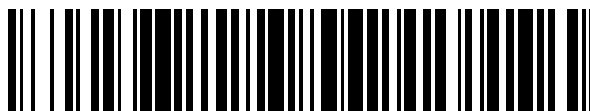


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 823**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2015 PCT/US2015/060602**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16077709**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2015 E 15859714 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3218523**

54 Título: **Uso de ARN sin células circulante para el diagnóstico y/o la monitorización de cáncer**

30 Prioridad:

14.11.2014 US 201462080022 P
04.09.2015 US 201562214756 P
28.09.2015 US 201562233935 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2020

73 Titular/es:

LIQUID GENOMICS INC. (100.0%)
1725 Del Amo Blvd.
Torrance, CA 90501, US

72 Inventor/es:

DANENBERG, KATHLEEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 790 823 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

Uso de ARN sin células circulante para el diagnóstico y/o la monitorización de cáncer

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere al uso de ácidos nucleicos sin células, particularmente, ARN sin células, para el diagnóstico y/o la monitorización de diversos tipos de cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se conoce la existencia de ácidos nucleicos sin células (sc), tanto ADN como ARN, en sangre humana y se ha estudiado desde finales de los años 40. El mecanismo por el que estas moléculas son liberadas en la circulación sanguínea todavía no está bastante claro. Puede ser un resultado de la apoptosis y necrosis de células de diferentes tejidos, o en el caso de ARN, el ácido nucleico puede estar contenido y protegido de RNasas en vesículas que son secretadas en la sangre. La utilidad del ADN sin células (ADNsc) se ha demostrado recientemente fuertemente en la capacidad para tanto diagnosticar cáncer como monitorizar la respuesta del tratamiento del cáncer. Los recientes desarrollos en la tecnología de secuenciación basada en PCR, tales como la secuenciación de nueva generación, han hecho posible detectar mutaciones en ADNsc y así identificar mutaciones de predisposición al cáncer, así como mutaciones originadas por el cáncer. Frecuentemente no se pueden obtener biopsias de tejido tumoral convencionales por motivos logísticos o médicos. Cuando no están disponibles especímenes de tejido de tumor de pacientes con cáncer metastásico, las biopsias líquidas (por ejemplo, sangre) ofrecen una alternativa que puede ser rápidamente implementada sin el dolor, riesgo y coste que implica una biopsia de una de las lesiones metastásicas (Bettgowda C et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. Sci Transl Med 2014; 6, (224). La relativa facilidad para obtener muestras de sangre en comparación con biopsias de tejido tumoral hace ahora posible realizar fácilmente análisis en serie de ADN tumoral y así seguir la emergencia de clones resistentes a fármacos a medida que el tumor se adapta al tratamiento inicial y empieza a reaparecer. El volver a analizar el ADNsc del paciente podría entonces identificar nuevas mutaciones originadas por el cáncer que han emergido, permitiendo diseñar nuevas terapias dirigidas.

20 Un reto ha sido la sensibilidad de los análisis de ADNsc - en muchos casos, la mutación presente en tejido tumoral no se puede encontrar en la sangre debido a que no se puede detectar el ADNsc. Así, un problema a resolver es un método de detección mejorado, de manera que se puedan detectar bajos niveles de ácidos nucleicos sin células, por ejemplo, ARN sin células (ARNsc), particularmente para la población rara de células que son una pequeña parte de la población total de células en la muestra biológica que se prueba. Una solución que logra elevada sensibilidad para los tipos raros de células es particularmente útil para el diagnóstico y/o la monitorización de células resistentes, por ejemplo, las células encontradas en individuos con cáncer que están desarrollando resistencia a uno o más fármacos antineoplásicos.

30 Otro reto es la detección sensible de especies raras que se puede llevar a cabo con una cantidad convencional de plasma normalmente recogido de pacientes. La fracción de pacientes con ADNsc detectable representa el máximo actualmente obtenible de la cantidad de plasma recogido. En el caso de baja secreción, se podría intentar usar cada vez más plasma para aislar ADNsc detectable, sin embargo, este enfoque no es práctico. Como tales, las mejoras en la metodología usada para la detección de mutaciones podrían permitir analizar un mayor porcentaje de tumores.

40 Además, actualmente, los tumores se muestrean con una biopsia tumoral, que produce información estática referente a un sitio tumoral. Un sitio tumoral puede no ser indicativo del estado de resistencia de un individuo a las terapias contra el cáncer. Similarmente, una instantánea estática en el tiempo puede no ser indicativa del presente estado de resistencia a las terapias contra el cáncer o su probabilidad de desarrollar dicha resistencia. Lo que se necesita es una forma no invasiva de muestrear tumores de manera que exista elevada sensibilidad para la detección de especies raras. Además, esta forma también debe ser capaz de proporcionar información dinámica sobre tumores a media que evolucionan en posibles etapas resistentes a las terapias contra el cáncer. La invención descrita en esta memoria descriptiva y definida en las reivindicaciones adjuntas proporciona todo lo anterior y también proporciona beneficios adicionales.

En toda la memoria descriptiva se citan diversas publicaciones, patentes, solicitudes de patente y otras referencias.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 50 La invención proporciona, entre otras cosas, composiciones, métodos y sistemas para la detección mejorada de ácido nucleico sin células, particularmente ARN sin células (ARNsc) para identificar especies raras que pueden ser útiles para el diagnóstico y/o la monitorización de diversos tipos de cáncer.

55 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos de identificación de la presencia de uno o más biomarcadores asociados al cáncer en una muestra biológica de un individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo dicho método: (a) aislar ARN de la muestra biológica usando un soporte sólido, en donde la

muestra biológica ha interactuado con un estabilizador de ARN; (b) digerir el ADN existente de la muestra biológica mientras que el ARN está sobre el soporte sólido; (c) eluir el ARN al menos una vez del soporte sólido; (d) retrotranscribir el ARN en ADNc; (e) hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar uno o más biomarcadores asociados al cáncer; y (f) determinar si uno o más biomarcadores están presentes en la muestra biológica, en donde la presencia del biomarcador identifica si el individuo tiene uno o más biomarcadores asociados al cáncer. En algunas realizaciones, el eluato de la etapa (c) se pasa por la misma columna para una elución doble. En otras realizaciones, la muestra biológica es plasma del individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer. En otras realizaciones, el plasma se procesa en el plazo de 7 días desde la interacción con el estabilizador de ARN. En otras realizaciones, se usan hexámeros al azar en la etapa (d) para retrotranscribir el ARN en ADNc. En otras realizaciones, el biomarcador es una mutación en un gen o transcrito de fusión o expresión génica del gen PD-L1 y opcionalmente en combinación con cualquier gen seleccionado del grupo que consiste en ERCC1, EGFR, TS, AREG, EREG, VEGFR2, EML4ALK, ROS1, RET, c-Met, FGFR1, KRAS, BRAF, NRAS, Her-2, PIK3CA, KIT, GNAQ y GNA11. En otras realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer gástrico, de esófago, de mama, de ovario, sarcoma, cáncer de células renales, de próstata, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI) y cáncer pancreático.

En otros aspectos, la divulgación proporciona métodos de aumento de la sensibilidad de detección de una o más mutaciones somáticas asociadas a resistencia a quimioterapia en ARN sin células (ARNsc) en una muestra biológica de un individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo dicho método: (a) aislar ARN de la muestra biológica usando un soporte sólido, en donde la muestra biológica ha interactuado con estabilizador de ARN; (b) digerir el ADN existente de la muestra biológica mientras que el ARN está sobre el soporte sólido; (c) eluir el ARN al menos una vez del soporte sólido; (d) retrotranscribir el ARN en ADNc; (e) hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar una o más mutaciones somáticas asociadas a resistencia; y (f) determinar si una o más mutaciones somáticas están presentes en la muestra biológica, en donde la presencia de la(s) mutación (mutaciones) somática(s) identifica si el individuo tiene una o más mutaciones somáticas asociadas a resistencia a quimioterapia.

En otros aspectos, la invención proporciona métodos de determinación de la probabilidad de que un individuo tenga cáncer o se sospeche que tiene cáncer, comprendiendo dicho método: (a) aislar ARN de una muestra biológica del individuo en donde la muestra biológica ha interactuado con estabilizador de ARN; (b) digerir el ADN existente de la muestra biológica mientras que el ARN está sobre el soporte sólido; (c) eluir el ARN al menos una vez del soporte sólido; (d) retrotranscribir el ARN en ADNc; (e) hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar uno o más biomarcadores asociados al cáncer; y (f) detectar si uno o más biomarcadores asociados al cáncer están presentes en la muestra biológica, en donde la presencia del biomarcador determina la probabilidad de que el individuo tenga cáncer.

En otros aspectos, la invención proporciona métodos de ayuda en el diagnóstico de la probabilidad de que un individuo tenga cáncer o se sospeche que tiene cáncer, comprendiendo dicho método: (a) aislar ARN de una muestra biológica del individuo en donde la muestra biológica ha interactuado con estabilizador de ARN; (b) digerir el ADN existente de la muestra biológica mientras que el ARN está sobre el soporte sólido; (c) eluir el ARN al menos una vez del soporte sólido; (d) retrotranscribir el ARN en ADNc; (e) hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar uno o más biomarcadores asociados al cáncer; y (f) detectar si uno o más biomarcadores asociados al cáncer están presentes en la muestra biológica, en donde la presencia del biomarcador ayuda en el diagnóstico de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer.

En cualquiera de las realizaciones, el eluato de la etapa (c) se pasa por la misma columna para una elución doble. En cualquiera de las realizaciones, la muestra biológica es plasma del individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer. En otras realizaciones, el plasma se procesa en el plazo de 7 días desde la interacción con el estabilizador de ARN. En cualquiera de las realizaciones desveladas, se usan hexámeros al azar en la etapa (d) para retrotranscribir el ARN en ADNc. En cualquiera de las realizaciones desveladas, la mutación somática es un gen o transcrito de fusión o expresión génica seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, ERCC1, EGFR, TS, AREG, EREG, VEGFR2, EML4ALK, ROS1, RET, Met, FGFR1, KRAS, BRAF, NRAS, Her-2, PIK3CA, KIT, GNAQ y GNA11. En cualquiera de las realizaciones desveladas, el biomarcador es una mutación en un gen o transcrito de fusión o expresión génica seleccionado del grupo que consiste en PDLAR-V7, -1, PD-L1, ERCC1, EGFR, TS, AREG, EREG, VEGFR2, EML4ALK, ROS1, RET, c-Met, FGFR1, KRAS, BRAF, NRAS, Her-2, PIK3CA, KIT, GNAQ y GNA11. En cualquiera de las realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer gástrico, de esófago, de mama, de ovario, sarcoma, cáncer de células renales, de próstata, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI) y cáncer pancreático.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la expresión relativa de ERCC1 y KRAS frente a beta-actina de ARN sin células extraído de plasma de pacientes con cáncer de colon.

La Figura 2 muestra la expresión de ERCC1 de plasma de pacientes con cáncer de colon.

La Figura 3 muestra el análisis de ADN para diversas fracciones alélicas de mutaciones KRAS G12D y G12V en la frecuencia esperada y el ensayo del número de copias para KRAS.

La Figura 4 muestra el análisis de la mutación KRAS G12D en un paciente. La mutación KRAS específica determinada a partir de ADN sin células se refleja en el ARN del mismo paciente.

5 La Figura 5 muestra el análisis de la mutación KRAS G12D en un paciente usando PCR digital. La mutación KRAS G12D fue nuevamente validada usando una plataforma diferente. Se definen varias poblaciones en la figura, en el orden del sentido de las agujas del reloj desde arriba a la izquierda - (1) Amplificación por PCR del mutante KRAS G12D, (2) amplificación por PCR del mutante KRAS G12D y de no mutante, (3) amplificación por PCR de KRAS no mutante, y (4) sin amplificación por PCR.

10 La Figura 6 muestra la relación en la señal entre ARN y ADN. Se encontró que la mediana de la señal de PCR del ARNm retrotranscrito (ADNc) extraído de plasma de pacientes con cáncer de colon era aproximadamente siete veces superior a la del ADN correspondiente.

15 La Figura 7 muestra resultados usando métodos de purificación de ADNc en columna. La señal de ARN con respecto a la de ADN está más potenciada. El rendimiento de ARN es aproximadamente 60 veces superior al de ADN.

La Figura 8 muestra los resultados de la expresión relativa de PD-L1 en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y un grupo de control sano.

La Figura 9 muestra los resultados de la expresión relativa de ERCC1 en pacientes con CPCNP y grupo de control sano.

20 La Figura 10 muestra los resultados de ácido nucleico total (ARNtc de Cts de β -actina normalizados por mediana) de pacientes con CPCNP y un grupo de control sano.

La Figura 11 muestra la relación en la señal entre ADN y ARNm. La mediana de la señal de ADN es 59,63 ng/5 mL (intervalo 5,88 - 2016,0 ng/5 mL). La mediana de la señal de ARNm es 608,49 ng/5 mL (intervalo 111,1 - 6312,02 ng/mL).

25 La Figura 12 muestra los resultados de la expresión relativa de KRAS G12D en un paciente particular. La expresión se midió por análisis por PCR de KRAS G12D, usando β -actina como referencia.

La Figura 13A muestra la expresión de PD-L1 antes del tratamiento para ARN sin células (ARNsc) en pacientes con alta respuesta y sin respuesta antes del tratamiento. La Figura 13B muestra una disminución esperada en la expresión de PD-L1 en ARNsc durante el transcurso del tratamiento en un paciente que responde.

30 La Figura 14A muestra la frecuencia relativa de la expresión génica de PD-L1 en cáncer colorrectal (CCR), pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) e individuos sanos, 17,4 % de pacientes con CCR, 50 % de pacientes con CPCNP y 0 % de individuos sanos tienen aumentos relativos en la expresión de PD-L1. La Figura 14B muestra que los niveles relativos de expresión génica PD-L1 son similares entre pacientes con CCR y CPCNP positivos para PD-L1.

35 La Figura 15A muestra un aumento en la monitorización de la fracción alélica de ADNsc para KRAS G12V durante todo el tratamiento del cáncer colorrectal con Regorafenib/Cetuximab. La Figura 15B muestra que con el tiempo en el régimen de tratamiento existe una disminución en la expresión relativa de PD-L1 en ARNsc durante el tratamiento de cáncer colorrectal con Regorafenib/Cetuximab. La Figura 15C muestra la expresión relativa de ERCC1 con el tiempo durante el tratamiento del cáncer colorrectal con Regorafenib/Cetuximab.

40 La Figura 16 muestra la expresión relativa génica de ARNsc en pacientes con cáncer colorrectal durante el tratamiento con crizotinib y FOLFOX para PD-L1, ERCC1 y KRAS G12D.

La Figura 17 muestra la expresión relativa génica de ARNsc en pacientes con cáncer colorrectal durante el tratamiento con FOLFIRI/Bevacizumab y Regorafenib/Cetuximab para ERCC1, y KRAS G12D.

45 La Figura 18 muestra la expresión relativa de ERCC1 en pacientes con mutaciones KRAS (rojo), NRAS (verde), BRAF (amarillo) o sin mutaciones (azul).

La Figura 19 muestra la expresión relativa monitorizada en ARN sin células de PD-L1 y HER2 en un paciente con cáncer gástrico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 La divulgación proporciona, entre otras cosas, composiciones, métodos y sistemas para la detección mejorada de ácido nucleico sin células, particularmente ARN sin células (ARNsc) para identificar especies raras que pueden ser útiles para el diagnóstico y/o la monitorización de diversos tipos de cáncer. Para motivos más detallados en el

presente documento, en diversas realizaciones, las especies de ARN se pueden usar mejor que las especies de ADN para el diagnóstico y/o la monitorización de diversos tipos de cáncer. Es, en general, bien conocida la capacidad para detectar especies importantes de ARN. Sin embargo, la capacidad para detectar las especies minoritarias (o raras) de ARN con elevada sensibilidad es un problema que no se ha resuelto eficazmente hasta la fecha.

En general, se acepta que es difícil trabajar con el ARN en el ámbito clínico y de laboratorio. Numerosas referencias documentan problemas con la degradación de ARN y retos que tratan el procesamiento del ARN. La invención desvelada aquí supera estos retos existentes y proporciona formas para detectar especies raras de ARN de un modo que es sensible, rápido, preciso y proporciona información útil para la monitorización y/o el diagnóstico dinámico (en lugar de la monitorización y/o el diagnóstico estático).

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que se conocen bien por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, cuarta edición (Sambrook et al., 2012) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook and Russel, 2001), (denominados conjuntamente en el presente documento "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, que incluye los suplementos hasta 2014); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis et al., eds., 1994); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (Greenfield, ed., 2014), Beaucage et al. eds., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000, (que incluye los suplementos hasta 2014) y *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells* (Makrides, ed., Elsevier Sciences B.V., Amsterdam, 2003).

Definiciones

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que se refiere la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra biológica" engloba cualquier muestra tomada del individuo (por ejemplo, paciente). Los ejemplos de muestra biológica incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, muestras de tejido, suero y líquido corporal.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína" incluye polipéptidos, péptidos, fragmentos de polipéptidos y polipéptidos de fusión.

Como se usa en el presente documento, los términos en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

Se pretende que cada limitación numérica máxima dada en toda esta memoria descriptiva incluya cada limitación numérica más baja, como si dichas limitaciones numéricas más bajas estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada limitación numérica mínima dada en toda esta memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica más alta, como si dichas limitaciones numéricas más altas se escribieran expresamente en el presente documento. Cada intervalo numérico dado en toda esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más estrecho que entra dentro de dicho intervalo numérico más ancho, como si dichos intervalos numéricos más estrechos estuvieran expresamente escritos en el presente documento. También está previsto que cuando se cite un intervalo de números, entonces los números que entran dentro del intervalo también se deben incluir como si cada número individual estuviera expresamente escrito en el presente documento.

Composiciones y métodos para la elevada detección de ARN

Se creyó originalmente que el ARN era altamente lábil, fácilmente degradable y, por tanto, probablemente no era estable o detectable fuera del entorno celular protector. Aunque el ADN contiene una copia (o varias en el caso de amplificación) de un gen, es probable que la transcripción de un gen dé muchas copias de ese gen en forma de ARNm. El ARNm contiene la misma información genética que en la región transcrita del ADN, por lo que la misma mutación debe estar presente en ambas moléculas. Teóricamente, entonces, si un gen se transcribe 100 veces, la sensibilidad de detección de ese gen mutado también debe aumentar 100 veces. Un determinante del éxito del análisis de ARNsc es si existe en la sangre ARNsc suficiente originado de tumor para el análisis diagnóstico y si puede ser fácilmente y satisfactoriamente aislado. Por consiguiente, siguiendo la metodología descrita en el presente documento, es posible obtener resultados donde se detecta hasta 30-60 veces más ARN que ADN de los ácidos nucleicos circulantes. Esto es útil para muchas utilidades, una de las cuales es que las mutaciones específicas de tumor se pueden detectar en el ADNc resultante.

Como se ejemplifica en el Ejemplo 1, un experto en la técnica puede detectar ARN sin células, particularmente de especies minoritarias o raras de ARN según la siguiente metodología. Un experto en la técnica debe ser capaz de

entender las diversas sustituciones y se pueden usar desviaciones menores que todavía estarían dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. A partir de individuos que tienen cáncer o se sospecha que tienen cáncer, se obtiene una muestra biológica (por ejemplo, sangre). En algunas realizaciones, el individuo que tiene cáncer o que se sospecha que tiene cáncer es un paciente que está bajo el cuidado de uno o más médicos. La muestra biológica se mezcla, se pone en contacto, interacciona y/o procesa con un estabilizador de ARN. Se pueden usar diversos estabilizadores de ARN a modo de ejemplo. Se pueden usar diversos estabilizadores de ARN en las composiciones usadas en los métodos de la invención. Un método normalizado a modo de ejemplo para la recogida de muestras, estabilización y transporte de ARN de plasma sin células que se puede usar es el ARN sin células BCT® de Streck. Otros estabilizadores de ARN que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, Biomatrix RNA Guard (Biomatrix) <http://www.biomatrix.com/rnagardblood_tube.php>, Paxgene blood RNA tube (Becton Dickinson) <<http://www.preanalytix.com/products/blood/RNA/paxgene-blood-rna-tube>>, Tempus Blood RNA Tube (Life Tech) <<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4342792>> y RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone/Marrow (Roche) <<http://lifescience.roche.com/shop/products/rna-dna-stabilization-reagent-for-blood-bone-marrow>>.

El plasma se puede separar de otras capas de la sangre por diversos métodos conocidos por un experto en la técnica (por ejemplo, centrifugadora, rotación, etc.). En una realización, la capa de plasma se retira de la capa leucocítica. El momento exacto de la separación puede estar dentro de un corto periodo de tiempo desde la extracción de la sangre del individuo. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo está dentro de aproximadamente 1 minuto, 2 minutos, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos. En otras realizaciones, el periodo de tiempo está dentro de aproximadamente 10-15 minutos, 15-30 minutos, 30-45 minutos, 45 minutos - 1 hora, 1-24 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y 7 días. El plasma adicional se puede congelar y usar en un momento diferente según se necesite.

En algunas realizaciones, el plasma se procesa en el plazo de aproximadamente 1 minuto, 2 minutos, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos desde la interacción con un estabilizador de ARN. En otras realizaciones, el periodo de tiempo está en el plazo de aproximadamente 10-15 minutos, 15-30 minutos, 30-45 minutos, 45 minutos - 1 hora, 1-24 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y 7 días.

El ácido nucleico (por ejemplo, ARN) se extrae entonces de la muestra biológica, por ejemplo, plasma. Se pueden usar diversos métodos de extracción del ARN. Se puede usar el protocolo a modo de ejemplo en el Ejemplo 1. Se puede usar otro kit comercialmente disponible para extraer el ARN. En una realización, la extracción usa un soporte sólido, tal como una columna. En una realización, el ADN se puede digerir en la columna usando digestión con DNasa. La elución se puede lograr por técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. Se puede encontrar un protocolo a modo de ejemplo en el Ejemplo 1. En una realización, el mismo eluato de la columna se pasa por la misma columna otra vez para una etapa de elución doble. En otra realización, la metodología tiene la combinación de poner en contacto la sangre con estabilizadores de ARN, procesar el plasma en el plazo de 3 días desde la separación de la sangre, usar digestión con DNasa en la columna y eluir el ARN de la columna dos veces (o más).

El ARN resultante puede ser retrotranscrito a ADNc por métodos convencionales conocidos por un experto en la técnica. Se puede encontrar un protocolo a modo de ejemplo en el Ejemplo 1. Se pueden usar hexámeros al azar. Puede ocurrir amplificación adicional del ARN cuando se convierte en ADNc, especialmente con el uso opcional de secuencias de pinzamiento tales como ácidos nucleicos ZIP, que se pueden añadir al cebador de retrotranscriptasa para aumentar adicionalmente la afinidad de oligonucleótidos por su diana, disminuyendo las repulsiones electrostáticas debido a la naturaleza polianiónica de los ácidos nucleicos.

Se puede purificar el ADNc resultante y usar para análisis. Se pueden usar PCR y otra técnica de amplificación para detectar biomarcadores específicos para tumores y cánceres, genes asociados a tumores y cánceres y/o transcritos de fusión observados en cánceres y tumores. Se puede detectar la expresión génica de ciertos genes que están asociados con el cáncer y también cuantificar y usar para predecir, determinar, diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de cánceres y tumores.

Existen varios transcritos de fusión importantes que son dirigidos por los agentes quimioterapéuticos específicos. Estos incluyen componentes de fusión de EML4-ALK, RET y ROS1. Los ensayos basados en sangre que miden ADN por PCR no pueden detectar las fusiones de transcrito. La detección de ARNm en la sangre potenciará la capacidad para monitorizar pacientes para la detección de fusiones como corresponde a la sensibilidad al fármaco y la emergencia de mutaciones específicas en estas fusiones que puedan crear resistencia al régimen de quimioterapia original y sensibilidad a otro régimen.

Se pueden usar diversos algoritmos para cuantificar el rendimiento del ARN comparando con controles internos (por ejemplo, beta-actina, genes de mantenimiento). En una realización, se puede determinar la expresión relativa de genes de interés mediante la diferencia de los umbrales de ciclo (Cts) de PCR del gen de interés (usando cebadores específicos para ese gen) menos el umbral de ciclo de PCR de un gen de mantenimiento establemente expresado tal como beta-actina. Este método de cuantificación se denomina el método de delta delta Ct de cuantificación relativa. La cantidad de diana normalizada a una referencia endógena y con respecto a un calibrador se da por $2^{-\text{delta, delta Ct}}$. Boletín de Usuario de ABI Nº 2: ABI 7700 Sequence Detection System December 11, 1997 (actualizado

10/2001) <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocument/s/cms_040980.pdf> Por ejemplo, la expresión relativa de un ARNm de fusión de EML4-ALK se puede expresar como una constante (K) x 2^{-(Ct(EML40ALK)-Ct (Beta-actina))}

5 Se establece una constante multiplicadora K que genera un número entero para la mediana de cada nivel de expresión relativa de la fusión EML4-ALK (2^{-(Ct(EML40ALK)-Ct (Beta-actina))}) en múltiples muestras de cáncer de pulmón. Se puede determinar la expresión relativa de la fusión de EML4-ALK en muestras desconocidas comparando los resultados de la muestra desconocida con una muestra de control conocida con un valor establecido para la expresión. Si el valor de la muestra conocida se establece en 10 y K se establece arbitrariamente en 100, la expresión relativa de la muestra desconocida, X, se calcula según la siguiente fórmula:

$$10 = K \times 2^{-(Ct(EML40ALK)-Ct (Beta-actina)) (\Delta Ct \text{ Conocida})}$$

$$X = K \times 2^{-(Ct(EML40ALK)-Ct (Beta-actina)) (\Delta Ct \text{ Desconocida})}$$

$$\text{Expresión relativa de Desconocida} = X = 10 \times 2^{-\Delta Ct \text{ Desconocida} / \Delta Ct \text{ Conocida}}$$

15 Para cada serie de placas de PCR, el valor del multiplicador K se puede ajustar para corregir la placa de PCR para las variaciones de la placa en la expresión relativa de una muestra conocida de manera que el valor para la muestra conocida permanezca exactamente en el punto establecido, 10.

20 En otra realización, se puede emplear una curva patrón de productos de PCR empleando cantidades conocidas de fragmentos de ADN de fusión de EML4-ALK enriquecidos en una cantidad constante de ADN sin fusiones para actuar de control para comparar expresiones relativas de muestras desconocidas con controles con expresiones conocidas de EML4-ALK. Un gráfico de Cts de muestras conocidas en el eje Y frente a log₁₀ Expresión relativa de controles conocidos de EML4-ALK en el eje X generará una curva lineal descrita por la siguiente ecuación:

$$Ct_{EML4-ALK} = \text{Pendiente} \times X_{(\text{expresión relativa de EML4-ALK})} + \text{Intersección con Y}$$

Resolviendo para X (la expresión relativa de una muestra desconocida)

$$X = \text{Expresión relativa muestra desconocida} = (Ct_{\text{muestra desconocida}} - \text{Intersección con Y de la curva estándar}) / \text{Pendiente de la curva estándar}$$

25 *Cuantificación de especies minoritarias o raras*

En algunos aspectos de la invención, se pueden usar la composición y metodología descritas en el presente documento para cuantificar ácido nucleico sin células, particularmente ARN sin células. La cuantificación se puede lograr para especies mayoritarias así como minoritarias de ARN. El reto al que se enfrenta el diagnóstico preciso es la detección de especies minoritarias (o raras) de ARN que puedan ser predictivas, diagnosticar y/o ayudar en el diagnóstico de resistencia a terapia del cáncer y/o indicar la emergencia de un mutante o célula(s) resistente(s). En algunos aspectos de la invención, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en aproximadamente 0,01 % a 60 % de ARN no mutante. En algunas realizaciones, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en al menos aproximadamente 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, o 1 % de ARN no mutante. En otras realizaciones, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en al menos aproximadamente 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de ARN no mutante. En otras realizaciones, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en al menos aproximadamente 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, o 30 % de ARN no mutante. En otras realizaciones, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en al menos aproximadamente 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 % o 40 % de ARN no mutante. En otras realizaciones, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en al menos aproximadamente 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, o 50 % de ARN no mutante. En otras realizaciones, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en al menos aproximadamente 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 % o 60 % de ARN no mutante. En cualquiera de las realizaciones anteriormente, las especies minoritarias de ARN que se pueden detectar están presentes en como máximo aproximadamente cualquiera de los porcentajes indicados anteriormente y también en intervalos que incluyen la combinación del límite inferior y el límite superior de cualquiera de los porcentajes indicados anteriormente.

Uso de ARN sin células para el diagnóstico y/o la monitorización para oncología

50 En el presente documento se describen composiciones, sistemas y métodos de diagnóstico y/o monitorización de diversos tipos de cáncer usando ácidos nucleicos sin células, particularmente ARN sin células. Los ARNsc pueden ser útiles para diagnosticar un individuo (por ejemplo, un paciente bajo el cuidado de un médico) que tiene cáncer o que se sospecha que tiene cáncer para determinar qué tipo de cáncer tiene y/o para determinar si tiene cualquier mutación asociada al cáncer (es decir, biomarcador de cáncer) y/o para determinar si tiene (o está desarrollando) un fenotipo resistente o genotipo resistente a los terapéuticos contra el cáncer. Además, las composiciones, sistemas y

métodos desvelados en el presente documento se pueden usar para monitorizar individuos con el tiempo (por ejemplo, transcurso longitudinal) para detectar rápidamente cuándo está emergiendo un fenotipo resistente o genotipo resistente. La exactitud y especificidad del diagnóstico y/o monitorización se pueden lograr usando ARNsc que no se puede lograr fácilmente usando ADNsc. Como se describe además en el presente documento, la diferencia estadísticamente significativa observada en la medición de ARNsc entre un individuo con cáncer y un individuo sano sin solapamiento en los intervalos de expresión proporciona ventajas para la detección (incluyendo detección precoz) del cáncer y para monitorizar la reaparición del cáncer. Según se necesite, el médico puede tomar medidas apropiadas para adaptar la resistencia emergente al fármaco terapéutico contra el cáncer o compuesto(s).

La especificidad de la detección de mutaciones en ADN de sangre puede ser próxima a 100 %, es decir, las mutaciones encontradas en el ADN de la sangre casi siempre reflejan aquellas en el ADN obtenido del tejido tumoral real. Sin embargo, un problema es que la sensibilidad del actual análisis de ADNsc, en general, es inferior a 100 %; es decir, en muchos casos, la mutación presente en el tejido tumoral no se puede encontrar en la sangre debido a que no se detecta el ADNsc. Por ejemplo, en un estudio, el ADNsc fue detectable en >75 % de pacientes con cánceres pancreático, de ovario, colorrectal, de vejiga, gastroesofágico, de mama, melanoma, hepatocelular y de cabeza y cuellos avanzados, pero en menos de 50 % de cánceres primarios de cerebro, renal, de próstata o de tiroides, mientras que en pacientes con tumores localizados el ADNsc se detectó en 73 %, 57 %, 48 %, y 50 % de los pacientes con cáncer colorrectal, gastroesofágico, cáncer pancreático y adenocarcinoma de mama, respectivamente (Bettagowda, 2012).

Sin desear quedar ligado a teoría, la ausencia de detección de ADNsc podría ser debida a los siguientes motivos no limitantes: 1) algunos cánceres no secretan ningún ADN en la circulación sanguínea, o 2) todos los tumores secretan algún ADNsc, pero la cantidad de ADN que emana de algunos tumores es demasiado pequeña como para ser detectada por la tecnología actual. Sin desear quedar ligado a teoría, la última posibilidad puede ser debido a que una característica de los tumores es que las células se recuperan rápidamente, muriendo tan rápidamente como se forman, representando así, en general, los niveles más altos de ácidos nucleicos encontrados en la sangre de pacientes con cáncer. Además, se sabe que la secreción de ADNsc por tumores varía durante un intervalo muy amplio. Un estudio usando un método de detección sensible especialmente diseñado encontró que el ADNsc en los 18 pacientes con cáncer colorrectal variaba desde 1,3 hasta 23.000 plantillas de mutante por muestra (mediana 99 plantillas de mutante por muestra; intervalo entre el centil 10 y 90, 3-2,837). Este estudio llegó a la conclusión de que "la mayoría de los estudios previos no han usado técnicas suficientemente sensibles como para detectar los bajos niveles de ADNsc encontrados en muchos de los sujetos evaluados en el presente estudio" (Diehl F et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med. 2008; 14:985-990).

Como se describe en el presente documento, el uso de ARNsc presenta oportunidades para acceder a información potencialmente valiosa y útil que no se puede obtener del análisis de ADN. Aunque la expresión de ARNm está altamente regulada en células normales, se desregula cada vez más en la progresión hacia el cáncer. Así, sin desear quedar ligado a teoría, debe haber muchos genes que se expresan altamente en tumores que no se expresan altamente en tejido normal. Un estudio anterior mostró que el ARNm de tirosinasa se podría detectar a altos niveles en el suero de pacientes con cáncer, pero no en individuos no cancerosos (Kopreski MS et al. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. Clin Cancer Res. 1999;8:1961-5). Similar al ARNm de tirosinasa, otro ARNm de tumor debe ser demostrable en suero y plasma en otros tumores malignos. En otro estudio, se midió la expresión de timidilato sintasa (TS) en el plasma de 88 pacientes y 26 controles por PCR cuantitativa. Se detectó ARNm de TS en plasma en 47 % de los pacientes, que muestra diferencias significativas de los controles sanos. En particular, los pacientes con ARNm de TS en plasma tuvieron niveles más altos de TS en tejido tumoral que los pacientes sin.

Por consiguiente, en un aspecto, las mediciones de ARNm (expresión génica) usando ARNsc pueden ser útiles para detectar una expresión anormal de uno o más genes asociados al cáncer y/o alelos y/o mutaciones. Dicha detección se puede usar para diagnosticar la presencia (o ausencia) de enfermedad, o para evaluar el estado del cáncer. En una realización, los niveles de ARNm sin células son más altos en comparación con ADN.

Una "biopsia líquida" - usando sangre periférica para obtener información oportuna sobre información genética en tumores malignos sólidos, contiene información dinámica de ADN y ARN de todos los sitios tumorales y no se limita al área de la biopsia.

En otra realización, la expresión génica también podría ser útil para monitorizar el régimen de quimioterapia. Aunque el ADN es en gran parte una molécula estática en términos de alteraciones (es decir, puede tardar un tiempo hasta que aparezcan nuevas mutaciones en el ADN), los cambios en la expresión génica pueden ocurrir rápidamente, en cuestión de días o incluso horas, y así puede proporcionar un medio rápido y sensible de evaluación de los cambios en el tumor, tales como los provocados por los efectos de fármacos. Se puede medir un continuo de valores para la expresión relativa (aumento, disminución o niveles estáticos) de la fracción de transcritos raros o aberrantes con respecto a los transcritos normales o no mutantes con el tiempo en plasma del individuo (por ejemplo, paciente). La tendencia al alza o a la baja de la expresión se puede asociar al resultado del paciente a regímenes de quimioterapia específicos.

Los regímenes de quimioterapia se pueden diferenciar por tipo de cáncer, etapa y genética del paciente. La quimioterapia se puede adaptar al fenotipo específico del tumor. Se pueden usar los métodos de la presente invención para monitorizar la respuesta a un régimen específico de quimioterapia antes, durante y tras el tratamiento. Los regímenes de quimioterapia de ejemplo incluyeron, pero no se limitan a, tratamiento de cáncer PD-L1 positivo con nivolumab; tratamiento de CCR con Regorafenib/Cetuximab; crizotinib; FOLFOX; FOLFORI/Bevacizumab; y Regorafenib/Cetuximab.

En otra realización más, la invención proporciona que determinar cuantitativamente las expresiones de genes determinantes de la respuesta a fármaco puede predecir la eficacia de los fármacos y así se podría usar para tomar decisiones de tratamiento. Por ejemplo, un estudio reciente mostró que los tumores de mama avanzados positivos para HER2 expresaron cantidades variables de HER-2 y los pacientes con el nivel más alto de expresión obtuvieron un beneficio de supervivencia espectacularmente mejor de Herceptin® que aquellos con expresiones más bajas (Baselga J, et al. Relationship between tumor biomarkers and efficacy in EMILIA, a phase III study of trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive metastatic breast cancer. AACR 2013; Resumen LB-63). Además, mutaciones activantes en PIK3CA, que mitigan los efectos de fármacos anti-HER-2 tales como lapatanib, no tuvieron efecto sobre la terapia con Herceptin®. Si los niveles de expresión en tejido de HER-2 de estos pacientes con cáncer de mama se reflejan en sus ARNsc, se puede usar una extracción de sangre en vez de una biopsia de tejido para conseguir información sobre la expresión de HER-2, así como el estado de mutaciones de PIK3; (4) para algunos biomarcadores asociados al cáncer y/o genes (por ejemplo, Her-2), el número de copias puede variar. Esta variación se puede detectar solo con ARN; y (5) un problema adicional con el análisis de ADN es que algunos agentes quimioterapéuticos son casos objetivo de fusiones de genes que solo son analizables a partir de ARN y no se pueden medir en ADN. Los ejemplos no limitantes de estas dianas son fusiones de genes (por ejemplo, EML4-ALK, ROS1, RET). A modo de otro ejemplo, para aquellos pacientes con cambios secundarios como resistencia mediada por T790M a los inhibidores de EGFR, los inhibidores de tirosina cinasas (TKI) irreversibles parecen ser una alternativa prometedora.

La medición de expresiones de cada variante o mutaciones de resistencia emergentes en estos genes del plasma de pacientes que reciben terapia puede ser crítica para el cuidado óptimo del paciente. Se pueden utilizar fármacos específicos que son activos en solo ciertas fusiones o mutaciones en estos genes para ayudar al paciente si ocurre el rápido y preciso diagnóstico de esas fusiones de genes. No es práctico para estos pacientes volver a hacer una biopsia de pacientes que reciben terapia. Esto se puede lograr usando la metodología de ARNsc como se describe en el presente documento.

Por consiguiente, el ejemplo no limitante de genes asociados a respuesta a quimioterapia que se puede medir según la metodología descrita en el presente documento incluye: EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, JAK2, ALK, PDGFRA, IDH1, IDH2 y KIT. En algunos aspectos de la divulgación, el biomarcador es una mutación en un gen o transcrito de fusión seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, ERCC1, EGFR, TS, AREG, EREG, VEGFR2, EML4ALK, ROS1, RET, c-Met, FGFR1, KRAS, BRAF, NRAS, Her-2, PIK3CA, KIT, GNAQ y GNA11.

En algunas realizaciones de la invención, el individuo tiene o se sospecha que tiene cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer gástrico, de esófago, de mama, de ovario, sarcoma, cáncer de células renales, de próstata, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI) y cánceres pancreáticos. En otras realizaciones, el gen que se detecta y/o cuantifica se enumera a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1			
ARN	Colon	Pulmón	Melanoma
PD-L1	PD-L1	PD-L1	PD-L1
ERCC1	ERCC1	ERCC1	
EGFR	EGFR	EGFR	
TS	TS	TS	
AREG	AREG		
EREG	EREG		
VEGFR2	VEGFR2		
EML4ALK		EML4ALK	
ROS1		ROS1	
RET		RET	

ES 2 790 823 T3

Tabla 1			
ARN	Colon	Pulmón	Melanoma
ROS1			
RET			
c-Met		c-Met	
FGFR1		FGFR1	FGFR1

En otras realizaciones, el gen y/o mutación que se detecta y/o cuantifica se enumera a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2			
ARN o ADN	Colon	Pulmón	Melanoma
KRAS	G12C	G12C	
KRAS	G12V	G12V	
KRAS	G12D	G12D	
KRAS	G12A	G12A	
KRAS	G12S	G12S	
KRAS	G13D	G13D	
KRAS	Q61H		
EGFR		L858R	
EGFR		(Deleciones del exón 19) Δ E746-A750	
EGFR		L861Q	
EGFR		T790M	
EGFR		G719S	
BRAF	V600E	V600E	V600E
BRAF			V600K
NRAS	Q61K		
NRAS	Q61L		
NRAS	Q61R		
HER2ins		HER2 ins	
PIK3CA	H1047R	H1047R	
PIK3CA	H1047L	H1047L	
PIK3CA	E542K	E542K	
PIK3CA	E545K	E545K	
KIT			WQ577R
KIT			WQ577R

Tabla 2			
ARN o ADN	Colon	Pulmón	Melanoma
KIT			L576P
KIT			V559A
KIT			K642E
GNAQ			Q209L
GNA11			Q209L

5 El ADN sin células (ADNsc) liberado en la circulación sanguínea por los tumores permite la identificación no invasiva de mutaciones iniciales específicas de tumor. Sin embargo, no todos los cambios moleculares en los tumores implican mutaciones de ADN; en muchos casos también es la cantidad de un gen particular (por ejemplo, expresión génica) lo que es importante. En una realización, el uso de ARN sin células (ARNsc) liberado en la sangre para monitorizar la expresión génica en pacientes con cáncer. En una realización particular, la vía de PD-1/PD-L1 es una diana terapéutica prometedora y agentes anti-PD-L1 han mostrado actividad favorable en una variedad de tipos de tumor.

10 Para evaluar la cantidad de ARN celular para un gen particular (por ejemplo PD-L1), se puede fraccionar plasma de la sangre recogida del paciente. Se conocen en la técnica los métodos de fraccionamiento de sangre e incluyen como ejemplos no limitantes el fraccionamiento por el método de Cohn (por ejemplo, fraccionamiento con etanol frío), cromatografía, o combinaciones de los mismos. Se pueden usar RT-PCR cuantitativa con cebadores específicos de gen para cuantificar un gen específico. Se puede comparar la cantidad de gen para un gen de interés con voluntarios sanos. Se pueden usar genes de mantenimiento tales como, por ejemplo, β -actina como se describió anteriormente en este documento, como genes denominador que representan ARN total.

15 Un experto en la técnica puede usar la divulgación descrita en el presente documento para medir la expresión de ciertos genes para la detección y/o diagnóstico de cáncer. Como se detalla además en el presente documento, algunos biomarcadores de cáncer muestran una diferencia estadísticamente significativa para la medición de ARNsc entre individuos con cáncer e individuos sanos. La ausencia de solapamiento en los intervalos de expresión entre individuos con cáncer e individuos sanos permite múltiples usos, por ejemplo, para la detección (incluyendo detección precoz) de cáncer y para monitorizar la reparación de cáncer.

Composición, kits y sistemas

25 La divulgación también proporciona composiciones para lograr la detección altamente sensible de manera que se puedan detectar mutaciones de resistencia emergentes. En un aspecto, un sistema es una condición que incluye no solo los reactivos para aislar las muestras biológicas (tales como plasma), estabilizador(es) de ARN, columna(s) de extracción, disolución (disoluciones) de elución, sino también los reactivos necesarios para la retrotranscripción y cebadores/sondas específicos para biomarcadores de tumor/cáncer. En algunas realizaciones, el sistema es un kit que incluye instrucciones para la metodología. Opcionalmente, el sistema incluye instrucciones para calcular el rendimiento de ARN de mutante, transcritos de fusión y otros transcritos raros con respecto a transcritos normales o no mutantes.

30 Se proporcionan los siguientes ejemplos para fines ilustrativos solo y no pretenden limitar el alcance de la invención en ningún modo. El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

35 Lo siguiente describe protocolos a modo de ejemplo para la extracción de ARN sin células, retrotranscripción y el procedimiento de amplificación por PCR que se utilizaron en algunas realizaciones. Los protocolos descritos a continuación incluyen modificaciones hechas por los inventores que no se describieron en las instrucciones del fabricante que vinieron con el kit y/o reactivos comercialmente disponibles.

- 1) Sacar sangre del paciente en tubos Streck® RNA BCT (con estabilizador de ARN)
- 40 2) Centrifugar y separar el plasma de ARN sin células de otras capas de sangre en el plazo de 7 días desde la extracción de la sangre del paciente.
- 3) Retirar la capa de plasma de la capa leucocítica pipeteando cuidadosamente la capa superior

- 4) Extraer aproximadamente 1-3 mL de plasma tras la centrifugación del plasma.
- Se recuperan cantidades máximas de ARN por extracción inmediatamente después de separar el plasma de la sangre estabilizada de ARN completo.
- 5) Congelar el exceso de plasma en alícuotas de 1 mL a - 80 °C
- 5) La extracción de ácido nucleico se hizo del siguiente modo:
- a. Usar el kit de ácido nucleico circulante QIAamp®
 - i. Preparar los tampones contenidos en el kit: Tampón ACB, ACW1 y ACW2 con los volúmenes requeridos para el número de muestras a aislar
 - ii. Añadir ARN portador (1 ug) al tampón ACL a los volúmenes por reacción descritos en el kit
 - 10 iii. Incubar proteinasa K y plasma a 60 °C durante 1 hora
 - iv. Añadir tampón ACB al lisado
 - v. Incubar sobre hielo durante 5 minutos
 - vi. Aplicar la mezcla a la minicolumna de QIAamp y extraer el líquido a vacío
 - 15 vii. Aplicar 600 uL de tampón ACW1 a la minicolumna de QIAamp. Sacar el líquido a través de la columna con bomba de vacío
 - viii. Aplicar 750 uL de tampón ACW2 a la minicolumna de QIAamp. Sacar el líquido usando vacío
 - 20 ix. Realizar en la columna la digestión con DNasa del ADN añadiendo 60 uL de DNasa libre de RNasa directamente al centro de la columna e incubando en la columna durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 - b. Preparar DNasa libre de RNasa (Qiagen Cat. No. 79254) usando 2,5 uL de disolución madre de DNasa, 10 uL de tampón RDD, 87,7 uL de agua (sin RNasa).
 - i. Repetir las etapas vii y viii anteriores (6)(a)
 - 25 a. Aplicar 600 uL de tampón ACW1 a la minicolumna de QIAamp. Sacar el líquido a través de la columna con bomba de vacío
 - b. Aplicar 750 uL de tampón ACW2 a la minicolumna de QIAamp. Sacar el líquido usando vacío
 - ii. Etapas adicionales:
 - 30 1. Aplicar 750 uL de etanol (96-100 %) a la minicolumna de QIAamp. Sacar el etanol con vacío.
 2. Centrifugar la minicolumna en un tubo limpio de 2 mL para secar por centrifugación
 3. Secar adicionalmente calentando la columna a 56 °C durante 10 minutos
 - iii. Etapa de elución
 - 35 1. El fabricante sugirió que se realiza la elución disponiendo 30 a 150 uL de tampón AVE en el centro de la minimembrana de QIAamp, incubando a temperatura ambiente durante 3 min y centrifugando a 2.000 x g durante 1 min para eluir el ácido nucleico.
 - 40 2. El fabricante también sugirió que se digiriera el ADN en la disolución de eluato usando RNasa libre de DNasa con una purificación adicional usando columnas de purificación de RNeasy. Resultados: Se encontró que este procedimiento era insatisfactorio y dio de muy poco a ningún ARN o ADNc resultante.
 3. El fabricante sugirió insistentemente que no funcionaría el tratamiento con DNasa en la columna. Los inventores intentaron la siguiente sugerencia del fabricante para otro producto comercialmente disponible: kit de retrotranscripción Quantitect, que retrotranscribe así como digiere ADN en disolución. Resultados: Este kit de

retrotranscripción Quantitect produjo de muy poca a ninguna señal de ADNc resultante cuando la PCR se amplificó con cebador/sondas de beta-actina.

4. Los inventores eluyeron dos veces con el mismo tampón y luego

5 a. Disponer 60 uL de tampón AVE en el centro de la minimembrana de QIAamp, incubar a temperatura ambiente durante 3 min, centrifugar a 20.000 x g durante 1 min, sacar el eluato del tubo de recogida, ponerlo de nuevo en la minimembrana de QIAamp Mini otra vez, incubar durante 3 min adicionales y centrifugar para eluir.

b. Puesto que el ADN se digirió en la columna, no se requirió purificación.

10 5. A continuación, se retrotranscribió el ARN en ADNc usando el kit de retrotranscripción VILO (Life Technologies) y cebadores de hexámeros al azar, seguido por la unión de hexámeros al azar a temperatura ambiente durante 10 minutos, extensión a 42 °C durante 60 minutos, destrucción térmica de la enzima a 85 °C durante 15 minutos.

15 a. Se purificó el ADNc resultante usando columnas de purificación de ADNmc y ARN ZYMO por instrucciones del fabricante. Esto se puede hacer en algunas realizaciones.

b. Se usó PCR de ADNc usando cebador/sondas de beta-actina para determinar la cantidad relativa de ARN. La lectura QUBIT de concentraciones de ARN no indicó la aparición de ARN.

20 6. El ADNc resultante se amplificó por PCR con cebador/sondas desarrollados para amplificar secuencias de ARN en vez de ADN por extensión de intrones cuando fuera posible.

7. Se realizaron controles no RT (ARNs no retrotranscritos) para descartar la presencia de ADN amplificable en la muestra.

25 8. En otra realización, se usaron técnicas de extracción robóticas para aislar ARN del plasma del paciente.

30 A diferencia de lo que enseñó el fabricante y el actual estado de la técnica con respecto a la estabilidad del ARN y cómo tratar ARN, el procedimiento de extracción de ARN utiliza una combinación de tubos de extracción de sangre estabilizada de ARN, una digestión con DNasa en la columna, la elución doble de ARN (pasando el primer eluato de nuevo a través de la columna para aumentar el rendimiento) y el procesamiento inmediato del plasma separado de la sangre estabilizada con BCT. El ARN es inestable en plasma incluso en condiciones de congelación. No parece que los tubos de ARN estabilizados con BCT de Streck protejan el ARN de la degradación después de la congelación.

35 Se desarrollaron algoritmos para determinar los rendimientos de ARN (ADNc retrotranscrito) comparando los Cts resultantes de PCR de ADNc de plasma usando cebador/sondas de beta-actina y hexámeros al azar con ADNc de concentraciones conocidas de controles tales como el ARN de referencia humana universal (UHR) de Agilent. En general, se establece un valor para un ADNc de control conocido a incluir en cada serie de PCR de muestras desconocidas para determinar la expresión relativa de las muestras desconocidas. Se usa el método de delta-delta Ct descrito en la sección 00033 para el cálculo de expresiones relativas. Los controles pueden ser ARN de línea celular (tal como UHR) comprado o se pueden enriquecer fragmentos de ADNc sintéticos con ADNc de control no mutante o normal para cada gen de interés.

40 Se emplearon cebadores y sondas para amplificar la hebra de ADNc resultante de la retrotranscripción usando hexámeros al azar.

Ejemplo 2

45 Se extrajo sangre de un paciente con cáncer de colon en tubos que contenían un agente estabilizante de ARN (tubos BCT de ARN de Streck) y se almacenaron durante la noche a temperatura ambiente. Se separó el plasma por centrifugación y se extrajo ARN usando el kit de ácidos nucleicos circulantes de Qiagen. Se determinó la expresión génica relativa usando una plataforma de Taqman en tiempo real (ABI 7900) con cebadores específicos para ERCC1, KRAS WT y beta-actina. Los cálculos se hicieron usando un método de delta CT entre el nivel de los productos de PCR para el gen de mantenimiento estándar, beta-actina y los productos de PCR de cebadores específicos de ERCC1 y KRAS WT, respectivamente. Los resultados se muestran en la **Figura 1** que muestra la expresión relativa de ERCC1 y KRAS frente a beta-actina de ARN sin células extraído de plasma de pacientes con cáncer de colon. La Figura 18 muestra la expresión de ERCC1 en pacientes con mutaciones KRAS (rojo), NRAS (verde), BRAF (amarillo) o sin mutaciones (azul).

Ejemplo 3

El experimento descrito en este ejemplo evaluó la posibilidad de que la señal de ERCC1 se pudiera obtener del ADN residual que queda en el plasma después de la digestión con DNasa. La porción superior de la **Figura 2** muestra el panel de expresión por PCR usando ARN que se ha retrotranscrito en ADNc. El panel inferior muestra los resultados negativos de amplificar las muestras usando ARN no retrotranscrito. Cualquier amplificación de ADN residual que hubiera contribuido al ensayo de expresión en el panel superior hubiera producido una señal usando ARN no retrotranscrito. La señal de PCR es específica de ARN y muestra además que el ARN no retrotranscrito (no-RT) no genera señal de PCR de fondo.

Ejemplo 4

El experimento descrito en este ejemplo evaluó el estado de la mutación KRAS en ADN de las muestras usadas para medir la expresión génica. Como se muestra en la **Figura 3**, estos datos se generaron para mostrar que las muestras en el estudio reflejaron, en general, las frecuencias de mutación genética de KRAS en cáncer de colon. Se encontraron en este conjunto de muestras variantes de la mutación KRAS de frecuencia esperada, así como la aparición de niveles de genes no mutantes de referencia KRAS. La variante de mutación de KRAS más frecuente en el cáncer de colon fue KRAS G12D, seguida por G12V y la menos frecuente G13D. Estadísticamente, los mutantes G12D y G12V se deben haber identificado en este pequeño número de pacientes, mientras que se necesitaría un mayor número de pacientes para identificar una mutación G13D. Se amplificó por PCR el ADN de referencia de KRAS usando un área del gen que carece de mutaciones. Todas las muestras del paciente deben contener las secuencias de ADN de referencia de KRAS.

Ejemplo 5

En este ejemplo y como se representa en la **Figura 4**, una mutación KRAS específica determinada de ADN sin células se reflejó en el ARN del mismo paciente. Se exudó del tumor ADN sin células en la corriente sanguínea. Este ejemplo confirmó la hipótesis de que si ARN sin células refleja ADN sin células del tumor, entonces el estado de mutaciones para un gen debe ser concordante en estos dos ácidos nucleicos. Éste fue el caso para el análisis del paciente con cáncer de colon 1037.

Se realizó análisis adicional para la presencia de la mutación KRAS G12D en el paciente 1037 usando tecnología de PCR digital como segunda plataforma.

Ejemplo 6

En este ejemplo y como se representa en la **Figura 5**, los presentes inventores fueron capaces de evaluar el porcentaje de alelo mutante KRAS con respecto al alelo no mutante. Con el fin de este estudio, los presentes inventores usaron la segunda plataforma y el segundo ensayo para validar la existencia de la mutación KRAS G12D en esta muestra de paciente.

La Figura 12 muestra la cantidad relativa de KRAS G12D por mL de plasma en ADN y ADNc/ARN.

Se usaron cebador / sondas de PCR específicas de alelo con o sin cebadores de bloqueante no mutante para evaluar el estado de mutaciones de KRAS de las muestras de plasma de pacientes con cáncer colorrectal. Se obtuvieron los mismos resultados. En la medición de las mutaciones en ADNc retrotranscrito de ARN, se usaron cebador / sondas de PCR específicas de alelo. Además, se diseñan y usan cebadores bloqueantes no mutantes para potenciar adicionalmente la sensibilidad de la señal de la amplificación por PCR de ARN/ADNc.

Se pueden obtener elevada sensibilidad y especificidad de la elevada señal de ARN frente a ADN. Puesto que existen múltiples fragmentos de ARN transcritos de ADN, los presentes inventores esperarían que la señal fuera más alta del análisis por PCR de ADNc retrotranscrito de ARN frente a ADN genómico. En la **Figura 6**, los presentes inventores muestran la relación en la señal entre ARN y ADN. La mediana de la señal de PCR de ARNm retrotranscrito (ADNc) extraído de plasma de pacientes con cáncer de colon fue aproximadamente siete veces superior a la del ADN correspondiente. Fue despreciable el ruido de fondo de ARNm no retrotranscrito.

Ejemplo 7

Se usaron métodos de purificación de ADNc en columna para potenciar adicionalmente la señal de ARN con respecto a la de ADN. Sin desear quedar ligado a teoría, los métodos de purificación potenciaron la señal de ARN disminuyendo las sustancias inhibitoras en las reacciones de retrotranscripción y concentraron el ADNc. Como se muestra en la **Figura 7**, el rendimiento de ARN fue hasta 60 veces superior al de ADN. El rendimiento medido por Cts relativos de beta-actina por volumen proporcional de ADNc (ARN) frente a ADN se extrajo de plasma del mismo paciente. Se ajustaron los parámetros de ciclado y las reacciones de purificación con retrotranscriptasa para aumentar la señal de ARN.

Ejemplo 8

El ADN sin células (ADNsc) liberado en la circulación sanguínea por los tumores permite la identificación no invasiva de mutaciones iniciales específicas de tumor. Sin embargo, no todos los cambios moleculares en los tumores implican mutaciones de ADN; en muchos casos también es la cantidad de un gen particular (es decir, la expresión génica) lo que es importante. Se midió el ARN sin células (ARNsc) liberado en la sangre para monitorizar la expresión del gen PD-L1 en pacientes con CPCNP. La vía de PD-1/PD-L1 es una diana terapéutica prometedora y agentes anti-PD-L1 han mostrado actividad favorable en una variedad de tipos de tumor.

Se recogieron muestras de sangre de pacientes con CPCNP en diversos momentos durante la terapia. Además, se obtuvieron muestras de sangre que no tenían cáncer de voluntarios sanos ("grupo de control"). El plasma se fraccionó de las muestras de sangre y se extrajeron los ácidos nucleicos. Se retrotranscribió el ARN en ADNc usando cebadores al azar, y luego se analizó por RT-PCR cuantitativa usando cebadores específicos de gen apropiados. Se cuantificó el ADNc de PD-L1 en tanto pacientes con cáncer como el grupo de control. También se cuantificó la expresión de ERCC1 como un ejemplo de un gen no específico de tumor. Se usó la expresión de β -actina como el gen denominador que representa ARN total.

Se detectó la expresión de PD-L1 en el ARNc de 70 % (7/10 muestras de plasma) de pacientes con CPCNP, pero no se detectó en ninguna muestra del grupo de control (0/9), ($p = 0,0031$, prueba exacta de Fisher) (Fig. 8). Se detectó la expresión de ERCC1 en 100 % (10/10) de pacientes con CPCNP y 67 % (6/9) del grupo de control, sin observarse diferencia significativa en la expresión relativa de los detectados ($p = 0,2328$, prueba de Wilcoxon para datos independientes) (Fig. 9). La mediana de las expresiones relativas de β -actina en pacientes con cáncer y el grupo de control fueron 15,52 (0,54 - 94,91) y 0,53 (0 - 1,03), respectivamente ($p = 0,0008$, prueba de Wilcoxon para datos independientes) (Fig. 10).

Estos datos demuestran el posible valor de uso de ARNsc de sangre para medir expresiones génicas para la detección de cáncer y su reaparición, y en la selección y monitorización de terapias. La presencia de ARNsc de PD-L1 en sangre puede ser un indicador específico de cáncer, aunque su sensibilidad de detección de tumores es inferior a 100 % debido a que no se expresa en todos los pacientes con cáncer. La expresión de ERCC1 ejemplifica un gen sin diferencia significativa en el nivel de expresión en pacientes con cáncer e individuos sanos. La diferencia sorprendentemente grande (aproximadamente 30 veces) en la mediana de ARNsc total entre pacientes con cáncer e individuos sanos sugiere que el ARNsc total puede ser útil como un indicador preliminar sensible de la presencia de cáncer y para la monitorización de la reaparición. La Figura 14A muestra la frecuencia relativa de la expresión del gen PD-L1 en pacientes con cáncer colorrectal (CCR), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) e individuos sanos, 17,4 % de pacientes con CCR, 50 % de pacientes con CPCNP y 0 % de individuos sanos tienen aumentos relativos en la expresión de PD-L1. La Figura 14B muestra que los niveles relativos de expresión del gen PD-L1 son similares entre pacientes con CCR y CPCNP positivos para PD-L1.

Ejemplo 9

En cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), se han identificado varios cambios genéticos que tienen consecuencias clínicas para los enfoques de tratamiento elegidos. En cuanto a las mutaciones de EGFR, las mutaciones ya son opciones para más de una línea de tratamiento. Para pacientes con cambios secundarios como resistencia mediada por T790M a inhibidores de EGFR, los inhibidores de tirosina cinasas (TKI) irreversibles parecen ser una alternativa prometedora. Estas opciones se pueden limitar, sin embargo, a prueba ausente de dichos cambios y que con carga tumoral en progresión los pacientes pueden ser susceptibles a mayor mortalidad con procedimientos invasivos necesarios. La denominada "Biopsia líquida" – usando sangre periférica para obtener información oportuna sobre información genética en tumores malignos sólidos – parece ser la solución urgentemente necesaria a este problema. Se necesitan métodos que cumplan la promesa de cambio rápido y amplia disponibilidad.

La correlación de los resultados de la detección de mutaciones de suero se correlacionó significativamente con la medición del espécimen de tumor disponible. Además, las frecuencias esperadas estuvieron en línea con la aparición publicada de cambios genéticos. Sin embargo, hubo un posible sesgo ya que las mutaciones T790M fueron superiores a las esperadas, que puede ser debido a la selección de pacientes específica del centro del cáncer. Estos resultados estuvieron en línea con muestras frescas de sangre probadas. El cambio de las muestras frescas fue tres (3) días.

Es factible la detección de mutaciones de sangre periférica con cambio rápido y alta sensibilidad y especificidad. Además, se pueden usar muestras o frescas o como sondas de suero almacenadas. Esto permitirá decisiones de tratamiento más rápidas y mayor satisfacción del paciente debido a intervalos más cortos hasta el inicio de la terapia. El método descrito en el presente documento para detectar mutaciones de líquido (por ejemplo, suero o sangre) es una alternativa clara y médicamente necesaria para analizar muestras de tejido. Este método será crucial, especialmente en casos de cambios secundarios a tumores durante la terapia sistémica.

Ejemplo 10

En este ejemplo, se utilizan los métodos de la presente invención en la prueba dinámica en la progresión de la enfermedad y el tratamiento. La Figura 13B muestra una disminución esperada en la expresión de PD-L1 en ARNsc durante el transcurso del tratamiento en un paciente respondedor.

5 La Figura 15A muestra un aumento en la monitorización de la fracción de alelos de ADNsc para KRAS G12V durante todo el tratamiento del cáncer colorrectal con Regorafenib/Cetuximab. La Figura 15B muestra que con el tiempo en el transcurso del tratamiento existe una disminución en la expresión relativa de PD-L1 en ARNsc durante el tratamiento del cáncer colorrectal con Regorafenib/Cetuximab. La Figura 15C muestra la expresión relativa de ERCC1 con el tiempo durante el tratamiento del cáncer colorrectal con Regorafenib/Cetuximab.

10 La Figura 16 muestra la expresión relativa génica de ARNsc en pacientes con cáncer colorrectal durante el tratamiento con crizotinib y FOLFOX para PD-L1, ERCC1 y KRAS G12D.

La Figura 17 muestra la expresión relativa génica de ARNsc en pacientes con cáncer colorrectal durante el tratamiento con FOLFIRI/Bevacizumab y Regorafenib/Cetuximab para ERCC1 y KRAS G12D.

15 Los métodos de la presente invención proporcionan formas no invasivas, o menos invasivas, para monitorizar la progresión de la enfermedad o respuesta terapéutica en momentos de tiempo antes, durante y después del tratamiento.

Además, los métodos se pueden usar para evaluar la expresión relativa génica en la búsqueda de dianas adicionales para terapia. Por ejemplo, la Figura 19 muestra la expresión relativa monitorizada en ARN sin células de PD-L1 y HER2 en un paciente con cáncer gástrico. Los datos indican un aumento en la expresión de PD-L1 y HER2 tras la monitorización inicial que presenta dos dianas adicionales para terapia.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de la presencia de uno o más biomarcadores asociados al cáncer en una muestra biológica de un individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo dicho método:
- 5 a. aislar ARN sin células (ARNsc) de la muestra biológica usando un soporte sólido, en donde la muestra biológica ha interactuado con un estabilizador de ARN;
- b. digerir el ADN existente de la muestra biológica mientras que el ARNsc está sobre el soporte sólido;
- c. eluir el ARNsc al menos una vez del soporte sólido;
- d. retrotranscribir el ARNsc en ADNc;
- 10 e. hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar un biomarcador asociado al cáncer, en donde el biomarcador es una mutación en el gen PD-L1 o transcrito de fusión del gen PD-L1 o nivel de expresión génica de PD-L1; y
- f. determinar si el biomarcador está presente en la muestra biológica, en donde la presencia del biomarcador identifica si el individuo tiene el biomarcador asociado al cáncer.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el eluato de la etapa (c) se pasa por la misma columna para una elución doble.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la muestra biológica es plasma del individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer, en donde opcionalmente el plasma se procesa en el plazo de 7 días desde la interacción con el estabilizador de ARN.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde en la etapa (d) se usan hexámeros al azar para retrotranscribir el ARNsc en ADNc.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, que comprende además hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar otro biomarcador, en donde el otro biomarcador es una mutación en un gen o transcrito de fusión o expresión génica seleccionado del grupo que consiste en ERCC1, KRAS y Her-2.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 o 5, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer gástrico, de esófago, de mama, de ovario, sarcoma, cáncer de células renales, de próstata, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI) y cáncer pancreático.
7. Un método de evaluación de la expresión relativa génica en la búsqueda de una diana para terapia en ARN sin células (ARNsc) en una muestra biológica de un individuo que tiene o que se sospecha que tiene un cáncer gástrico, comprendiendo dicho método:
- 30 las etapas a. a d. como se define en la reivindicación 1; y
- e. hacer reaccionar el ADNc con cebadores específicos de gen de uno o más biomarcadores asociados al cáncer, en donde el uno o más biomarcadores son el gen PD-L1 o el gen PD-L1 y el gen HER2; y
- f. monitorizar los niveles relativos de expresión del uno o más biomarcadores, en donde elevados niveles relativos de expresión del uno o más biomarcadores indican la diana para la terapia.
- 35 8. Un método de determinación de la probabilidad de un individuo que tiene cáncer o que se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo dicho método:
- las etapas a. a e. como se definen en la reivindicación 1; y
- f. detectar si el biomarcador asociado al cáncer está presente en la muestra biológica, en donde la presencia del biomarcador determina la probabilidad de que el individuo tenga cáncer.
- 40 9. Un método de ayuda en el diagnóstico de la probabilidad de un individuo que tiene cáncer o que se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo dicho método:
- las etapas a. a e. como se definen en la reivindicación 1; y
- f. detectar si el biomarcador asociado al cáncer está presente en la muestra biológica, en donde la presencia del biomarcador ayuda en el diagnóstico de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer.
- 45 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 o 9, en donde el eluato de la etapa (c) se pasa por la misma columna para una elución doble.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, 9 o 10, en donde la muestra biológica es plasma del individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer, en donde opcionalmente el plasma se procesa en el plazo de 7 días desde la interacción con el estabilizador de ARN.
- 50

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, 9, 10 u 11, en donde en la etapa (d) se usan hexámeros al azar para retrotranscribir el ARNsc en ADNc.
13. El método de la reivindicación 7, que comprende además hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar otro biomarcador, en donde el otro biomarcador es una mutación en un gen o transcrito de fusión o expresión génica de ERCC1.
- 5
14. El método de las reivindicaciones 8 o 9, que comprende además hacer reaccionar el ADNc con al menos un cebador que es específico para detectar otro biomarcador, en donde el otro biomarcador es una mutación en un gen o transcrito de fusión o expresión génica seleccionado del grupo que consiste en ERCC1, KRAS y Her-2.
- 10
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer gástrico, de esófago, de mama, de ovario, sarcoma, cáncer de células renales, de próstata, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI) y cáncer pancreático.

Figura 1

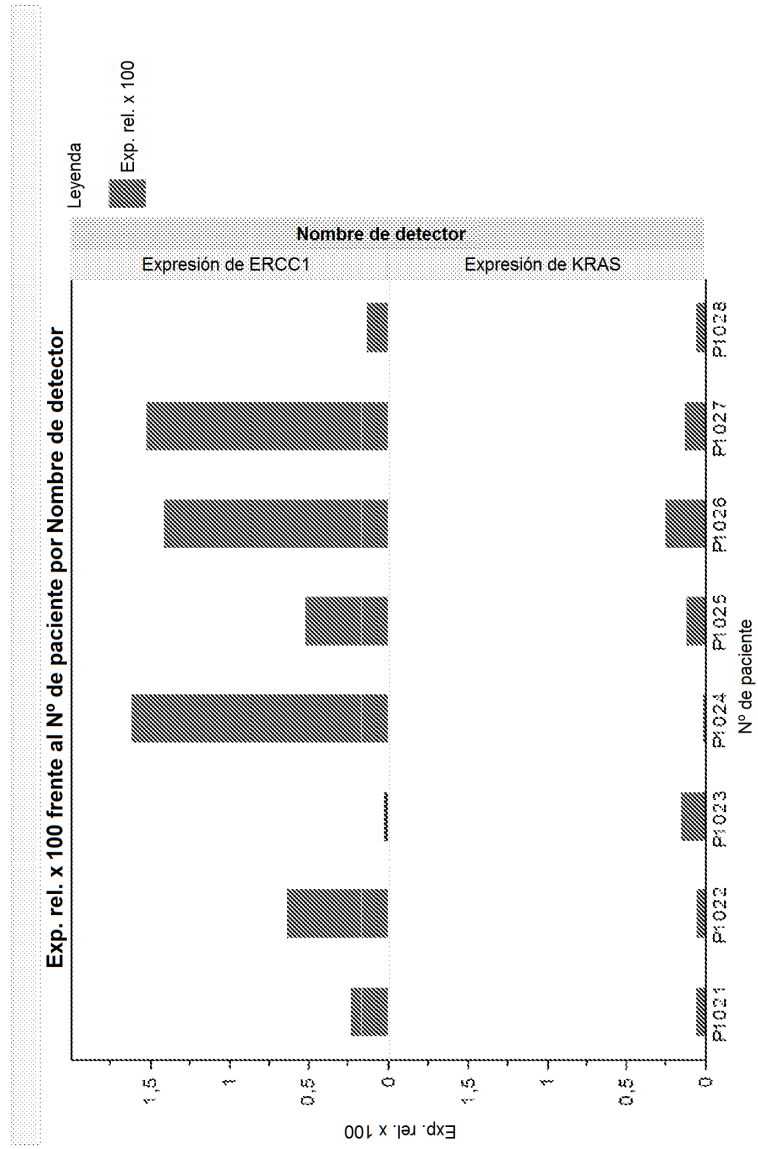


Figura 2

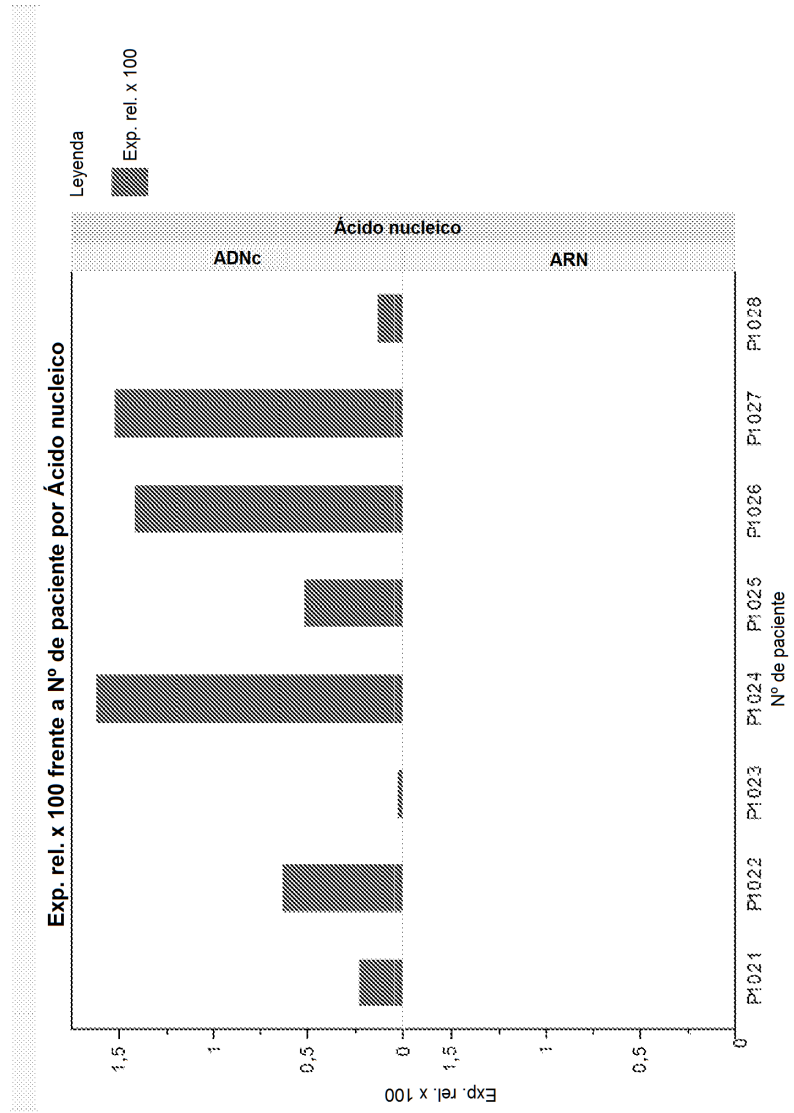


Figura 3

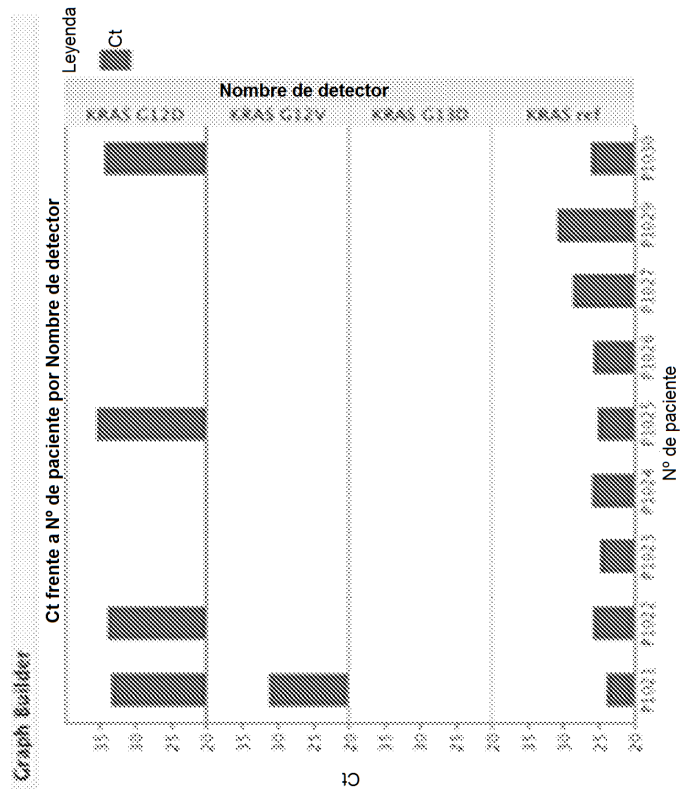


Figura 4

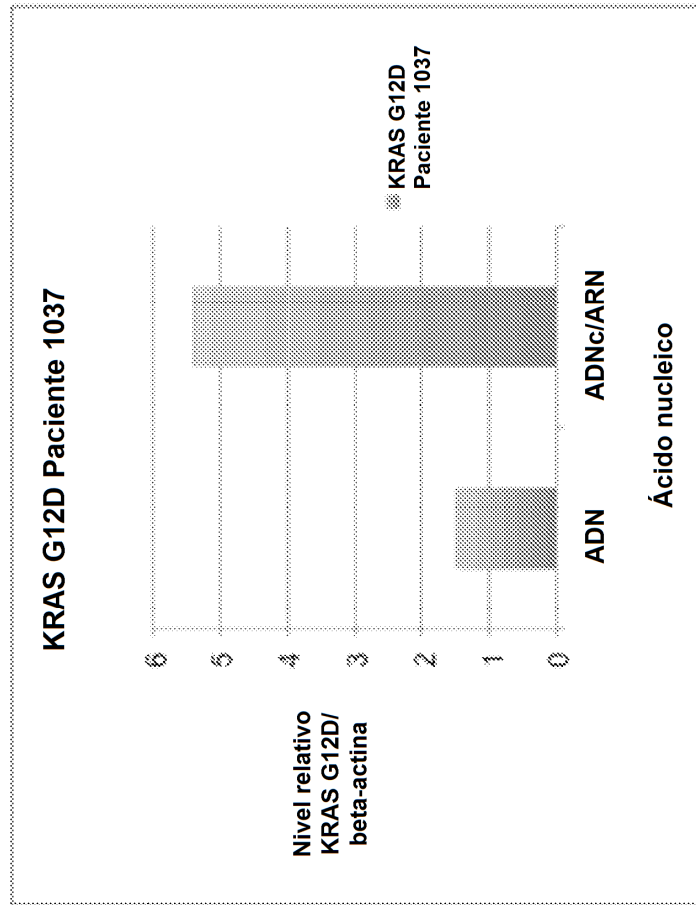


Figura 5

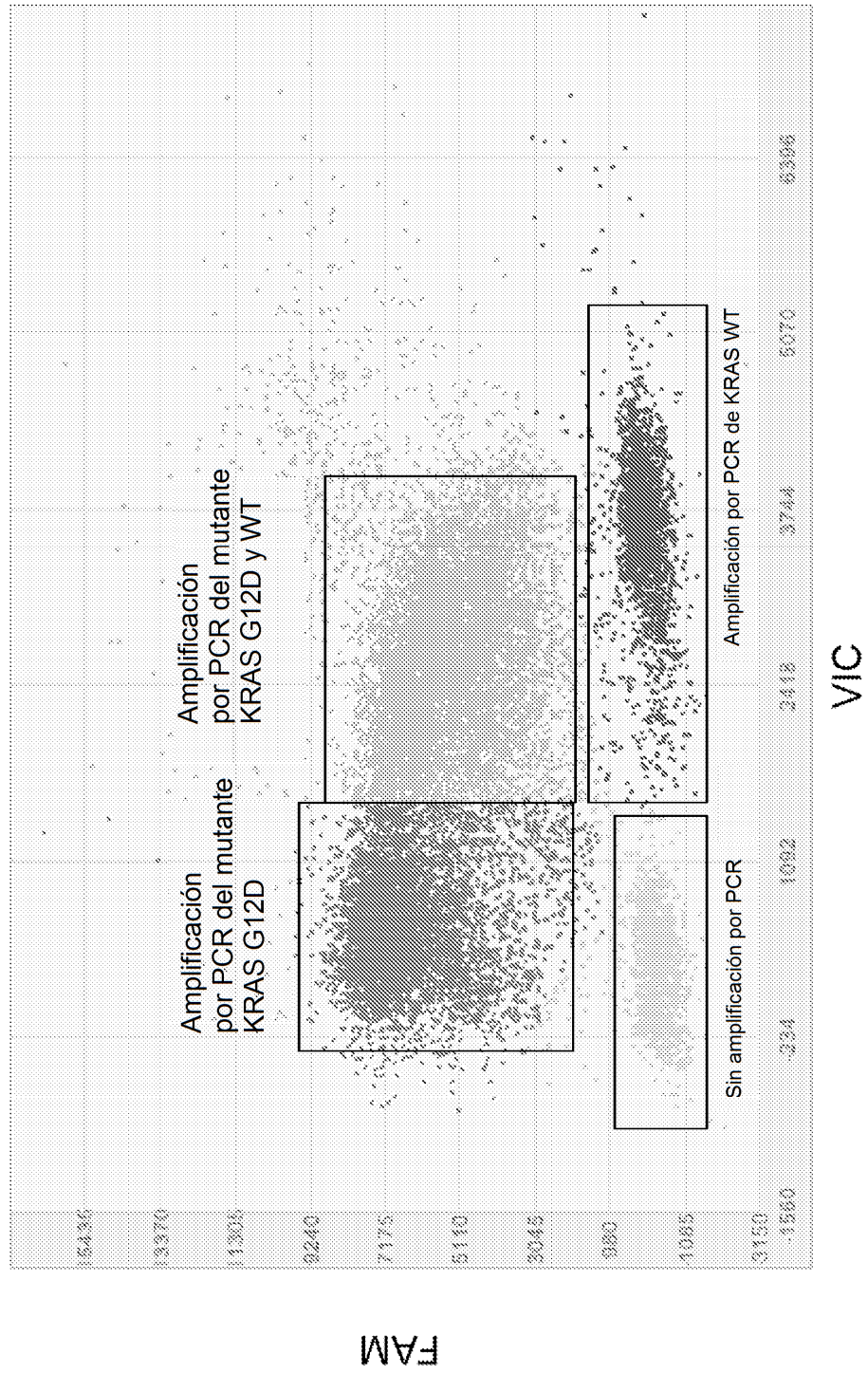
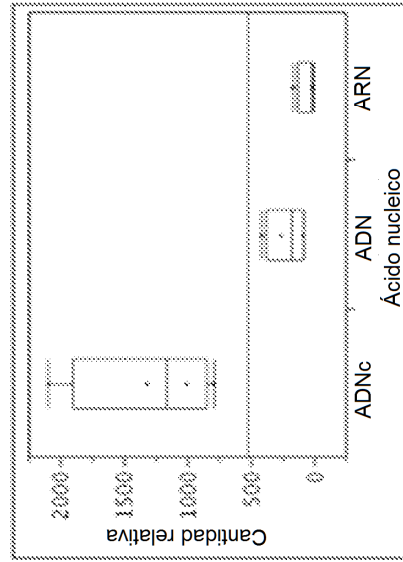


Figura 5 (continuación)

Ensayo	Muestra	Diana/ total	CI diana/total	Copias/ μ L (VIC)	CI Copias/ μ L (VIC)	Precisión (VIC)
G12D	S1053	63,93 %	60,48 % - 67,395 %	1056,5	1035,8 - 1077,6	2,00 %

Copias/ μ L (FAM)	CI Copias/ μ L (FAM)	Precisión (FAM)
1872,5	1838,4 - 1907,3	1,86 %

Figura 6



Cuantiles						
Nivel	Mínimo	10%	25%	Mediana	75%	Máximo
ADNc	786,88	786,88	840,89	1158,375	1896,83	2091,03
ADN	78,24	78,24	79,9375	171,405	374,195	413
ARN	1	1	2,64	12,715	127,67	164,27

Figura 7

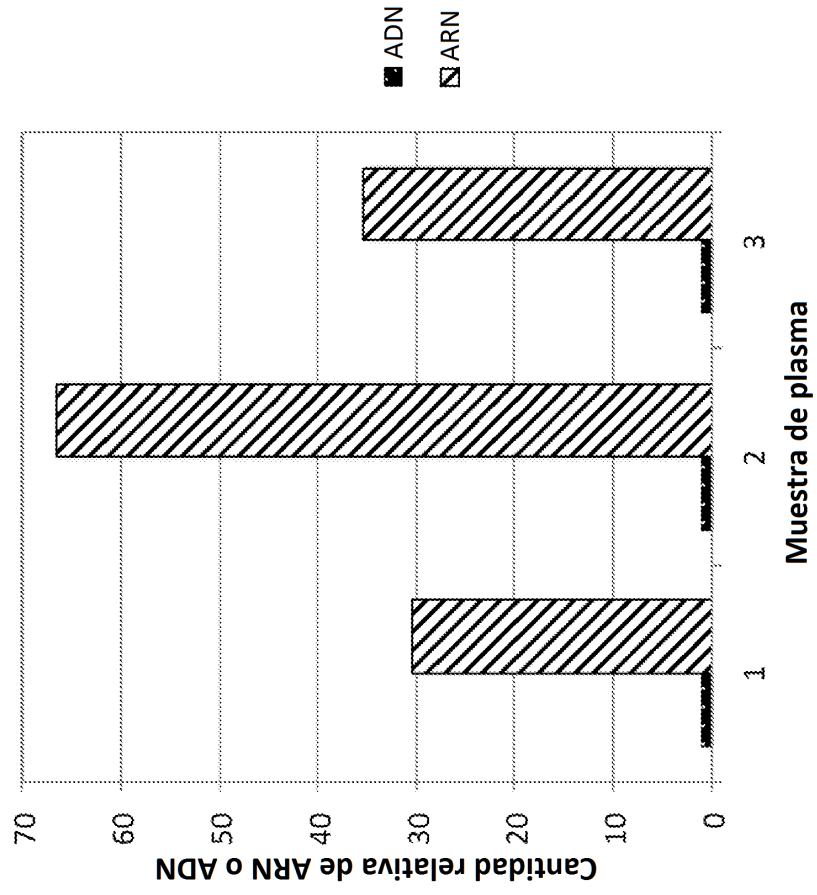


Figura 8

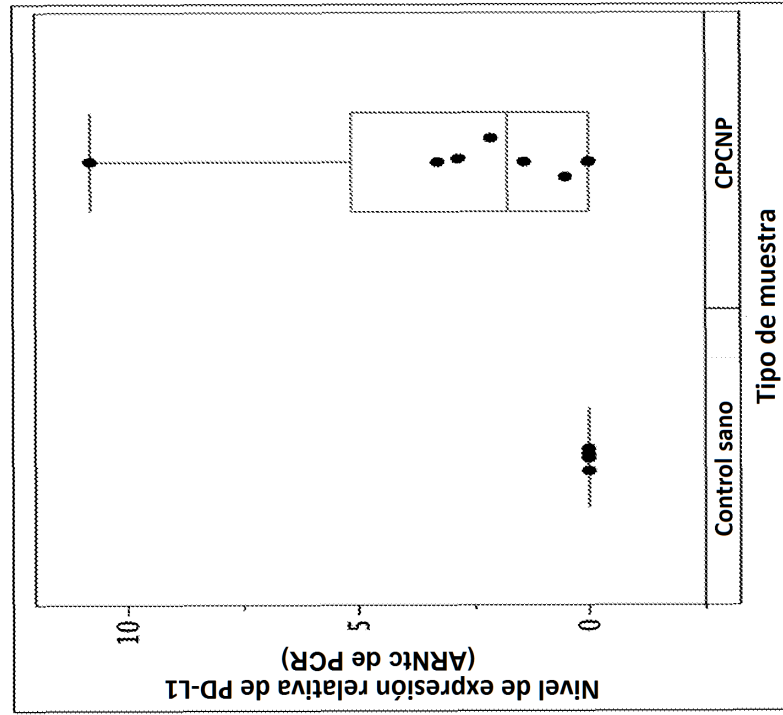


Figura 9

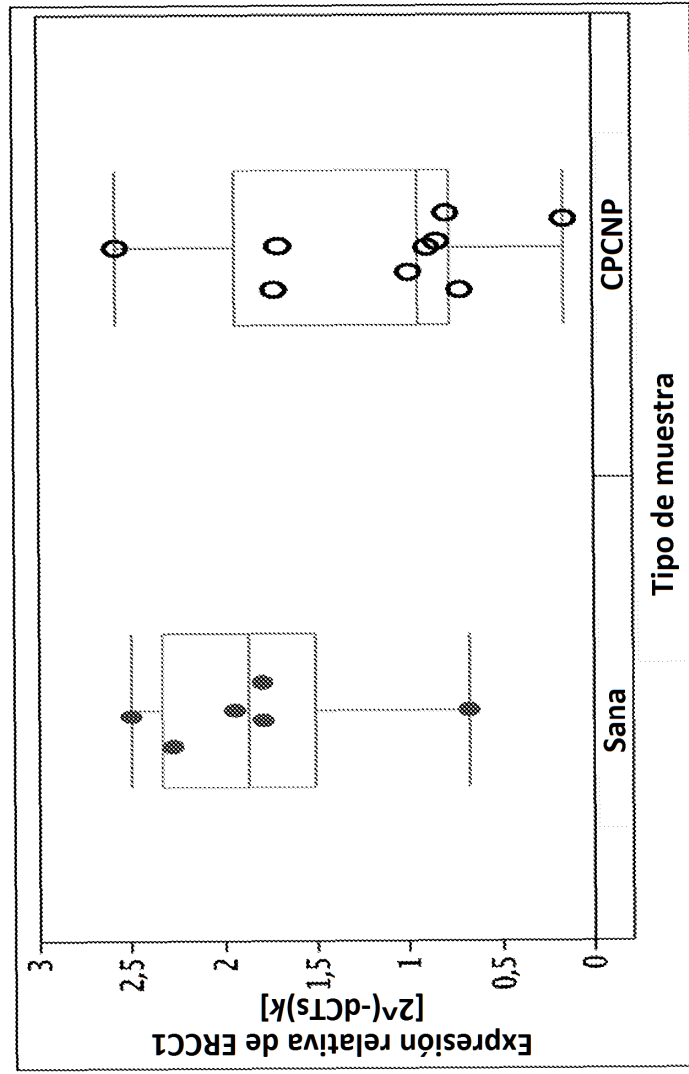


Figura 10

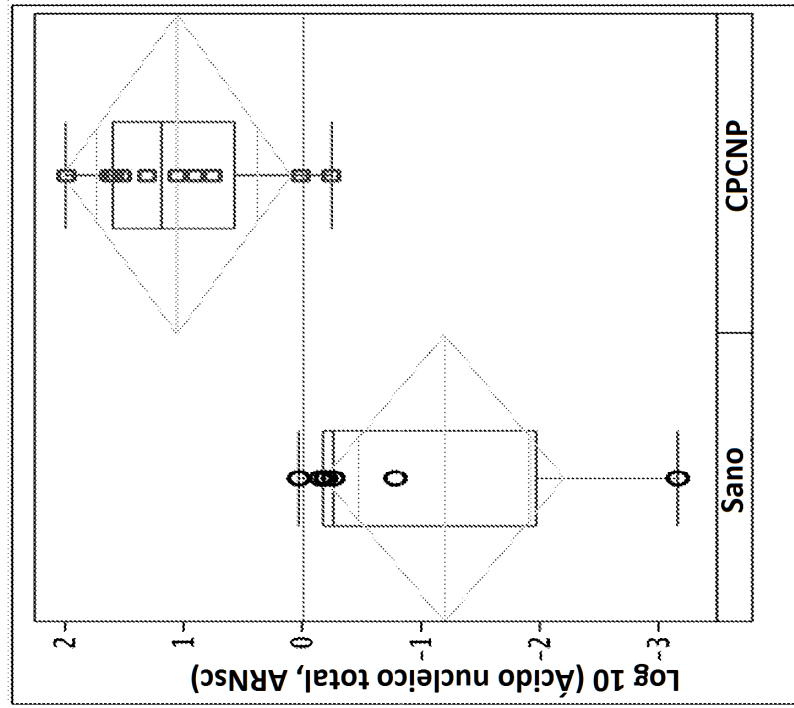


Figura 11

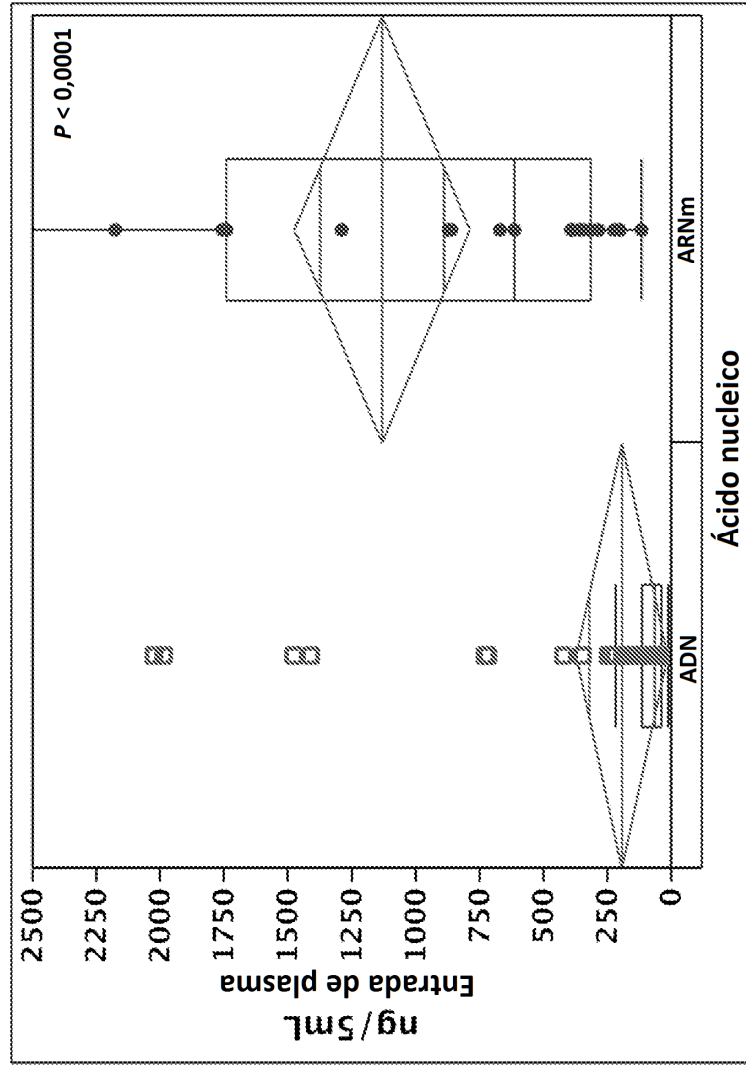


Figura 12

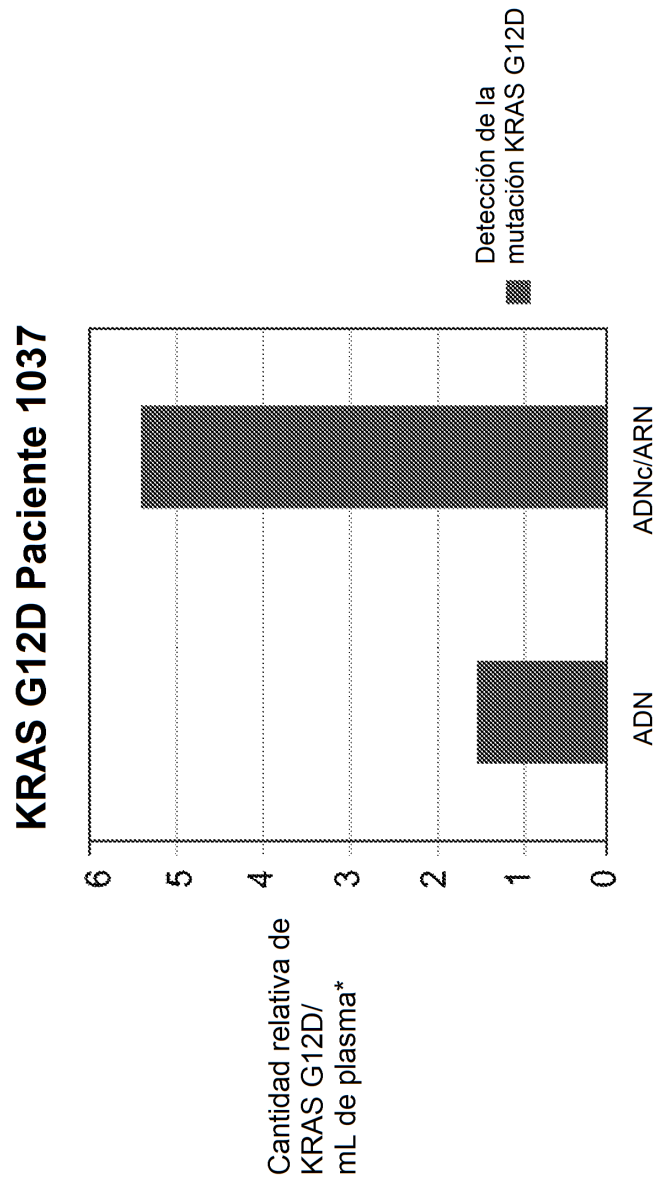


Figura 13

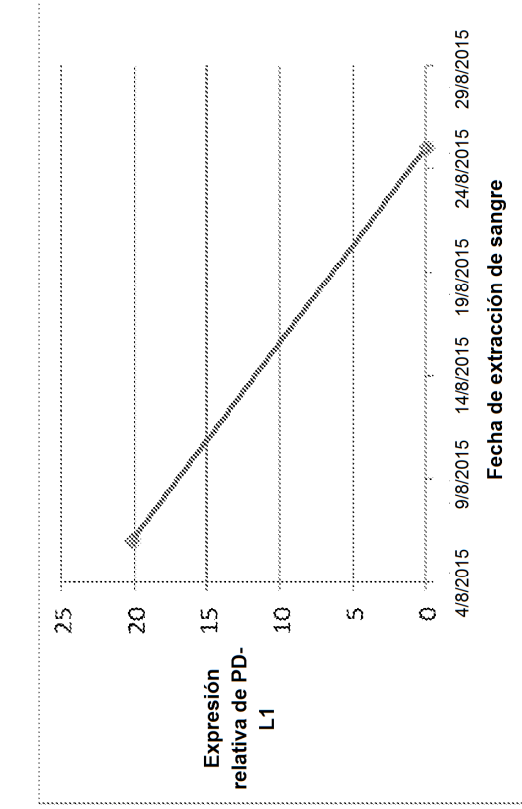


Fig. 13B

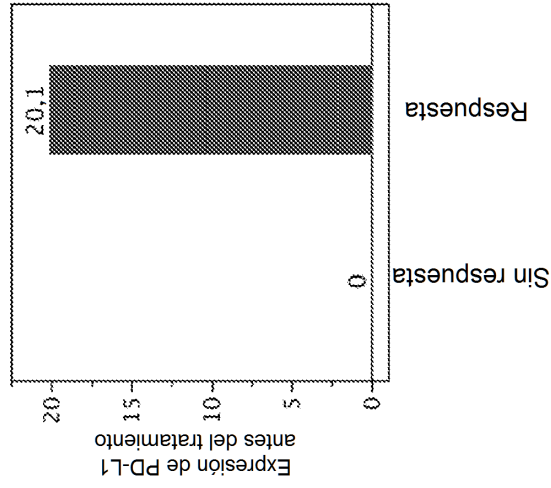


Fig. 13A

Figura 14

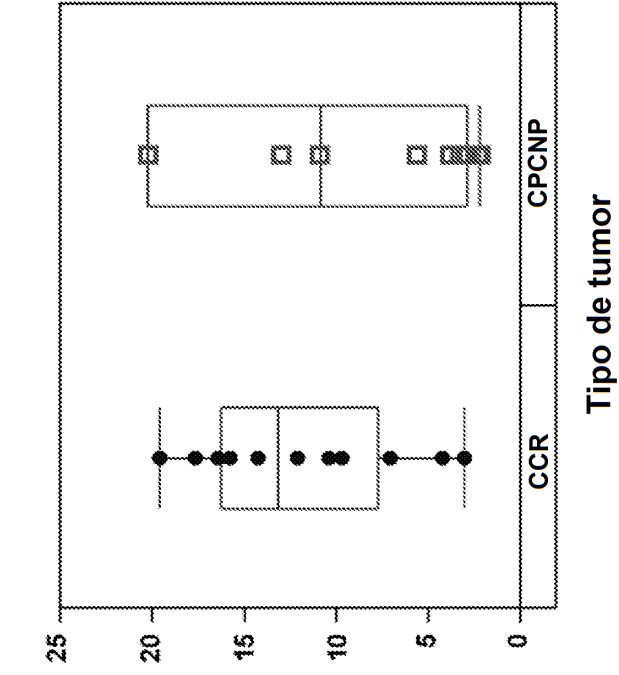


Fig. 14B

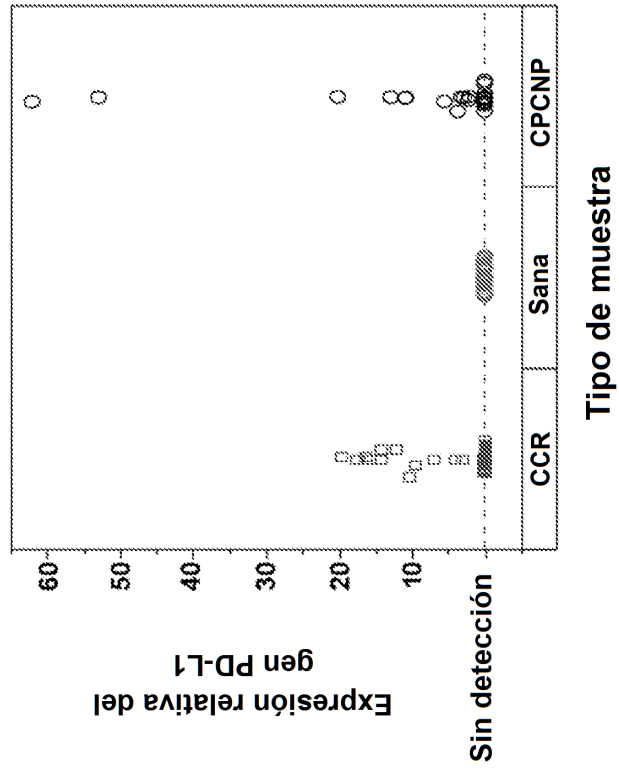
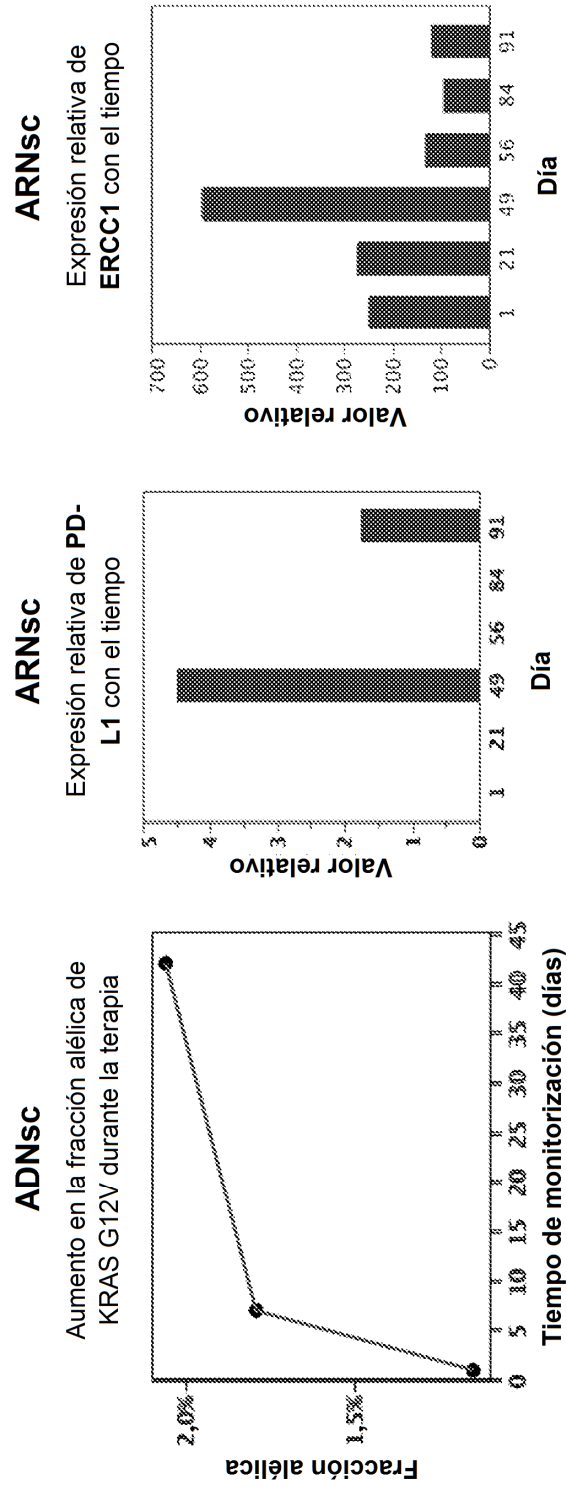


Fig. 14A

Figura 15

Monitorización de ADNsc y ARNsc durante la terapia Paciente con cáncer colorrectal: Regorafenib/Cetuximab



ES 2 790 823 T3

Se observan tendencias dinámicas en tanto el ADNsc como el ARNsc durante la terapia

Fig. 15A

Fig. 15B

Fig. 15C

Figura 16

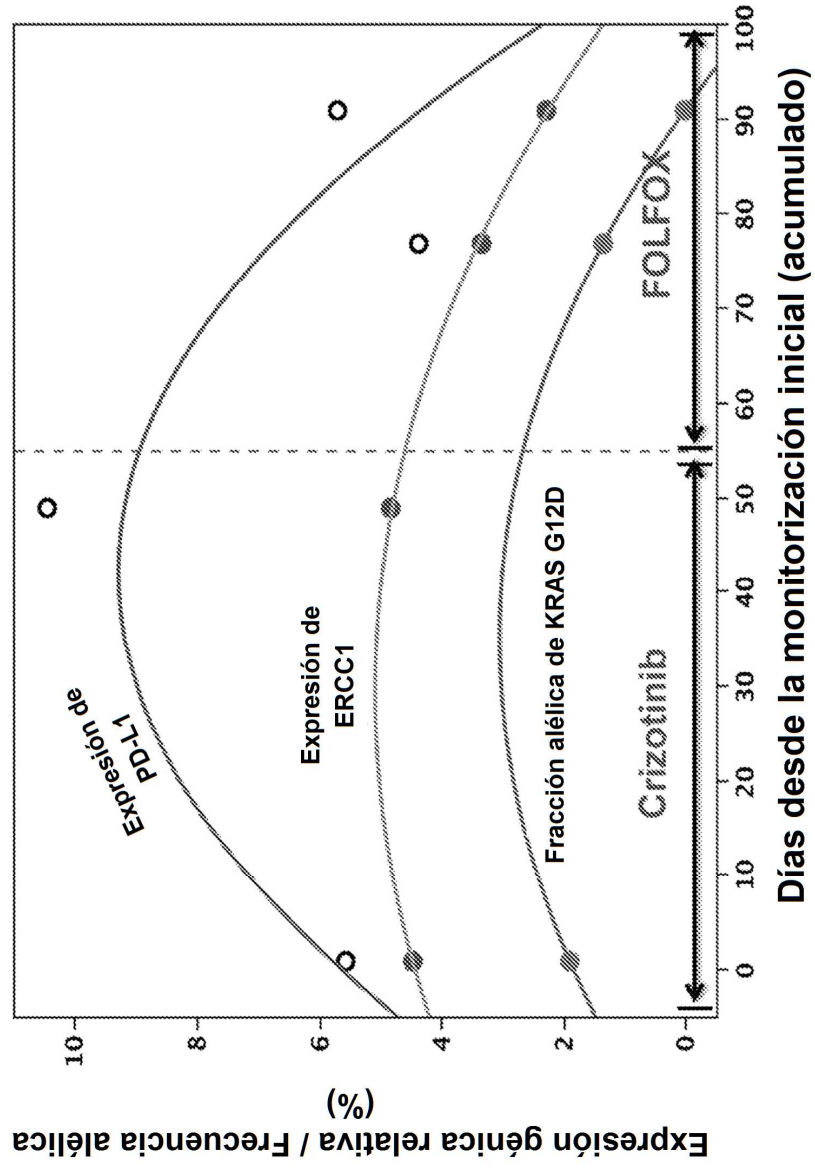


Figura 17

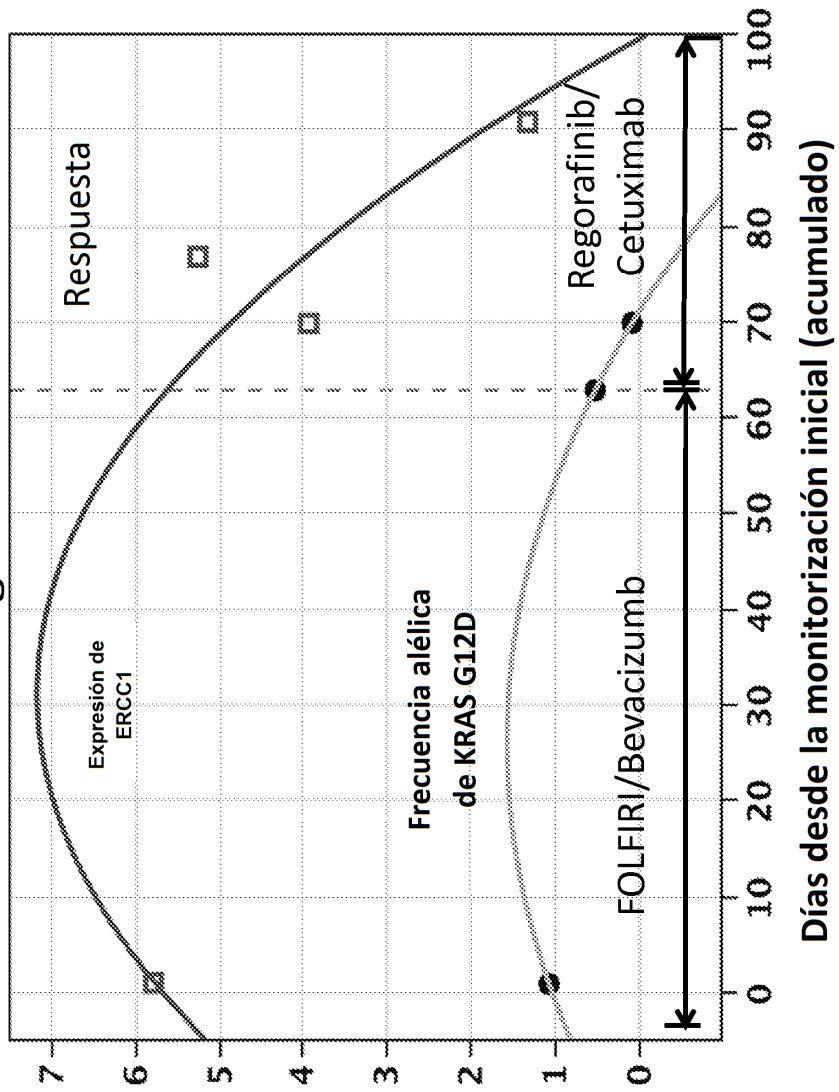


Figura 18

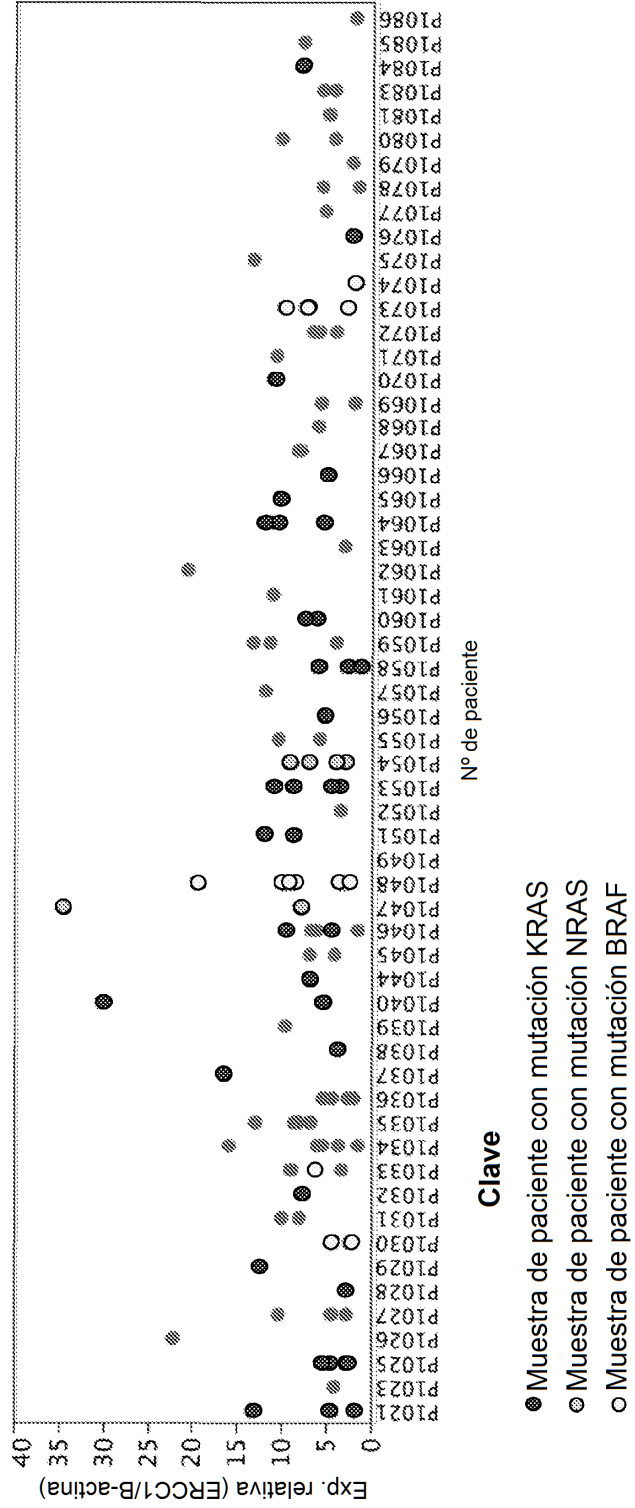
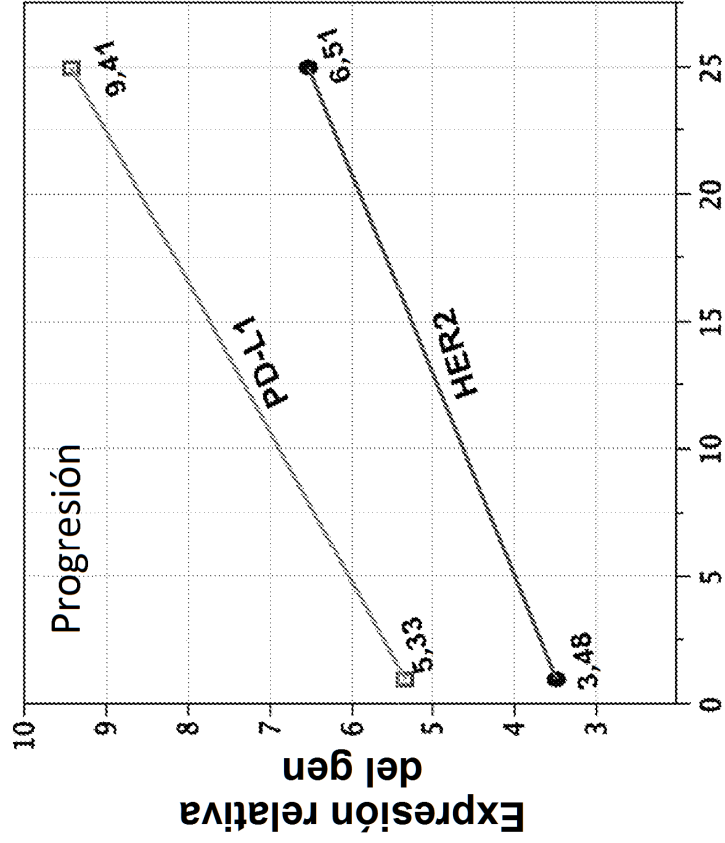


Figura 19



El análisis de ARN sin células proporciona dos dianas adicionales para terapia.

Días desde la monitorización inicial (acumulado)