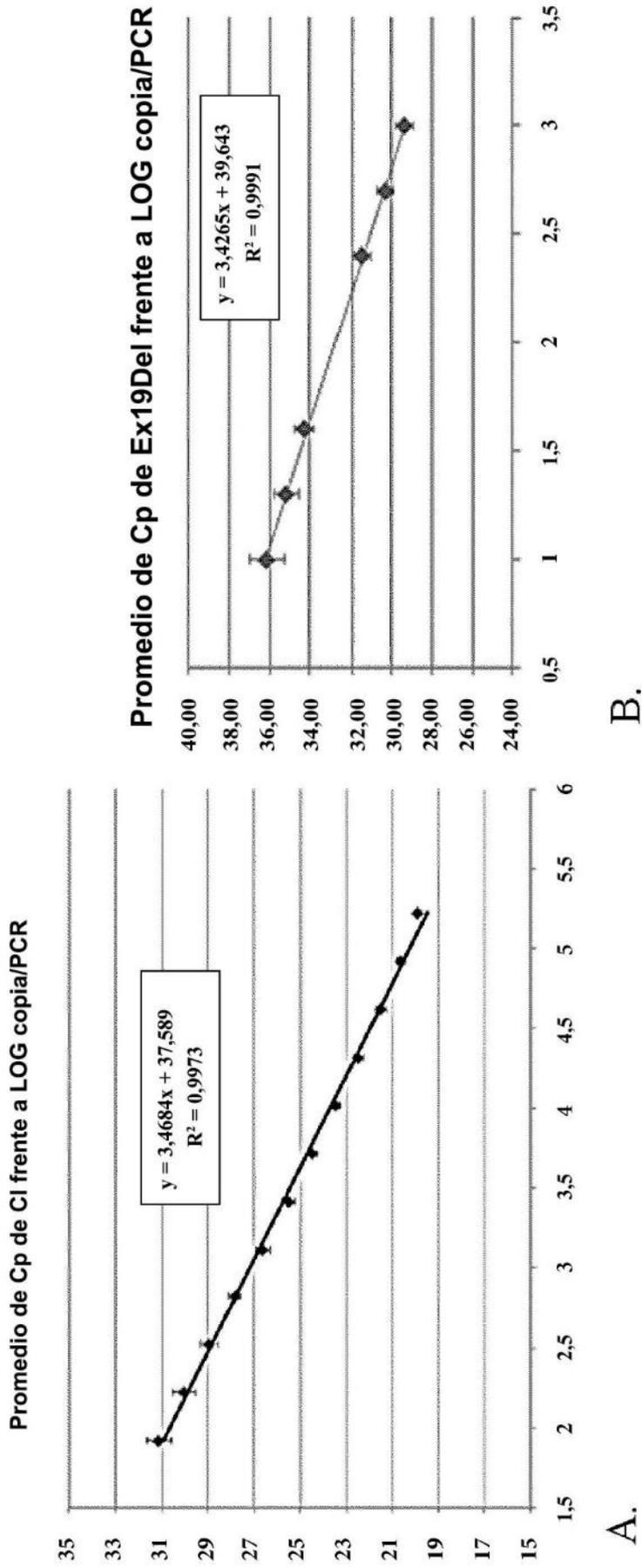
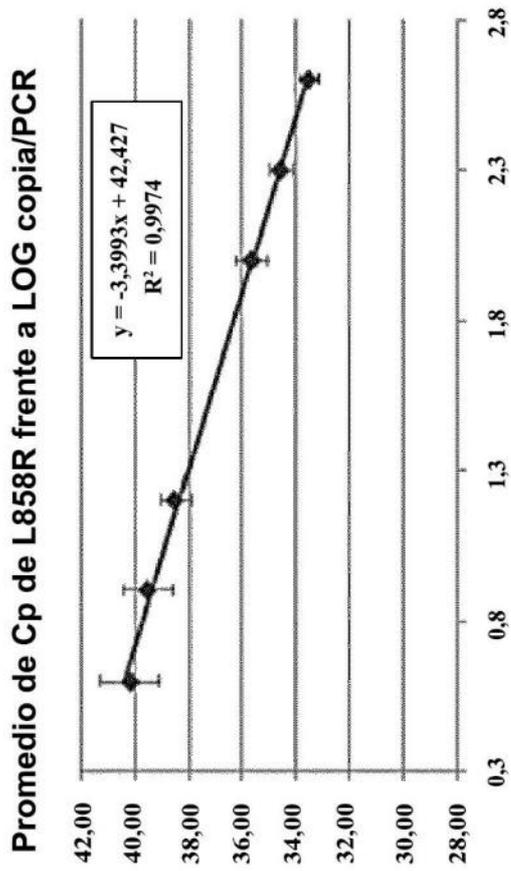
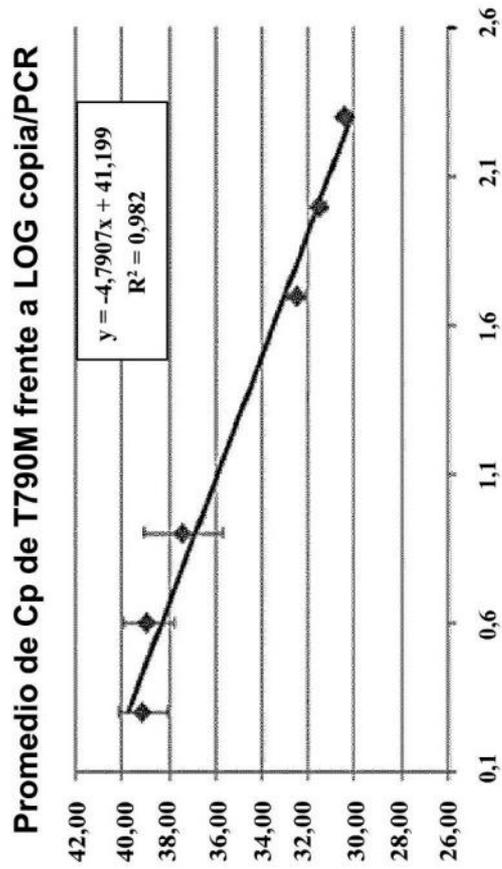


Figura 11



C.



D.

Figura 11 cont.

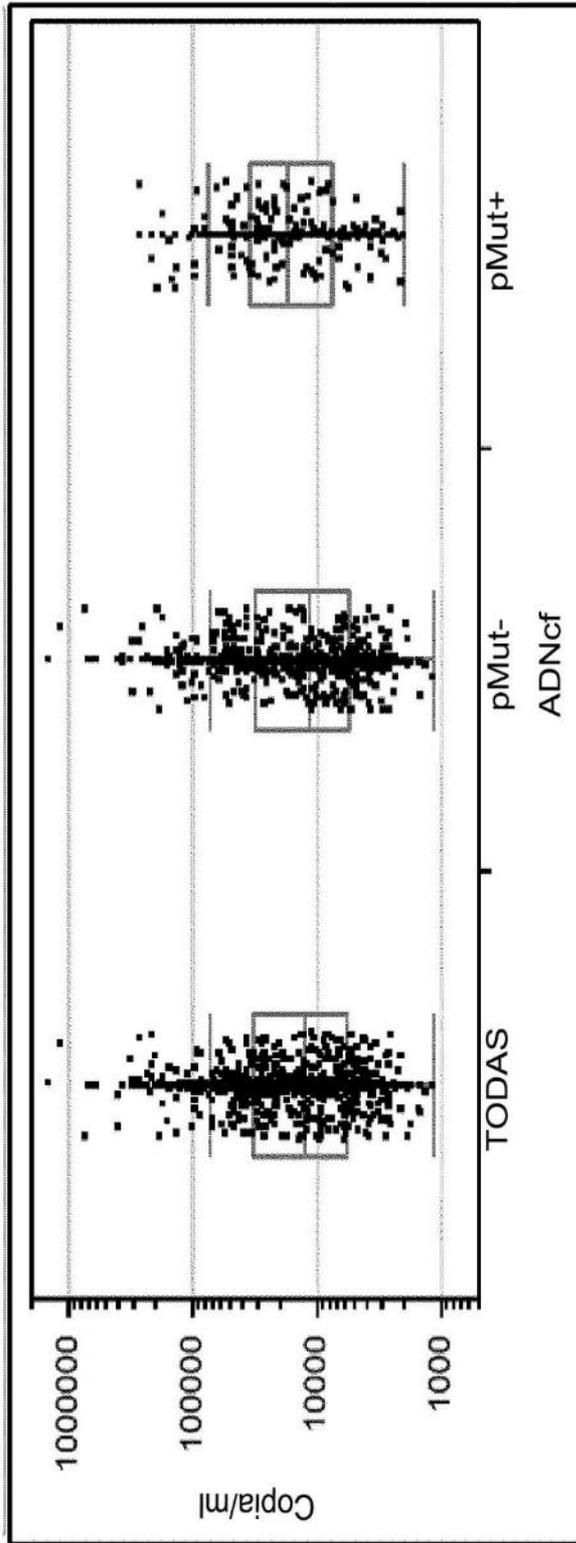


Figura 12

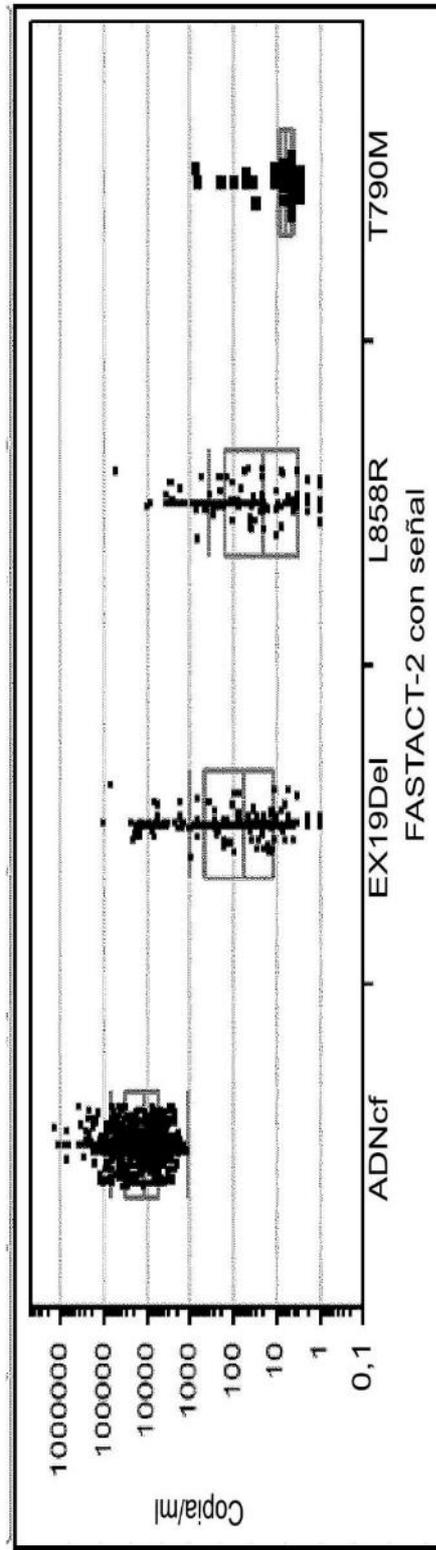


Figura 13

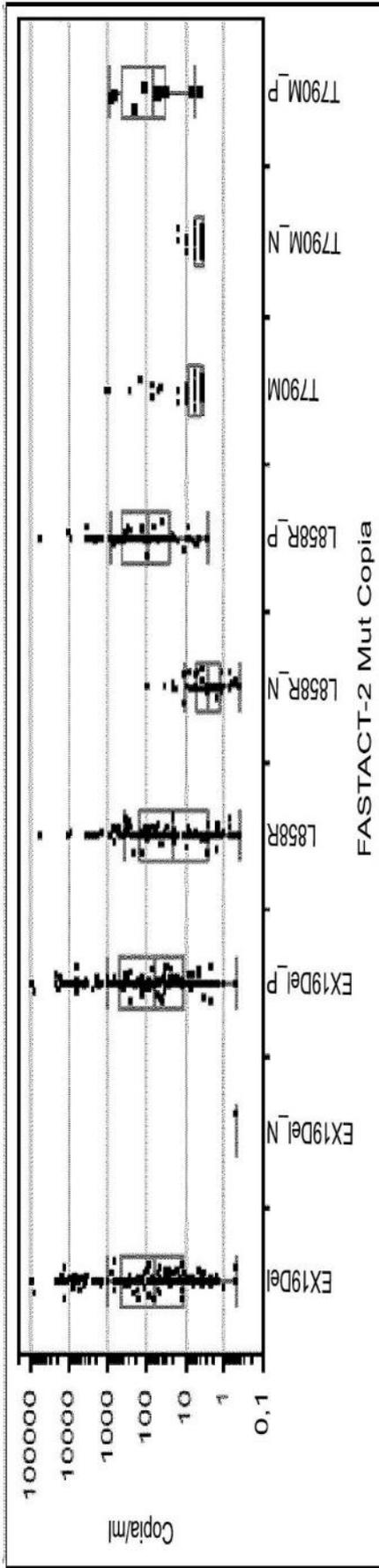


Figura 14

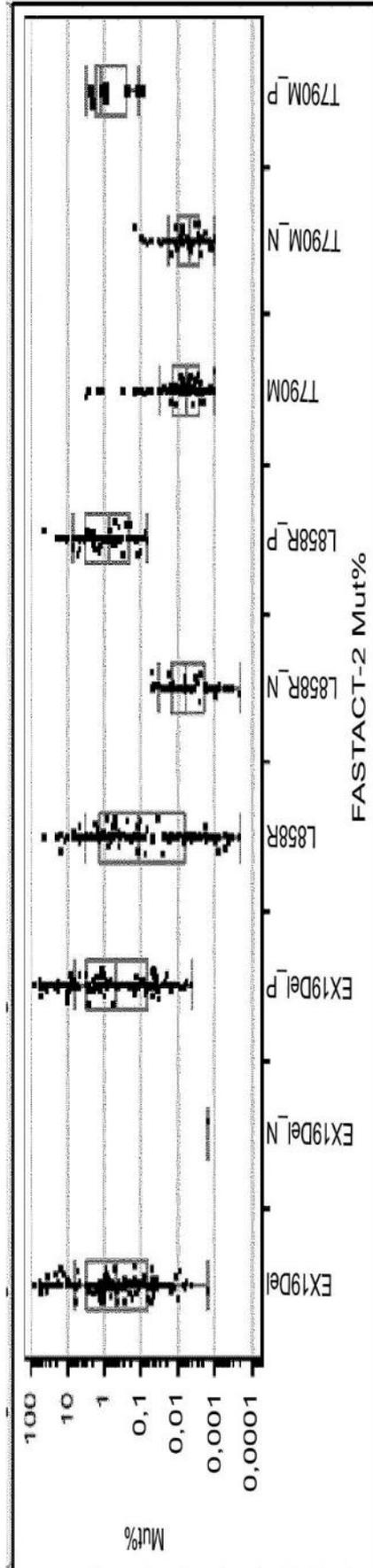
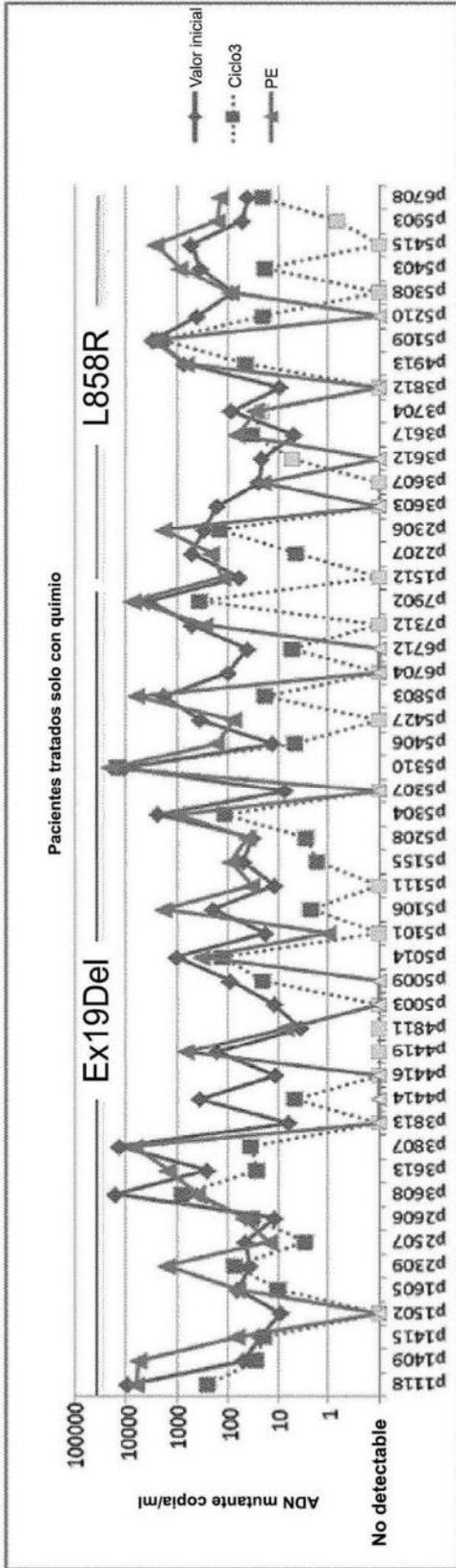
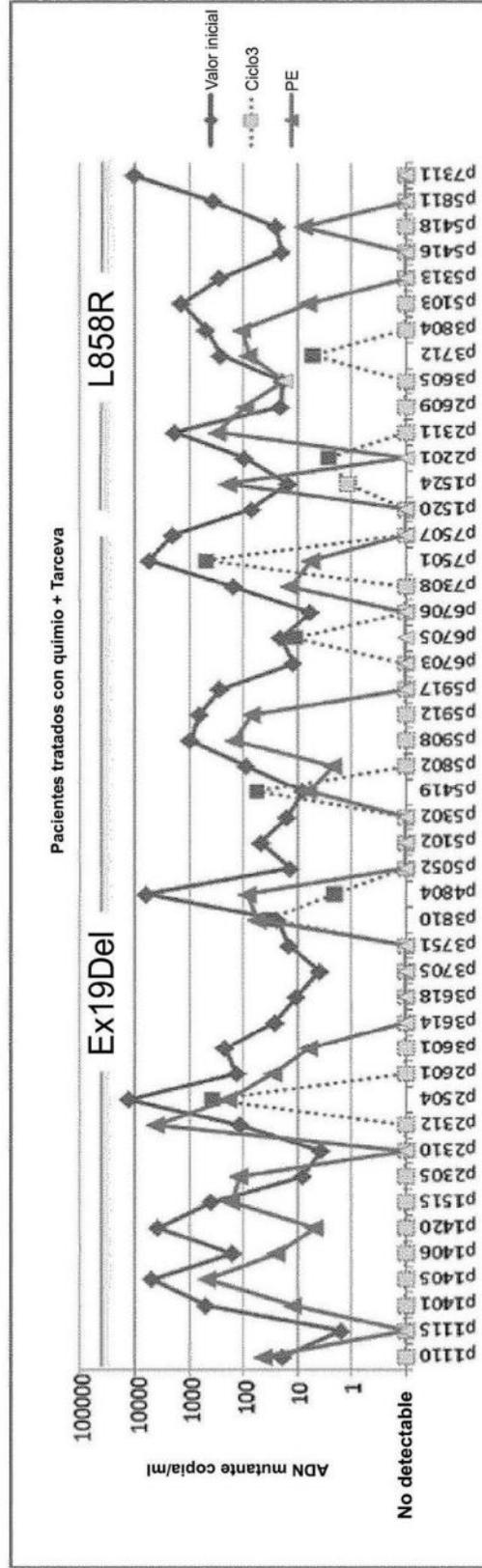


Figura 15

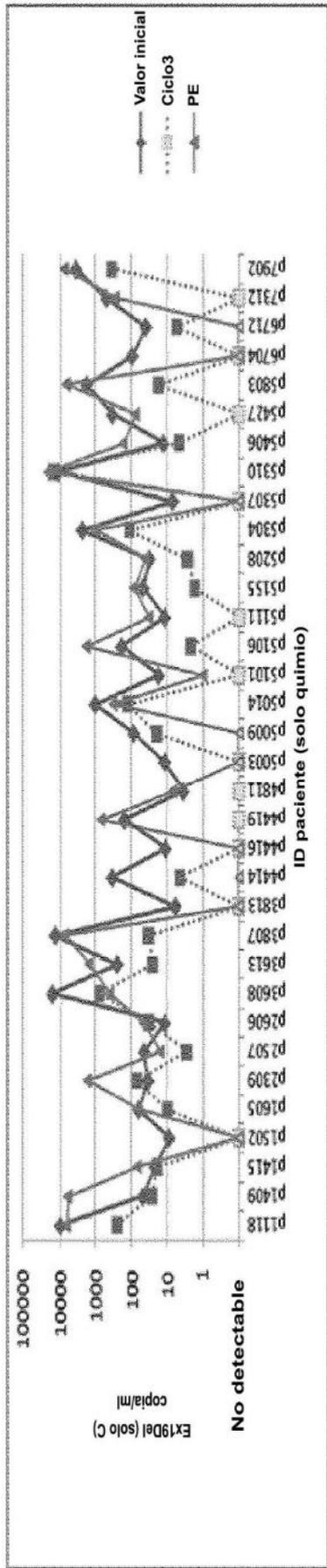


A.

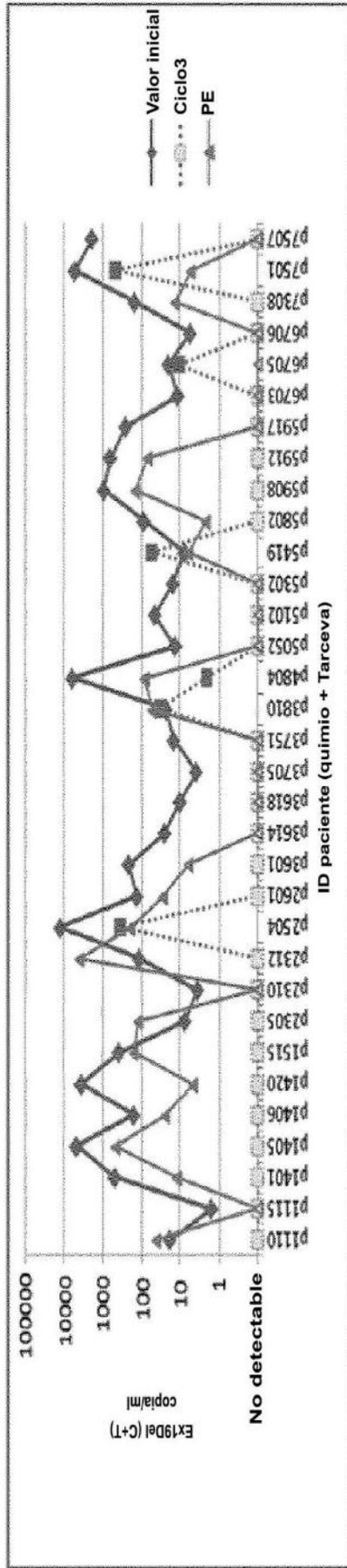


B.

Figura 16

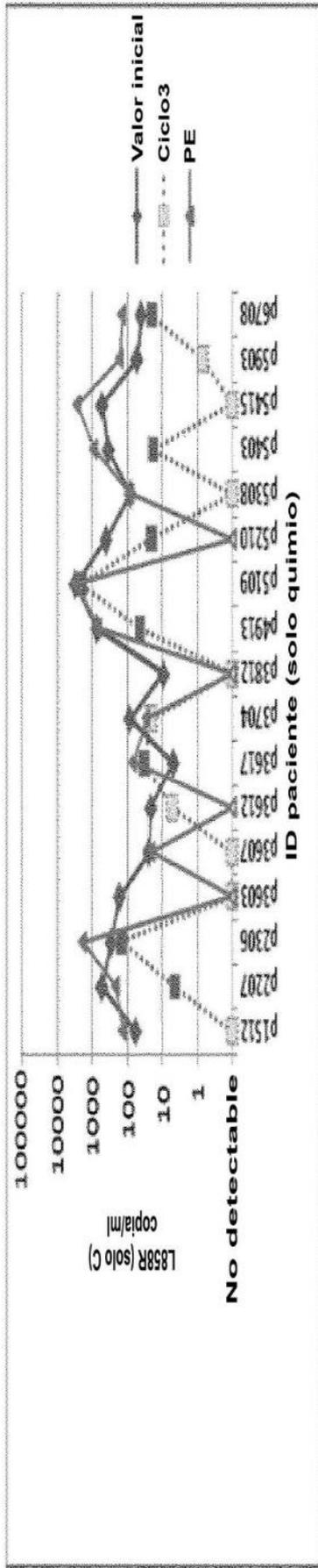


A.

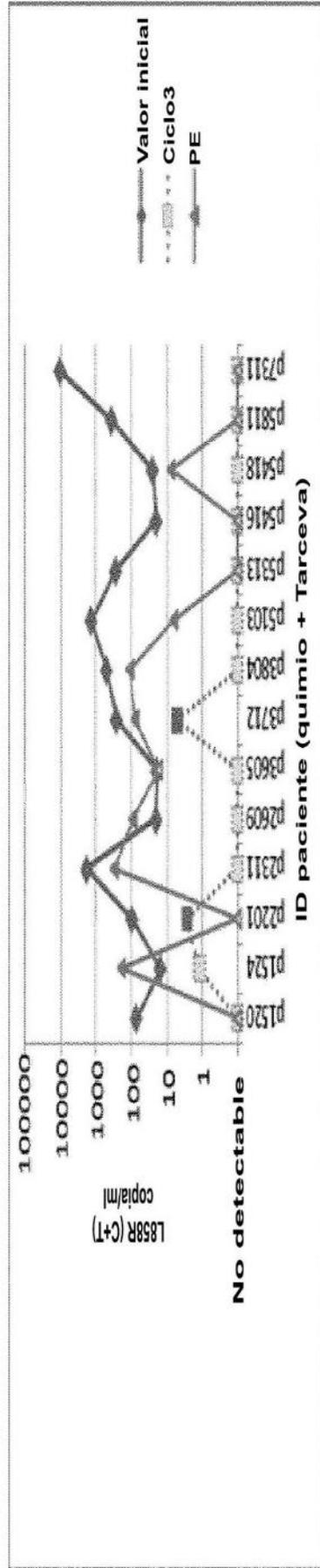


B.

Figura 17



A.



B.

Figura 18

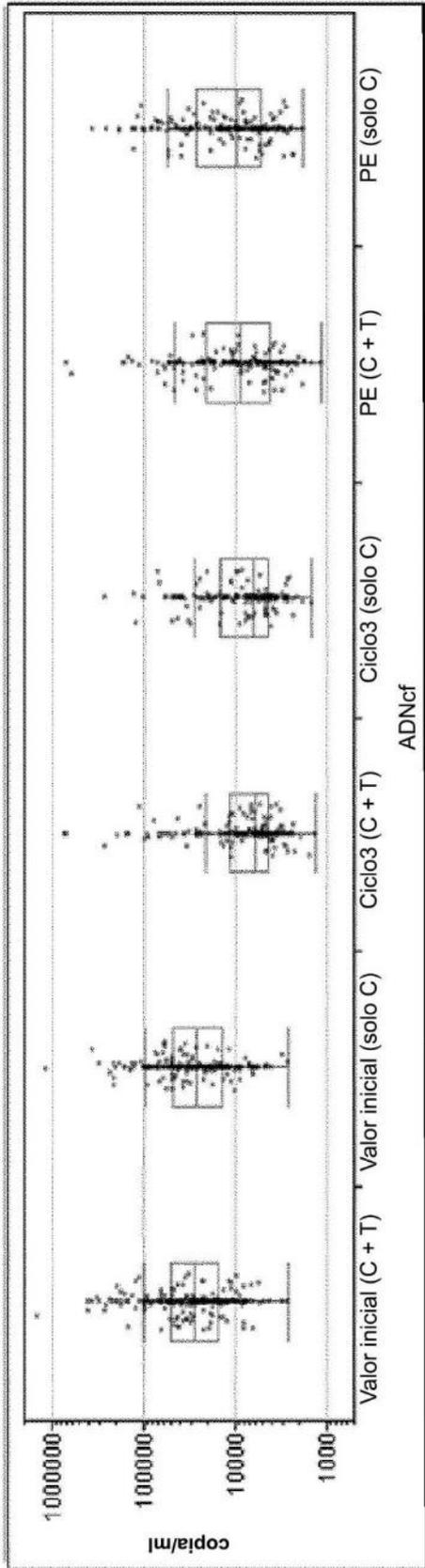


Figura 19

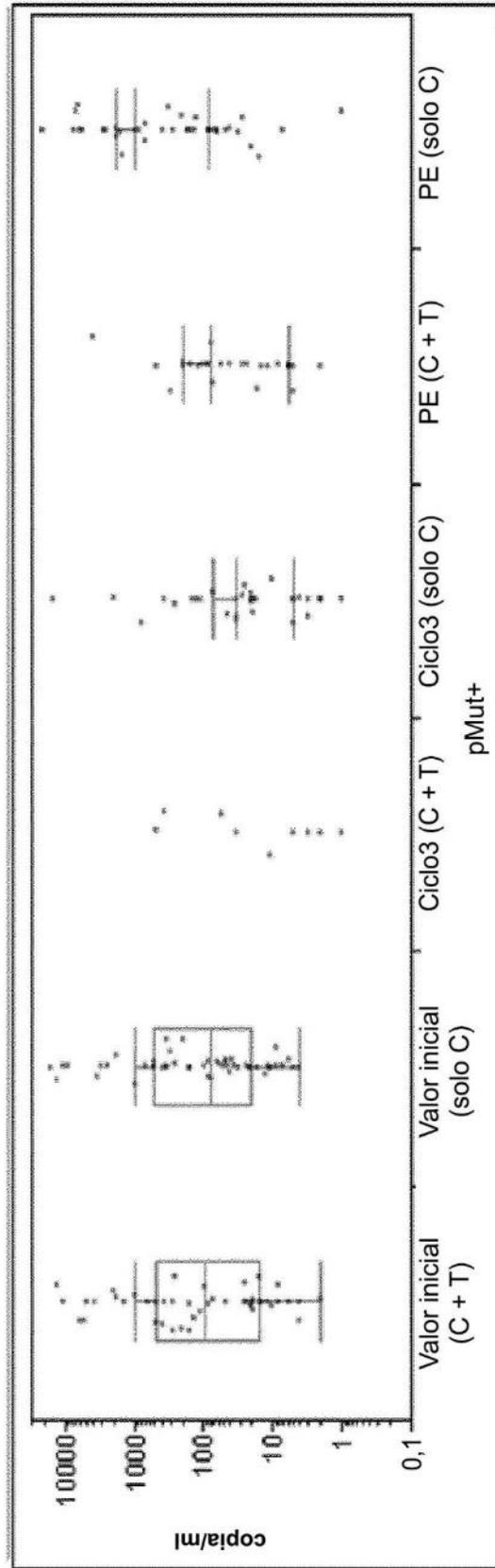
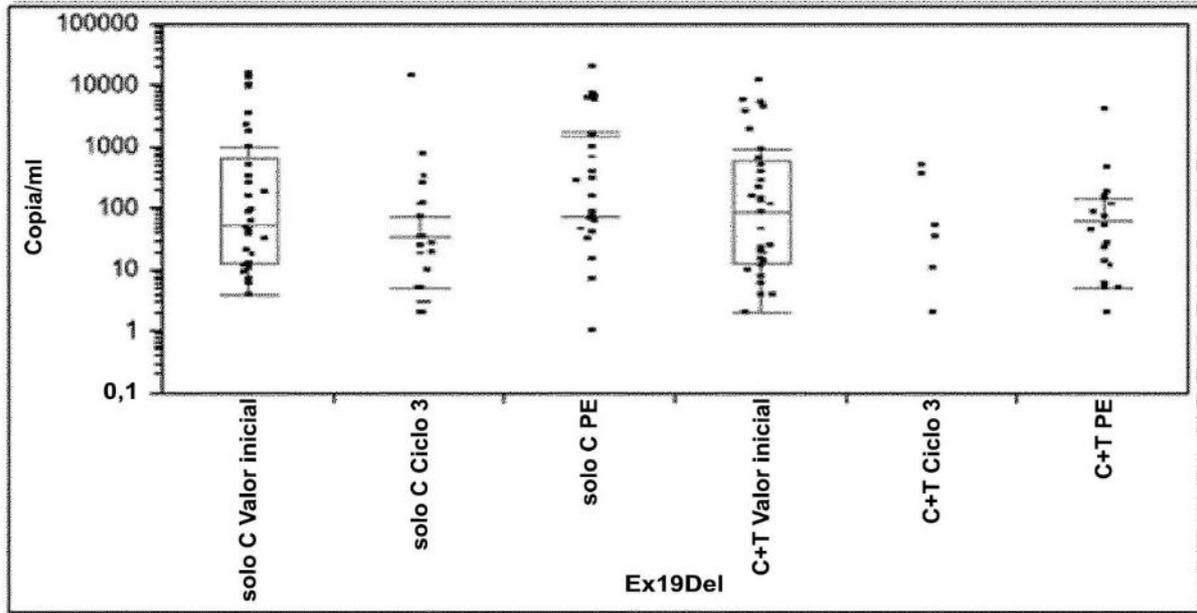
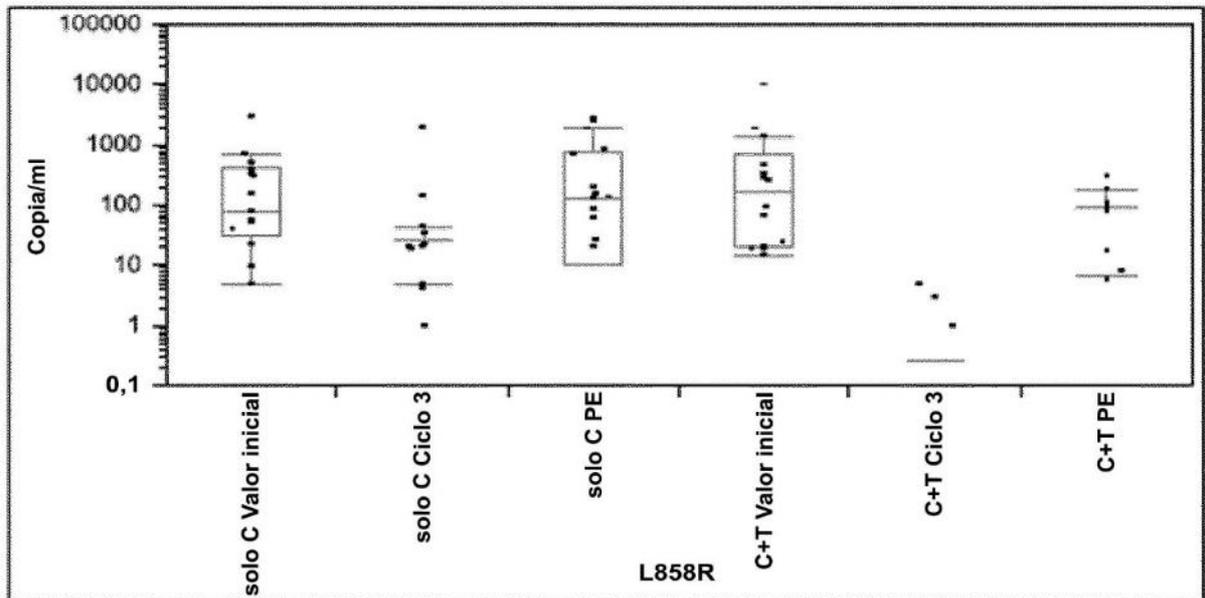


Figura 20

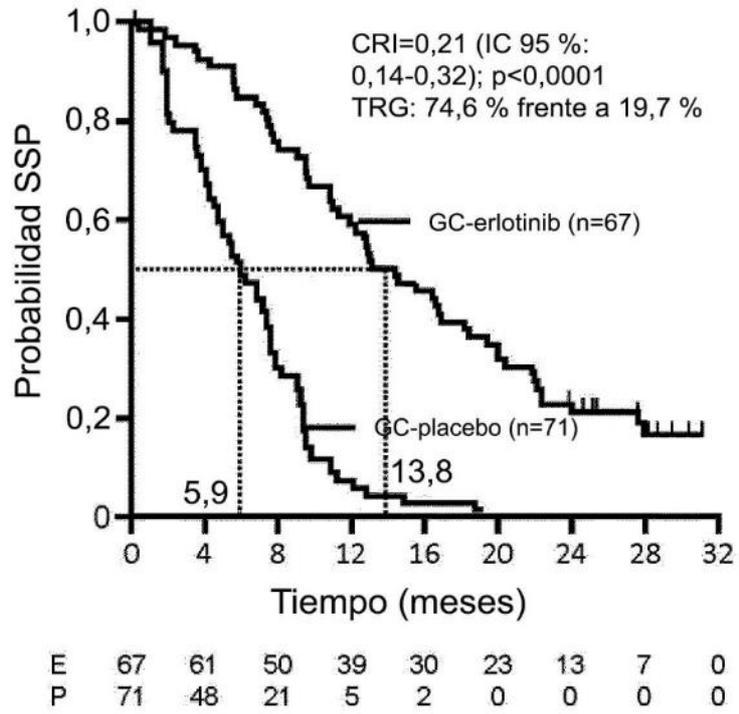


A.

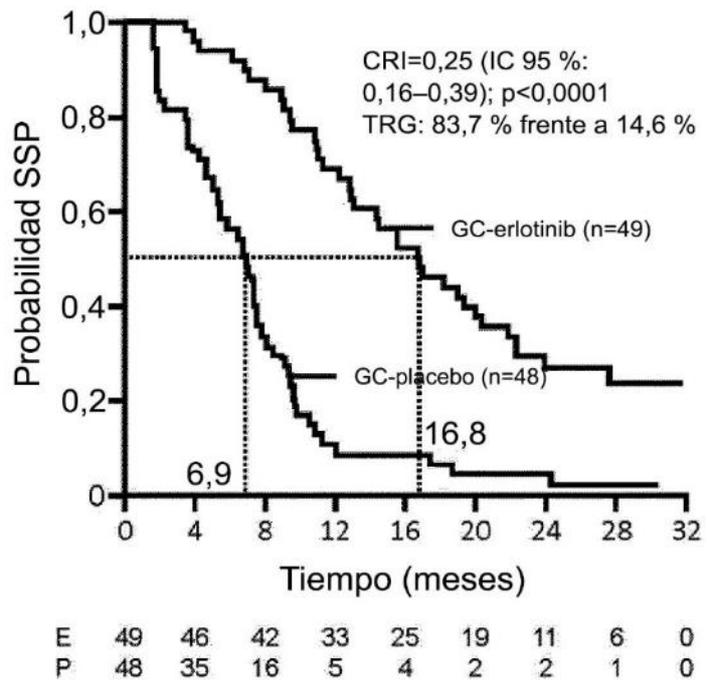


B.

Figura 21

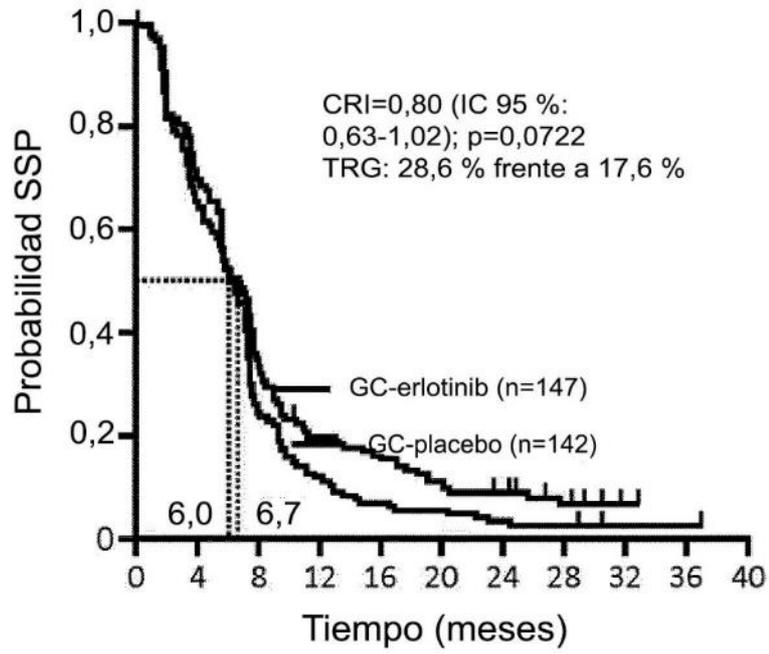


A.



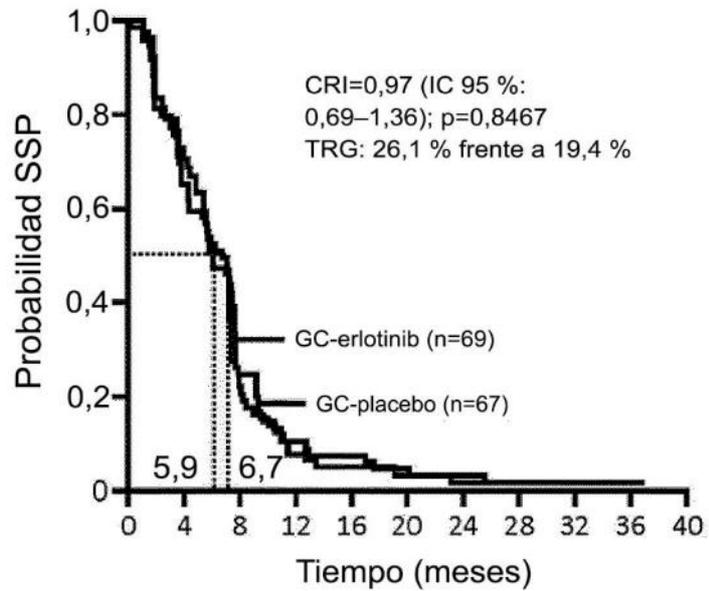
B.

Figura 22



E	147	94	48	27	21	15	11	5	1	0	0
P	142	48	33	16	9	7	4	3	1	1	0

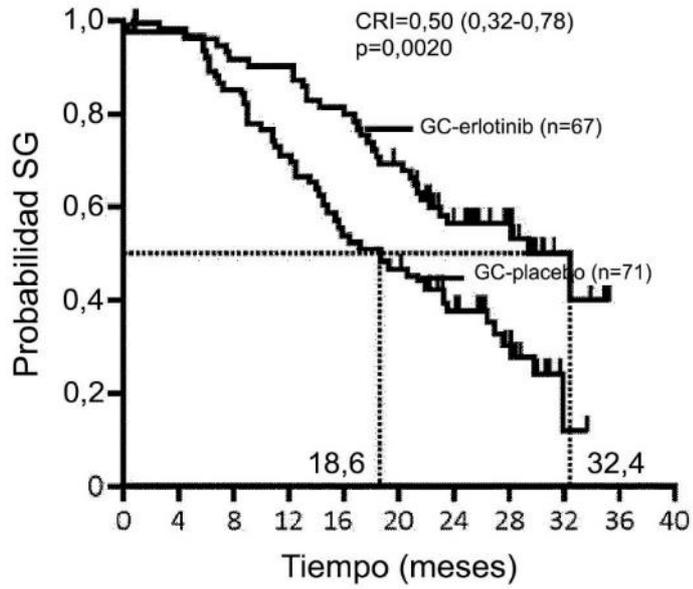
A.



E	69	45	15	7	5	3	2	1	0	0	0
P	67	46	16	5	3	2	1	1	1	1	0

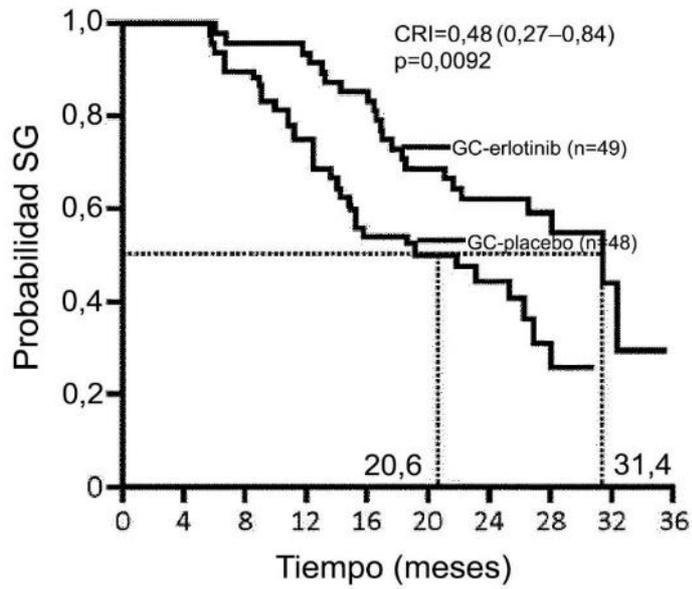
B.

Figura 23



E	67	65	61	60	53	45	30	20	5	0	-
P	71	69	60	50	38	33	22	12	1	0	-

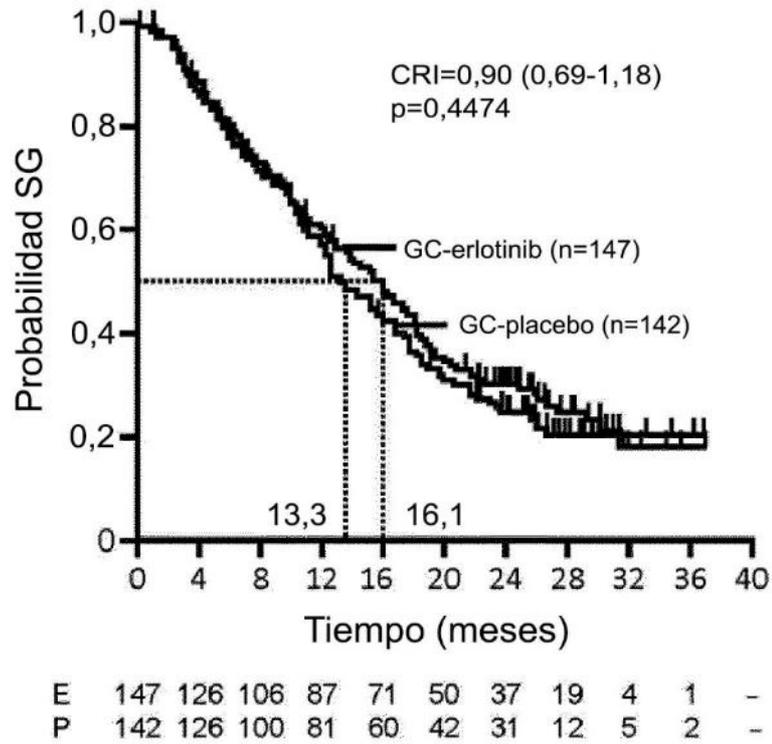
A.



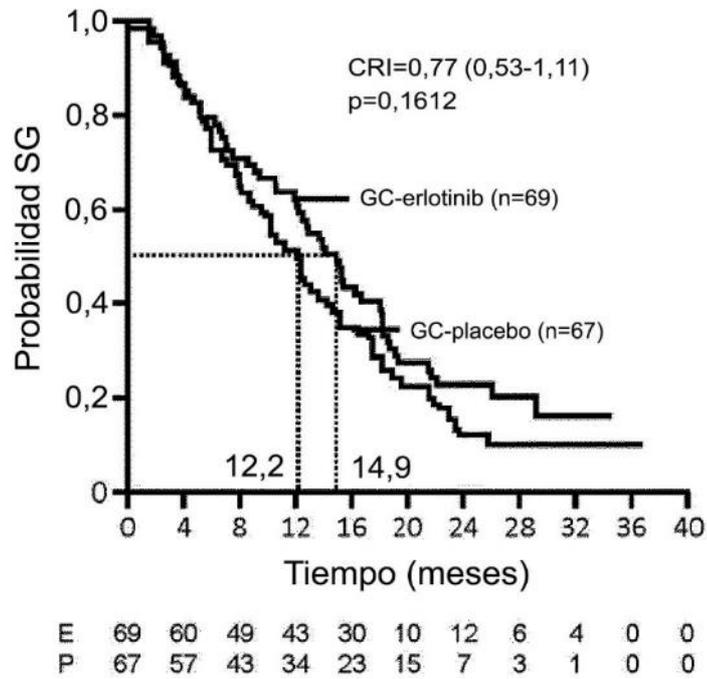
E	49	48	46	45	41	33	24	15	3	0
P	48	48	43	36	26	24	14	6	0	0

B.

Figura 24

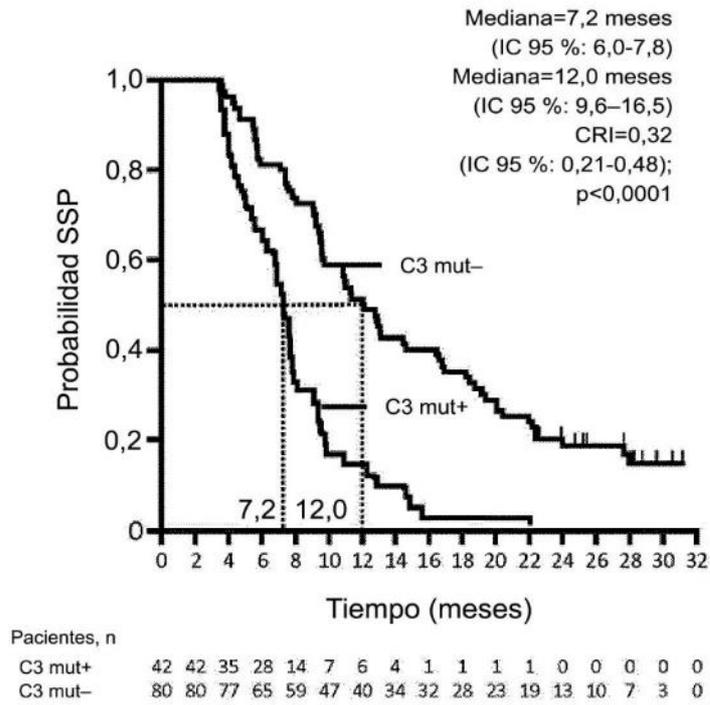


A.

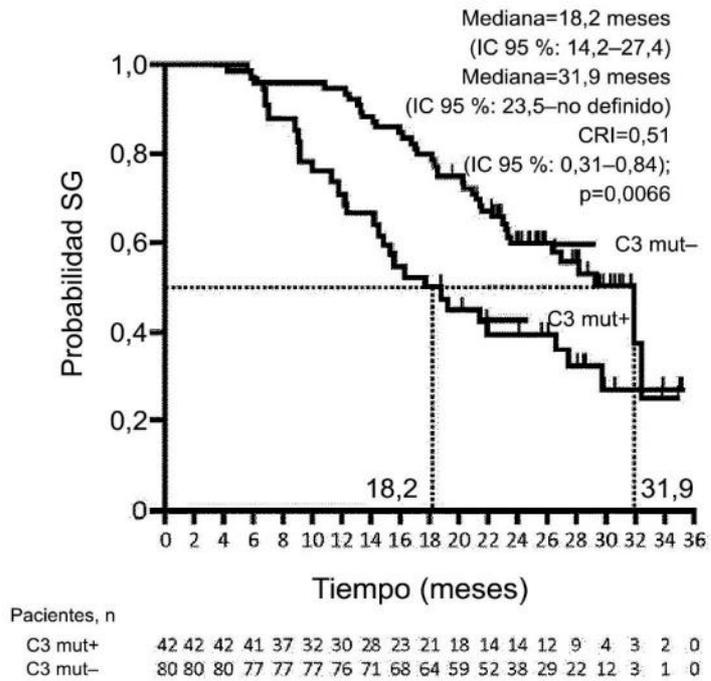


B.

Figura 25

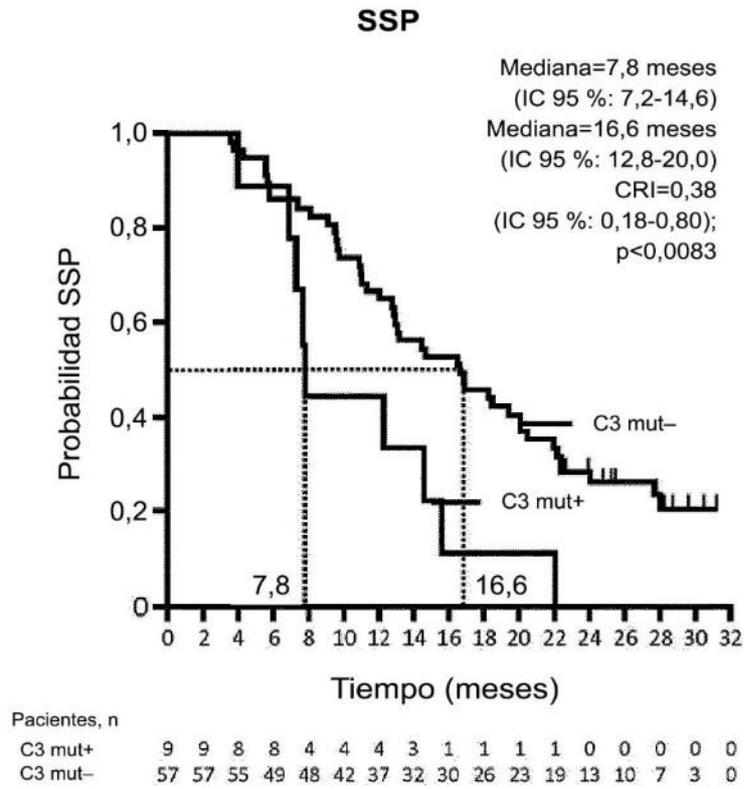


A.

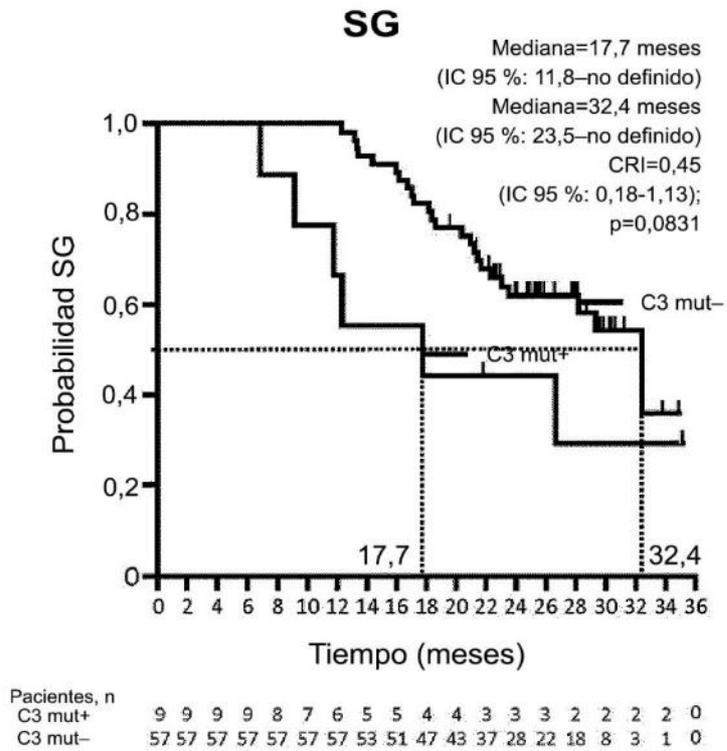


B.

Figura 26



A.



B.

Figura 27