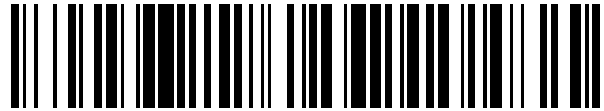


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 423**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2015 PCT/GR2015/000036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020710**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2015 E 15753745 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3198026**

54 Título: **Método para determinar el estado mutacional de PIK3CA en una muestra**

30 Prioridad:

**07.08.2014 US 201462034231 P**

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

**03.06.2020**

73 Titular/es:

**PHARMASSIST LTD (100.0%)  
Anthrakorichon 15  
142 35 Nea Ionia, Athens, GR**

72 Inventor/es:

**LIANIDOU, EVRYKLEIA y  
MARKOU, ATHINA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 764 423 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para determinar el estado mutacional de PIK3CA en una muestra

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un método altamente sensible para determinar el estado mutacional de *PIK3CA* en una muestra de ADN, por ejemplo, de células tumorales circulantes (CTC), ADN libre circulante (cfADN) en plasma/suero y tejidos inmersos en parafina fijados con formalina (FFPE).

**Antecedentes de la invención**

10 La detección y enumeración de células tumorales circulantes (CTC) puede actuar como una "biopsia líquida" y un marcador temprano de respuesta a una terapia sistémica, mientras que su caracterización molecular tiene un fuerte potencial para ser utilizada en tratamientos dirigidos individualizados y para evitar someter a los pacientes oncológicos a terapias innecesarias e ineficaces.

15 Se ha demostrado que la detección de una o más CTC en 7,5 ml de sangre antes de la quimioterapia adyuvante puede predecir con precisión la supervivencia global (SG). Se ha asociado la detección persistente de CTC durante los primeros cinco años de seguimiento con un mayor riesgo de recidiva tardía de la enfermedad y muerte e indica la presencia de una enfermedad residual resistente a la terapia hormonal y a la quimioterapia. Un reciente estudio clínico prospectivo ha confirmado que la presencia de una o más CTC predice una recurrencia temprana y una menor supervivencia global (SG).

20 En el cáncer de mama metastásico (CMM), las CTC representan un factor de pronóstico independiente para la supervivencia libre de progresión (SLP) y la SG, y el ensayo de enumeración de CTC (sistema CellSearch™, Veridex) ha sido autorizado por la FDA para el cáncer de mama, próstata y colorrectal metastásico. Un mayor número de CTC antes del segundo ciclo de terapia ha constituido un marcador predictivo temprano de una mala SLP y SG, y se puede utilizar para controlar el beneficio del tratamiento, mientras la disminución de CTC durante el tratamiento es mayor con una terapia dirigida. La detección de CTC en pacientes con CMM antes de la terapia de primera línea pudo definir un subgrupo de pacientes con mal resultado clínico.

25 Actualmente se ha establecido que el ADN libre circulante (cfADN) es liberado hacia la circulación por células que sufren apoptosis u otros acontecimientos fisiológicos inducidos por estrés microambiental y puede ser identificado en las muestras sanguíneas de pacientes con cáncer. Sin embargo, por medio de la longitud de los fragmentos de cfADN producidos (integridad del ADN), se puede distinguir el origen apoptótico o necrótico de la fuente del cfADN. La expresión "ADN tumoral circulante (ctADN)" se refiere esencialmente a un subtipo de cfADN total derivado del tumor.  
30 Muchos estudios han demostrado que tanto el ctADN como las CTC están presentes en el plasma/suero y en la sangre periférica de los pacientes oncológicos no solo en estadios avanzados sino también en estadios tempranos.

35 Aunque hay muchos kits de extracción de cfADN comercialmente disponibles, su eficiencia y rendimiento siguen siendo bajos debido a la pérdida de material inicial durante la extracción, y su cuantificación es variable debido a la falta de estandarización. Aún así, la eficiencia de la extracción de cfDNA puede afectar directamente al resultado de la detección de mutaciones, es decir, a la sensibilidad del ensayo.

40 Las fosfoinositida 3-quinasas (PI3Ks) comprenden una familia de lípido quinazas, descubiertas en los ochenta, que son responsables de mediar en funciones biológicas importantes como la supervivencia, la diferenciación y la proliferación celular. La vía de señalización de las fosfatidilinositol 3-quinazas (PI3K)/AKT está implicada en enfermedades humanas como el cáncer, y entender la complejidad de esta vía puede proporcionar nuevas opciones para la intervención terapéutica. Las mutaciones somáticas en la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de PI3K son muy frecuentes en muchos tipos de cánceres sólidos como el de mama, colorrectal, próstata, ovario, cervical, cabeza y cuello, esófago, pulmón, cerebro, piel, hígado, páncreas, gástrico o de tiroides y desempeñan un papel crucial en la respuesta a las terapias dirigidas moleculares y frecuentemente cohabitan con la amplificación del *HER-2* en el cáncer de mama. Se han observado mutaciones de *PIK3CA* en 18 %–40 % de las pacientes con cáncer de mama, mientras  
45 que en la gran mayoría, aproximadamente el 90 % de los casos, se agrupan en dos regiones de puntos calientes del exón 9 y del exón 20.

50 La importancia clínica de detectar mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en una muestra de ADN de CTC, cfADN o tejidos FFPE es muy importante, puesto que la presencia de mutaciones *PIK3CA* está asociada a la resistencia farmacológica en terapias dirigidas. El problema es que las mutaciones aparecen en cantidades muy bajas en las muestras tumorales clínicas y los límites de detección de las metodologías actuales son muy bajos, lo que puede llevar a falsos negativos con su posible impacto en el diagnóstico clínico y tratamiento del paciente.

55 Se ha demostrado que el análisis de ctADN es una herramienta útil para valorar la progresión tumoral y para evaluar el pronóstico, el diagnóstico y la respuesta al tratamiento. Muchos estudios han confirmado la utilidad clínica del ctADN y se han desarrollado muchas tecnologías para aumentar la sensibilidad analítica de las metodologías utilizadas para este fin. Janku *et al.*, con el método de transmisión, han demostrado que la proporción de concordancia entre tejidos y plasma para las mutaciones de *PIK3CA* en ambos exones era del 91 % [Janku F., *et al.*, Actionable mutations in

plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies, *Oncotarget*, 2015, 6:12809-128021]. En otro estudio, se observó mediante el ensayo PCR digital (dPCR) que el porcentaje de mutaciones de *PIK3CA* en ctADN era del 22,7 % en pacientes con cáncer de mama [Oshiro C., *et al.*, *PIK3CA* mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, 150:299-307].

5 El documento EP2505672 A1 describe un kit que incluye un polinucleótido y un método para detectar la presencia o ausencia de mutaciones de *PIK3CA*. El documento WO 2013/026027 A1 proporciona compuestos, métodos y un kit para detectar la presencia y/o el nivel de variantes alélicas poco frecuentes en muestras que incluyen abundantes variantes alélicas con alta sensibilidad y/o especificidad. El documento WO 2011/131151 A1 describe un chip líquido para detectar las mutaciones de *PIK3CA*. El documento CN102533958 (A) describe un método para detectar las mutaciones de *PIK3CA*, basado en la combinación de la tecnología de amplificación de PCR convencional, la tecnología de enriquecimiento del producto por amplificación isotérmica de PCR y la tecnología de análisis de curva de fusión de alta resolución. El documento WO 2012/131092 A2 describe un método para la detección del estado mutacional de los genes *BRAF*, *KRAS* y *PIK3CA* a fin de predecir la respuesta de un paciente humano al tratamiento anti-EGFR. El documento WO 2012/075231 A1 describe la amplificación y la detección de un variante o variantes poco frecuentes de una secuencia de ADN en un variante abundante de la secuencia, como la detección de mutaciones somáticas de nivel bajo y alelos minoritarios en un exceso de secuencias diana de ácidos nucleicos normales. Zhou Luming *et al.*, "Rare allele enrichment and detection by allele-specific PCR, competitive probe blocking, and melting analysis", *Biotechniques*, Informa Healthcare, US, vol. 50, n.º 5, 1 de mayo de 2011, pp. 311-318 informa sobre el desarrollo de un método para detectar la mutación *BRAF* V600E basada en la combinación de PCR específica del alelo, sonda de bloqueo competitiva, PCR asimétrica y análisis de fusión para mejorar la detección de alelos poco frecuentes en un sistema homogéneo. El documento WO 2012/095378 proporciona un método de detección del estado mutacional de los genes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* y *AKT1*, prediciendo la susceptibilidad a determinadas terapias tumorales. El documento EP 2377933 A1 presenta un chip líquido para la detección de mutaciones de *PIK3CA* basado en sondas, proporcionando sugerencias para el tratamiento clínico. Schneck *et al.*, "Analysing the mutational status of *PIK3CA* in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients", *Molecular Oncology*, vol. 7, n.º 5, pp. 976-986 describe el análisis de mutaciones de *PIK3CA* en CTC de pacientes con cáncer de mama metastásico, utilizando la metodología SNaPshot que incluye la amplificación de PCR y la extensión con cebadores de nucleótidos individuales. El documento WO 2012/151560 A2 describe un método para detectar los variantes de ácido nucleico en una secuencia de ácido nucleico diana y métodos para la amplificación de secuencia de alta fidelidad. El documento WO 2009/019008 A1 presenta métodos y composiciones para la amplificación de una secuencia polinucleótida diana al suprimir la amplificación de secuencias no diana, usando una polimerasa sin actividad de exonucleasa 5'-3' y un oligonucleótido bloqueante no extensible.

Por este motivo, se ha desarrollado un método novedoso para mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA*, caracterizado por una sensibilidad extrema (0,05 %) y una alta especificidad (100 %) [Markou A., *et al.*, *PIK3CA* mutational status in circulating tumor cells can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 15 de noviembre de 2014, 20(22):5823-5834]. Este ensayo ofrece muchas ventajas: puede detectar cantidades muy bajas de alelos mutantes con mutaciones de *PIK3CA* en presencia de un exceso de alelos de tipo salvaje. Además, mediante el método desarrollado, se pueden detectar mutaciones de *PIK3CA* en ADN aislado de CTC en un porcentaje mucho más alto tanto en pacientes con estadio inicial de cáncer de mama (20,3 %) como en pacientes con metástasis confirmada clínicamente (35,1%) que lo detectado anteriormente.

Por este motivo, se ha desarrollado y validado una metodología ultrasensible y altamente específica para la detección de mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* (exones 9 y 20) en CTC, basada en la combinación de cebado específico de alelos, sonda de bloqueo competitiva de amplificación del tipo salvaje, PCR asimétrica, y análisis de fusión de sonda [Markou A., *et al.*, *PIK3CA* mutational status in circulating tumor cells can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, 15 de noviembre de 2014, 20(22):5823-5834]. Los datos también sugieren que el estado mutacional de *PIK3CA* puede cambiar durante la recurrencia o progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama y que la presencia de mutaciones de *PIK3CA* en CTC está asociada a una peor supervivencia en pacientes con metástasis confirmada clínicamente [Markou A., *et al.*, *PIK3CA* mutational status in CTCs can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, 15 de noviembre de 2014, 20(22):5823-5834].

## Sumario

Un objeto consiste en proporcionar un método mejorado de determinación del estado mutacional de *PIK3CA* en una muestra, por ejemplo, de CTC.

Este objeto se logra parcial o totalmente por un método según la reivindicación 1. Las realizaciones y demás detalles del invento se exponen en las reivindicaciones dependientes anexas, en los gráficos y en el listado de secuencias.

De este modo, el método se refiere a la determinación de la presencia de un alelo *PIK3CA* en una muestra, es decir, un alelo de *PIK3CA* conteniendo una mutación o mutaciones, tales como una mutación o mutaciones en un punto caliente en una muestra. La muestra puede ser, por ejemplo, de CTC, pero el método también puede ser utilizado en cualquier otro tipo de muestra biológica, por ejemplo, en ADN libre en plasma/suero o tejidos FFPE en tumores sólidos. La detección de mutación o mutaciones de *PIK3CA* puede ser utilizada para determinar muchos tipos de cánceres,

incluidos cánceres de colon, mama, cerebro, tiroides, páncreas, próstata, cabeza y cuello, ovario, cervical, hígado, estómago, esófago, piel y pulmón. El método es especialmente ventajoso a la hora de determinar los riesgos de desarrollar cáncer cuando puedan existir mutaciones de *PIK3CA*, como por ejemplo, durante el diagnóstico precoz del cáncer de mama.

5 El método de la invención se basa en una estrategia descrita por primera vez para mutaciones de *BRAF* por L. Zhou *et al.* [Zhou L, *et al.*, Rare allele enrichment and detection by allele-specific PCR, competitive probe blocking, and melting analysis, *BioTechniques*, 2011, 50:311–318]. Usando la estrategia básica de este método, se diseñaron cebadores y sondas de novo y se comprobaron todas las condiciones experimentales a fin de detectar mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en una muestra de CTC. Los aspectos del análisis de fusión y las sondas no marcadas  
10 fueron autorizados desde la Universidad de Utah a IDAHO technology.

El método de la invención puede mejorar la detección de alelos poco frecuentes en un sistema homogéneo. El método incluye una reacción en cadena de polimerasa (PCR) específica de alelo y asimétrica utilizando una sonda de bloqueo competitiva y un análisis de fusión. El método necesita un cebador específico de alelos mutantes complementario con el extremo-3' (tres prima) de la primera hebra del ADN del alelo mutante diana para ser amplificado y una sonda de  
15 bloqueo no marcada (sonda competitiva), que es un oligonucleótido complementario con la secuencia de tipo salvaje de la primera hebra correspondiente del ADN de tipo salvaje y exactamente en la posición donde está presente la mutación que se va a detectar. Además, el método incluye un cebador común complementario con el extremo-3' de la segunda hebra del ADN diana que va a ser amplificado por la PCR.

El método de la invención para determinar la presencia de un alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra, por ejemplo, de CTC incluye por lo tanto las siguientes etapas:

- realizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) específica de alelo y asimétrica, y
- realizar un análisis de fusión del ADN producido en la PCR,

La PCR se lleva a cabo mediante:

- un cebador específico de alelo mutante complementario con el extremo-3' (tres prima) de una primera hebra del ADN del alelo mutante diana para amplificar,  
25
- una sonda de bloqueo no marcada que es un oligonucleótido complementario con la secuencia de tipo salvaje de una primera hebra del ADN de tipo salvaje correspondiente a la primera hebra del alelo mutante y en la posición correspondiente donde se encuentra la mutación que se va a detectar, y dicha sonda está bloqueada para actuar como cebador para la síntesis de ADN en la reacción de PCR; y
- un cebador común complementario con el extremo-3' de la segunda hebra del ADN diana que va a ser amplificado por la PCR.  
30

El análisis de fusión se lleva a cabo mediante:

- una sonda de fusión no marcada que es un oligonucleótido que incluye una secuencia complementaria a la secuencia del alelo de tipo salvaje y que se solapa con una secuencia del alelo mutante; y
- un componente detectable para medir la temperatura de fusión de los componentes de ADN de doble hebra que al menos incluye el componente de doble hebra de la sonda de fusión unida a una hebra del alelo mutante amplificado o una hebra del alelo de tipo salvaje, en el que la temperatura de fusión difiere entre el componente de hebra doble de la sonda de fusión unida a la hebra del alelo mutante amplificado y la sonda de fusión unida a la hebra del alelo de tipo salvaje amplificado.  
35

40 Por lo tanto se utiliza una PCR específica de alelo para enriquecer en alelos poco frecuentes. La PCR específica de alelo necesita un primer cebador, siendo el cebador específico del alelo mutante (inverso o directo) diseñado para ser completamente específico para el alelo mutado deseado y su extremo-3' está diseñado para estar exactamente en el sitio de mutación que debería ser detectada. También se utiliza un segundo cebador que es el cebador común (directo o inverso), cuyo cebador se une a la hebra complementaria a la que se une el primer cebador y que se puede utilizar  
45 para amplificar tanto el alelo de hebra mutante como el de tipo salvaje. De esta manera, los otros alelos presentes en una muestra, por ejemplo, el de tipo salvaje, no coinciden y se limita la amplificación no específica. Aunque al utilizar únicamente un cebador específico de alelo mutante, esta inhibición no se completa al 100 % en todos los casos descritos hasta el momento, puesto que el tipo salvaje está presente normalmente en una concentración en exceso.

Por lo tanto, el método incluye el uso de sonda de bloqueo competitiva, en el que se utiliza una sonda de bloqueo no  
50 marcada. La sonda de bloqueo no marcada (sonda competitiva) es un oligonucleótido complementario con la secuencia de tipo salvaje exactamente en la posición donde está la mutación que se va a detectar. Esta sonda de bloqueo no marcada está bloqueada en su extremo-3' para usar como un cebador en la PCR, por ejemplo, está bloqueada al tener un grupo fosfato adicional en su extremo-3' en comparación con los cebadores normales para la PCR. Esta sonda de bloqueo no marcada se utiliza para el bloqueo competitivo del alelo de tipo salvaje y se añade a

una concentración más alta que el cebador específico de alelo mutante, por ejemplo, una concentración de 5 a 20 veces o 10 veces mayor del cebador específico de alelo. Hay un solapamiento en las secuencias del cebador específico de alelo mutante y la sonda de bloqueo no marcada, y cuando tanto el cebador específico de alelo mutante como este cebador de bloqueo no marcado están presentes (de tipo salvaje y mutante), la sonda de bloqueo no marcada se hibrida con el tipo salvaje, y el cebador específico de alelo mutante al alelo mutante. De este modo, la sonda de bloqueo no marcada compite con el cebador específico de alelo por una mayor sensibilidad, puesto que está diseñada para coincidir con el tipo salvaje y así unirse exactamente al alelo de tipo salvaje. La sonda de bloqueo no marcada puede ser diseñada para que las correspondientes mutaciones en puntos calientes estén colocadas lo más cerca posible del centro de la sonda de bloqueo no marcada. De esta manera, se puede reducir al mínimo la amplificación no específica del tipo salvaje. El enriquecimiento en un alelo poco frecuente es óptimo con un exceso de sonda de bloqueo y el cebador inverso en comparación con el cebador específico de alelo.

La PCR asimétrica incluye la PCR específica de alelo, en la que el cebador específico de alelo mutante se añade en una concentración más baja (por ejemplo, 10 veces más baja) con respecto a un cebador común. De esta manera, este cebador específico de alelo mutante es utilizado totalmente en la PCR solo por el alelo mutante presente en concentraciones muy bajas. Ante un alelo mutante y después de algunos ciclos de PCR se utiliza totalmente el cebador específico de alelo mutante, y la hebra que incluye la información de la mutación es producida en exceso, puesto que se utiliza como un molde constante para el otro cebador que es común para ambos alelos y la amplificación del alelo de tipo salvaje es limitada por el uso del cebador específico de alelo mutante y la sonda de bloqueo no marcada. Los productos de PCR de hebra única contienen la información de la mutación. Después de PCR, estos están en exceso y la sonda reconoce el exceso y que no son totalmente complementarios, por lo que la curva de fusión tiene lugar a una temperatura más baja.

El análisis de fusión sigue a la reacción de PCR e incluye una etapa de aumentar la temperatura desde una temperatura que es más baja que la temperatura de fusión de interés a una temperatura superior a la temperatura de fusión de interés, y detectar la temperatura de fusión de ADN de doble hebra.

El análisis de fusión incluye el uso de una sonda de fusión no marcada que es un oligonucleótido que incluye una secuencia complementaria con una secuencia de alelo de tipo salvaje y que se solapa con una secuencia del alelo mutante, preferiblemente alrededor de la posición de la mutación. La sonda de fusión (sonda de bloqueo no marcada) puede incluir entonces una secuencia que se solapa con la secuencia del cebador específico de alelo mutante. La sonda de fusión proporciona una diferente temperatura de fusión para su unión al alelo mutante en comparación con su unión al alelo de tipo salvaje. La sonda de fusión también puede ser, como también se ejemplifica en la presente, la sonda de bloqueo no marcada. La temperatura de fusión de la sonda de bloqueo no marcada del alelo mutante es más baja que la temperatura de fusión de la sonda de bloqueo no marcada del alelo de tipo salvaje. La sonda de bloqueo no marcada se añade a una concentración muy alta, y se utiliza principalmente en la reacción para bloquear la secuencia de tipo salvaje, en la que el cebador específico de alelo mutante no podrá unirse no específicamente al tipo salvaje y proporcionar productos PCR no específicos. Además, esta misma sonda de bloqueo no marcada está reconociendo las hebras individuales que contienen la información de la mutación así como las hebras individuales de tipo salvaje descritas anteriormente. Como resultado, las curvas de fusión resultantes son como firmas específicas para el alelo bajo la sonda.

La medición de la temperatura de fusión entre la sonda de fusión y la primera hebra complementaria del producto de la PCR asimétrica puede ser realizada mediante el uso de una técnica de detección fluorescente, en la que se utiliza un tinte fluorescente. En una realización, el tinte fluorescente es un tinte que emite fluorescencia solo en presencia de ADN de doble hebra en la muestra medida. El tinte puede ser LC-Green Plus. Al medir la emisión de fluorescencia del ADN de doble hebra y el tinte fluorescente LC-Green Plus, se derivan las curvas de fusión, características del alelo mutante, puesto que la temperatura de fusión de la secuencia de ADN mutante es más baja que la de la secuencia de tipo salvaje. El método puede incluir aumentar la temperatura después del final de la reacción PCR; cuando todos los productos son de doble hebra y emiten fluorescencia al 100 %. Entonces se aumenta la temperatura gradualmente, y la fluorescencia empieza a disminuir cuando la temperatura alcanza la característica de la secuencia del ADN, es decir, la Tf. Tf es la temperatura en la que el 50 % del ADN es de doble hebra y el otro 50 % es de hebra individual.

El análisis de fusión que emplea el tinte puede, por ejemplo, incluir las etapas de 55 a 60 °C para la asociación durante 10 s y 95 °C durante 1 minuto, cuando la temperatura aumenta gradualmente en incrementos de 0,2 °C/s (tasa de pendiente), empezando por la temperatura de 55 a 60 °C y midiendo la temperatura de fusión mediante la detección del tinte (etapa de recogida de datos).

El ADN del alelo mutante diana que se va a amplificar en la reacción de PCR puede comprender o consistir en el exón 9 (SEQ NO ID:1) y/o del exón 20 (SEQ ID NO:2) de *PIK3CA* y la secuencia del cebador específico de alelo mutante es complementaria a una hebra de ADN del exón 9 (SEQ NO ID:1) o del exón 20 (SEQ NO ID:2).

La sonda de fusión puede ser la sonda de bloqueo no marcada. La sonda de bloqueo no marcada puede tener un extremo-3' modificado por un grupo fosfato añadidos en comparación con un cebador de la PCR para la amplificación. Esto bloqueará el uso de la sonda de bloqueo no marcada como un cebador de PCR para la síntesis de una hebra de ADN. Opcionalmente, la sonda de bloqueo no marcada podrá ser modificada con uno o más restos no fluorescentes, incluyendo sin limitar ligandos de unión al surco menor no fluorescentes, biotina, espaciadores, conectores, fosfatos,

análogos de base, bases no naturales y similares.

Como se ha mencionado anteriormente, el componente detectable puede incluir un componente fluorescente y el análisis de fusión puede incluir la detección del componente fluorescente. El componente fluorescente puede ser un tinte fluorescente, como un tinte fluorescente del grupo que consiste en LC-Green Plus o SYBR Green I que emite fluorescencia solo en presencia del ADN de doble hebra en la muestra.

La sonda de bloqueo no marcada se añade a una concentración más alta que el cebador específico de alelo mutante en la reacción a fin de bloquear la amplificación de la secuencia de alelo de tipo salvaje. La sonda no marcada se une preferiblemente al ADN de tipo salvaje y compite con la unión del cebador. Al mismo tiempo, la concentración más baja del cebador específico de alelo mutante lleva a extender únicamente la secuencia del alelo mutante. De este modo, la concentración de la sonda de bloqueo debería ser más alta que el cebador mutante para unirse al exceso de los alelos de tipo salvaje. Además, las diferentes concentraciones entre el cebador específico de alelo mutante y el cebador común llevan a producir la hebra que incluye la información de la mutación en exceso para aumentar la sensibilidad del método.

La mutación puede estar presente en el exón 9 (SEQ NO ID:1) de *PIK3CA*, en el que el cebador específico de alelo mutante comprende o consiste en la secuencia 5'-TTTCTCCTGATI-3' (SEQ ID NO:3), en la que I indica el sitio de la mutación y A indica un desapareamiento adicional que inhibe la amplificación de la secuencia del alelo de tipo salvaje, a fin de aumentar la amplificación únicamente de los alelos poco frecuentes mutantes y mejorar la especificidad del método. La secuencia del cebador específico de alelo mutante puede comprender preferiblemente o ser 5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATI-3' (SEQ ID NO:4).

La sonda de bloqueo no marcada puede componerse o consistir en la secuencia 5'-CTGATCAGTGA-3' (SEQ ID NO:5), en la que C indica la posición exacta donde la secuencia es complementaria con el sitio de tipo salvaje, y un componente de bloqueo de PCR, que impide que la sonda de bloqueo no marcada actúe como un cebador para la síntesis de ADN en la reacción de PCR. La secuencia de la sonda de bloqueo no marcada preferiblemente puede comprender o ser 5'-CTTTCTCCTGATCAGTGATTTCAGAG -P-3' (SEQ ID NO:6), en la que P es fosfato que actúa como el componente de bloqueo de PCR.

El cebador común puede tener entre 75 % y 100 % de identidad con la secuencia 5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3' (SEQ ID NO:7). Esto significa que un cebador común puede tener al menos 75 %, o al menos 80 %, o al menos 85 % o al menos 90 % de identidad, tal como 75-100 %, 76-100 %, 77-100 %, 78-100 %, 79-100 %, 80-100 %, 81-100 %, 82-100 %, 83-100 %, 84-100 %, 85-100 %, 86-100 %, 87-100 %, 89-100 %, 90-100 %, 91-100 %, 92-100 %, 93-100 %, 94-100 %, 95-100 %, 96-100 %, 97-100 %, 98-100 %, 99-100 % o 100 % de identidad, con la secuencia de ácido nucleico 5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3' (SEQ ID NO:7).

La mutación también puede estar presente en el exón 20 (SEQ ID NO:2) de *PIK3CA*, en el que el cebador específico de alelo mutante comprende o consiste en la secuencia 5'-AATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:8), y G indica el sitio de la mutación. La secuencia del cebador específico de alelo mutante preferiblemente puede comprender o ser 5'-ATGAAACAAATGAATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:9).

La sonda de bloqueo no marcada puede componerse o constar de una secuencia 5'-TGCACATCATG-3' (SEQ ID NO:10), en la que A indica la posición exacta donde la secuencia es complementaria con un sitio de tipo salvaje, y un componente de bloqueo PCR, que impide que la sonda de bloqueo no marcada actúe como un cebador para la síntesis de ADN en la reacción de PCR. La secuencia de la sonda de bloqueo no marcada preferiblemente puede comprender o ser 5'-GAATGATGCACATCATGGTGG-P-3' (SEQ ID NO:11), en la que P es fosfato que actúa como el componente de bloqueo de PCR.

El cebador común puede tener entre 75 % y 100 % de identidad con la secuencia 5'-TCTCAGTTATCTTTTTCAGTTCAATGC-3' (SEQ ID NO:12). Esto significa que un cebador común puede tener al menos 75 %, o al menos 80 %, o al menos 85 % o al menos 90 % de identidad, como 75-100 %, 76-100 %, 77-100 %, 78-100 %, 79-100 %, 80-100 %, 81-100 %, 82-100 %, 83-100 %, 84-100 %, 85-100 %, 86-100 %, 87-100 %, 89-100 %, 90-100 %, 91-100 %, 92-100 %, 93-100 %, 94-100 %, 95-100 %, 96-100 %, 97-100 %, 98-100 %, 99-100 % o 100 % de identidad, con la secuencia de ácido nucleico 5'-TCTCAGTTATCTTTTTCAGTTCAATGC-3' (SEQ ID NO:12).

Este documento también se refiere un método para:

i) diagnosticar una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

ii) predecir la eficacia del tratamiento de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

iii) evaluar el resultado del tratamiento para una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

iv) evaluar la recurrencia de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto

en el que el sujeto es un mamífero con enfermedad neoplásica maligna confirmada o sospechada,

en el que el método mencionado comprende el análisis de la presencia de ADN del alelo mutante de *PIK3CA* en una

muestra según las etapas descritas en la presente.

El método descrito puede ser utilizado de forma ventajosa para detectar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra y:

i) diagnosticar una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

5 ii) predecir la eficacia del tratamiento de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

iii) evaluar el resultado del tratamiento para una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

iv) evaluar la recurrencia de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto

en e lque el sujeto es un mamífero con enfermedad neoplásica maligna confirmada o sospechada,

10 La muestra analizada puede ser una muestra biológica, y dicha muestra biológica puede ser obtenida de un sujeto. Ventajosamente el sujeto es un ser humano.

La enfermedad neoplásica maligna puede ser seleccionada del grupo que incluye cáncer de mama, colon, endometrio, esófago, gástrico, cabeza y cuello, hígado, ovario, tiroides, piel, páncreas, próstata y estómago.

Ventajosamente, la enfermedad neoplásica maligna es cáncer de mama.

15 A la hora de realizar un diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, el método comprende las siguientes etapas:

a) obtener una muestra biológica de un sujeto determinado,

b) realizar el método para analizar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra de ADN obtenida de la muestra biológica mencionada tal y como se describe en la presente,

c) detectar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en la muestra de ADN mencionada; y

20 d) comparar la cantidad de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* detectada en la muestra de ADN mencionada con un control positivo y/o negativo, de esto modo realizando un diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad neoplásica maligna en el sujeto.

25 En otras realizaciones, el control positivo comprende células de una línea celular que porta la mutación. En otras realizaciones, el control negativo comprende células de sujetos sanos que no sufren una enfermedad neoplásica maligna.

A la hora de predecir el resultado del tratamiento en un sujeto que sufre una enfermedad neoplásica maligna o predecir la respuesta al tratamiento, el método comprende las etapas de:

a) obtener una muestra biológica de un sujeto determinado,

30 b) realizar el método para analizar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra de ADN obtenida de la muestra biológica mencionada tal y como se describe en la presente; y

c) detectar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en la muestra de ADN mencionada; y

35 d) comparar la cantidad de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* detectada en dicha muestra de ADN con un control positivo y/o negativo, prediciendo de esta manera el resultado del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en dicho sujeto en función de la presencia detectada de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en la muestra de ADN mencionada.

A la hora de evaluar la eficacia del tratamiento de la enfermedad neoplásica maligna en un sujeto que está siendo tratado por una enfermedad neoplásica maligna, el método comprende las etapas de:

a) obtener una muestra biológica de un sujeto que se está sometiendo a un tratamiento para una enfermedad neoplásica maligna,

40 b) realizar el método para analizar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra de ADN obtenida de la muestra biológica mencionada tal y como se describe en la presente;

c) detectar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en la muestra de ADN mencionada; y

45 d) repetir los pasos a) a c) en uno o más momentos durante el tratamiento de dicho sujeto para una enfermedad neoplásica maligna, en el que un cambio en la presencia relativa de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en dicha muestra de ADN a lo largo del tiempo indica la eficacia del tratamiento.

De este modo, una indicación de la eficacia del tratamiento es un cambio relativo en la disminución de la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en dicha muestra de ADN con relación a una muestra analizada en las etapas de repetir el método.

5 Opcionalmente, se puede realizar una puntuación del ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en dicha muestra de ADN según el sistema de puntuación convencional conocido en la técnica o descrito en la presente.

La muestra puede ser cualquier muestra que pueda comprender una enfermedad neoplásica maligna, preferiblemente una muestra biológica de un sujeto una con enfermedad neoplásica maligna, y este sujeto estará en tratamiento, o estará entre tratamientos, o está recibiendo tratamiento en la actualidad

A la hora de evaluar la recurrencia de una enfermedad neoplásica maligna, el método comprende las etapas de:

- 10 a) obtener una muestra biológica de un sujeto que ha sufrido anteriormente una enfermedad neoplásica maligna,  
 b) detectar la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra de ADN obtenida de la muestra biológica mencionada;  
 c) repetir los pasos a) y b) en uno o más momentos después del tratamiento de dicho sujeto para una enfermedad neoplásica maligna, en el que un cambio en la presencia relativa de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en dicha muestra de ADN a lo largo del tiempo puede indicar la recurrencia de una enfermedad neoplásica maligna.
- 15

De este modo, una indicación de recurrencia es un cambio relativo en el aumento de cantidades de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en dicha muestra de ADN que identifica una enfermedad neoplásica maligna, es decir, un aumento a lo largo del tiempo de la presencia de ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en dicha muestra de ADN con relación a una muestra anterior analizada en las etapas de repetición del método.

20 La invención también se refiere a un polinucleótido para detectar la presencia de una mutación en el exón 9 de *PIK3CA* en una muestra, que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-TTTCTCCTGATT-3' (SEQ ID NO:3), preferiblemente una secuencia comprende o consiste en 5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATT-3' (SEQ ID NO:4), en la que **T** indica el sitio de mutación y **A** indica un desapareamiento adicional. El polinucleótido puede ser utilizado ventajosamente como el cebador específico de alelo mutante para detectar la presencia de una mutación en el exón 9 de *PIK3CA* en el método descrito anteriormente. El polinucleótido puede ser utilizado como un marcador de pronóstico para el cáncer de mama.

25

La invención también se refiere a un polinucleótido para detectar la presencia de una mutación en el exón 20 de *PIK3CA* en una muestra, que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-AATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:8), preferiblemente una secuencia que comprende o consiste en de 5'-ATGAAACAAATGAATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:9), en la que **G** indica el sitio de la mutación. El polinucleótido puede ser utilizado como el cebador específico de alelo mutante para detectar la presencia de una mutación en el exón 20 de *PIK3CA* en el método descrito en la presente. El polinucleótido puede ser utilizado como un marcador de pronóstico para el cáncer de mama.

30

La invención también se refiere a un kit para detectar ADN del alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra, como CTC, ctADN o FFPE. El kit para detectar una mutación en *PIK3CA* en una muestra también se puede utilizar para:

- 35 i) detectar un ADN de alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra biológica, y/o  
 ii) detectar ima enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, o  
 iii) diagnosticar o pronosticar una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o  
 iv) predecir el resultado del tratamiento para una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o  
 v) evaluar la eficacia del tratamiento de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, o  
 40 vi) evaluar la recurrencia de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto;

El kit puede incluir:

- un primer polinucleótido para detectar una mutación en el exón 9 de *PIK3CA* en una muestra. Este primer polinucleótido comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-TTTCTCCTGATT-3' (SEQ ID NO:3), preferiblemente este primer polinucleótido comprende o consiste en 5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATT-3' (SEQ ID NO:4), y/o  
 45 - un segundo polinucleótido para detectar una mutación en el exón 20 de *PIK3CA* en una muestra. Este segundo polinucleótido comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-AATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:8), preferiblemente este segundo polinucleótido comprende o consiste en 5'-ATGAAACAAATGAATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:9). El primer y/o segundo polinucleótido pueden utilizarse como cebadores específicos de alelo mutante en el método descrito anteriormente.
- 50 El kit puede incluir también un tercer polinucleótido que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-



CTGATCAGTGA-3' (SEQ ID NO:5) y un componente de bloqueo PCR, preferiblemente este tercer polinucleótido comprende o es 5'-CTTTCTCCTGATCAGTGATTTTCAGAG-P-3' (SEQ ID NO:6), en el que P es fosfato y A es un desapareamiento adicional, y/o un cuarto polinucleótido que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-TGACATCATG-3' (SEQ ID NO:10) y un componente de bloqueo de PCR, preferiblemente en el que este cuarto polinucleótido comprende o es 5'-GAATGATGCACATCATGGTGG-P-3' (SEQ ID NO:11), en el que P es fosfato. El tercer y/o cuarto polinucleótido pueden ser utilizados como sondas de bloqueo no marcadas en el método descrito anteriormente.

El kit también puede incluir un quinto polinucleótido con una secuencia con 75 % al 100 % de identidad con la secuencia 5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3' (SEQ ID NO:7) y/o un sexto polinucleótido con 75 % a 100 % de identidad con la secuencia 5'-TCTCAGTTATCTTTTCAGTTCAATGC-3' (SEQ ID NO:12). El quinto y/o sexto polinucleótido pueden utilizarse como cebadores comunes en el método descrito anteriormente.

### Descripción breve de las figuras

La figura 1 muestra un diagrama de flujo experimental del estudio actual.

Las figuras 2A-D muestran la especificidad del ensayo desarrollado de mutación de *PIK3CA* para 1633 G>A (A) del exón 9 y para 3140 A>G (B) del exón 20 y la sensibilidad del ensayo desarrollado de mutación de *PIK3CA* para 1633 G>A (C) del exón 9 y para 3140 A>G (D) del exón 20.

Las figuras 3A-D muestran la detección de las mutaciones de *PIK3CA* en CTC en pacientes con cáncer de mama operable para 1633 G>A (A) del exón 9 y para 3140 A>G (B) del exón 20. La detección de mutaciones de *PIK3CA* en CTC en pacientes con metástasis confirmada clínicamente para 1633 G>A (C) del exón 9 y para 3140 A>G (D) del exón 20.

La figura 4 presenta la curva de Kaplan–Meier, que calcula la SG en meses de pacientes con cáncer de mama y metástasis confirmada clínicamente, en relación con el estado mutacional de *PIK3CA* en CTC.

La figura 5 muestra la detección de las mutaciones de *PIK3CA* en ADN libre en pacientes con cáncer de mama metastásico confirmado clínicamente para 1633 G>A (A, B) del exón 9 y para 3140 A>G (C) del exón 20.

La figura 6 presenta el principio del método.

La figura 7 presenta las secuencias de nucleótidos para los exones 9 y 20.

### Definiciones

Se prevé que los términos utilizados en esta invención cumplan en general las definiciones convencionales aceptadas en general por los expertos en la técnica de la biología molecular. Como se enumera abajo, se han definido algunas excepciones dentro del alcance de la presente invención.

"Al menos uno" utilizado en la presente se refiere a uno o más, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.

"Detección", "detectar", "detectando" utilizados en la presente incluyen la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control y se refieren a la identificación de la presencia, ausencia o cantidad de una molécula de ADN de alelo mutante de *PIK3CA*.

Como se ha utilizado en la presente, la expresión "secuencia de ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" y similares, se refiere a una molécula de polinucleótido (ADN – ácido deoxirribonucleico, o ARN – ácido ribonucleico) que comprende una cadena de bases de ácido nucleico. Estas bases de ácido nucleico son "A" (adenina), "T" (timidina)/"U" (uracilo), "C" (citidina) y "G" (guanidina). En el ARN, "T" se sustituye por "U". El ADN o ARN pueden ser de hebra única o doble. Una secuencia de ARN "correspondiente a" una secuencia de ácido nucleico expresada en la presente como una secuencia de ADN significa la misma secuencia de ácido nucleico, pero en la que se ha sustituido "T" por "U" para obtener la secuencia de ARN correspondiente. La expresión "ácido nucleico" puede incluir secuencias de ADN y ARN a menos que se haga referencia específicamente a una u otra.

En la presente en conexión con las moléculas de ácido nucleico (moléculas de ADN y ARN), el término "aislado" significa que la molécula ha sido extraída de su entorno original. Esto significa que una molécula de ácido nucleico cuando está presente en un organismo vivo no está "aislada". Romper los enlaces químicos y/o separar por otros medios la secuencia de su entorno natural significa que la molécula de ácido nucleico está "aislada".

Tal y como se utiliza en la presente, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que, producido sintéticamente, es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis del ácido nucleico cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una hebra de ácido nucleico, es decir, en la presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización como la ADN polimerasa, la transcriptasa reversa o similares, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador es preferiblemente de hebra individual para una máxima eficiencia, aunque como alternativa puede ser de hebra doble. Si es de doble hebra, el cebador es tratado primero para separar sus hebras antes de utilizarse para preparar los productos de extensión. El cebador debe ser

- suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia de los agentes para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluidos la temperatura y la fuente del cebador. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, un cebador suele contener de 15 a 25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos. Las moléculas de cebadore cortos suelen necesitar temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con una molde.
- 5 La expresión "cebador específico de alelo mutante" se refiere a un cebador que se hibridiza a una secuencia de alelo mutante y es capaz de discriminar entre los variantes de la secuencia diana, ya que solo en aquellas con las mutaciones, el cebador es extendido eficientemente por la polimerasa de ácido nucleico en las condiciones adecuadas. Con otros variantes de la secuencia diana, la extensión es menos eficiente o ineficiente.
- 10 El término "cebador directo" se refiere a un cebador que forma un producto de extensión uniéndose en la dirección de 5' a 3' al extremo-3' de una hebra de un analito de ADN desnaturalizado.
- El término "cebador inverso" se refiere a un cebador que forma un producto de extensión uniéndose en la dirección de 3' a 5' al extremo-5' de una hebra de un analito de ADN desnaturalizado.
- El término "amplicon" se refiere al producto de amplificación de un ensayo de extensión de ácido nucleico, como PCR.
- 15 El término "sonda no marcada" se refiere a un oligonucleótido que no está enlazado covalentemente a un tinte y que está configurado para hibridarse total o parcialmente a una secuencia diana. El tinte que está presente en la mezcla puede unirse o disociarse de la sonda no marcada, especialmente cuando la sonda se hibridiza y funde de la secuencia diana.
- 20 El término "sonda de bloqueo" o "sonda competitiva" se refiere a un oligonucleótido complementario a una secuencia de alelo de tipo salvaje y compite con el cebador específico de alelo mutante a fin de evitar la amplificación de productos de tipo salvaje no específicos.
- 25 En la presente, el término "temperatura de fusión" (T<sub>f</sub>) en relación con un oligonucleótido se define como la temperatura en la que el 50 % del ADN forma una doble hélice estable y el otro 50 % se ha separado en moléculas de hebra individual. Como saben los expertos en la técnica, la temperatura de asociación sde PCR suele ser unos grados más baja que la T<sub>f</sub>, la cual se calcula en base a las concentraciones de oligos y sal en la reacción.
- 30 Los términos "complementario" o "complementariedad" se utilizan en referencia a hebras antiparalelas de polinucleótidos relacionadas por las normas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los términos "perfectamente complementario" o "100 % complementario" se refieren a secuencias complementarias que presentan un apareamiento de Watson-Crick de todas las bases entre las hebras antiparalelas, es decir, no hay desapareamientos entre dos bases cualquiera en el dúplex del polinucleótido. Sin embargo, los dúplex se forman entre hebras antiparalelas incluso en ausencia de una complementariedad perfecta. Las expresiones "parcialmente complementario" o "incompletamente complementario" se refieren a cualquier alineamiento de bases entre las hebras polinucleotídicas antiparalelas que es menos que 100 % perfecto (por ejemplo, existe al menos un desapareamiento o base no apareada en el dúplex del polinucleótido). Los dúplex entre hebras parcialmente complementarias suelen ser menos estables que los dúplex entre hebras perfectamente complementarias.
- 35 Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan indistintamente. "Oligonucleótido" es un término utilizado en ocasiones para describir un polinucleótido más corto.
- 40 Los términos "hibridizado" e "hibridización" se refieren a las interacciones de apareamiento de bases entre dos ácidos nucleicos que resultan en la formación de un dúplex. No es un requisito que dos ácidos nucleicos tengan 100 % de complementariedad en toda su longitud para lograr la hibridización.
- "Variante del mismo" o "variantes del mismo" y similares, como se utilizan en la presente, se refieren a una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que presentan una identidad con una secuencia de ácido nucleico especificado de al menos 85 % o al menos 90 %, como 85-100 %, 86-100 %, 87-100 %, 89-100 %, 90-100 %, 91-100 %, 92-100 %, 93-100 %, 94-100 %, 95-100 %, 96-100 %, 97-100 %, 98-100 %, 99-100 % o aproximadamente 100 %.
- 45 La PCR (reacción en cadena de polimerasa) es un método para la amplificación de moléculas de ácido nucleico. La reacción de PCR es bien conocida por los expertos en la técnica y conlleva el contacto de una muestra con un par de los llamados "cebadores de oligonucleótidos" (un cebador directo y otro inverso) en condiciones que permiten la hibridización entre los cebadores y una secuencia diana (molde) con complementariedad con los cebadores, en el que dicha secuencia diana está presente posiblemente en la muestra a fin de amplificar la secuencia diana.
- 50 "Diagnóstico" se utiliza en el presente documento para englobar la identificación de la naturaleza de una enfermedad.
- "Prognosis" se utiliza en la presente para englobar una previsión del resultado probable de una enfermedad, las perspectivas de recuperación de una enfermedad según lo indicado por la naturaleza y los síntomas de una enfermedad.
- "Positivos reales" se refiere a la presencia de mutaciones específicas de *PIK3CA* en un neoplasma maligno localizado

o metastásico.

"Falsos negativos" se refiere a la presencia de mutaciones específicas de *PIK3CA* en un neoplasma maligno localizado o metastásico y que no están categorizadas como tales mediante un ensayo de diagnóstico.

5 "Negativos reales" se refiere a aquellos sujetos que no tienen un neoplasma maligno localizado o metastásico y que se categorizan como que sí lo contienen mediante un ensayo diagnóstico.

"Falsos positivos" se refiere a aquellos sujetos que no tienen un neoplasma maligno localizado o metastásico pero que se categorizan mediante un ensayo diagnóstico convencional como que tienen un neoplasma maligno localizado o metastásico.

10 Dependiendo del contexto, la expresión "falsos positivos" también se refiere a aquellos sujetos que no tienen un neoplasma maligno pero que se categorizan mediante un ensayo de diagnóstico como que presentan neoplasma maligno o enfermedad no maligna.

15 "Sensibilidad", tal y como se usa en la presente dentro del contexto de su aplicación en los ensayos de diagnóstico, se refiere a la proporción de todos los sujetos con neoplasma maligno localizado o metastásico que son identificados correctamente (es decir, el número de positivos reales dividido entre la suma del número de positivos reales y falsos negativos).

"Especificidad" de un ensayo diagnóstico, tal y como se usa en la presente dentro del contexto de su aplicación a los ensayos de diagnóstico, se refiere a la proporción de todos los sujetos con neoplasma maligno localizado o metastásico que son identificados correctamente (es decir, el número de negativos reales dividido entre la suma del número de negativos reales y falsos positivos).

20 Los términos "neoplasma" o "tumor" se pueden utilizar indistintamente y se refieren a una masa anormal de tejido donde el crecimiento de la masa se sobrepasa y no está coordinado con el crecimiento del tejido normal. Un neoplasma o tumor puede definirse como "benigno" o "maligno" dependiendo de las siguientes características: grado de diferenciación celular incluida la morfología y la funcionalidad, tasa de crecimiento, invasión local y metástasis. Un neoplasma "benigno" suele estar bien diferenciado, tiene un crecimiento característicamente más lento que un  
25 neoplasma maligno y permanece localizado en el lugar de origen. Además un neoplasma benigno no tiene la capacidad de infiltrar, invadir o metastatizarse hacia lugares distantes.

30 Un neoplasma "maligno" suele estar poco diferenciado (anaplasia), tiene un crecimiento característicamente rápido acompañado por la infiltración, la invasión y la destrucción progresiva de los tejidos circundantes. Además, un neoplasma maligno tiene la capacidad de metastatizar hacia lugares distantes. El término "metástasis" se refiere a la difusión o migración de células cancerígenas desde un tumor primario (original) hacia otro órgano o tejido, y suele ser identificable por la presencia de un "tumor secundario" o "masa de células secundarias" del tipo de tejido del tumor primario (original) y no del órgano o tejido donde se localiza el tumor secundario (metastásico). Por ejemplo, un carcinoma de pulmón que ha migrado al hueso se considera cáncer de pulmón metastatizado, y consiste en células cancerosas que se han originado a partir de células pulmonares epiteliales que crecen en tejido óseo.

35 "Sano" se refiere a un sujeto con buena salud. Dicho sujeto demuestra la ausencia de cualquier enfermedad maligna o no maligna. En el contexto de esta solicitud, un "individuo sano" solo está sano en cuanto a que hay ausencia de cualquier enfermedad maligna o no maligna; un "individuo sano" puede tener otras enfermedades o trastornos que normalmente no se considerarían "sanas".

40 "Sujeto" se utiliza en la presente para incluir a seres humanos, primates no humanos como chimpancés y otros simios y especies de monos, animales de granja como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos, mamíferos domésticos como perros y gatos, animales de laboratorio incluyendo roedores como ratones, ratas, cobayas, y similares. El término no denota una edad o sexo específico. De este modo, se pretende incluir sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, tanto masculinos como femeninos. En realizaciones preferidas, el sujeto es un mamífero, incluidos seres humanos y mamíferos no humanos. En la realización predilecta, el sujeto es un ser humano.

45 "Plasma sanguíneo" o "plasma" es el componente líquido de la sangre que es de color pajizo/amarillo pálido y normalmente contiene a las células sanguíneas de la sangre completa en suspensión. Representa aproximadamente 55 % del volumen total de la sangre completa. Es la parte de fluido intravascular de fluido extracelular (todo el fluido corporal fuera de las células). Principalmente es agua (93 % en volumen), y contiene proteínas disueltas que incluyen albuminas, inmunoglobulinas y fibrinógeno, glucosa, factores de coagulación, electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Me}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  etc.), hormonas y dióxido de carbono.  
50

Tal y como se utiliza en la presente, una "muestra biológica" engloba una variedad de tipos de muestras obtenidas de cualquier sujeto con o sin neoplasma maligno. Un sujeto típico es un ser humano. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen muestras obtenidas de un tejido o de fluidos corporales recogidos de un individuo sospechoso de padecer neoplasma maligno.

55 El término "tratamiento" utilizado en la presente se define como la gestión de un paciente a través de medios médicos

o quirúrgicos. El tratamiento mejora o alivia al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno médico y se requiere que proporcione una cura. Las expresiones "resultado terapéutico" o "resultado del tratamiento", tal como se emplean la presente, son el efecto físico del tratamiento en el paciente.

5 Tal y como se utiliza en la presente, la expresión "células tumorales circulantes (CTC)" son células que se han desprendido de un tumor primario hacia la vasculatura y circulan en el torrente sanguíneo. Por tanto, las CTC constituyen semillas para el consiguiente crecimiento de tumores adicionales (metástasis) en órganos vitales distantes, desencadenando un mecanismo que es responsable de la gran mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer.

10 La expresión "ADN libre circulante (cfADN)" se refiere al ADN que es liberado hacia la circulación desde células que sufren apoptosis u otros acontecimientos fisiológicos inducidos por estrés microambiental. El cfADN puede detectarse en la sangre de los pacientes con cáncer.

La expresión "ADN tumoral circulante (ctADN)" se refiere al ADN liberado hacia la circulación desde células del tumor principal y proporciona información sobre el estado del tumor principal o el tumor metastásico.

15 Tal como se utiliza en la presente, el término *PIK3CA* se refiere al nombre oficial del gen llamado "fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa". La vía de señalización de las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3K)/AKT está implicada en enfermedades humanas como el cáncer, y comprender la complejidad de esta vía puede proporcionar nuevas opciones para la intervención terapéutica. Las mutaciones somáticas en la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de PI3K son muy frecuentes, y desempeñan un papel crucial en respuesta a las terapias dirigidas moleculares y suelen aparecer simultáneamente con la amplificación de *HER-2* en el cáncer de mama. Se han descrito mutaciones de *PIK3CA* en 18 %–40 % de pacientes con cáncer de mama, mientras que en la mayoría, aproximadamente el 90 % de los casos, se agrupan en dos regiones de puntos calientes en el exón 9 y el exón 20, que codifican los dominios de hélice y quinasa, respectivamente. La activación aberrante de la vía de PI3K se correlaciona con una respuesta disminuida a las terapias dirigidas a *HER2*, puesto que el resultado en los pacientes con *HER2*-positivo tratados con trastuzumab es significativamente peor en pacientes con mutaciones en *PIK3CA* en comparación con tumores de tipo salvaje.

25 La expresión "ADN del alelo mutante" se refiere a la secuencia de ADN que incluye al menos una mutación entre dos exones en el gen *PIK3CA* según la secuencia de referencia. El ADN de alelo mutante podría tener la mutación en un punto caliente 1633G>A en el exón 9 o la mutación en un punto caliente 3140A>G en el exón 20.

30 La mutación es una alteración permanente en la secuencia de ADN que compone un gen, de modo que la secuencia se diferencia de lo encontrado en una secuencia de referencia. Las mutaciones varían en tamaño; pueden afectar desde a un único bloque de construcción del ADN (par de bases) hasta un segmento grande de un cromosoma que incluye múltiples genes.

35 Tal como se utiliza en la presente, la expresión "genoma de referencia" o "secuencia de referencia" se refiere a cualquier secuencia de genoma particular conocida, tanto parcial como completa, de cualquier organismo o virus que pueda ser utilizada para referenciar secuencias identificadas de un sujeto. Por ejemplo, se puede encontrar un genoma de referencia utilizado para sujetos humanos, así como muchos otros organismos en el National Center for Biotechnology Information en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Un "genoma" se refiere a la información genética completa de un organismo o virus, expresada en secuencias de ácido nucleico.

40 La expresión "hebra de alelo de tipo salvaje" se refiere a la secuencia de ADN que codifica el fenotipo más habitual en una población natural específica. Originalmente, el tipo salvaje se conceptualizó como un producto del alelo "normal" convencional en un locus, por contraste al producto de un alelo "mutante" no convencional.

La expresión término "mutación en puntos calientes" se refiere a las mutaciones que tienen lugar en una región cromosómica que es más susceptible de sufrir daños/cambios genéticos que las secuencias normales.

### Descripción detallada

45 La presente invención proporciona un método molecular ultrasensible y altamente específico para la detección de mutaciones de alta capacidad de procesamiento de mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en una muestra, por ejemplo, de células tumorales circulantes o ADN tumoral circulante. La importancia de las mutaciones de *PIK3CA* se asocia a la respuesta a terapias dirigidas moleculares en el cáncer de mama.

### Materiales y métodos

#### *Pacientes*

50 Como grupo de capacitación, se analizaron un total de 78 muestras: i) 63 muestras de sangre periférica; 37 de pacientes con metástasis clínicamente confirmada y 26 de voluntarias sanas, utilizadas para definir la especificidad del ensayo, y ii) 15 tejidos de tumor de mama primario (FFPE). Como un grupo independiente, se obtuvieron un total de 175 muestras de sangre periférica de 118 pacientes con cáncer de mama operable y 57 pacientes con metástasis clínicamente confirmada; además, para 76 de estas pacientes con cáncer de mama (32 con metástasis y 44 con

cáncer de mama operable), también se analizaron FFPE del tumor principal. Para 157 de estas muestras, también había información disponible sobre la expresión de *CK-19* en la fracción de CTC EpCAM-positiva en estudios anteriores. En el grupo independiente de los 118 pacientes con cáncer de mama operable, 9 pacientes recayeron y fallecieron debido a la progresión de la enfermedad (mediana de seguimiento: 42 meses). Además, las pacientes con tumores *HER2+* recibieron trastuzumab durante 12 meses, mientras que las pacientes con tumores *HR+* recibieron tratamiento endocrino (análogos LH/RH más tamoxifeno o inhibidores de la aromatasas). También se administró radioterapia adyuvante conforme con las directrices. Todos los participantes en el estudio firmaron un formulario de consentimiento informado para participar en el estudio, el cual fue autorizado por los comités científicos y éticos de las instituciones.

#### 10 Selección inmunomagnética positiva de CTC

Se aislaron CTC de 20 ml de sangre periférica como se ha descrito anteriormente [Strati A, *et al.*, Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR, BMC Cancer, 2011, 11:422]. Más específicamente, después de la dilución de sangre periférica con 20 ml de PBS (pH = 7,3), se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC) por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque TM PLUS (GE Healthcare, Bio-Science AB) a 670 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaron las células de la interfase, se lavaron dos veces con 40 ml de PBS estéril (pH = 7,3, 4 °C) a 530 g durante 10 minutos, y se suspendieron de nuevo en 10 ml de PBS. Las células se tiñeron con azul de tripano y se contabilizaron en un hemocitómetro. Se utilizaron perlas (Dynabeads Epithelial Enrich, Invitrogen) de captura revestidas con Ber-EP4 [anti-molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM)] inmunomagnéticas para enriquecer en células epiteliales.

#### 20 Extracción de ADN de CTC

El ADN genómico (ADNg) se extrajo de CTC como se ha descrito anteriormente [Chimonidou M., *et al.*, DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells, Clin. Chem., 2011, 57:1169-1177]. Después de la eliminación de la fase acuosa de Trizol, se precipitó el ADN (de la interfase) añadiendo 150 µl de etanol al 100 %. Las muestras se mezclaron por inversión y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2-3 minutos, y después se sedimentó el ADN por centrifugación (2000 g, 5 min, 4 °C) y se lavaron dos veces en una solución con citrato de sodio 0,1 mol/l en etanol al 10 % (500 µl). Después de cada lavado, el sedimento de ADN se almacenó en la solución de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente con un mezclado periódico y se centrifugaron (2000 g, 5 minutos, 4 °C). Después de estos dos lavados, el sedimento de ADN se suspendió en 1 ml de etanol al 75 %, se mantuvieron durante 10-20 minutos a temperatura ambiente con un mezclado periódico y se centrifugaron (2000 g, 5 minutos, 4 °C). Entonces se secó el ADNg al aire durante 15 minutos y se disolvió en 50 µl de NaOH 8 mmol/l. La concentración de ADN se determinó en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. La sangre periférica recogida de 26 voluntarias sanas para los estudios de especificidad se procesó utilizando exactamente el mismo procedimiento que el utilizado para las muestras de pacientes.

#### Extracción de ADN de plasma

El ADN libre células se aisló de las muestras de plasma utilizando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. En primer lugar, las muestras de sangre periférica en EDTA se usaron dentro durante 1 hora para el aislamiento en el plasma, y las muestras de plasma se almacenaron a -70 °C hasta el aislamiento del cfADN. Justo antes del aislamiento del cfADN, las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13 400 g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar los componentes celulares precipitados residuales. En total, se mezclaron 2,00 ml de plasma con 1,6 ml de solución tampón ACL (que contenía 1,0 µg de ARN portador) de disolución de trabajo y 200 µl de proteinasa K (18 mg ml<sup>-1</sup>) y se incubó durante 30 minutos a 60 °C. Entonces se procesó el aislamiento del ADN como se describe en el protocolo del fabricante.

#### Diseños del cebador y de la sonda

Todos los oligonucleótidos fueron diseñados de novo *in-silico* para el exón 9 *PIK3CA* (SEQ ID NO:1) y el exón 20 (SEQ ID NO:2), utilizando el software PrimerPremier 5 (Premier Biosoft International), y fueron sintetizados por IDT (Intergraded DNA Technologies). Véase la figura 7 para las secuencias para el exón 9 (SEQ ID NO:1) y el exón 20 (SEQ ID NO:2). Para cada exón, se diseñaron un cebador específico de alelo (apareado con la mutación 1633 G>A para el exón 9 y con la mutación 3140 A>G para el exón 20), una sonda de bloqueo competitiva no marcada, y un cebador para la amplificación asimétrica según el estudio de Zhou y sus colegas [Zhou L., *et al.*, Rare allele enrichment and detection by allele-specific PCR, competitive probe blocking, and melting analysis, BioTechniques, 2011, 50:311–318]. Para el exón 9, se diseñó el conjunto de cebadores S1 para amplificar la región (70 pb) que incluye la mutación en un punto caliente del exón 9. Se diseñó el cebador inverso (cebador específico de alelo) para amplificar el alelo mutante mediante el apareamiento del extremo 30 con el alelo derivado. La sonda no marcada y los cebadores directos fueron diseñados para aparearse con el tipo salvaje. La sonda de bloqueo compite con el cebador específico de alelo para una mayor sensibilidad. Para el exón 20, se diseñó el conjunto de cebadores S2 para amplificar la región (104 pb) que incluye la mutación en un punto caliente del exón 20. El cebador directo (cebador específico de alelo) fue diseñado para amplificar el alelo mutante mediante el apareamiento del extremo 30 con el alelo derivado. La sonda no marcada y los cebadores inversos fueron diseñados para aparearse con el tipo salvaje. Las mutaciones en puntos calientes se colocaron lo más cerca posible del centro de la sonda no marcada. Todos los cebadores y las sondas

fueron diseñados con cuidado para evitar la amplificación de un pseudogén en el cromosoma 22 que tiene más del 95 % de homología con el exón 9 de *PIK3CA*. Todas las secuencias de cebadores y sondas se indican en detalle en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de cebadores y sondas diseñadas y utilizadas en este estudio

<b>Exón 9 (mutación 1633 G&gt;A)</b>	
<b>Cebador inverso (cebador específico de alelo mutante)</b>	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGAT <u>I</u> -3' (SEQ ID NO:4), <b>S1</b>
<b>Cebador directo (cebador común)</b>	5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3' (SEQ ID NO:7), <b>S1</b>
<b>Sonda de bloqueo no marcada</b>	5'-CTTTCTCCTGAT <u>C</u> AGTGATTTTCAGAG-P-3' (SEQ ID NO:6), <b>S1</b>
<b>Exón 20 (mutación 3140 A&gt;G)</b>	
<b>Cebador directo (cebador específico de alelo mutante)</b>	5'-ATGAAACAAATGAATGATGCAC <u>G</u> -3' (SEQ ID NO:9), <b>S2</b>
<b>Cebador inverso (cebador común)</b>	5'-TCTCAGTTATCTTTTCAGTTCAATGC-3' (SEQ ID NO:12), <b>S2</b>
<b>Sonda no marcada</b>	5'-GAATGATGCACAT <u>C</u> ATGGTGG-P-3' (SEQ ID NO:11), <b>S2</b>

5

#### PCR y análisis de fusión

La PCR en tiempo real y las curvas de fusión fueron obtenidas mediante el LightScanner 32 (Idaho Technology, EE. UU.) utilizando tubos capilares de vidrio (Roche Applied Science, Alemania). Sin embargo, también se pueden obtener los mismos resultados utilizando el instrumento LightCycler 2.0 (IVD) y LightCycler 480 (Roche Diagnostics). El LC-Green Plus (Idaho Technology, EE. UU.) se utilizó para las mediciones de fluorescencia. Se utilizaron dos muestras de ADNg aisladas de las líneas de células de cáncer de mama de MCF-7 (c.1633G>A: E545K; heterocigótico), y T47D (c.3140A>G: H1047R; heterocigótico) como controles mutantes de *PIK3CA*. En la tabla 2 se describen las condiciones de la PCR y los protocolos de análisis de fusión para cada exón. La mezcla de reacción de PCR para cada exón se describe en detalle en la tabla 3.

15

Tabla 2: Condiciones de PCR y protocolos de análisis de fusión para cada exón de *PIK3CA*

	<b>Exón 9 (1633 G&gt;A)</b>	<b>Exón 20 (3140 A&gt;G)</b>
<b>Condiciones de PCR</b> <b>80 ciclos</b>	95°C/2 min	95°C/2 min
	95°C/0 s	95°C/5 s
	61°C/4 s	63°C/5 s
		72°C/3 s
<b>Curva de fusión</b> <b>Condiciones</b>	60°C/10 s	55°C/10 s
	95°C/1 min	95°C/1 min
	405°C/1 min	40°C/1 min

Tabla 3: Mezcla de reacción de PCR para la detección de mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en el exón 9 y en el exón 20

<b>Reactivos</b>	<b>Exón 9 (mutación 1633 G&gt;A)</b>			<b>Exón 20 (mutación 3140 A&gt;G)</b>		
	<b>Conc. inicial</b>	<b>V (µl)</b>	<b>Conc. final</b>	<b>Conc. inicial</b>	<b>V (µl)</b>	<b>Conc. final</b>
Cebador directo	10 µM	0,5	0,5 µM	1 µM	1,0	0,1 µM
Cebador inverso	1 µM	0,5	0,05 µM	10 µM	1,0	1,0 µM
Sonda no marcada	10 µM	0,5	0,5 µM	10 µM	1,0	1,0 µM
dNTP	10 mM	0,2	0,2 mM	10 mM	0,2	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,0	2,5 mM	25 mM	0,8	2,0 mM

BSA	10 µg/µl	0,5	0,5 µg/µl	10 µg/µl	0,5	0,5 µg/µl
Tampón de PCR	5X	2,0	1X	5X	2,0	1X
Polimerasa Taq	5 U/µl	0,1	0,05 U/µl	5 U/µl	0,1	0,05 U/µl
LC Green I	10X	1,0	1X	10X	1,0	1X
H <sub>2</sub> O	-	1,7	-	-	1,4	-
ADNg	25 ng/µl	2,0	5,0 ng/µl	50 ng/µl	1,0	5,0 ng/µl

#### Análisis estadístico

Se evaluaron las correlaciones entre el estado mutacional de *PIK3CA* en CTC y los tumores primarios utilizando el ensayo de la Chi-cuadrado. Se utilizó el coeficiente kappa de Cohen, una medida estadística de la concordancia entre evaluadores o la concordancia entre anotadores para elementos cualitativos, para la evaluación de la concordancia entre las mutaciones de *PIK3CA* en CTC y tumores primarios, así como entre las mutaciones de *PIK3CA* en CTC y la expresión de ARNm de *CK-19* puesto que se considera que es en general una medición más sólida que el simple cálculo del porcentaje de concordancia, ya que *k* tiene en cuenta la concordancia que aparece por casualidad. Se calculan las curvas de intervalo libre de enfermedad (ILE) y supervivencia global (SG) utilizando el método de Kaplan–Meier y se realizan comparaciones utilizando el ensayo de rangos logarítmicos. Los valores de *P* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando la versión 19.0 de SPSS Windows (SPSS, Chicago, IL).

Ejemplo 1: Desarrollo y validación de un método ultrasensible y altamente específico para mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA*

El diagrama de flujo del experimento del estudio se representa en la figura 1.

Inicialmente, se desarrolló y validó una metodología ultrasensible y altamente específica para mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* (exones 9 y 20) en CTC. Este ensayo se realizó en el formato de un tubo cerrado y se basa en la combinación del cebado específico de alelo, el bloqueo de sonda competitiva de la amplificación de tipo salvaje, una PCR asimétrica y el análisis de fusión de sonda [Markou A., *et al.*, *PIK3CA* mutational status in circulating tumor cells can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, 15 de noviembre de 2014, 20(22):5823-5834]. En este diseño de ensayo, se han mejorado la sensibilidad y especificidad de la PCR específica de alelo con una sonda de bloqueo específica de tipo salvaje competitiva no marcada para la amplificación asimétrica y el análisis de fusión de sonda. El pico del análisis de fusión de esta sonda competitiva no marcada a 60 °C pudo indicar la presencia de mutaciones de *PIK3CA* en ambos exones. El pico de la curva de fusión derivada de la sonda de bloqueo no marcada y el molde de ADN del exón 9 de *PIK3CA* de tipo salvaje, amplificado con el cebador específico de alelo de tipo salvaje, y el pico de la curva de fusión de la sonda de bloqueo no marcada y el molde de ADN del exón 9 del *PIK3CA* mutante, amplificado con el cebador específico de alelo mutante, difieren aproximadamente 4 °C en ambos casos (resultados no mostrados). En todos los experimentos, dirigidos al alelo mutante, se detectó la mutación por la fusión derivativa de esta sonda de bloqueo no marcada y la secuencia de *PIK3CA* mutante, amplificada con el cebador específico de alelo mutante. De este modo, una mutación solo se detecta si existe este pico en esta temperatura más baja de 60 °C. El otro pico debido al producto de PCR y que puede ser detectado a temperaturas más altas puede observarse para el mutante y el tipo salvaje, en el caso de que se produzca una amplificación no específica del tipo salvaje, al utilizar el cebador específico de alelo mutante. Todos los cebadores y las sondas fueron diseñados de-novo *in-silico* para cada uno de los exones 9 y 20 de *PIK3CA*, con cuidado de evitar la amplificación de un pseudogén en el cromosoma 22 que tiene más del 95 % de homología con el exón 9 de *PIK3CA*.

*Optimización del protocolo.* El ensayo de mutación de *PIK3CA* fue optimizado extensamente para ambos exones en una serie de experimentos, utilizando como controles positivos y negativos muestras de ADN de líneas celulares de cáncer (MCF-7 y T47D) y ADN de tipo salvaje aislado de donantes sanos, con respecto a: temperatura de asociación de PCR, concentración de Mg<sup>2+</sup>, concentración de cebador y sonda no marcada, número de ciclos de PCR, duración de cada etapa de la PCR asimétrica, proporción de cebador para la PCR asimétrica a la cantidad de ADN diana, y condiciones de análisis de fusión (datos no mostrados).

Para desarrollar un método altamente específico con un límite de detección bajo para la detección de mutaciones de *PIK3CA* en CTC, el protocolo y las condiciones fueron inicialmente optimizados según los mejores resultados. Se realizaron la amplificación y detección con PCR específica de alelo utilizando una PCR asimétrica, una sonda de bloqueo de tipo salvaje y el análisis de fusión de sonda. El enriquecimiento en alelos poco frecuentes fue óptimo con un exceso de sonda de bloqueo y el cebador común, en comparación con el cebador específico de alelo. Se observó que a medida que la concentración del cebador específico de alelo mutante disminuía, la especificidad aumentaba, mientras que la eficacia de la PCR disminuía. El aumento de especificidad se reflejó en el  $\Delta Cq$  entre el ADN de *PIK3CA* y de tipo salvaje. Se demostró la disminución de la eficacia de la PCR por un aumento en el  $Cq$  del ADN de *PIK3CA*. Aunque la eficacia de la PCR se vio afectada al disminuir las concentraciones de cualquiera de los cebadores, solo las concentraciones más bajas del cebador específico de alelo mutante aumentaron la especificidad. A fin de

compensar la eficacia más baja de la PCR, se realizaron normalmente 80 ciclos.

El enriquecimiento específico de alelo con una sonda de bloqueo se ve afectado por la temperatura de asociación/extensión. La especificidad es óptima cuando la temperatura de asociación/extensión está entre las temperaturas de fusión ( $T_f$ ) de la sonda de bloqueo de tipo salvaje para el alelo de tipo salvaje apareador y el alelo de mutación no apareado. Si la temperatura de asociación es menor o igual que la  $T_f$  del alelo mutante, la sonda suprime la amplificación de los alelos de tipo salvaje y mutantes, limitando la sensibilidad. Si la temperatura de asociación es mayor o igual que la  $T_f$  del alelo de tipo salvaje, el bloqueo preferencial y la eficiencia de la PCR disminuyen limitando la sensibilidad.

#### Ejemplo 2: Estudio de especificidad

La especificidad del ensayo del método desarrollado fue evaluada primero analizando el ADN<sub>g</sub> aislado de 26 voluntarias sanas, exactamente de la misma manera que en pacientes con cáncer de mama. El método desarrollado es altamente específico, puesto que no ha habido ningún caso de donante sana con alguna mutación en ambos exones de *PIK3CA* en ninguna de estas muestras. Las figuras 2A y B muestran la especificidad del ensayo de mutación de *PIK3CA* desarrollado y muestran las curvas de fusión derivadas características obtenidas después de una PCR en la presencia de sondas de bloqueo no marcadas que detectan la mutación en un punto caliente (A) 1633G>A del exón 9 y la mutación en un punto caliente (B) 3140A>G del exón 20. La línea de base es el control negativo de la PCR. Se detectaron mutaciones de *PIK3CA* mediante la fusión derivada de la sonda de bloqueo no marcada y la secuencia de *PIK3CA* mutante, amplificada con el cebador específico de alelo mutante. Las mutaciones se detectan solo si está presente este pico a 60 °C. El otro pico a temperaturas más altas se debe al producto de la PCR y puede observarse tanto para el mutante como para el tipo salvaje, en el caso de que se haya producido una amplificación no específica del tipo salvaje, al utilizar el cebador específico de alelo mutante.

Como se puede ver en la figura 2a, en el exón 9, se amplificó uno de los ADN<sub>g</sub> (N18) de donante sana mediante el cebador específico de PCR del sistema de mutación refractaria a la amplificación (ARMS) y se obtuvo un pico a 77,5 °C, pero no a 60,0 °C. Esto podría explicarse por el hecho de que incluso utilizando los cebadores específicos para la mutación en puntos calientes de *PIK3CA*, se pudo amplificar de forma no específica una cantidad muy baja de la secuencia de tipo salvaje que está presente en concentraciones muy altas. Para evitar esto, se utilizó la sonda no marcada que desempeña un papel clave como bloqueante, ya que es específica del tipo salvaje y se une a la misma secuencia que el cebador específico de mutante. En el caso de N18, esta secuencia de tipo salvaje fue amplificada de forma no específica y por esto se detectó el pico de la curva de fusión a 77,5 °C. Sin embargo, no se detectó ningún pico en la curva de fusión para la sonda no marcada a 60,0 °C, lo cual indica específicamente la presencia de la mutación específica que se está buscando. Estos resultados confirman el 100 % de la especificidad del método.

#### Ejemplo 3: Estudio de sensibilidad

La sensibilidad del método desarrollado se evaluó más a fondo mezclando ADN<sub>g</sub> mutado procedente de líneas celulares, con ADN<sub>g</sub> de tipo salvaje a unas proporciones del 50 %, 25 %, 12,5 %, 2,5 %, 1,25 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, y 0,05 % (véase la figura 2C para la mutación en un punto caliente 1633G>A del exón 9 y la figura 2D para la mutación en un punto caliente 3140A>G del exón 20). Las muestras de ADN<sub>g</sub> de tipo salvaje que se utilizaron para diluciones fueron seleccionadas para coincidir con la cantidad, calidad y el ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) del ADN<sub>g</sub> mutado, para minimizar el sesgo de PCR. Se generaron curvas de fusión y se evaluó la capacidad para discriminar las transiciones de fusión de las diluciones de las líneas celulares de las de la muestra de tipo salvaje. Para el exón 9, fue posible discriminar claramente una dilución correspondiente al 0,05 % de la línea celular MCF-7 (figura 2C), mientras que para el exón 20 también pudo discriminarse una proporción del 0,05 % de la dilución de línea celular T47D (figura 2D). Las curvas de fusión fueron altamente reproducibles.

Para ambos exones, se detectaron mutaciones de *PIK3CA* por la fusión derivada de la sonda de bloqueo no marcada y la secuencia de *PIK3CA* mutante, amplificada con el cebador específico de alelo mutante. Las mutaciones se detectan solo si está presente este pico a 60 °C. El otro pico a temperaturas más altas se debe al producto de la PCR y puede observarse tanto para el mutante como para el tipo salvaje, en el caso de que se haya producido una amplificación no específica del tipo salvaje, al utilizar el cebador específico de alelo mutante.

Especialmente, para obtener información fiable para la caracterización molecular de CTC, es extremadamente importante la sensibilidad, la especificidad y la solidez de los sistemas de detección de mutaciones. Se ha desarrollado un método muy sensible para las mutaciones de *PIK3CA*, basado en HRMA [Vorkas P.A., *et al.*, *PIK3CA* hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method, *J. Mol. Diagn.*, 2010, 12:697–704]. A pesar del hecho de que este método es mucho más sensible (1 %) que la secuenciación de Sanger tradicional, cuando este ensayo se aplica a muestras de CTC, falla la detección de mutaciones en CTC.

Ejemplo 4: Detección de mutaciones de *PIK3CA* en CTC EpCAM-positivas de pacientes de cáncer de mama con metástasis clínicamente confirmada y tejidos primarios (FFPE)

Como un grupo de capacitación, se analizaron 37 muestras de sangre periférica de pacientes con metástasis clínicamente confirmada y 15 tejidos de tumor de mama primario (FFPE) para mutaciones de *PIK3CA*. Se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 6/37 pacientes (16,2 %) para el exón 9 y 4/37 pacientes (10,8 %) para el exón 20, en las



fracciones de CTC EpCAM-positivas. En total, se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 10/37 (27,0 %) pacientes con cáncer de mama metastásico. En los tejidos de tumor de mama primario, se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 9/15 (60,0 %) para el exón 9 y 7/15 (46,7 %) para el exón 20. Hubo seis casos en los que se detectaron ambas mutaciones en puntos calientes en la misma muestra de FFPE; en total, se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 10/15 (66,7 %) muestras de FFPE.

Ejemplo 5: Grupo independiente

Después se evaluó el ensayo en un grupo independiente de 118 pacientes con cáncer de mama operable y 57 pacientes con metástasis clínicamente confirmada. Para 76 de estas pacientes con cáncer de mama, también estaban disponibles FFPE del tumor primario.

*Detección de mutaciones de PIK3CA en CTC de pacientes con cáncer de mama operable*

En el grupo independiente, se analizaron fracciones de CTC EpCAM-positivas de 118 pacientes con cáncer de mama operable después de que se extirpase el cáncer primario y antes de que se iniciase la quimioterapia adyuvante. Se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 3/118 (2,5 %) para la mutación en un punto caliente 1633G>A (A) del exón 9 (figura 3A) así como en 21/118 (17,8 %) para la mutación en un punto caliente 3140A>G del exón 20 (figura 3b). Hubo un caso donde se detectaron ambas mutaciones en puntos calientes en la muestra de CTC. En total, se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 24/118 (20,3 %) de pacientes de cáncer de mama operable. La línea de base es el control negativo de la PCR.

*Detección de las mutaciones de PIK3CA en CTC EpCAM-positivas de pacientes de cáncer de mama con metástasis clínicamente confirmada*

En el grupo independiente, se analizaron las fracciones de CTC EpCAM-positivas de 57 pacientes con cáncer de mama metastásico. De estas 57 pacientes, 24 presentaban metástasis ósea, 3 en hígado, 2 en el cerebro, 9 en el pulmón, 3 en hueso e hígado, y 6 en pulmón y hueso y 2 en más de dos sitios diferentes. Se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 8/57 (14,0 %) para la mutación en un punto caliente 1633G>A del exón 9 (figura 3C) y en 12/57 (21,1 %) para la mutación en un punto caliente 3140A>G del exón 20, en las fracciones de CTC EpCAM-positivas (figura 3D). En total, se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 20/57 (35,1 %) en este grupo de pacientes. Los picos a 60 °C en las curvas de fusión en las figuras 3C y 3D indican la presencia de mutaciones del exón 9 y del exón 20, respectivamente. En este contexto, si no se detecta ningún pico a 60 °C, la muestra se considera de tipo salvaje para la mutación examinada. La línea de base es el control negativo de la PCR.

*Detección de mutaciones de PIK3CA en tumores primarios correspondientes*

En el grupo independiente, se comparó el estado mutacional de *PIK3CA* en CTC y los tumores primarios correspondientes en 76 pacientes con cáncer de mama (32 con metástasis clínicamente confirmada y 44 con cáncer de mama operable), ya que estaban también disponibles los FFPE correspondientes (tabla 4).

Tabla 4. Grupo independiente: estado mutacional de *PIK3CA* en CTC y tumores primarios correspondientes (FFPE)

Mutaciones de <i>PIK3CA</i> en tumores primarios (FFPE)		Mutaciones de <i>PIK3CA</i> en el exón 9 de CTC, 1633G>A		Mutaciones de <i>PIK3CA</i> en el exón 20 de CTC, 3140A>G	
<b>Cáncer de mama de estadio temprano (n=44)</b>					
		CTC pos	CTC neg	CTC pos	CTC neg
FFPE	pos	0	21	2	3
	neg	<u>1</u>	<u>22</u>	<u>8</u>	31
Concordancia (%)		22/44=50 %		33/44=75 %	
p		P=0,523		P=0,317	
Coeficiente kappa de Cohen		<b>k=0,045</b>		k=0,136	
<b>Metástasis clínicamente confirmada (n=32)</b>					
		CTC pos	CTC neg	CTC pos	CTC neg
FFPE	pos	4	13	2	6
	neg	<u>1</u>	<u>14</u>	<u>2</u>	22
Concordancia (%)		18/32=56,2 %		24/32=75 %	
p		P=0,208		P=0,254	
Coeficiente kappa de Cohen		k=0,161		k=0,200	

Todos los pacientes (n=76)					
		CTC pos	CTC neg	CTC pos	CTC neg
FFPE	pos	4	34	4	9
	neg	<u>2</u>	36	<u>10</u>	53
Concordancia (%)		40/76=52,6 %		57/76=75 %	
p		P=0,337		P=0,188	
Coeficiente kappa de Cohen		k=0,053		k=0,145	

Exón 9, 1633 G>A. En relación con todas las pacientes, se observó la mutación en un punto caliente 1633G>A del exón en 38/76 (50 %) de las muestras de tumor primario y en 6 de 76 (7,9 %) muestras de la fracción de CTC EpCAM-positivas correspondiente. Para 4 pacientes que presentaban esta mutación en un punto caliente de *PIK3CA* en su tumor primario, también se detectó una mutación idéntica en las CTC. En 34 pacientes, se identificó esta mutación en el tumor primario, pero no en la fracción de CTC EpCAM-positivas, mientras que 36 pacientes dieron negativo en esta mutación tanto en el tumor primario como en las CTC. Sin embargo, en dos casos, esta mutación en un punto caliente se identificó en la fracción de CTC EpCAM-positiva, pero no en el tumor primario correspondiente. En pacientes con cáncer de mama operable, se observó 1633G>A en 21/44 (47,7 %) de FFPE y en 1/44 (2,3 %) muestras correspondientes de CTC; ninguna de las pacientes con esta mutación en un punto caliente de *PIK3CA* en su tumor primario presentaba la mutación idéntica en CTC. En 21 pacientes, se identificó esta mutación en el tumor primario, pero no en las CTC, mientras que 22 pacientes dieron negativo en esta mutación tanto en el tumor primario como en las CTC. Sin embargo, en un caso, esta mutación en un punto caliente se identificó en la fracción de CTC, pero no en el tumor primario correspondiente. En pacientes con metástasis, se observó 1633G>A en 17/32 (53,1 %) de FFPE y en 5/32 (15,6 %) de CTC correspondientes. Para 4 pacientes que presentaban esta mutación en un punto caliente de *PIK3CA* en su tumor primario, también se detectó una mutación idéntica en las CTC. En 13 pacientes, se identificó esta mutación en el tumor primario, pero no en las CTC, mientras que 14 pacientes dieron resultados negativos en esta mutación tanto en el tumor primario como en las CTC. Sin embargo, en un caso, esta mutación en un punto caliente se identificó en la fracción de CTC, pero no en el tumor primario correspondiente.

Exón 20, 3140 A>G. En relación con todos los pacientes, se observó la mutación en un punto caliente 3140 A>G del exón 20 en 13/76 (17,1 %) de FFPE y en 14/76 (18,4 %) de muestras de CTC correspondientes. Para 4 de 13 pacientes que presentaban esta mutación en un punto caliente de *PIK3CA* en su tumor primario, también se detectó una mutación idéntica en la fracción de CTC EpCAM-positivas. En 9 pacientes, se identificó esta mutación en el tumor primario, pero no en CTC, mientras que 53 pacientes dieron resultados negativos en esta mutación tanto en el tumor primario como en las CTC. Es destacable que en 10 pacientes se detectó esta mutación en un punto caliente solo en la fracción de CTC EpCAM-positivas, pero no en el tumor primario correspondiente. En el grupo de pacientes con cáncer de mama operable, se observó 3140 A>G en 5/44 (11,4 %) de FFPE y en 10/44 (22,7 %) de CTC correspondientes. Para 2/5 pacientes que presentaban esta mutación en un punto caliente de *PIK3CA* en su tumor primario, también se detectó una mutación idéntica en las CTC. En 3 pacientes, se identificó esta mutación en el tumor primario, pero no en las CTC, mientras que 31 pacientes dieron resultados negativos en esta mutación tanto en el tumor primario como en las CTC. Sin embargo, en 8 pacientes se detectó esta mutación en un punto caliente solo en CTC, pero no en los correspondientes FFPE. En el grupo de pacientes con metástasis, se observó 3140 A>G en 8/32 (25,0 %) de las muestras del tumor primario y en 4/32 (12,5 %) de las CTC correspondientes. Para 2/8 pacientes que presentaban esta mutación en un punto caliente de *PIK3CA* en su tumor primario, también se detectó una mutación idéntica en las CTC. En 6 pacientes, se identificó esta mutación en el tumor primario, pero no en las CTC, mientras que 22 pacientes dieron resultados negativos en esta mutación tanto en el tumor primario como en las CTC. Sin embargo, en 2 pacientes se detectó esta mutación en un punto caliente solo en CTC, pero no en el tumor primario correspondiente.

No hubo concordancia entre la presencia de estas mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en tumores primarios y las CTC correspondientes, ya que esto se evaluó estadísticamente por separado para pacientes con cáncer de mama verificado operable y metastásico, o para todos las pacientes juntos (véase la tabla 4).

Los resultados sugieren que el estado mutacional de *PIK3CA* en las CTC puede cambiar durante la recurrencia o progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama. Cuando se comparó el estado mutacional de *PIK3CA* en CTC y en los tumores primarios correspondientes en un subgrupo de 76 pacientes, se observó que la misma mutación estaba presente tanto en el tumor primario como en las CTC en una minoría de muestras. En la mayoría de las pacientes, se identificó esta mutación en el tumor primario, pero no en las CTC, mientras que muchas pacientes dieron negativo en esta mutación tanto en el tumor primario como en las CTC. Sin embargo, hubo 12 casos en los que se identificaron mutaciones en puntos calientes en CTC, pero no en el tumor primario correspondiente; en dos pacientes, se observó 1633 G>A en CTC, pero no en los FFPE correspondientes, mientras que en 10 pacientes se observó 3140 A>G en CTC, pero no en el tumor primario correspondiente. Se han recogido resultados similares que reflejan la heterogeneidad de CTC.

Ejemplo 6: Estado mutacional de *PIK3CA* en CTC con respecto a la expresión de ARNm de *CK-19*

En el grupo independiente, se evaluó además si el estado mutacional de *PIK3CA* en CTC se correlaciona con la expresión de ARNm de *CK-19*, en 157 de estos pacientes (57 con metástasis clínica y 100 con cáncer de mama de estadio temprano; tabla 5). La detección de células *CK-19* positivas a ARNm en la sangre periférica es el biomarcador más sensible para células tumorales ocultas en cáncer de mama operable y metastásico.

Tabla 5. Grupo independiente: comparación entre mutaciones de *PIK3CA* en CTC y expresión de *CK-19*

Pacientes		Mutaciones de <i>PIK3CA</i> en el exón 9 de CTC, 1633G>A		Mutaciones de <i>PIK3CA</i> en el exón 20 de CTC, 3140A>G		Mutaciones de <i>PIK3CA</i> en CTC, al menos una mutación	
<b>Cáncer de mama de estadio temprano (n=100)</b>							
		pos	neg	pos	neg	pos	neg
<i>CK-19</i>	pos	0	36	3	33	3	33
	neg	<u>2</u>	62	<u>15</u>	49	<u>17</u>	47
Concordancia (%)		62/100 (62 %)		52/100 (52 %)		<b>50/100 (50 %)</b>	
P		P=0,407		<b>P=0,049</b>		<b>P=0,023</b>	
Coeficiente kappa de Cohen		k=0,59		k=0,49		k=0,46	
<b>Metástasis clínicamente confirmada verificada (n=57)</b>							
		pos	neg	pos	neg	pos	neg
<i>CK-19</i>	pos	6	19	5	20	11	14
	neg	<u>2</u>	30	<u>7</u>	25	<u>9</u>	23
Concordancia (%)		36/57 (63,2 %)		30/57 (52,6 %)		44/57 (77,2 %)	
P		P=0,073		P=0,564		P=0,167	
Coeficiente kappa de Cohen		k=0,61		k=0,48		k=0,52	
<b>Todos los pacientes (n=157)</b>							
		pos	neg	pos	neg	pos	neg
<i>CK-19</i>	pos	6	55	8	53	14	47
	neg	<u>4</u>	92	<u>22</u>	74	<u>26</u>	70
Concordancia (%)		98/157 (62,4 %)		82/157 (52,2 %)		84/157 (53,5 %)	
P		P=0,140		P=0,093		P=0,350	
Coeficiente kappa de Cohen		k=0,61		k=0,48		k=0,48	

En el cáncer de mama operable, solo 3/100 muestras fueron positivas para ambas mutaciones de *PIK3CA* y la expresión de ARNm de *CK-19*, todas en el exón 20. Hubo 33/100 muestras positivas para *CK-19*, sin mutaciones en *PIK3CA*, mientras que es muy destacado el que se identificaran mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en CTC de 17 pacientes que dieron negativo en la expresión ARNm de *CK-19*. En pacientes con metástasis clínicamente confirmada, 11/57 (19,3 %) muestras fueron positivas tanto para las mutaciones de *PIK3CA* como para la expresión de *CK-19*, 6 en el exón 9 y 5 en el exón 20. Hubo 14/57 (24,6 %) muestras positivas para *CK-19*, que no presentaban mutaciones en puntos calientes en *PIK3CA*. Es muy destacado que se identificaran mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en CTC de 9 pacientes que dieron negativo en la expresión ARNm de *CK-19*. Estas 26 muestras (17 de pacientes con cáncer de mama operable y 9 de pacientes con metástasis clínicamente confirmada) que dieron positivo en las mutaciones de *PIK3CA* en CTC, pero negativo en la expresión de ARNm de *CK-19*, hubiesen sido categorizadas como CTC-negativas si no se hubiesen detectado las mutaciones de *PIK3CA*. No hubo concordancia en cuanto a la presencia de estas dos mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* y la expresión ARNm de *CK-19* en CTC (véase la tabla 5).

Una observación importante de este estudio fue que un número significativo de pacientes (17/118 en el grupo de cáncer de mama operable y 9/57 en el grupo con metástasis verificada) que dio negativo en la expresión ARNm de *CK-19* presentaban mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en CTC. Estas pacientes hubiesen sido categorizadas como CTC-negativas si no se hubiesen detectado las mutaciones de *PIK3CA*. La caracterización molecular de las CTC ha demostrado que las CTC son muy heterogéneas. Esto podría atribuirse, al menos parcialmente, a la transición epitelial–mesenquimática y a la transición mesenquimática–epitelial. En este contexto, no se prevé que todas las CTC *CK-19*–positivas den positivo en la mutación de *PIK3CA* o que todas las muestras de los inventores *CK-19*–negativas

porten mutaciones de *PIK3CA* en CTC. El ensayo de PCR en tiempo real de *CK-19* es muy específico y sensible, y ya se ha demostrado su importancia clínica en estudios anteriores [Stathopoulou A., Vlachonikolis I., Mavroudis D., Perraki M., Kouroussis C., Apostolaki S., *et al.*, Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance, *J. Clin. Oncol.*, 2002, 20:3404–3412.]. Sin embargo, siempre hay un número de pacientes que no recaen incluso cuando son *CK-19*-positivos, o recaen incluso cuando son *CK-19*-negativos, y se ha demostrado lo mismo incluso cuando se utiliza el sistema autorizado por la FDA CellSearch™, una clara indicación de que un marcador no es la panacea y que no es suficiente para verificar la presencia de una población CTC maligna en las muestras de los inventores.

Ejemplo 7: Importancia clínica del estado mutacional de *PIK3CA* en CTC en pacientes con metástasis verificada

- 10 Se evaluó en mayor profundidad la correlación entre el estado mutacional de *PIK3CA* en CTC y el resultado clínico de este grupo relativamente pequeño de pacientes con metástasis clínicamente confirmada. El análisis de supervivencia de Kaplan–Meier, realizado utilizando la supervivencia postquirúrgica de las pacientes, demostró que las pacientes con mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en CTC (n = 20) tenían una SG significativamente más corta que aquellas sin estas mutaciones (n = 37) (P = 0,047, ensayos de rangos logarítmicos; véase la figura 4).
- 15 Un resultado sorprendente también es que la presencia de mutaciones de *PIK3CA* en CTC está asociada a una peor supervivencia en pacientes metastásicos. Esta es la primera vez que la presencia de mutaciones genéticas en CTC se correlaciona con la supervivencia del paciente, en cualquier tipo de cáncer. Comparar pacientes con cánceres con mutaciones activadoras en la vía de señalización de PI3K con los inhibidores PI3K de ensayo de protocolos de fase I ha mejorado las tasas de respuesta y supervivencia [Tsimberidou A.M., *et al.*, Personalized medicine in a phase I clinical trials program: the MD Anderson Cancer Center initiative, *Clin. Cancer Res.*, 2012, 18:6373–6383]. En relación con esto, los resultados de los inventores de que las mutaciones de *PIK3CA* pueden estar presentes exclusivamente en CTC, y ausentes en el tumor primario, pueden beneficiar a los pacientes, como se ha demostrado recientemente en un estudio prospectivo piloto, en el que la administración de herceptina se basó en la presencia de CTC positivas a ARNm de *CK-19* [Georgoulas V., *et al.*, Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant *CK-19* mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study, *Ann. Oncol.*, 2012, 23:1744–1750]. En fechas recientes se han detectado mutaciones en la vía de señalización de PI3K/AKT, que frecuentemente está desregulada en células tumorales, en células madre de cáncer de mama que se cree que desempeñan un papel central en el inicio, progresión y respuesta clínica del cáncer de mama [Donovan C.A., *et al.*, Correlation of breast cancer axillary lymph node metastases with stem cell mutations, *JAMA Surg.*, 2013, 148:873–878].

Ejemplo 8: Detección de mutaciones de *PIK3CA* en ctADN de pacientes con cáncer de mama con metástasis verificada

- Se utilizó el método desarrollado para detectar mutaciones en puntos calientes de *PIK3CA* en ctADN aislado del plasma de pacientes de cáncer de mama con metástasis verificada. Para empezar, se examinó la calidad del ADN de todas las muestras de ctADN extraídas del plasma; para verificar la calidad del ADN, se utilizaron los mismos cebadores específicos para el tipo salvaje en exactamente la misma región del gen *PIK3CA* para el exón 9 que los utilizados para evaluar las mutaciones en puntos calientes. La metodología desarrollada detectó el estado de mutación del gen *PIK3CA* en las muestras de ctADN exactamente como se ha descrito anteriormente (figura 5). Se detectaron mutaciones de *PIK3CA* en 4/24 (16 %) para el exón 9 (figuras 5A, 5B) y en 6/24 (25 %) para el exón 20 (Fig 5C), en muestras de ctADN. Los picos a 60 °C en las curvas de fusión en las figuras 5A, 5B y 5C indican la presencia de mutaciones del exón 9 y del exón 20, respectivamente. En este contexto, si no se detecta ningún pico a 60 °C, la muestra se considera de tipo salvaje para la mutación examinada.

- En este estudio se demostró que este ensayo puede detectar mutaciones de *PIK3CA* en ctADN aislado de plasma de pacientes con cáncer. La sensibilidad del ensayo es extremadamente baja (0,05 %) y la especificidad es muy alta; este ensayo puede detectar alelos mutantes de *PIK3CA* muy poco frecuentes en presencia de una cantidad alta de alelos de tipo salvaje. En general, 4 de 24 muestras dieron positivo en la mutación 1633 G>A en el exón 9 y 6 de 24 dieron positivo para la mutación 3140 A>G en el ctADN aislado de las muestras de plasma. El ADN del tumor circulante parece ser una fuente de biomarcadores extremadamente efectiva y ventajosa para determinar en tiempo real el estado mutacional de tumores; sin embargo, en este caso se necesitan metodologías altamente sensibles, sólidas y específicas. En la presente, la evidencia indica que este ensayo ofrece una herramienta útil para la detección de mutaciones de *PIK3CA* en ctADN, aisladas del plasma de pacientes con cáncer.

#### Lista de secuencias

- <110> Pharmassist Ltd
- 55 <120> MÉTODO PARA DETERMINAR EL ESTADO MUTACIONAL DE PIK3CA MUTACIONAL EN UNA MUESTRA
- <150> US62/034,231
- <151> 07-08-2014
- 60 <160> 12

	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
5	<211> 125	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	agtaacagac tagctagaga caatgaatta agggaaaatg acaaagaaca gctcaaagca	60
	atctctacac gagatcctct ctctgaaatc actaagcagg agaaagattt tctatggagt	120
10	cacag	125
	<210> 2	
	<211> 619	
	<212> ADN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	gtttcaggag atgtgttaca aggcttatct agctattcga cagcatgccca atctcttcat	60
	aatcttttc tcaatgatgc ttggctctgg aatgccagaa ctacaatctt ttgatgacat	120
	tgcatacatt cgaaagacct tagccttaga taaaactgag caagaggctt tggagtattt	180
	catgaaacaa atgaatgatg cacgtcatgg tggctggaca acaaaaatgg attggatctt	240
	ccacacaatt aacacagcatg cattgaactg aaaagataac tgagaaaatg aaagctcact	300
	ctggattcca cactgcactg ttaataactc tcagcaggca aagaccgatt gcataggaat	360
	tgcaacaatcc atgaacagca ttagaattta cagcaagaac agaaataaaa tactatataa	420
	tttaataaat gtaaacgcaa acagggtttg atagcactta aactagttca tttcaaaatt	480
	aagctttaga ataatgcgca atttcatgtt atgccttaag tccaaaaagg taaactttga	540
	agattgtttg tatctttttt taaaaaaca aacaaaaca aatcccca aatatataga	600
	aatgatggag aaggaaaaa	619
20	<210> 3	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador para PCR	
	<400> 3	
30	tttctcctga tt 12	
	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> (cebador)	
	<400> 4	
40	actccataga aaatcttct cctgatt 27	
	<210> 5	
	<211> 11	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	

<220>  
 <223> (sonda)

5 <400> 5  
 ctgatcagtg a 11

<210> 6  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> (sonda)

15 <400> 6  
 ctttctcctg atcagtgatt tcagag 26

<210> 7  
 <211> 24  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> (cebador)

25 <400> 7  
 gctcaaagca atttctacac gaga 24

<210> 8  
 <211> 11  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> (cebador)

35 <400> 8  
 aatgatgcac g 11

40 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> (cebador)

45 <400> 9  
 atgaaacaaa tgaatgatgc acg 23

50 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> (sonda)

60 <400> 10  
 tgcacatcat g 11

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

# ES 2 764 423 T3

<220>

<223> (sonda)

5 <400> 11  
gaatgatgca catcatggtg g 21

<210> 12

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> (cebador)

15 <400> 12  
tctcagttat ctttcagtt caatgc 26

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para analizar la presencia de ADN de un alelo mutante de *PIK3CA* en una muestra de ADN, comprendiendo dicho método las etapas de realizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) asimétrica y específica de alelo de dicho ADN de alelo mutante, y realizar un análisis de fusión del ADN producido en la PCR, en el que dicha PCR se realiza mediante el uso de:
- un cebador específico de alelo mutante complementario con un extremo 3' (tres prima) de una primera hebra del ADN del alelo mutante que se va a amplificar, y dicho cebador específico de alelo mutante comprende un sitio de mutación y un desapareamiento con el ADN de tipo salvaje correspondiente, y
  - una sonda de bloqueo no marcada que es un oligonucleótido complementario con una secuencia de tipo salvaje de una primera hebra del ADN de tipo salvaje correspondiente a una primera hebra del ADN del alelo mutante en la posición correspondiente donde se encuentra la mutación que se va a detectar, y dicha sonda de bloqueo no marcada comprende un desapareamiento adicional con dicha primera hebra de ADN del alelo mutante además del sitio de mutación, y dicha sonda está bloqueada para actuar como cebador para la síntesis de ADN en la reacción de PCR; y
  - un cebador común que es complementario con un extremo 3' de una segunda hebra de ADN del alelo mutante se va a ser amplificado por la PCR, y en el que dicho análisis de fusión se realiza mediante el uso de:
    - una sonda de fusión, en forma de una sonda no marcada que es un oligonucleótido que comprende una secuencia complementaria al ADN del alelo de tipo salvaje y que se solapa con una secuencia del ADN del alelo mutante; y
    - un componente detectable para medir la temperatura de fusión de los componentes de ADN de doble hebra que al menos incluye un componente de doble hebra de la sonda de fusión unido a una hebra de ADN del alelo mutante amplificado o una hebra de ADN de alelo de tipo salvaje, en el que la temperatura de fusión difiere entre el componente de hebra doble de la sonda de fusión unido a la hebra del alelo mutante amplificado y la sonda de fusión unida a la hebra del alelo de tipo salvaje amplificado.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el ADN del alelo mutante que se va a amplificar en la reacción de PCR comprende o consiste en el exón 9 (SEQ ID NO:1) y/o del exón 20 (SEQ ID NO:2) de *PIK3CA*, y la secuencia del cebador específico de alelo mutante es complementaria con una hebra de ADN del exón 9 (SEQ ID NO:4) o 20 (SEQ ID NO:9).
- 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la sonda de fusión es la sonda de bloqueo no marcada.
- 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda de bloqueo no marcada tiene un extremo-3' modificado que se modifica mediante un grupo fosfato añadido, en comparación con un cebador de PCR para la amplificación.
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente detectable comprende un componente fluorescente, y en el que el análisis de fusión incluye la detección del componente fluorescente.
- 6.- El método según la reivindicación 5, en el que el componente fluorescente es un tinte fluorescente de unión al ADN, del grupo que consiste en LC-Green Plus o SYBR Green I, que emiten fluorescencia solo en presencia de ADN de doble hebra en la muestra.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda de bloqueo no marcada y el cebador común están presentes en una concentración más alta que el cebador específico de alelo mutante.
- 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mutación está presente en el exón 9 de *PIK3CA*, y el cebador específico de alelo mutante comprende o consiste en la secuencia 5'-TTTCTCCTGATI-3' (SEQ ID NO:3) o es 5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATI-3' (SEQ ID NO:4), en el que I indica un sitio de mutación y A indica un desapareamiento adicional.
- 9.- El método según la reivindicación 8, en el que la sonda de bloqueo no marcada comprende o consiste en la secuencia 5'-CTGATCAGTGA-3' (SEQ ID NO:5) y un componente de bloqueo de PCR, o que comprende o consiste en la secuencia 5'-CTTTCTCCTGATCAGTGATTTTCAGAG-P-3' (SEQ ID NO:6), y en el que P es fosfato y A un desapareamiento adicional.
- 10.- El método según las reivindicaciones 8 o 9, en el que el cebador común tiene de 75 % al 100 % de identidad con la secuencia 5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3' (SEQ ID NO:7).
- 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, en el que la mutación está presente en el exón 20 (SEQ ID NO:2) de *PIK3CA*, y en el que el cebador específico de alelo mutante comprende o consiste en la secuencia 5'-AATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:8), en el que G indica el sitio de la mutación.
- 12.- El método según la reivindicación 1, en el que el cebador específico de alelo mutante comprende o es 5'-



ATGAAACAAATGAATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:9), en el que G indica el sitio de la mutación.

13.- El método según la reivindicación 11 o 12, en el que la sonda de bloqueo no marcada comprende la secuencia de 5'-TGCACATCATG-3' (SEQ ID NO: 10) y un componente de bloqueo de PCR o la secuencia de 5'-GAATGATGCACATCATGGTGG-P-3' (SEQ ID NO:11), y en el que P es fosfato.

5 14.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10, en el que el cebador común tiene del 75 % al 100 % de identidad con la secuencia 5'-TCTCAGTTATCTTTTCAGTTCAATGC-3' (SEQ ID NO:12).

15.- Un método para:

i) diagnosticar una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

ii) predecir la eficacia del tratamiento de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

10 iii) evaluar el resultado del tratamiento para una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, y/o

iv) evaluar la recurrencia de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto

en el que el sujeto es un mamífero con una enfermedad neoplásica maligna confirmada o sospechada,

en el que dicho método comprende el análisis de la presencia de ADN de un alelo mutante de PIK3CA en una muestra según el método de reivindicaciones 1-14.

15 16.- El método según la reivindicación 15, en el que la muestra es una muestra biológica obtenida de un sujeto.

17.- El método según la reivindicación 15 o 16, en el que la enfermedad neoplásica maligna es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico y cáncer de tiroides.

18.- Un kit para:

20 i) detectar la presencia de una mutación en *PIK3CA* en una muestra, y/o

ii) detectar una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, o

iii) diagnosticar una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, o

iv) predecir el resultado del tratamiento para una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, o

v) evaluar la eficacia del tratamiento de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto, o

25 vi) evaluar la recurrencia de una enfermedad neoplásica maligna en un sujeto;

comprendiendo dicho kit:

- un primer polinucleótido que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-TTTCTCCTGATI-3' (SEQ ID NO:3), o que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATI-3' (SEQ ID NO:4), en el que I indica un sitio de mutación y A indica un desapareamiento adicional, y

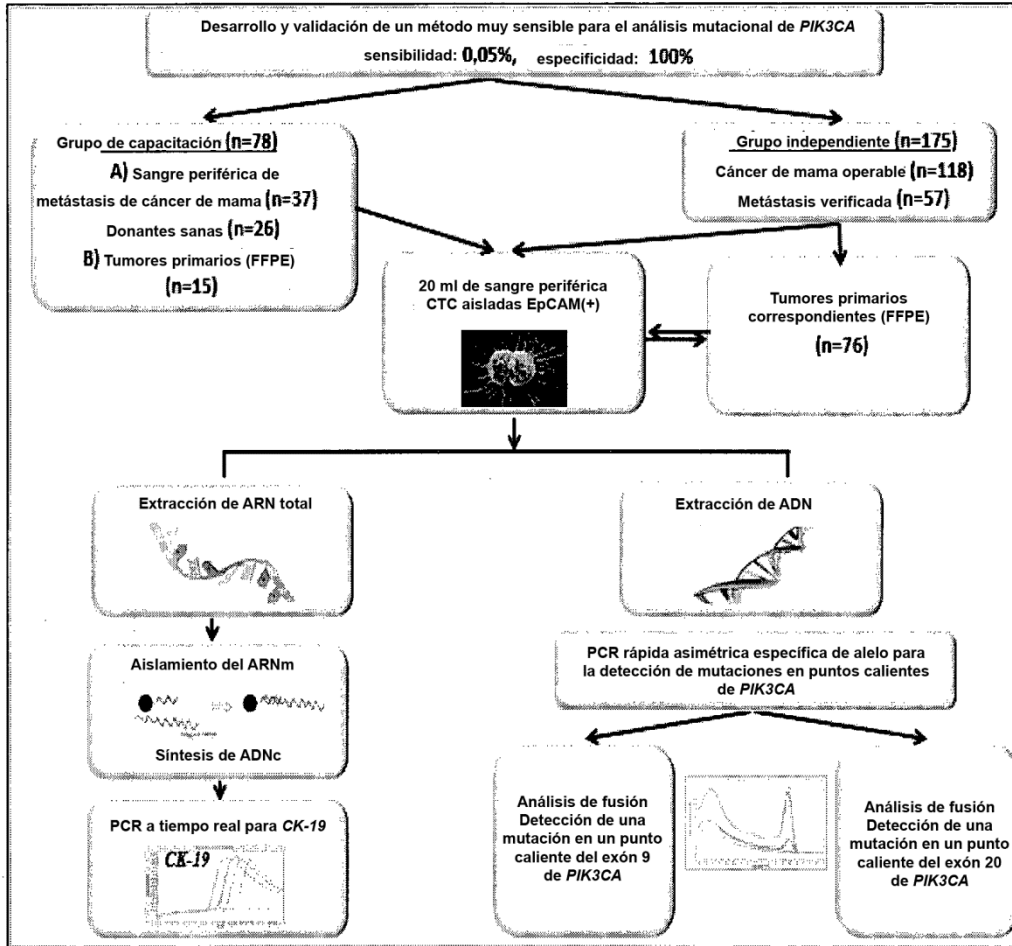
30 - un segundo polinucleótido que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-AATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:8), o que comprende o consiste en al menos la secuencia de 5'-TGAAACAAATGAATGATGCACG-3' (SEQ ID NO:9), en el que G indica el sitio de la mutación; y

35 - un tercer polinucleótido que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-CTGATCAGTGA-3' (SEQ ID NO:5) y un componente de bloqueo de PCR, o que comprende o consiste en la secuencia 5'-CTTCTCCTGATCAGTGATTTTCAGAG-P-3' (SEQ ID NO:6); en el que P es fosfato y A un apareamiento adicional, y

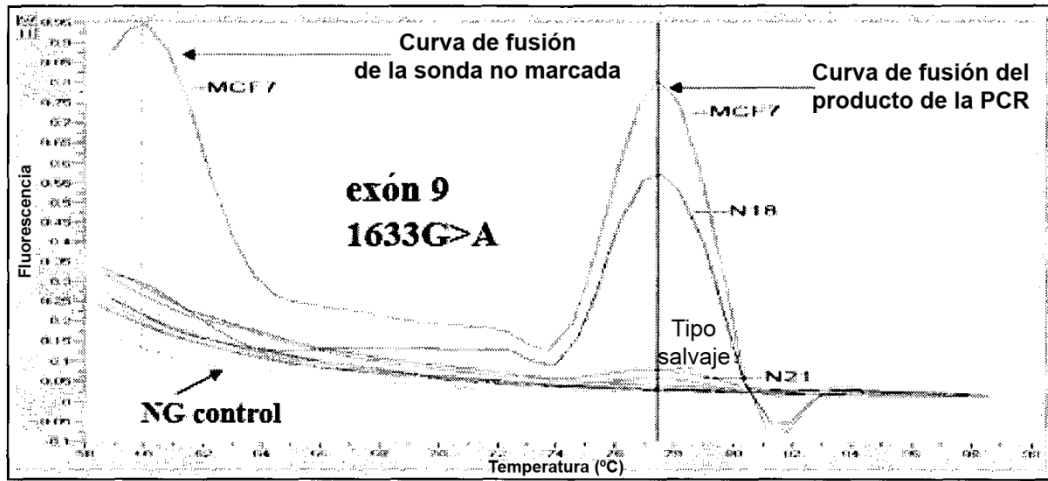
- un cuarto polinucleótido que comprende o consiste en al menos la secuencia 5'-TGCACATCATG-3' (SEQ ID NO:10) y un componente de bloqueo de PCR, o que comprende o consiste en la secuencia 5'-GAATGATGCACATCATGGTGG-P-3' (SEQ ID NO:11) y en el que P es fosfato, y

40 - un quinto polinucleótido que tiene entre 75 % y 100 % de identidad con la secuencia 5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3' (SEQ ID NO:7), y

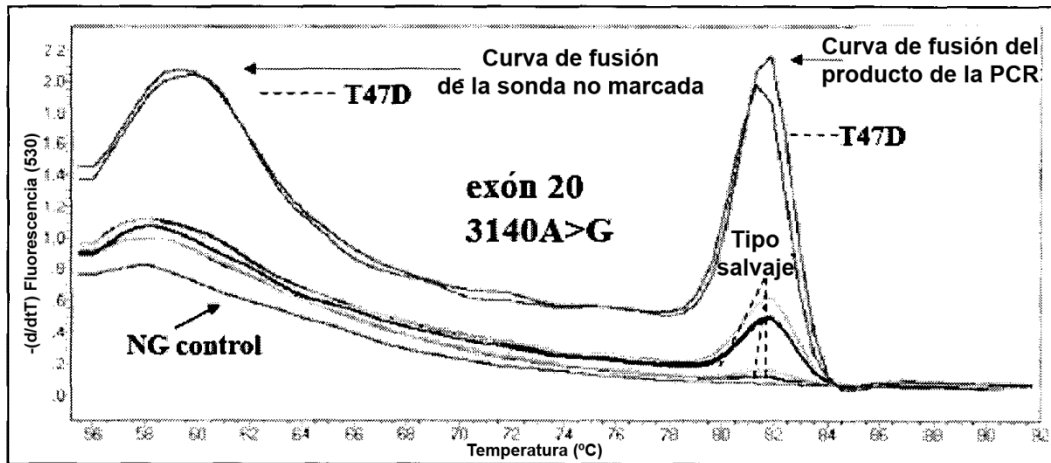
- un sexto polinucleótido que tiene entre 75 % y 100 % de identidad con la secuencia 5'-TCTCAGTTATCTTTTCAGTTCAATGC-3' (SEQ ID NO:12).



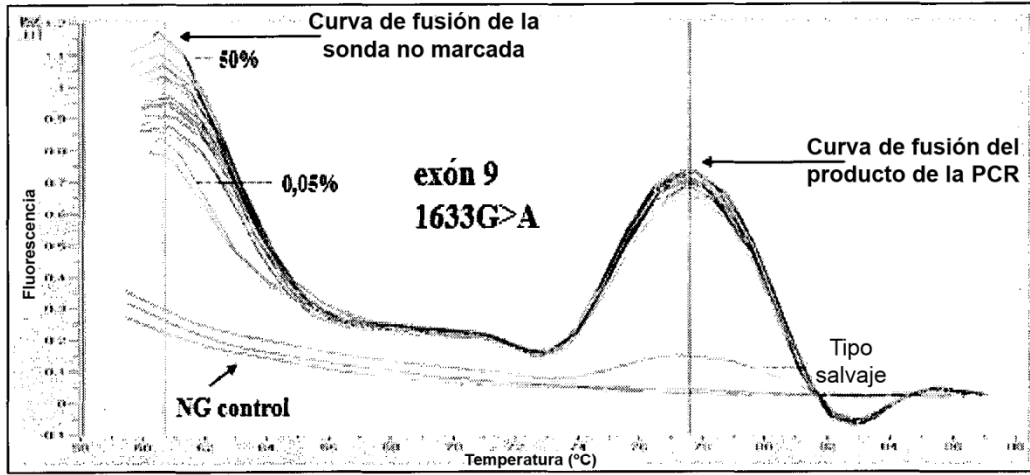
**Fig. 1**



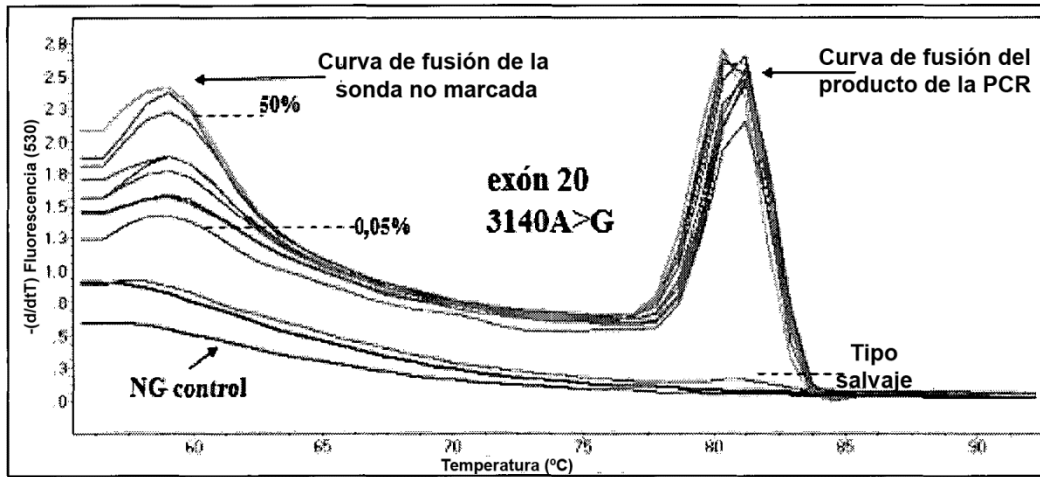
**Fig. 2a**



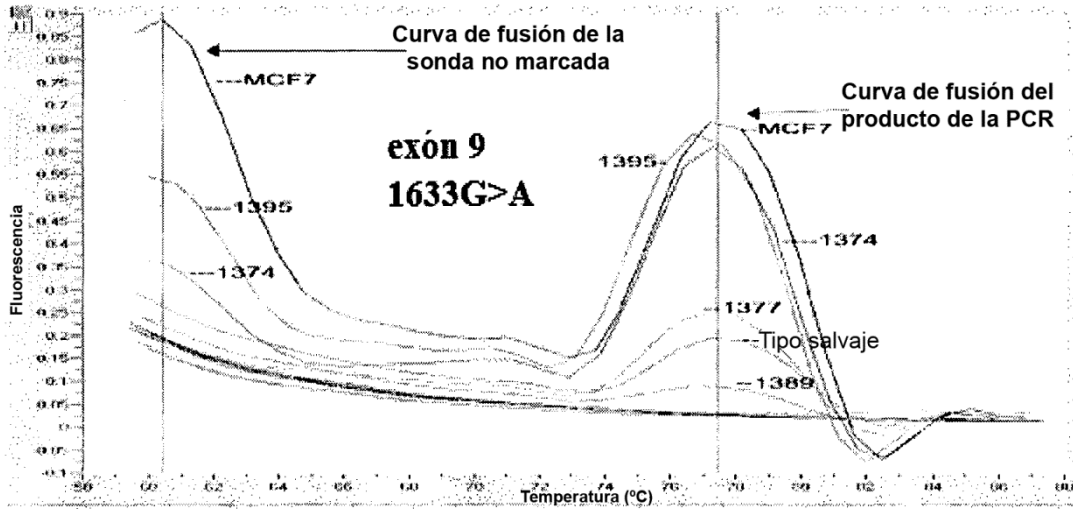
**Fig. 2b**



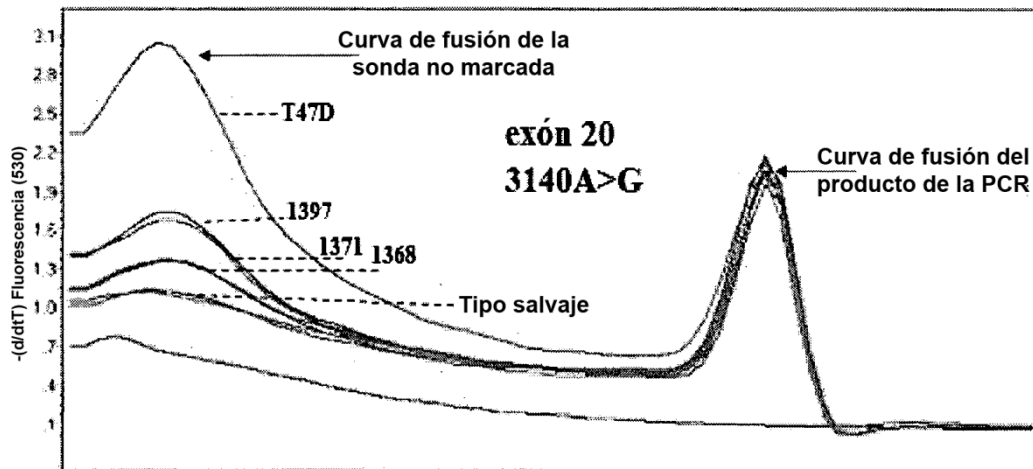
**Fig. 2c**



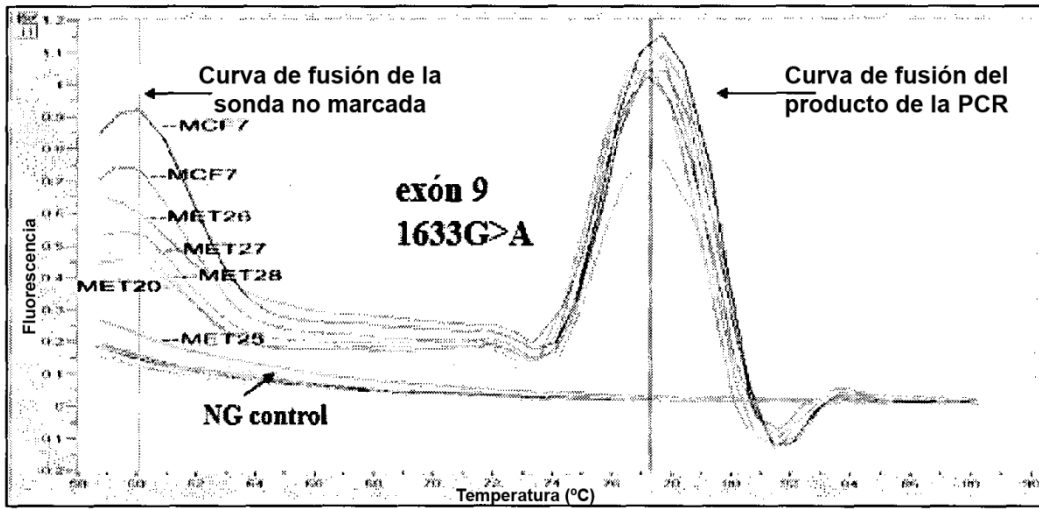
**Fig. 2d**



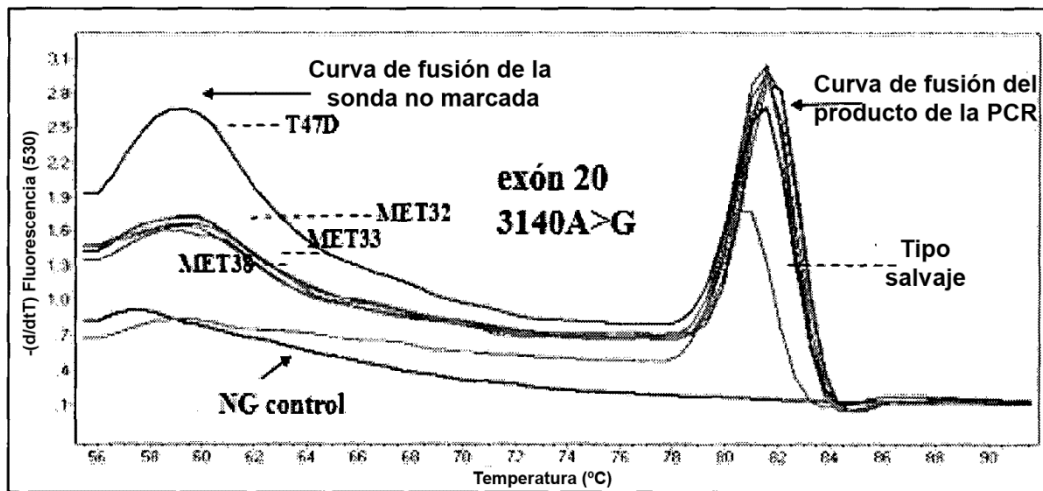
**Fig. 3a**



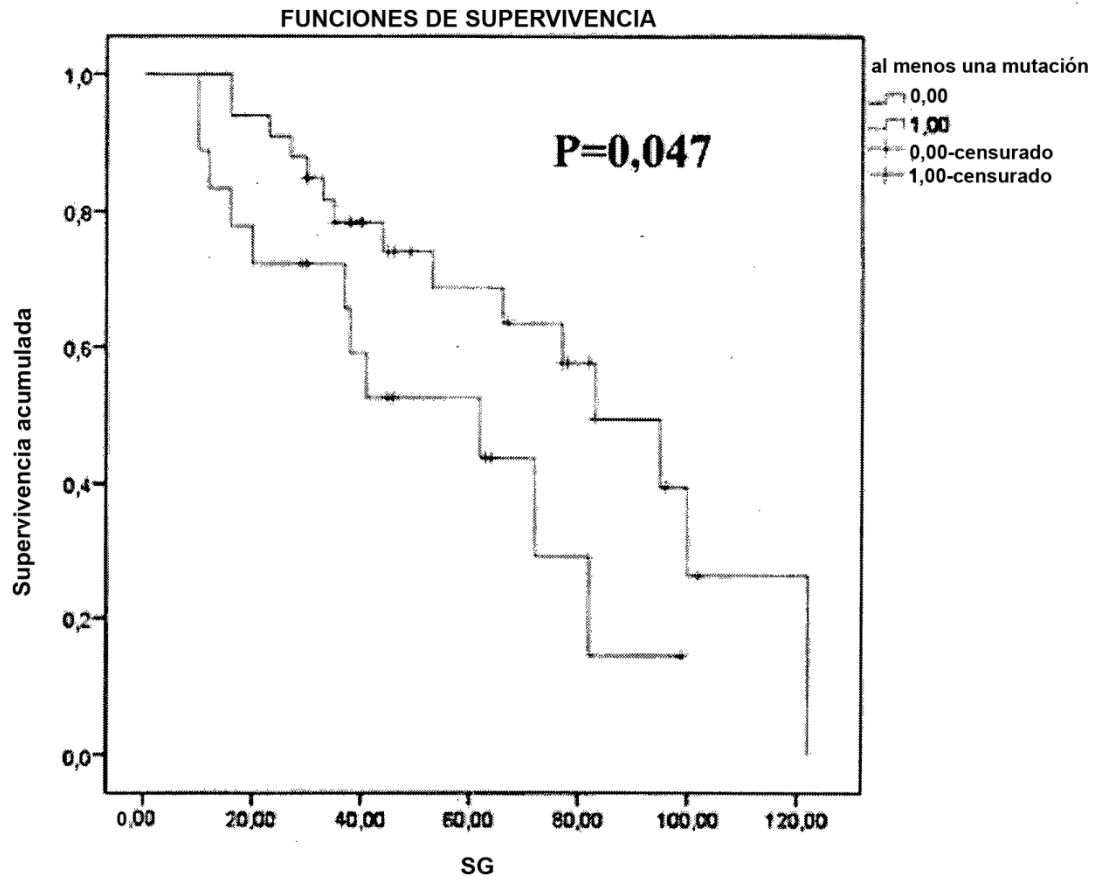
**Fig. 3b**



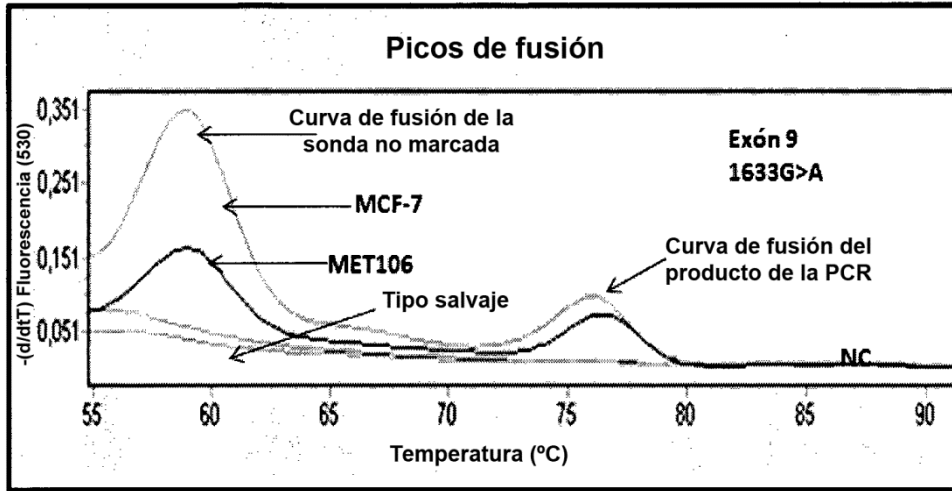
**Fig. 3c**



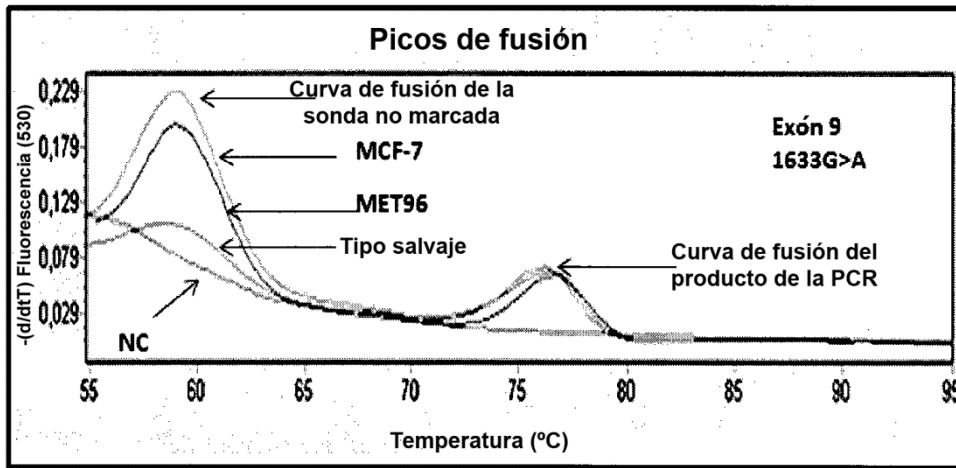
**Fig. 3d**



**Fig. 4**

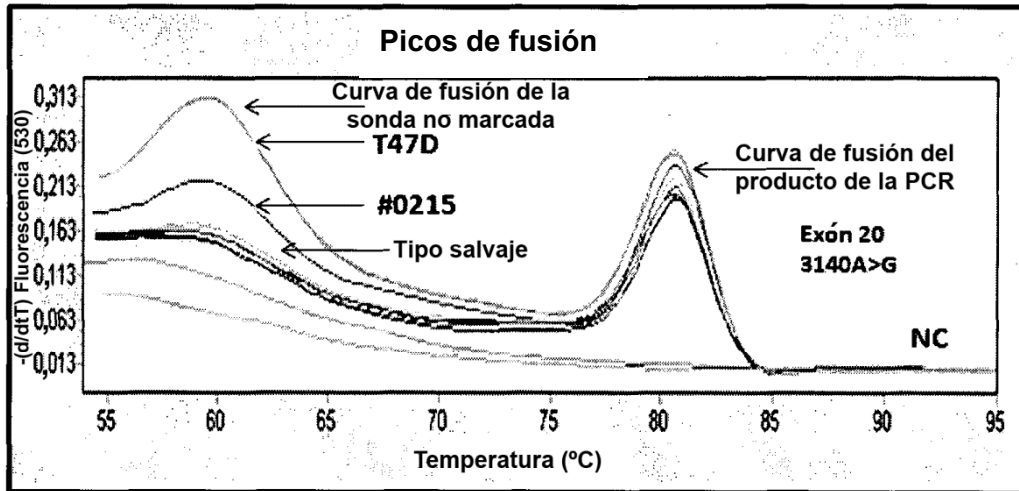


**Fig. 5a**



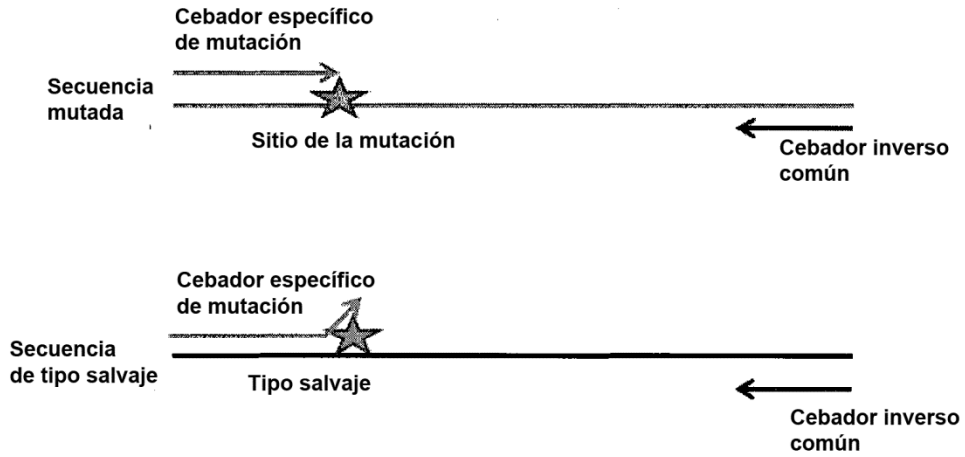
**Fig. 5b**





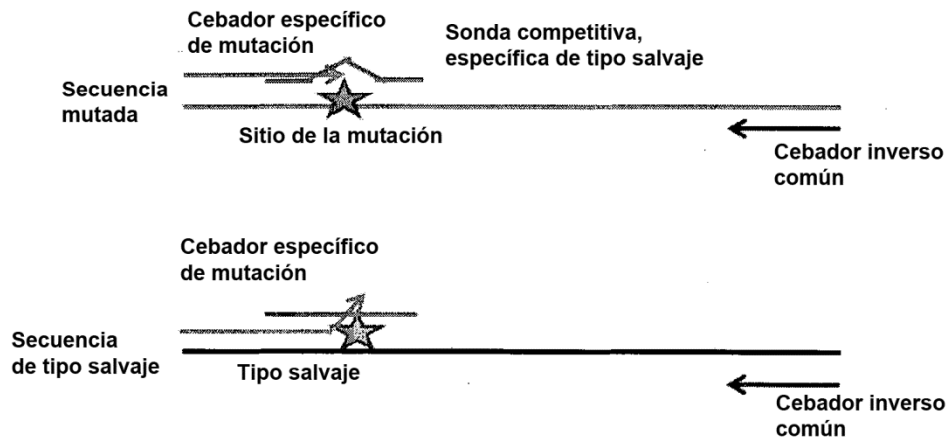
**Fig. 5c**

### PCR específica de alelo



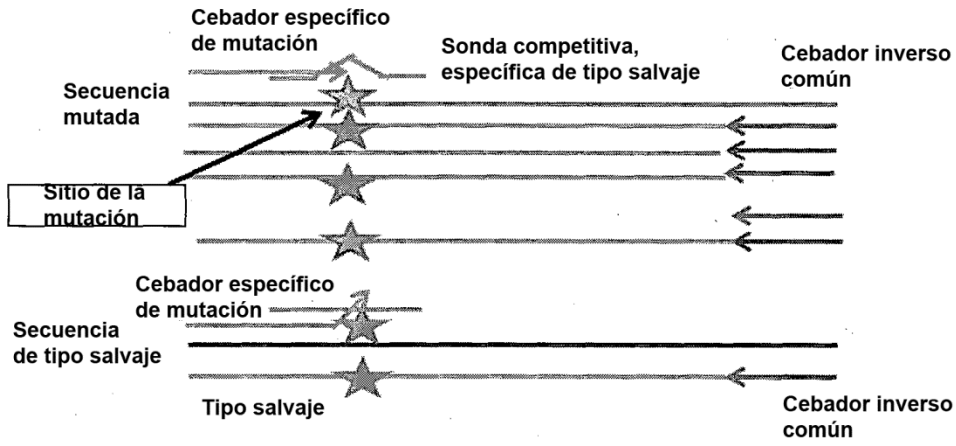
**Fig. 6a**

### Bloqueo de sonda competitiva



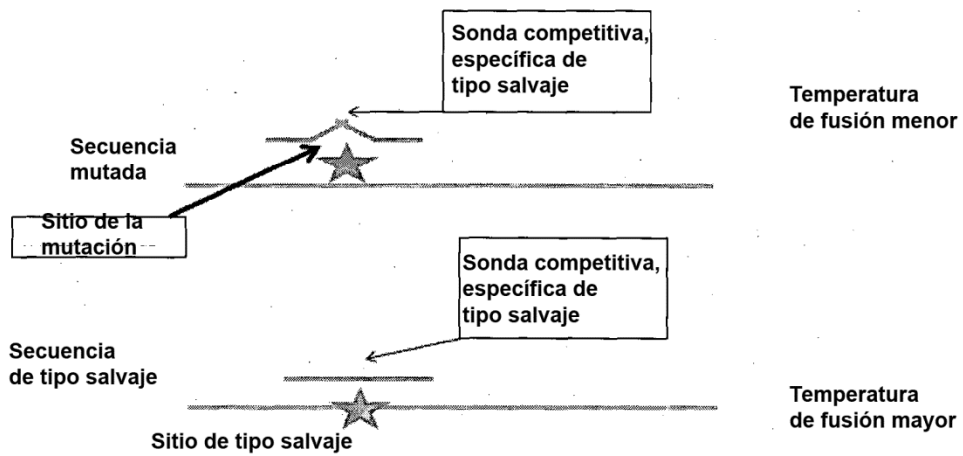
**Fig. 6b**

### PCR asimétrica



**Fig. 6c**

### Análisis de fusión



**Fig. 6d**

**EXÓN 9-PIK3CA**

**A:** sitio de la mutación

**G:** la posición del desapareamiento adicional está escrita en cursiva

Los cebadores (directo e inverso) están escritos en negrita y subrayados

La sonda de bloqueo no marcada se indica en negrita

**SECUENCIA DEL EXÓN 9 (SEQ ID NO:1):**

```
AGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACAAAGAACAGCTCAAAGC
AATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTAAGCAGGAGAAAGATTTTCTATGGA
GTCACAG
```

**EXÓN 20-PIK3CA**

**G:** sitio de la mutación

Los cebadores (directo e inverso) están escritos en negrita y subrayados

La sonda de bloqueo no marcada se indica en negrita

**SECUENCIA DEL EXÓN 20 (SEQ ID NO:2):**

```
GTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTCGACAGCATGCCAATCTCTTCATA
AATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTG
CATAATTCGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTCAT
GAAACAAATGAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGACAACAAAAATGGATTGGATCTTCCAC
ACAATTAAACAGCATGCATTGAACTGAAAAGATAACTGAGAAAAATGAAAGCTCACTCTGGA
TTCCACACTGCACTGTTAATAACTCTCAGCAGGCCAAAGACCGATTGCATAGGAATTGCACA
ATCCATGAACAGCATTAGAATTTACAGCAAGAACAGAAATAAAATACTATATAATTTAAAT
AATGTAAACGCAAACAGGGTTTGATAGCACTTAACTAGTTCATTTCAAATTAAGCTTTA
GAATAATGCGCAATTTTCATGTTATGCCTTAAGTCCAAAAGGTAACTTTGAAGATTGTTT
GTATCTTTTTTTAAAAAACAAAACAAAACAAAATCCCCAAAATATATAGAAATGATGGAG
AAGGAAAAA
```

**Figura 7**