

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 883**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2011 E 11727706 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2609213**

54 Título: **Métodos y composiciones para el diagnóstico de tumores del estroma gastrointestinal**

30 Prioridad:

**28.06.2010 EP 10167588**

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

**29.09.2015**

73 Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG  
(100.0%)  
Fahnenbergplatz  
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**VON BUBNOFF, NIKOLAS;  
LANGE, THORALF y  
MAIER, JACQUELINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 546 883 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para el diagnóstico de tumores del estroma gastrointestinal

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico y/o seguimiento de tumores del estroma gastrointestinal. El enfoque metodológico se basa en la detección y/o el análisis de una o más mutaciones específicas del tumor en los genes marcadores cKit y PDGFRA en muestras de ADN circulante.

**Antecedentes**

10 Los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) son uno de los tumores mesenquimales más comunes del tracto gastrointestinal (aproximadamente 1-3% de todas las neoplasias gastrointestinales). Aproximadamente 85% de los GIST albergan mutaciones activadoras (es decir de ganancia de función) en el gen cKit que codifica un receptor del factor de células madre que tiene actividad tirosina quinasa. Además, aproximadamente 35% de los GIST con un gen cKit de tipo salvaje tienen en cambio mutaciones en otro gen, PDGFRA (receptor-alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas), que es una tirosina quinasa relacionada (revisado, p. ej., por Corless, C. L. y Heinrich, M.C. (2008) *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 557-586). Estas mutaciones son un evento temprano en la progresión de GIST.

15 Las onco-proteínas cKit y PDGFRA sirven como dianas para los inhibidores de tirosina quinasa de molécula pequeña tales como imatinib y sunitinib. Notablemente, el tratamiento con imatinib no es curativo a menos que esa posible la resección completa del tumor. En los GIST avanzados, metastasizados o irresecables, se puede lograr una remisión parcial en aproximadamente 50% de los pacientes tratados con imatinib. Sin embargo, la mayoría de los pacientes aún experimentan progresión de la enfermedad durante la recepción de imatinib (véase, p. ej., Verweij, J. et al. (2004) *Lancet* **364**, 1127-34; Blanke, C. D. et al. (2008) *J. Clin. Oncol.* **26**, 626-632). Además, también se encontró que estos pacientes responden solo transitoriamente a sunitinib (Demetri, G. D. et al. (2006) *Lancet* **368**, 1329-1338).

20 A pesar de que imatinib y sunitinib exhibieron efectos clínicos notables, sus eficacias dependen en gran medida del genotipo del GIST. Los fármacos encontraron resistencia intrínseca o adquirida durante el tratamiento, cuyos mecanismos moleculares eran dependientes también en gran medida del genotipo de GIST, incluyendo mutaciones primarias o mutaciones secundarias en los dominios quinasa de los correspondientes genes diana, respectivamente. Por lo tanto, los GIST avanzados pueden requerir un tratamiento multidisciplinar.

25 A partir de lo anterior, es evidente de inmediato que un requisito previo necesario para una terapia satisfactoria de los GIST es la provisión de métodos precisos para el diagnóstico, estadificación y/o seguimiento del progreso de este tipo de tumores, lo que, a su vez, permite un pronóstico y evaluación de riesgos fiables, y por lo tanto, la selección de una terapia apropiada.

30 Un enfoque de diagnóstico se basa en la inmunohistoquímica, en particular, en la tinción de cKit por medio de anticuerpos específicos. Sin embargo, aproximadamente 5-10% de los GIST son cKit negativos. Por consiguiente, la tinción cKit no da como resultado la detección fiable de todos los GIST; se requieren métodos adicionales y/o alternativos.

35 Se utilizan métodos de diagnóstico médico por imagen para la estadificación o el seguimiento del progreso de GIST incluyendo la tomografía por emisión de positrones-(PET), la tomografía computarizada (CT), la tomografía de resonancia magnética, y combinaciones de las mismas tales como PET-CT. La técnica de diagnóstico médico por imagen más sensible disponible en la actualidad es la tomografía de emisión por positrones con 2-desoxi-2-<sup>18</sup>F)fluoro-D-glucosa (FDG-PET). Sin embargo, la especificidad y la sensibilidad de este método están limitadas de manera que, por ejemplo, se pueden pasar por alto pequeños tumores o actividad tumoral residual después del comienzo de la terapia (Gambhir, S. S. et al. (2001) *J. Nucl. Med.* **42**, 1S-93S; Antoch, G. et al. (2004) *J. Nucl. Med.* **45**, 357-365). Además, incluso en los casos con respuesta completa a una terapia dada, las lesiones en la mayoría de los casos todavía contienen tumor viable (Bauer, S. et al. (2005) *Int. J. Cancer* **117**, 316-25). De este modo, en este momento no es posible medir la enfermedad residual en respondedores mediante PET-CT, y el desencadenante para cambiar el tratamiento es clínico o por la progresión morfológica del PET/CT. Además, FDG-PET (así como otros métodos de diagnóstico médico por imagen) requiere instrumentación analítica sofisticada, que es costosa tanto en términos de coste inicial y de mantenimiento, así como personal capacitado. Esto hace que este tipo de sistemas sean inadecuados para las prácticas médicas de rutina, las pruebas de "cabecera", o en lugares remotos.

40 Por consiguiente, todavía sigue existiendo una necesidad de métodos y composiciones mejorados que permitan el diagnóstico rápido, fiable y con ahorro de costes, la estadificación, y el seguimiento de tumores del estroma gastrointestinal.

55 El documento US 2007/0254295 publicado el 1 de Noviembre de 2007 cedido a Prometheus Laboratories Inc. proporciona métodos para analizar una combinación de biomarcadores para individualizar la terapia con inhibidores

de tirosina quinasa en pacientes que han sido diagnosticados de cáncer (véase el resumen del documento US 2007/0254295).

Las siguientes publicaciones están relacionadas con mutaciones en los genes cKIT y PDGFRA y tumores del estroma gastrointestinal: Lux Marcia et al. "KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors", American Journal of Pathology Vol. 156, Núm. 3, Marzo de 2000, páginas 791-795; Rubin Brian et al., "KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors", Cancer Research, Vol. 61, Núm. 22, 15 de Noviembre de 2001, páginas 8118-8121; Corless Christopher et al., "PDGFRA Mutations in gastrointestinal stromal tumors: Frequency Spectrum and in vitro sensitivity to imatinib", Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American society of clinical oncology, vol. 23, núm. 23, 10 de Agosto de 2005, páginas 5357-5364.

Las siguientes publicaciones y solicitudes de patente están relacionadas con el ADN circulante: Shapiro et al., "Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease", Cancer, American Cancer Society, vol. 15, Núm. 11, 1 de Enero de 1983, páginas 2116-2120; Gormally Emmanuelle et al., "Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance", Mutation Research, vol. 635, Núm. 2-3, Mayo 2007, páginas 105-117; y documento WO 01/42504.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar tales métodos para el diagnóstico y el seguimiento de los GIST.

### Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico y/o el seguimiento en un sujeto un tumor del estroma gastrointestinal como se reivindica en la reivindicación independiente 1.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo utilizada es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de plasma.

En realizaciones específicas, el método comprende adicionalmente la comparación de los resultados obtenidos en la muestra de ensayo con los obtenidos en una muestra de control.

En realizaciones específicas, el ADN es ADN circulante en plasma.

El método comprende cuantificar la cantidad de ADN mutado presente en la muestra de ensayo; en donde una cantidad elevada de ADN mutado en la muestra de ensayo es indicativa de progreso del tumor del estroma gastrointestinal.

Preferiblemente, las una o más mutaciones están situadas en una o más cualesquiera de las regiones correspondientes a los codones 456-508, 549-599, 642-654, 670-709, 786-823, y 829 del gen marcador cKIT (núm. acc. GenBank NM\_000222.2) y/o en una o más cualesquiera de las regiones correspondientes a los codones 478, 561-571, 687 y 824-846 y del gen marcador PDGFRA (núm. acc. GenBank NM\_006206.4).

En otras realizaciones preferidas, las una o más mutaciones en el gen marcador cKIT (núm. acc. GenBank NM\_000222.2) se seleccionan del grupo que consiste en: una delección de una o más cualesquiera de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los codones 550-558, 551-554, 553-558, 554-571, 557-558, 558-559, y 559-560, 560-578, 574-580, y 578; una delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los codones 554-561 combinada con la inserción del nucleótido CTT; una delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los codones 555-572 combinada con una inserción del nucleótido G; una delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los codones 559-560 combinada con la sustitución de nucleótidos AAG → AGG en el codón 558; una duplicación de una o más cualesquiera de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los codones 502-503 y 573-591; una inserción de la secuencia de nucleótidos ACCAACACAACCTTC CTTATGATCACAAATGGGAGTTTCCAGAAACAGGCTGAGTTTTGG en los codones 573-592; una inserción de la secuencia de nucleótidos GCAACAACAACAACCTTCCTTATGATCACAAATGGGAGTTTCC EN EL CODÓN 585; una inserción de la secuencia de nucleótidos TCCAACAACAACCTTCCTTATGATCACAAATGGGAGTTTCCCA en el codón 586; una inserción de la secuencia de nucleótidos ACAACTTCCTTATGATCACAAATGGGAGTTTCCAGAAACAGGCT en el codón 589; y una o más cualesquiera de las sustituciones de nucleótidos TGG → CGG y TGG → GGG en el codón 557; AAG → CCG, AAG → AAC/T, AAG → ACG, y AAG → AGG en el codón 558; GTT → GAT, GTT → GCT, GTT → GGT y GTT → GAA/G en el codón 559; GTT → GAT, GTT → GAA/G y GTT → GGT en el codón 560; AAA → GAA en el codón 642; GTG → GCG en el codón 654; y GAC → GTC y GAC → TTC en el codón 816.

En otras realizaciones preferidas, las una o más mutaciones en el gen marcador PDGFRA (núm. acc. GenBank NM\_006206.4) comprenden la sustitución de nucleótidos CAG → GTC en el codón 842; y la delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los codones 542-546.

En algunas realizaciones, la detección y/o el análisis de las una o más mutaciones se llevan a cabo mediante un método específico de alelos, preferiblemente mediante PCR con ligación.

En algunas otras realizaciones, el método se lleva a cabo en un formato múltiplex.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un kit de partes para el diagnóstico y/o el seguimiento de un tumor del estroma gastrointestinal como se reivindica en la reivindicación independiente 8.

5 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a la utilización de una o más mutaciones, como se define en la presente memoria, en cualquiera o ambos de los genes marcadores cKIT (núm. acc. GenBank NM\_000222.2) y PDGFRA (núm. acc. GenBank NM\_006206.4) como se reivindica en la reivindicación independiente 9 en forma de un panel de marcadores moleculares para el diagnóstico y/o el seguimiento de un tumor del estroma gastrointestinal.

10 Otras realizaciones de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada de aquí en adelante.

### Descripción de los dibujos

Figura 1: Paciente 1 - Seguimiento de la actividad del tumor GIST.

15 (A) Se muestran imágenes de resonancia magnética ilustrativas del paciente 1 (76 años, mujer), que se trata con sunitinib. Las imágenes fueron tomadas en Marzo de 2009 (izquierda) y Agosto de 2009 (derecha). Las imágenes demuestran las metástasis progresivas en el hígado durante la terapia (indicadas por las flechas). En septiembre de 2009, las metástasis fueron tratadas por termo-terapia de alta frecuencia (HFTT). En octubre de 2009, se detuvo la terapia con sunitinib debido a un accidente cerebrovascular en el paciente 1. (B) Las imágenes fueron tomadas en Noviembre de 2009 (es decir, después de HFTT; izquierda) y Mayo de 2010. Se encontró que las metástasis en el hígado tenían un tamaño estable, pero después de HFTT se hizo visible una nueva manifestación de tumor (segunda flecha; izquierda y derecha).

20

Figura 2: Paciente 1 - Correlación de la actividad del tumor GIST con la mutación de cKIT.

25 Se detectó una duplicación de la secuencia de nucleótidos GCCTAT correspondiente a los codones 502-503 del gen marcador cKIT (localizado en el exón 9, que codificaba los aminoácidos AY) en el ADN de plasma de paciente 1. Se muestra un análisis de la cantidad del ADN de cKIT mutado (expresada como la razón específica del alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) durante la terapia con sunitinib. El aumento en los niveles de ADN de cKIT mutado en 2009 es paralelo al progreso de las metástasis en el hígado. Después de HFTT, el nuevo aumento de los niveles de ADN de cKIT mutado acompaña a la nueva manifestación del tumor.

30

Figura 3: Paciente 2 - Seguimiento de la actividad del tumor GIST.

30 (A) Se muestran imágenes de tomografía computarizada ilustrativas del paciente 2 (49 años, mujer). Las imágenes fueron tomadas en Mayo de 2009 (izquierda; inmediatamente antes de la terapia con imatinib) y Agosto de 2009 (derecha, dos meses después del inicio de la terapia). Las imágenes muestran una rápida respuesta a la terapia, y hay una disminución significativa en el tamaño, la densidad y el aumento de contraste de las metástasis del hígado (indicado por las flechas). (B) En Enero de 2010 (izquierda), y Enero de 2011 (derecha), se hizo visible una sucesiva reducción de tamaño mayor.

35

Figura 4: Paciente 2 - Correlación de la actividad del tumor GIST con la mutación de cKIT.

40 En el ADN de plasma del paciente 2, se detectó una delección de la secuencia de nucleótidos AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGGAAG correspondiente a los codones 550-558 del gen marcador cKIT (localizado en el exón 11). Se muestra un análisis de la cantidad del ADN de cKIT mutado (expresada como razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) durante la terapia con imatinib. Notablemente, solo dos semanas después del inicio de la terapia con imatinib no se pudo detectar ADN de cKIT mutado en la muestra de plasma. Por lo tanto, existe una excelente correlación entre la respuesta a la terapia, la morfología del tumor, y la presencia de un ADN de cKIT mutado específico de tumor

45

FIGURA 5: Paciente 3 - Seguimiento de actividad del tumor GIST.

50 Se muestran imágenes de tomografía por emisión de positrones con 2-desoxi-2-<sup>18</sup>F)fluoro-D-glucosa-tomografía computarizada (parte superior, izquierda y derecha) y tomografía computarizada (parte inferior, izquierda y derecha) ilustrativas del paciente 3 (65 años, varón) que tenía un GIST con metástasis estables en el hígado y un progreso lento de metástasis mesentéricas. Las imágenes fueron tomadas en Enero de 2008 (izquierda, parte superior), Marzo de 2008 (derecha, parte superior), Abril de 2008 (izquierda, parte inferior), y Julio de 2008 (derecha, parte inferior). El Paciente 3 fue tratado originalmente con imatinib pero desarrolló resistencia. Durante la terapia posterior con diversos compuestos se observó un lento progreso de las metástasis mesentéricas (indicadas por las flechas).

Figura 6: Paciente 3 - Correlación de la actividad del tumor GIST con la mutación de cKIT.

En el ADN en plasma del paciente 3, se detectó una sustitución de nucleótidos GTT → GAT en el codón 559 (localizado en el exón 11, que codificaba el cambio aminoácido V → D). En el contexto de la resistencia a imatinib se

pudo encontrar una mutación secundaria: una sustitución de nucleótidos GTG → GCG en el codón 654 (localizado en el exón 13; que codificaba el cambio de aminoácido V → A). Se muestra un análisis de la cantidad de ADN de cKIT V559D mutado (color azul; expresado como razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) y de la cantidad de ADN de cKIT V654A mutado (color rojo; expresado como razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) durante la terapia. El ADN de cKIT mutado V559D específico del tumor se identificó en tres muestras, mientras se identificó ADN de cKIT V654A mutado específico de tumor en una muestra.

Figura 7: Paciente 4 - Seguimiento de la actividad del tumor GIST

(A) Se muestran imágenes de tomografía computarizada ilustrativas del paciente 4 (51 años, mujer). Las imágenes se tomaron en Marzo de 2009 (izquierda) y Septiembre de 2009 (derecha). Las imágenes demuestran una recaída con metástasis del hígado en Septiembre de 2009 (derecha; indicado por la flecha). El paciente 4 de partida se trató con imatinib comenzando en Septiembre de 2009. (B) Las imágenes se tomaron en Diciembre de 2009 (izquierda) y Agosto de 2010 (derecha). Las metástasis en el hígado presentaron una reducción del tamaño sucesiva de aproximadamente 90% (flechas; izquierda y derecha).

Figura 8: Paciente 4 - Correlación de la actividad del tumor GIST con mutación de cKIT

Se detectó una delección/inserción de la secuencia de nucleótidos DelCAGTGGAAGGTTGTTGAGGA GATAAATGGAAACAATTATGTTTAKTAGACinsG correspondiente a los codones K550-K558 del gen marcador cKIT (localizado en el exón 11) en el ADN en plasma del paciente 4. Se muestra un análisis de la cantidad de ADN de cKIT mutado expresado como razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje durante la terapia con imatinib. La detección de ADN de cKIT mutante en Septiembre de 2009 es paralela a la emergencia de metástasis en el hígado. En las muestras de plasma obtenidas 6,5 meses antes de la recaída y durante el tratamiento con imatinib con respuesta, no fue detectable ADN de cKIT mutado.

Figura 9: Secuencia del gen cKIT

Figura 10: Secuencia del gen PDGFRA

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que la detección y el análisis cuantitativo de una o más mutaciones específicas del tumor a nivel del ADN de los genes marcadores cKIT y PDGFRA representan un enfoque fiable y eficaz para el diagnóstico y/o el seguimiento de tumores del estroma gastrointestinal. La presencia/ausencia y la cantidad de dichas mutaciones se correlacionan con los datos morfológicos determinados por métodos de diagnóstico médico por imagen. Por lo tanto, estas mutaciones pueden representar una medida adecuada para la actividad GIST y por lo tanto permitir la estadificación rápida y precisa de los GIST, así como el seguimiento del progreso del tumor y la capacidad de respuesta a una terapia en concreta. Además, puesto que el diagnóstico se realiza en ADN circulante (es decir, libre de células), p. ej., presente en las muestras de plasma, el enfoque de la presente invención es también simple, no requiere equipos sofisticados, y es rentable.

La presente invención descrita de forma ilustrativa a continuación se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente en la presente memoria.

Cuando se utilice el término "que comprende" en la presente descripción y en las reivindicaciones, éste no excluye otros elementos o etapas. Para los fines de la presente invención, se considera que el término "que consiste en" es una realización preferida de la expresión "que comprende". Si en lo sucesivo se define un grupo por comprender al menos un cierto número de realizaciones, también se debe entender que describe un grupo, que consiste preferiblemente solo en estas realizaciones.

Cuando se utiliza un artículo indefinido o definido para referirse a un sustantivo en singular, por ejemplo, "un", "uno", "una" o "el", o "la", esto incluye el plural de ese sustantivo a menos que se especifique lo contrario.

En el caso en el que los valores numéricos se indiquen en el contexto de la presente invención, el experto en la materia entenderá que el efecto técnico de la característica en cuestión está asegurado dentro de un intervalo de exactitud, que incluye típicamente una desviación del valor numérico dado de  $\pm 10\%$ , y preferiblemente de  $\pm 5\%$ .

Además, los términos primero, segundo, tercero, (a), (b), (c), y similares, en la descripción y en las reivindicaciones, se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden sucesivo o cronológico. Se debe entender que los términos utilizados de ese modo son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria son susceptibles de funcionar en otras secuencias distintas de las descritas o ilustradas en la presente memoria.

Otras definiciones de términos se proporcionarán a continuación en el contexto en el que se utilizan los términos. Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para ayudar a la comprensión de la invención. No se debe interpretar que estas definiciones tienen un alcance menor que el comprendido por un experto

normal en la técnica.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico y/o el seguimiento en un sujeto de un tumor del estroma gastrointestinal como se reivindica en la reivindicación 1.

5 El término "tumor", según se utiliza en la presente memoria, indica generalmente cualquier tipo de neoplasma maligno, es decir, cualquier alteración morfológica y/o fisiológica (basada en la re-programación genética) de células diana que presentan o que tienen una predisposición para desarrollar las características de un tumor en comparación con las células de control de tipo salvaje no afectadas (sanos). Los ejemplos de tales alteraciones pueden relacionarse, entre otras, con el tamaño y la forma (ampliación o reducción) de la célula, la proliferación celular (aumento del número de células), la diferenciación celular (cambio en el estado fisiológico), la apoptosis (muerte celular programada) o la supervivencia celular.

10 El término "que tiene una predisposición para desarrollar un tumor", según se utiliza en la presente memoria, indica cualquier fenotipo celular que sea indicativo de un estado pre-canceroso, es decir, un estado intermedio en la transformación de una célula normal en una célula tumoral. En otras palabras, el término indica un estado de riesgo de desarrollar un tumor.

15 El término "tumor del estroma gastrointestinal" (también referido como "GIST"), según se utiliza en la presente memoria, denota cualquier tipo de tumores mesenquimales del tracto gastrointestinal (es decir, estómago, intestino delgado, y esófago). Los GIST representan aproximadamente 1-3% de todas las neoplasias gastrointestinales. Los GIST constituyen tumores no epiteliales del tejido conectivo (es decir, sarcomas).

20 En la presente invención, se pretende que los términos "diagnóstico" y "seguimiento" incluyan las predicciones y los análisis de la probabilidad (basados tanto en las mediciones cualitativas como cuantitativas). Se pretende que el presente método sea utilizado clínicamente en la toma de decisiones relativas a las modalidades de tratamiento, incluyendo la intervención terapéutica, la estadificación de la enfermedad, y el seguimiento y la vigilancia de la enfermedad. De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar un resultado intermedio para el examen de la afección de un sujeto. Tal resultado intermedio se puede combinar con información adicional para ayudar a un médico, enfermera u otro profesional a diagnosticar que un sujeto sufre de la enfermedad. Alternativamente, la presente invención se puede utilizar para detectar células cancerosas en una muestra obtenida de un sujeto, y proporcionar al doctor una información útil para diagnosticar que el sujeto sufre de la enfermedad.

Típicamente, el método de la presente invención se lleva a cabo como un método *in vitro*.

30 Un sujeto que va a ser sometido diagnóstico y/o seguimiento mediante el presente método es un mamífero tal como un ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, cerdo, vaca, caballo o mono. Preferiblemente, el sujeto que se va a diagnosticar es un ser humano.

35 Las muestras de ensayo que se van a emplear en la presente invención derivan (es decir, se recogen) del sujeto que va a ser sometido diagnóstico y/o seguimiento para determinar la presencia de un GIST. Las muestras de ensayo pueden incluir los tejidos corporales (p. ej., biopsias o resecciones) y fluidos, tales como sangre, esputo, líquido cefalorraquídeo y orina. Además, las muestras de ensayo pueden contener una sola célula, una población de células (es decir, dos o más células) o un extracto celular derivado de un tejido corporal. Las muestras de ensayo utilizadas en el método de la presente invención deben ser recogidas generalmente de una manera clínicamente aceptable, preferiblemente de una manera en la que los ácidos nucleicos o proteínas se conserven. Las muestras de ensayo se pueden utilizar en forma no purificada o se pueden someter a etapas de enriquecimiento o purificación cualesquiera antes de su utilización, por ejemplo con el fin de aislar el ADN o la fracción de proteína comprendidos en una muestra dada. El experto es muy consciente de estos diversos métodos de purificación (véase, p. ej., Sambrook, J., y Russel, D.W. (2001), *Molecular cloning: A laboratory manual* (3ª Ed.) Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, Hoboken, Nueva Jersey, USA).

45 En realizaciones específicas, la muestra de ensayo es una muestra de sangre, tal como sangre completa, plasma y suero. El término "sangre completa", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la sangre con todos sus componentes (es decir, tanto células de sangre como plasma). El término "plasma", según se utiliza en la presente memoria, denota medio líquido de la sangre. El término "suero", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a plasma del que se han eliminado las proteínas de coagulación. En realizaciones preferidas, la muestra de ensayo empleada es una muestra de plasma.

50 El método de la presente invención comprende la detección y el análisis de una o más mutaciones en uno cualquiera o ambos de los genes marcadores cKIT y PDGFR. El gen cKIT codifica el receptor del factor de células madre (también conocido como receptor del factor de crecimiento de mastocitos o CD117), que tiene actividad tirosina quinasa. El gen de PDGFRA codifica el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (también referido como PDGFR2 o CD140A), que también presenta actividad tirosina quinasa.

Los dos genes marcadores referidos en la presente memoria representan típicamente secuencias humanas conocidas en la técnica. Las respectivas secuencias de ácidos nucleicos (que codifican los correspondientes ARNm)

están depositadas en GenBank, la base de datos de secuencias genéticas de NCBI/NIH (comunicación 177.0 15 de Abril de 2010; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>; véase también Benson, D. A. et al. (2008) *Nucl. Acids Res.* 36, D25-D30), Que tiene los siguientes números de acceso (también referidos en la presente memoria) "núm. acc.":

|   |        |  |
|---|--------|--|
|   | cKIT   | (Núm. acc. Genbank NM_000222.2) (SEQ ID NO: 1) |
| 5 | PDGFRA | (Núm. acc. Genbank NM_006206.4) (SEQ ID NO: 2) |

Los genes o loci también pueden ser designados por sinónimos, que son conocidos por los expertos en la técnica y pueden derivar, por ejemplo, de las entradas de bases de datos mencionadas anteriormente. Estos sinónimos también están abarcados por las realizaciones de la presente invención.

10 El término "detectar" (o "detección"), según se utiliza en la presente memoria, puede ser interpretado en el sentido de "identificar" al menos una mutación presente en cualquiera de los genes marcadores, y opcionalmente también en el sentido de "seleccionar" cualquiera o más de las mutaciones identificadas para una consideración adicional. La selección variar, por ejemplo, en función de las modalidades de tratamiento, incluyendo la intervención terapéutica, los criterios de diagnóstico, tales como los estadios de la enfermedad, y el seguimiento y la vigilancia de la enfermedad en el sujeto que se va a tratar. Se interpreta que el término "analizar" (o "análisis"), según se utiliza en  
15 la presente memoria también incluye una caracterización cuantitativa de al menos una mutación presente en cualquiera de los genes marcadores (por ejemplo, determinación de la cantidad de ADN mutado y/o del nivel de expresión del ADN mutado en una muestra de ensayo dada).

20 El término "mutación", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de alteración de ácidos nucleicos conocida en la técnica, que incluye, entre otros, una adición terminal de uno o más nucleótidos, una inserción (interna) de uno o más nucleótidos (que incluye la duplicación de uno o más nucleótidos), una deleción (es decir, eliminación) de uno o más nucleótidos, y una sustitución (es decir, un cambio) de uno o más nucleótidos o combinaciones de los mismos. Las mutaciones pueden representar mutaciones conservativas (es decir, mutaciones de nucleótidos que no dan como resultado ningún cambio de los residuos de aminoácidos codificados) o mutaciones no conservativas (es decir, mutaciones de nucleótidos que dan como resultado cambios de los residuos de aminoácidos codificados). En la presente invención, el término se refiere a alteraciones de ácidos nucleicos que son  
25 (cuando se consideran individualmente o combinadas) indicativas de un tumor del estroma gastrointestinal en el sujeto que va a ser diagnosticado.

30 El término "uno o más", según se utiliza en la presente memoria, indica que el método de la presente invención puede incluir la identificación de una única mutación presente en cualquiera de los dos genes marcadores o la detección de al menos dos mutaciones. Las al menos dos mutaciones (i) pueden estar todas presentes en el gen cKIT o (ii) pueden estar todas presentes en el gen de PDGFRA o (iii) al menos una mutación está presente en el gen cKIT y al menos una mutación está presente en el gen de PDGFRA.

35 Las una o más mutaciones se detectan y se analizan a nivel del ADN, es decir, mediante el análisis de la secuencia de ácido nucleico de cualquiera o de ambos genes marcadores para determinar la presencia de mutaciones. Sin embargo, en algunas realizaciones, la presencia de las una o más mutaciones puede también ser detectada adicionalmente, así como cuantificada mediante la determinación del nivel de expresión génica a nivel de ARNm y/o a nivel de proteína (por ejemplo, si la presencia de una mutación da como resultado una regulación al alza (ganancia de función) o una regulación a la baja (pérdida de función) del nivel de la expresión génica), o midiendo la actividad funcional de la proteína codificada. El experto en la técnica es muy consciente de numerosos  
40 métodos para realizar este tipo de análisis (véanse, p. ej., Sambrook, J., y Russel, D. W. (2001), *supra*; Ausubel, F. M. et al. (2001) *supra*). Por ejemplo, a nivel del ADN, se pueden emplear un enfoque de secuenciación directa o diversas técnicas de PCR establecidas (p. ej., PCR con ligación). A nivel de ARNm, los métodos adecuados incluyen, p. ej., análisis de transferencia Northern o RT-PCR. Por último, el nivel de proteína se puede determinar, p. ej., mediante métodos inmunoquímicos que implican la utilización de anticuerpos específicos, mientras que la  
45 actividad de la proteína se puede medir por medio de análisis enzimáticos.

50 En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente la comparación de los resultados obtenidos en la muestra de ensayo con los obtenidos en una muestra de control. El término "muestra de control", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra derivada del sujeto que va a ser diagnosticado que como mínimo no se sospecha que presentan actividad GIST ni desarrolla tal afección. Por lo tanto, el término también incluye muestras de ADN de tipo salvaje (es decir, ADN que no porta mutaciones en los genes marcadores cKIT y/o de PDGFRA). En la presente invención, el término "muestra de control" también se refiere a los valores de referencia (control) derivados de bases de datos o publicados en la bibliografía científica.

55 El método de la invención comprende cuantificar la cantidad de ADN mutado presente en la muestra de ensayo, en donde una cantidad elevada de ADN mutado en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control es indicativa del progreso del tumor del estroma gastrointestinal.

Tal cuantificación de la cantidad (concentración) de ADN mutado (y/o su ARNm correspondiente) puede realizarse por medio de diferentes métodos bien establecidos en la técnica tales como mecanismos de amplificación por PCR (véase, p. ej., Sambrook, J., y Russel, D. W. (2001), *supra*; Ausubel, F.M. et al. (2001) *supra*).

Se considera que la cantidad de ADN (y/o la cantidad de su correspondiente ARNm) en la muestra de ensayo es "elevada" cuando aumenta en comparación con la muestra de control, por ejemplo, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más del 100% en comparación con un nivel de control. Según se utiliza en la presente memoria, tal cantidad elevada (es decir, incrementada) se considera indicativa del progreso del tumor (es decir, desarrollo del tumores en curso). Por el contrario, una cantidad reducida (es decir, disminuida) de ADN mutado (y/o la cantidad de su correspondiente ARNm) en la muestra de ensayo (en comparación con la muestra de control) se considera indicativa de la regresión del tumor. Una cantidad de ADN mutado (y/o la cantidad de su correspondiente ARNm) en la muestra de ensayo que es aproximadamente la misma que en la muestra control) se considera indicativa de un estancamiento/interrupción del progreso del tumor.

El ADN utilizado para la detección y/o análisis de las una o más mutaciones es ADN circulante (denominado también en la presente memoria "ADN libre de células"), preferiblemente ADN circulante en plasma.

La una o más mutaciones en uno cualquiera o ambos de los genes marcadores también pueden ser detectadas y analizadas en una o más cualesquiera de otras fracciones o moléculas de ADN presentes en la muestra de ensayo analizada, es decir, p. ej., en ADN celular (es decir, ADN genómico incluyendo fracciones de ADN nuclear y no nuclear).

En realizaciones preferidas, las una o más mutaciones se encuentran en una o más cualesquiera de las regiones correspondientes a los codones 456-508 (localizado en el exón 9; que codifica los aminoácidos P456-F508), 549-599 (localizado en el exón 11; que codifica los aminoácidos Q549-R599), 642-654 (localizado en el exón 13; que codifica K642-V654), 670-709 (localizado en el exón 14, que codifica T670-S709), 786-823 (localizado en el exón 17; que codifica K786-Y823), y 829 (localizado en el exón 18; que codifica el aminoácido A829) del gen marcador cKIT (núm. acc. GenBank NM\_000222.2) y/o en una o más cualesquiera de las regiones correspondientes a los codones 478 (localizado en el exón 10; que codifica aminoácidos S478), 561-571 (localizado en el exón 12; que codifica los aminoácidos V561-E571), 687 (localizado en el exón 14, que codifica el aminoácido H687) y 824-846 (localizado en el exón 18, que codifica los aminoácidos V824-D846) en el gen marcador PDGFRA (núm. acc. GenBank NM\_006206.4). Todos los residuos de aminoácido anteriores se proporcionan en el código de una sola letra. En la presente invención, cualquiera de las regiones indicadas anteriormente puede incluir una sola mutación o una combinación de al menos dos mutaciones. Las regiones de ácido nucleico indicadas anteriormente se refieren a los respectivos genes marcadores humanos. Sin embargo, en caso de que el método de la presente invención se realice utilizando muestras de ensayo que no son de origen humano el experto en la técnica es bien consciente de los métodos para llevar a cabo comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos con el fin de determinar las correspondientes regiones de ácidos nucleicos en los genes marcadores no humanos. El término "uno cualquiera o más", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno cualquiera, cualquier subgrupo de de dos o más cualesquiera (es decir, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, cinco cualesquiera, seis cualesquiera, siete cualesquiera, ocho cualesquiera, nueve cualesquiera, diez cualesquiera, y así sucesivamente) o la totalidad de las regiones mencionadas anteriormente.

En realizaciones particularmente preferidas, las una o más mutaciones en el gen marcador cKIT (Núm. acc. Genbank NM\_000222.2) se selecciona entre una o más cualesquiera del grupo que consiste en:

- una delección de la secuencia de nucleótidos AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGAAAG correspondiente a los codones 550-558 (que codifica los aminoácidos K550-K558);
- una delección de la secuencia de nucleótidos CCCATGTATGAA correspondiente a los codones 551-554 (que codifica los aminoácidos P551-E554);
- una delección de la secuencia de nucleótidos TATGAAGTACAGTGGAAAG correspondiente a los codones 553-558 (que codifica los aminoácidos Y553-K558);
- una delección de la secuencia de nucleótidos GAAGTACAGTGGAAAGTTGTTGAGGAGATA AATGGAAACAATTATGTTTACATA correspondiente a los codones 554-571 (que codifica los aminoácidos E554-I571);
- una delección de la secuencia de nucleótidos TGGAAAG correspondiente a los codones 557-558 (que codifica los aminoácidos W557-K558);
- una delección de la secuencia de nucleótidos AAGGTT correspondiente a los codones 558-559 (que codifican los aminoácidos K558-V559);
- una delección de la secuencia de nucleótidos GTTGTT correspondiente a los codones 559-560 (que codifica los aminoácidos V559-V560);
- una delección de la secuencia de nucleótidos GTTGTT correspondiente a los codones 559-560 (que codifica los aminoácidos V559-V560) combinada con la sustitución de nucleótidos AAG → AGG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → R);



## ES 2 546 883 T3

- una duplicación de la secuencia de nucleótidos GCCTAT correspondiente a los codones 502-503 (que codifica los aminoácidos A502-Y503);
- una duplicación de la secuencia de nucleótidos ACCCAACACAACCTTCCTTATGATCACAAA  
TGGGAGTTTCCCAGAAACAGGCTGAGTT correspondiente a los codones 573-591 (que codifica los  
5 aminoácidos T573-V591);
- una inserción de la secuencia de nucleótidos ACCAACACAACCTTCCTTATGATCACAAAT  
GGGAGTTTCCCAGAAACAGGCTGAGTTTTGG en los codones 573 a 592 (que codifica los aminoácidos  
P573-G592);
- una inserción de la secuencia de nucleótidos TCCCAACACAACCTTCCTTATGATCACAA  
ATGGGAGTTTCCCA en el codón 586;  
10
- la sustitución de nucleótidos TGG → CGG en el codón 557 (que codifica los aminoácidos W → R);
- la sustitución de nucleótidos TGG → GGG en el codón 557 (que codifica los aminoácidos W → G);
- la sustitución de nucleótidos AAG → CCG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → P);
- la sustitución de nucleótidos AAG → AAC/T en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → N);
- la sustitución de nucleótidos AAG → ACG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → T);  
15
- la sustitución de nucleótidos AAG → AGG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → R);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAT en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → D);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GCT en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → A);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GGT en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → G);  
20
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAA/G en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → E);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAT en el codón 560 (que codifica los aminoácidos V → D);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAA/G en el codón 560 (que codifica los aminoácidos V → E);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GGT en el codón 560 (que codifica los aminoácidos V → G);
- la sustitución de nucleótidos AAA → GAA en el codón 642 (que codifica los aminoácidos K → E);  
25
- la sustitución de nucleótidos GTG → GCG en el codón 654 (que codifica los aminoácidos V → A);
- la sustitución de nucleótidos GAC → GTC en el codón 816 (que codifica los aminoácidos D → V); y
- la sustitución de nucleótidos GAC → TTC en el codón 816 (que codifica los aminoácidos D → F);

En otras realizaciones particularmente preferidas, las una o más mutaciones en el gen marcador cKIT (Núm. acc. Genbank NM\_000222.2) se seleccionan entre una o más cualesquiera del grupo que consiste en:

- una delección de la secuencia de nucleótidos AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGAAAG correspondiente a los codones 550 hasta 558 (que codifica los aminoácidos K550-K558);  
30
- una delección de la secuencia de nucleótidos CCCATGTATGAA correspondiente a los codones 551-554 (que codifica los aminoácidos P551-E554);
- una delección de la secuencia de nucleótidos GTATGAAGTACAGTGGAAAGGT correspondiente a los  
35 codones 552-559 (que codifica los aminoácidos P552-E559);
- una delección de la secuencia de nucleótidos TGAAGTACAGTGGAAAGGTTGTTGAGGAG  
ATAAATGGAAACAATTATGTTTACATAGA correspondiente a los codones 553-572 (que codifica los  
aminoácidos Y553-D572);
- una delección de la secuencia de nucleótidos TATGAAGTACAGTGGAAAG correspondiente a los codones  
40 553-558 (que codifica los aminoácidos Y553-K558);
- una delección de la secuencia de nucleótidos GAAGTACAGTGGAAAGGTTGTTGAGGAGATA  
AATGGAAACAATTATGTTTACATA correspondiente a los codones 554-571 (que codifica los aminoácidos

## ES 2 546 883 T3

E554-I571);

- una deleción de la secuencia de nucleótidos TGG AAG correspondiente a los codones 557-558 (que codifica los aminoácidos W557-K558);
- 5 • una deleción de la secuencia de nucleótidos AAGGTT correspondiente a los codones 558-559 (que codifica los aminoácidos K558-V559);
- una deleción de la secuencia de nucleótidos GTTGTT correspondiente a los codones 559 a 560 (que codifica los aminoácidos V559-V560);
- 10 • una deleción de la secuencia de nucleótidos TGAAGTACAGTGG AAGGTTGTTGA correspondiente a los codones 554-561 (que codifica los aminoácidos E554-E561) combinada con la inserción de nucleótidos CTT;
- una deleción de la secuencia de nucleótidos ACAGTGG AAGGTTGTTGAGGAGATAAATG GAAACAATTATGTTTACATAGAC correspondiente a los codones 555-572 (que codifica los aminoácidos V555-D572) combinada con la inserción de nucleótidos G;
- 15 • una deleción de la secuencia de nucleótidos GTTGTT correspondiente a los codones 559 a 560 (que codifica los aminoácidos V559-V560) combinada con la sustitución de nucleótidos AAG → AGG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → R);
- una deleción de la secuencia de nucleótidos GTTGAGGAGATAAATGGAAACAATTATGTTT ACATAGACCCAACACA AACTTCCTTAT correspondiente a los codones 560-578 (que codifica los aminoácidos V560-Y578);
- 20 • una deleción de la secuencia de nucleótidos ACACA AACTTCCTTATGATCAC correspondiente a los codones 574-580 (que codifica los aminoácidos T574-H580);
- una deleción de la secuencia de nucleótidos GAT correspondiente al codón 578 (que codifica el aminoácido D578);
- 25 • una duplicación de la secuencia de nucleótidos GCCTAT correspondiente a los codones 502-503 (que codifica los aminoácidos A502-Y503);
- una duplicación de la secuencia de nucleótidos ACCCAACACA AACTTCCTTATGATCACAAA TGGGAGTTTCCCAGAAACAGGCTGAGTT correspondiente a los codones 573-591 (que codifica los aminoácidos T573-V591);
- 30 • una inserción de la secuencia de nucleótidos ACCAACACA AACTTCCTTATGATCACAAAT GGGAGTTTCCCAGAAACAGGCTGAGTTTTGG en los codones 573-592 (que codifica los aminoácidos P573-G592);
- una inserción de la secuencia de nucleótidos GCAAACAACA AACTTCCTTATGATCACAA ATGGGAGTTTCC en el codón 585;
- 35 • una inserción de la secuencia de nucleótidos TCCCAACAACA AACTTCCTTATGATCACAA ATGGGAGTTTCCCA en el codón 586;
- una inserción de la secuencia de nucleótidos ACAACTTCCTTATGATCACAAATGGGAG TTTCCCAGAAACAGGCT en el codón 589;
- la sustitución de nucleótidos TGG → CGG en el codón 557 (que codifica los aminoácidos W → R);
- la sustitución de nucleótidos TGG → GGG en el codón 557 (que codifica los aminoácidos W → G);
- 40 • la sustitución de nucleótidos AAG → CCG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → P);
- la sustitución de nucleótidos AAG → AAC/T en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → N);
- la sustitución de nucleótidos AAG → ACG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → t);
- la sustitución de nucleótidos AAG → AGG en el codón 558 (que codifica los aminoácidos K → R);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAT en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → D);
- 45 • la sustitución de nucleótidos GTT → GCT en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → A);

- la sustitución de nucleótidos GTT → GGT en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → G);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAA/G en el codón 559 (que codifica los aminoácidos V → E);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAT en el codón 560 (que codifica los aminoácidos V → D);
- la sustitución de nucleótidos GTT → GAA/G en el codón 560 (que codifica los aminoácidos V → E);
- 5 • la sustitución de nucleótidos GTT → GGT en el codón 560 (que codifica los aminoácidos V → G);
- la sustitución de nucleótidos AAA → GAA en el codón 642 (que codifica los aminoácidos K → E);
- la sustitución de nucleótidos GTG → GCG en el codón 654 (que codifica los aminoácidos V → A);
- la sustitución de nucleótidos GAC → GTC en el codón 816 (que codifica los aminoácidos D → V); y
- la sustitución de nucleótidos GAC → TTC en el codón 816 (que codifica los aminoácidos D → F);

10 En realizaciones más particularmente preferidas, las una o más mutaciones en el gen marcador PDGFRA (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4) comprenden la sustitución de nucleótidos GAC → GTC en el codón 842 (que codifica los aminoácidos D → V).

15 En otras realizaciones adicionales particularmente preferidas, las una o más mutaciones en el gen marcador PDGFRA (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4) se seleccionan entre una o más cualesquiera del grupo que consiste en: la sustitución de nucleótidos GAC → GTC en el codón 842 (que codifica los aminoácidos D → V); y una delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los codones 542-546 (CATCATGCATGA).

20 Todas estas mutaciones concretas de los genes marcadores cKIT y PDGFRA mencionadas anteriormente son bien conocidas en la técnica y se publican entre otros en: Hirota, S. et al. (1998) *Science* **279**, 577-580; Rubin, B. P. et al. (2001) *Cancer Res.* **61**, 8118-8121; Hirota, S. et al. (2003) *Gastroenterology* **125**, 660-667; Corless, C. L. et al. (2005) *J. Clin. Oncol.* **23**, 5357-5364; y Corless, C. L. y Heinrich, M. C. (2008), *supra*.

25 Una vez más, las regiones de ácido nucleico indicadas anteriormente se refieren a los respectivos genes marcadores humanos. Sin embargo, en caso de que el método de la presente invención se realice utilizando muestras de ensayo de origen no humano los expertos en la técnica son bien conscientes de los métodos para llevar a cabo las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos con el fin de determinar las regiones de ácidos nucleicos correspondientes en los genes marcadores no humanos. Los términos "uno o más" o "uno cualquiera o más", según se utiliza en la presente memoria, se refieren a una cualquiera, cualquier subgrupo de dos o más cualesquiera (es decir, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, cinco cualesquiera, seis cualesquiera, siete cualesquiera, ocho cualesquiera, nueve cualesquiera, diez cualesquiera, y así sucesivamente) o la totalidad de las mutaciones concretas referidas anteriormente.

30 En otras realizaciones específicas, la detección y el análisis cuantitativo de las una o más mutaciones se llevan a cabo mediante un método específico de alelo (es decir, comparando directamente fracciones de ADN o muestras mutadas y de tipo salvaje), preferiblemente mediante mecanismos de PCR específicos de alelo, tales como, por ejemplo, PCR con ligación (véase la descripción detallada en la sección experimental a continuación).

35 Tales mecanismos de PCR específicos de alelo son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook, J., y Russel, D. W. (2001), *supra*; Ausubel, F. M. et al. (2001) *supra*).

40 En algunas otras realizaciones, el método se realiza en un formato múltiplex. El término "formato múltiplex", según se utiliza en la presente memoria, se refiere al análisis de detección en paralelo de dos o más mutaciones presentes en la misma muestra de prueba dentro de un solo ensayo (por ejemplo, en función del método de detección empleado mediante la utilización de recipientes de reacción separados para cada una de las mutaciones en cuestión) así como dos análisis en paralelo de dos o más muestras de prueba en paralelo (en donde las una o más mutaciones analizadas en las dos o más muestras de prueba pueden ser iguales o diferentes). El término también incluye análisis de alto rendimiento, por ejemplo mediante el empleo de la tecnología de micromatrices.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere la utilización de un kit de partes para el diagnóstico y/o seguimiento de un tumor del estroma gastrointestinal como se reivindica en la reivindicación independiente 8.

50 Los métodos para detectar y determinar la cantidad de una o más mutaciones (a nivel de ADN) en los dos genes marcadores empleados pueden incluir entre otros uno o más oligonucleótidos de ADN específicos que se van a emplear como cebadores de PCR o moléculas sonda para amplificar cualquier región concreta de los respectivos genes marcadores que portan tales mutaciones específicas del tumor o para llevar a cabo análisis de secuencia. El kit de partes de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente reactivos para llevar a cabo dichos análisis tales como enzimas (p. ej., ADN polimerasas), así como para el aislamiento y/o la purificación de una muestra de prueba (y una muestra de control) que se va a analizar (p. ej., reactivos para la purificación de ADN).

Los diversos componentes del kit se pueden envasar en uno o más recipientes tales como uno o más viales. Por ejemplo, cada componente comprendido en el kit se puede envasar en un recipiente separado.

5 Los componentes del kit se pueden proporcionar en forma liofilizada o seca o disueltos en un tampón adecuado tal como solución salina tamponada con fosfato o tampón de Tris/EDTA (TE). El kit también puede comprender reactivos adicionales, incluyendo entre otros conservantes, tampones para el almacenamiento y/o la reconstitución de los componentes anteriormente referidos, soluciones de lavado, y similares. Estos reactivos se pueden proporcionar combinados con uno o más de los componentes indicados anteriormente, es decir, en el mismo recipiente (p. ej., un oligonucleótido de ADN disuelto en un tampón apropiado). Alternativamente, al menos algunos de estos reactivos adicionales se pueden proporcionar en recipientes separados.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una o más mutaciones, como se han definido anteriormente en la presente memoria, en uno cualquiera o ambos de los genes marcadores cKIT (Núm. acc. Genbank NM\_000222.2) y PDGFRA (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4) como se reivindica en la reivindicación independiente 9 en forma de un panel de marcadores moleculares para el diagnóstico y/o seguimiento de un tumor del estroma gastrointestinal.

15 En la presente invención, se debe entender que el término "utilización" hace referencia tanto a la información cualitativa como cuantitativa obtenida mediante la realización de los métodos definidos anteriormente en la presente memoria (es decir, el "estado de mutación" de los genes marcadores en una muestra de prueba dada incluyendo la identificación de cualquier mutación, así como la determinación de la cantidad de ADN mutado). En otras palabras, tal "estado de mutación" se utiliza como una "firma" para el diagnóstico y/o la estadificación de un GIST y/o para el seguimiento del progreso tumoral o la capacidad de respuesta a una terapia dada.

20 La invención se describe adicionalmente por medio de las figuras y los ejemplos siguientes, que tienen únicamente para el propósito de ilustrar las realizaciones específicas de esta invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: PCR con ligación

25 La detección de fragmentos de ADN mutantes específicos de tumores en muestras de plasma requiere métodos experimentales que tengan alta sensibilidad y especificidad para el ADN específico del tumor ya que la última fracción representa menos del 0,01% del ADN total. En la presente invención, se empleó la PCR con ligación en este sentido como un método ilustrativo.

#### 1.1 Diseño de los oligonucleótidos

30 Debido a que el ADN en plasma libre es el resultado de la fragmentación de ADN genómico, se utilizan secuencias intrónicas-exónicas del gen diana (que se va a amplificar) para diseñar los respectivos oligonucleótidos. La técnica de PCR con ligación requiere dos pares de sondas por ensayo. El primer par es complementario a la secuencia de tipo salvaje y el segundo par abarca la región mutada. Los cebadores y cebadores anidados para el alelo tanto de tipo salvaje como mutado están flanqueando las sondas. La temperatura de fusión de las sondas debe ajustarse a 65°C (+/- 2°C) con el fin de tener temperaturas de fusión similares para la reacción de hibridación y ligación. La alta temperatura (60-65°C) durante la reacción de ligación da como resultado el recocido y la fusión posterior de las sondas solo si existe coincidencia perfecta en el sitio de la mutación. Además, la ligación requiere una modificación 5'-fosfato de la sonda 2. El extremo 5' de la sonda 1 y el extremo 3' de la sonda 2 abarcan dos secuencias sintéticas con el fin de introducir sitios de unión para el cebador de PCR. Estas secuencias son universales para cualquier ensayo específico de mutación. En caso de que las sondas 1 y 2 se ligen, las sondas y los cebadores para las secuencias externas sintéticos se utilizan para la amplificación utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

*Sondas específicas para el alelo mutado:* La sonda 1 de la región mutada incluye la mutación en el extremo 3', mientras que el extremo 5' de la sonda 2 es complementario a las bases vecinas en dirección 5'.

45 *Sondas específicas para el alelo de tipo salvaje:* Se utiliza una región exónica no mutada se utiliza para el diseño de sondas complementarias a la secuencia de tipo silvestre que son necesarias para la posterior cuantificación del ADN no mutado. Dado que el ADN de plasma contiene solo fragmentos cortos de ADN, las sondas de mutación y de tipo salvaje se deben diseñar lo más cerca posible para generar un producto de PCR corto.

50 *Cebadores de amplificación:* Los cebadores de amplificación deben flanquear las sondas específicas tanto de tipo salvaje como de mutación.

Con el fin de determinar la temperatura de recocido óptima para una reacción de PCR dada se utilizaron temperaturas de recocido para PCR en gradiente en el intervalo entre 48-72°C para optimizar cada ensayo de reacción.

#### 1.2 Extracción de ADN circulante libre en plasma y suero

Se separaron el plasma sanguíneo o el suero de las células de la sangre por medio de centrifugación. Las alícuotas se almacenaron a -20°C. El ADN circulante libre de 1-5 ml de plasma se extrajo utilizando el QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit o el QIAamp DNA Blood Mini Kit (ambos adquiridos de QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 1.3 Hibridación específica de alelo

Se emplearon hibridaciones restrictivas de sondas complementarias a la secuencia del alelo de tipo salvaje y mutado en diferentes tubos de reacción. Se utilizaron como controles positivos el ADN tumoral positivo para la mutación conocida, los plásmidos o los oligonucleótidos sintéticos. El ADN de tipo salvaje genómico sirvió como control negativo. Los productos de PCR se diluyeron por lo general 1:20.000 (intervalo 1:10.000 a 1:40.000) en agua. Con el fin de eliminar cualquier estructura secundaria del ADN, se realizó una etapa de desnaturalización (5 min, 98°C) de 5 µl de ADN diluido seguido de enfriamiento a 4°C. Se añadieron las sondas 1 y 2 en tampón Salsa MLPA (Lig-5a, MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) a la dilución de ADN a una concentración final de 0,25 nM. Después de una corta etapa de desnaturalización (1 min, 95°C) se llevó a cabo la hibridación de la mezcla de ADN/sonda durante la noche (16 horas, 60-65°C).

15 1.4 Reacción de Ligación

La mezcla de Ligase-65 (Lig-5a, MRC-Holanda, Amsterdam, Países Bajos; por muestra 25 µl de agua destilada, 1 µl de Ligase-65, 3 µl de Tampón A para Ligase y 3 µl de Tampón B para ligase-65) se pre-incubó a 60-65°C (5-10 min) y se añadió a la mezcla de ADN/sonda a 60-65°C. La reacción de ligación se detuvo después de 5 min, seguido de una corta etapa de desnaturalización (5 min, 98°C). Posteriormente, las muestras se enfriaron a 4°C.

20 1.5 PCR en tiempo real

Se añadieron 5 µl de producto de PCR ligado a 20 µl de la mezcla SYBR Green PCR (por muestra 7,4 µl de agua dest., 0,05 µl de cebador directo universal (100 µM), 0,05 µl de cebador inverso universal (100 µM) y 12,5 µl Quantitect SYBR Green PCR Kit 2x; QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). La aplicación de TaqMan-PCR se realizó con las condiciones del cebador universal de acuerdo con el fabricante.

25 1.6 Análisis de los resultados de la PCR en tiempo real

Los valores de ct (umbral de ciclo) de la amplificación de tipo salvaje no deben exceder ct 25, y las temperaturas de fusión (Tm) de todas las muestras deben ser idénticas (+/- 0,8°C). Los valores Ct de las muestras con sondas mutadas dependen del rendimiento del alelo mutado en la muestra. En una ronda de PCR típica, la Tm del control negativo debe ser superior a ct 30 y representa la reactividad cruzada de las sondas. El método ct delta se utilizó para calcular el porcentaje relativo del alelo mutado con respecto al alelo de tipo salvaje:  $2^{-(\Delta Ct)} \cdot 100$ . Los valores ct de la mutación y de la reacción de tipo salvaje se compararán directamente para determinar el alelo mutado en el fondo de tipo salvaje (menos reactividad cruzada) en %.

30 1.7 Ejemplo específico: Diseño de un ensayo de PCR con ligación para la detección de la mutación en cKIT

35 V559D en el paciente 3 (véase más abajo)

*Sondas para región mutada (la región de secuencia específica de mutación se muestra en las mayúsculas, el alelo mutado se muestra en negrita y subrayado):*

cKITV559D\_1 (SEQ ID NO: 3)

5'-gggttcctaagggttga**CCCATGTATGAAGTACAGTGAAGG**A-3'

40 cKITV559D\_2 (5' fosfato) (SEQ ID NO: 4)

5'-TGTTGAGGAGATAAATGGAAACAATTATGTTTACATggcgtctagattggatcttctggcac-3'

*Sondas para la región de tipo salvaje (la región de secuencia específica de tipo salvaje de muestra en mayúsculas):*

cKIT-wt\_1 (SEQ ID NO: 5)

45 5'-gggttcctaagggttga**CGTAGCTGGCATGATGTGCATTATTGT**-3'

cKIT-wt\_2 (fosfato 5') (SEQ ID NO: 6)

5'-GATGATTCTGACCTACAAATATTTACAGGTAACCAATTctagattggatcttctggcac-3'

*Cebadores de amplificación:*

cKIT\_f (SEQ ID NO: 7)

5'-CACCCCTGTTCACTCCTTTGCTG-3'

cKIT\_r1 (Cebador Anidado) (SEQ ID NO: 8)

5'-CCCATTTGTGATCATAAGGAAGTTGTG-3'

5 cKIT\_r2 (SEQ ID NO: 9)

5'-AAAACCTCAGCCTGTTTCTGGGAAACT-3'

La amplificación utilizando los cebadores cKIT\_f/cKIT\_r2 da como resultado un producto de PCR de 308 pb de longitud, mientras que la amplificación utilizando los cebadores cKIT\_f/resultados cKIT\_r1 da como resultado un producto de PCR de 282 pb de longitud.

## 10 Ejemplo 2: Resultados

### 2.1 Análisis del paciente 1

El paciente 1 es una mujer de 76 años de edad que tiene un GIST con metástasis hepáticas. El paciente 1 se trata con sunitinib. La **Figura 1** muestra imágenes ilustrativas de resonancia magnética (RM) del seguimiento de la actividad del tumor GIST. Las imágenes de la **Figura 1(A)** fueron tomadas en Marzo de 2009 (izquierda) y Agosto de 2009 (derecha) y demuestran metástasis progresivas en el hígado durante la terapia (indicada por las flechas; aproximadamente un aumento del 150% en el tamaño). En Septiembre de 2009, las metástasis se trataron mediante termoterapia de alta frecuencia (HFTT). En Octubre de 2009, la terapia con sunitinib se detuvo debido a un accidente cerebrovascular del paciente 1 (datos no mostrados). Las imágenes de RM en la **Figura 1(B)** fueron tomadas en noviembre de 2009 (es decir, después la HFTT, izquierda) y en Mayo de 2010 (derecha). Se encontró que las metástasis en el hígado eran estables en tamaño (aumento de solo aproximadamente 5%; primera flecha, izquierda y derecha), pero después de la HFTT se hizo visible una nueva manifestación del tumor que aumentó de tamaño (segunda flecha; izquierda y derecha).

Se detectó una duplicación de la secuencia de nucleótidos GCCTAT correspondiente a los codones 502-503 del gen marcador cKIT (localizado en el exón 9, que codifica los aminoácidos AY) en el ADN del plasma de paciente 1. La **Figura 2** representa un análisis de la cantidad del ADN de cKIT mutado (expresado como la razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) durante la terapia con sunitinib. El aumento en los niveles de ADN cKIT mutado en 2009 es paralelo al progreso de las metástasis en el hígado. Después de la HFTT, el nuevo aumento en los niveles de ADN de cKIT mutado aparece en paralelo con la nueva manifestación del tumor.

### 2.2 Análisis del paciente 2

El Paciente 2 es una mujer de 49 años de edad que tiene un GIST con metástasis hepáticas en el estómago. Las imágenes de tomografía computarizada (TC) en la **Figura 3(A)** fueron tomadas en Mayo de 2009 (izquierda) inmediatamente antes del inicio de una terapia con imatinib y en Agosto de 2009 (derecha), es decir, aproximadamente dos meses después del inicio de la terapia. Las imágenes muestran una rápida respuesta a la terapia, ya que hay una disminución significativa en el tamaño, la densidad y el aumento del contraste de las metástasis hepáticas (indicadas por las flechas), así como del tumor primario (aproximadamente una reducción de 35% en el tamaño). Las imágenes de tomografía computarizada (TC) en **Figura 3(B)** fueron tomadas en Enero de 2010 (izquierda) y Enero de 2011 (derecha), respectivamente, cuando se hizo visible una sucesiva reducción de tamaño adicional (aproximadamente una nueva reducción de 30% en el tamaño).

En el ADN en plasma del paciente 2, se detectó una delección de la secuencia de nucleótidos AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGGAAG correspondiente a los codones 550-558 del gen marcador cKIT (localizado en el exón 11). La **Figura 4** representa un análisis de la cantidad del ADN de cKIT mutado (expresado como razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) durante la terapia con imatinib. Notablemente, solo dos semanas después del inicio de la terapia con imatinib no se pudo detectar ADN de cKIT mutado en la muestra de plasma. Por lo tanto, hay una excelente correlación entre la respuesta a la terapia, la morfología del tumor, y la presencia de un ADN de cKIT mutado específico del tumor

### 2.3 Análisis del paciente 3

El paciente 3 es un varón de 65 años de edad que tiene un GIST con metástasis estables en el hígado y un lento progreso de metástasis mesentéricas. Las imágenes de tomografía de emisión por positrones con 2-desoxi-2-(<sup>18</sup>F)fluoro-D-glucosa-tomografía computarizada (FDG-PET-CT; parte superior, izquierda y derecha) y la tomografía computarizada (parte inferior, izquierda y derecha) mostradas en la **Figura 5** fueron tomadas en Enero de 2008 (izquierda, parte superior), marzo de 2008 (derecha, parte superior), Abril de 2008 (izquierda, parte inferior), y Julio de 2008 (derecha, parte inferior). El paciente 3 se trató originalmente con imatinib pero desarrolló una resistencia. Durante la terapia posterior con diversos compuestos se observó un progreso más lento de las metástasis mesentéricas (indicadas por las flechas, aproximadamente 10% del tamaño).

En el ADN del plasma del paciente 3, se detectó una sustitución de nucleótidos GTT → GAT en el codón 559 (localizado en el exón 11, que codifica el cambio de aminoácido V → D). En el contexto de la resistencia a imatinib se pudo encontrar una segunda mutación: una sustitución de nucleótidos GTG → GCG en el codón 654 (localizado en el exón 13; que codifica el cambio de aminoácido V → A). La **Figura 6** muestra un análisis de la cantidad de ADN de cKIT V559D mutado (expresado como una razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) durante la terapia. El ADN de cKIT mutado V559D específico del tumor se identificó en tres muestras, mientras el ADN de cKIT mutado V654A específico del tumor se identificó en una muestra.

Estos datos demuestran que la cantidad de ADN específico del tumor presente en las muestras de plasma respectivas se corresponde con el progreso de la enfermedad durante la terapia.

#### 10 2.4 Análisis del paciente 4

El paciente 4 es una mujer de 51 años de edad que tiene un GIST en el íleon que fue tratado con resección del segmento del íleon en 2005, seguido de tres años de tratamiento coadyuvante con imatinib. Las imágenes de tomografía computarizada de la **Figura 7(A)** fueron tomadas en Marzo de 2009 (izquierda) y Septiembre de 2009 (derecha), respectivamente. En Marzo de 2009, las imágenes no mostraron evidencia de recaída. Por el contrario, la imagen tomada en Septiembre de 2009 demostró metástasis hepáticas (flecha en la **Figura 7(A)**; (izquierda)). A partir de Octubre de 2009, el paciente 4 se trató con imatinib. Las imágenes mostradas en la **Figura 7(B)** se tomaron en Diciembre de 2009 (izquierda) y Agosto de 2010 (derecha), y muestran una respuesta al tratamiento con una reducción de tamaño sucesiva de metástasis hepáticas (aproximadamente una reducción de 90% en el tamaño).

Se detectó una delección/inserción de la secuencia de nucleótidos DeIACAGTGGGAAGGTTGTTGA GGAGATAAATGGAAACAATTATGTTTACATAGACinsG correspondiente a los codones K550-K558 del gen marcador cKIT (localizado en el exón 11) en el ADN del plasma de paciente 4. La **Figura 8** representa un análisis de la cantidad del ADN de cKIT mutado (expresado como la razón específica de alelo de ADN de cKIT mutado/de tipo salvaje) antes y durante la terapia con imatinib. La detección de ADN de cKIT mutado en Octubre de 2009 es paralela a la recaída con metástasis en el hígado. No se pudo detectar ADN de cKIT mutado en las muestras de plasma obtenidas 6,5 meses antes de la recaída y en las muestras de plasma tomadas después del inicio de la terapia con imatinib. Por lo tanto, hay una excelente correlación entre la respuesta a la terapia, la morfología del tumor, y la presencia de un ADN de cKIT mutado específico del tumor.

La presente invención descrita ilustrativamente en la presente memoria se puede poner en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente en la presente memoria. De este modo, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. se deberán leer en sentido amplio y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en la presente memoria se han utilizados como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente invención se ha descrito específicamente mediante realizaciones y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de las invenciones incorporadas en ella, y que se debe considerar que tales modificaciones y variaciones están dentro del alcance de esta invención.

La invención se ha descrito ampliamente y genéricamente en la presente memoria. Cada uno de los agrupamientos de especies y sub-genéricos más reducidos que caen dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con la condición o limitación negativa de eliminar cualquier materia tratada, independientemente de si la materia eliminada se enumera específicamente o no en la presente memoria.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico y/o el seguimiento en un sujeto un tumor del estroma gastrointestinal, que comprende:
- 5 detectar en una muestra de ensayo derivada del sujeto una o más mutaciones a nivel de ADN en uno cualquiera o ambos de los genes marcadores cKIT cuya secuencia se representa en la Figura 9 (Núm. acc. GenBank NM\_000222.2) y PDGFRA cuya secuencia se representa en la Figura 10 (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4) y determinar la cantidad de ADN mutado, en donde la cantidad de ADN mutado se determina comparando directamente las fracciones de ADN mutadas y de tipo salvaje;
- en donde ADN es ADN circulante;
- 10 en donde la presencia de una cualquiera de las mutaciones detectadas en la muestra de ensayo es indicativa de un tumor del estroma gastrointestinal en el sujeto, y
- en donde una cantidad elevada de ADN mutado es indicativa de progreso del tumor del estroma gastrointestinal.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de ensayo es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de plasma.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde las una o más mutaciones se localizan en una o más cualesquiera de las regiones correspondientes a los codones 456-508, 549-599, 642-654, 670-709, 786-823, y 829 del gen marcador cKIT (Núm. de acc. GenBank NM\_000222.2) y/o en una o más cualesquiera de las regiones correspondientes a los codones 478, 561-571, 687, 824-846 y en el gen marcador de PDGFRA (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4).
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde las una o más mutaciones en el gen marcador cKIT (Núm. acc. Genbank NM\_000222.2) se seleccionan del grupo que consiste en:
- una delección de una o más cualesquiera de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los codones 550-558, 551-554, 552-559, 553-572, 553-558, 554-571, 557-558, 558-559, y 559-560, 560-578, 574-580, 578;
- 25 una delección de una o más cualesquiera de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los codones 554-561 combinada con la inserción de nucleótidos CTT;
- una delección de una o más cualesquiera de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los codones 555-572 combinada con la inserción del nucleótido G;
- una delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los codones 559-560 combinada con la sustitución de nucleótidos AAG → AGC en el codón 558;
- 30 una duplicación de una o más cualesquiera de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los codones 502-503 y 573-591;
- una inserción de la secuencia de nucleótidos
- ACCAACACAACCTTCCTTATGATCACAATGGGAGTTTCCCAGAAACAGGCTGAGTTTTGG en los codones 573-592;
- 35 una inserción de la secuencia de nucleótidos
- GCAAACAACAACCTTCCTTATGATCACAATGGGAGTTTCC en el codón 585;
- una inserción de la secuencia de nucleótidos
- TCCCAACACAACCTTCCTTATGATCACAATGGGAGTTTCCCA en el codón 586;
- una inserción de la secuencia de nucleótidos
- 40 ACAACTTCCTTATGATCACAATGGGAGTTTCCCAGAAACAGGCT en el codón 589; y
- una o más cualesquiera de las sustituciones de nucleótidos TGG → CGG y TGG → GGG en el codón 557; AAG → CCG, AAG → AAC/T, AAG → ACG, y AAG → AGG en el codón 558; GTT → GAT, GTT → GCT, GTT → GGT y GTT → GAA/G en el codón 559; GTT → GAT, GTT → GAA/G y GTT → GGT en el codón 560; AAA → GAA en el codón 642; GTG → GCG en el codón 654; y GAC → GTC y GAC → TTC en el codón 816.
- 45 5. El método de la reivindicación 3, en donde una o más mutaciones en el gen marcador PDGFRA (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4) se selecciona del grupo que consiste en: la sustitución de nucleótidos GAC → GTC en el codón 842; y una delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a los codones 542-546.



6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la detección y/o análisis de las una o más mutaciones se realiza mediante una técnica de PCR específica de alelo, preferiblemente mediante PCR con ligación.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método se realiza en un formato múltiplex.
- 5 8. El uso de un kit de partes para el diagnóstico y/o seguimiento de un tumor del estroma gastrointestinal en un método de la reivindicación 1, en donde dicho kit de partes comprende medios para detectar y determinar la cantidad de ADN mutado que comprende una o más mutaciones en uno cualquiera o ambos de los genes marcadores cKIT (Núm. de acc. GenBank NM\_000222.2) y PDGFRA (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4).
- 10 9. El uso de una o más mutaciones como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en uno cualquiera o ambos de los genes marcadores cKIT (Núm. acc. Genbank NM\_000222.2) y PDGFRA (Núm. acc. Genbank NM\_006206.4) en forma de un panel de marcadores moleculares para la obtención de información cuantitativa para el diagnóstico y/o seguimiento de un tumor del estroma gastrointestinal, en donde dicha información cuantitativa se obtiene comparando directamente fracciones de ADN mutado y de tipo salvaje y en donde una cantidad elevada de ADN mutado es indicativa del progreso del tumor del estroma gastrointestinal.

**FIGURA 1**

**A**



**B**

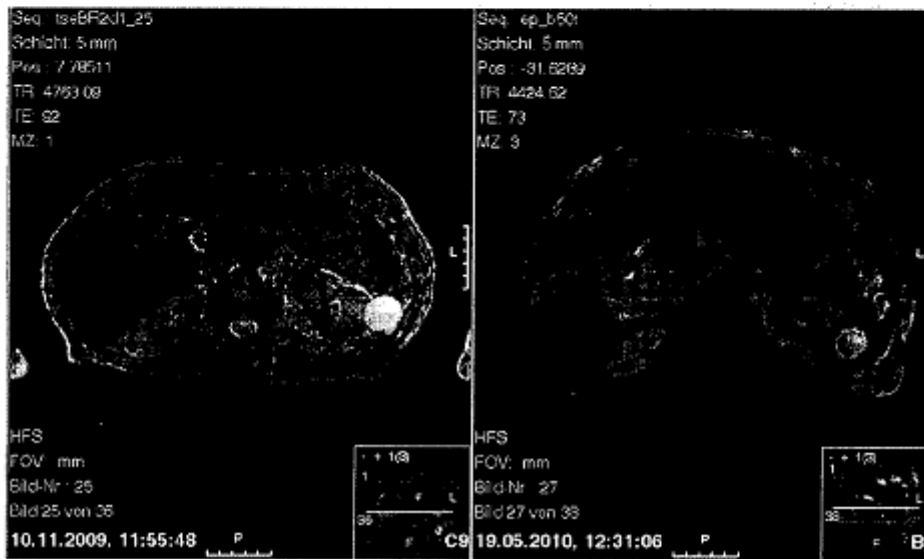
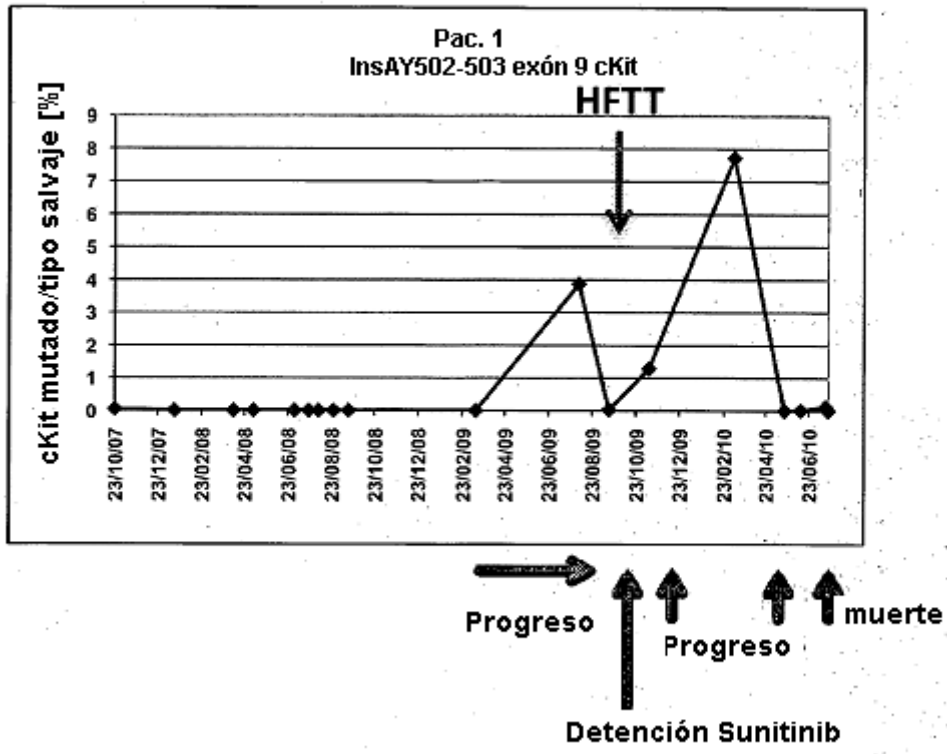


FIGURA 2

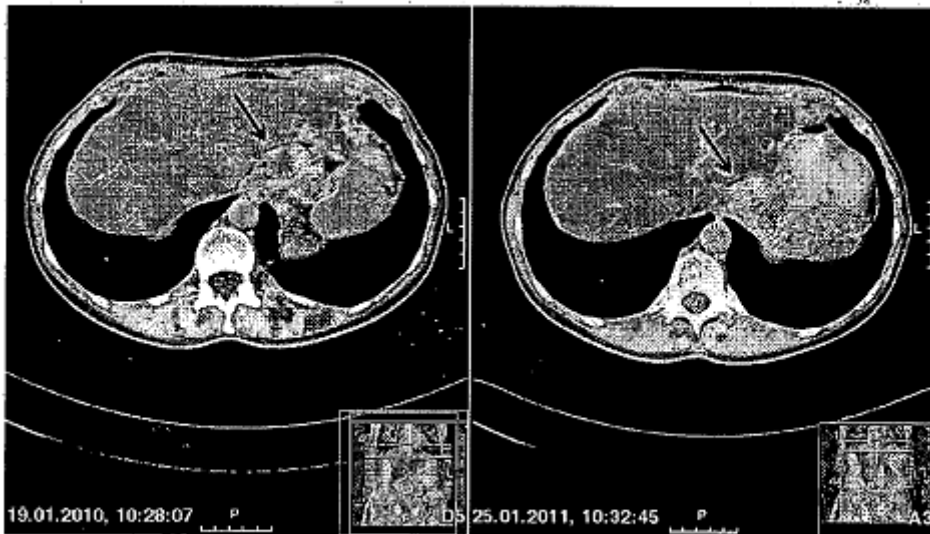


**FIGURA 3**

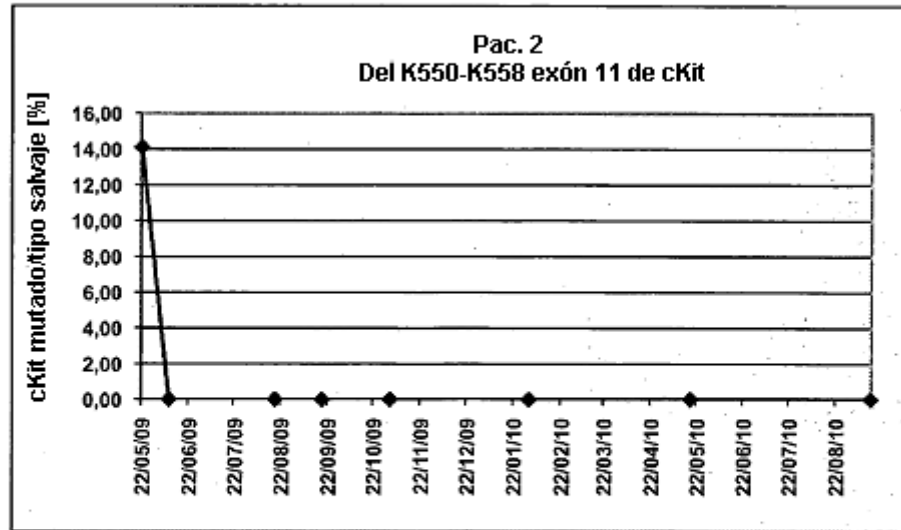
**A**



**B**

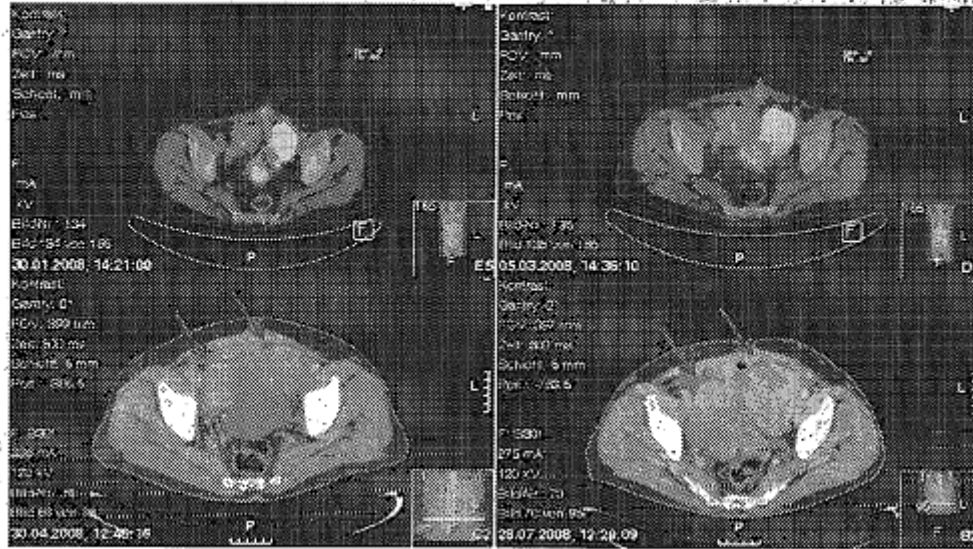


**FIGURA 4**

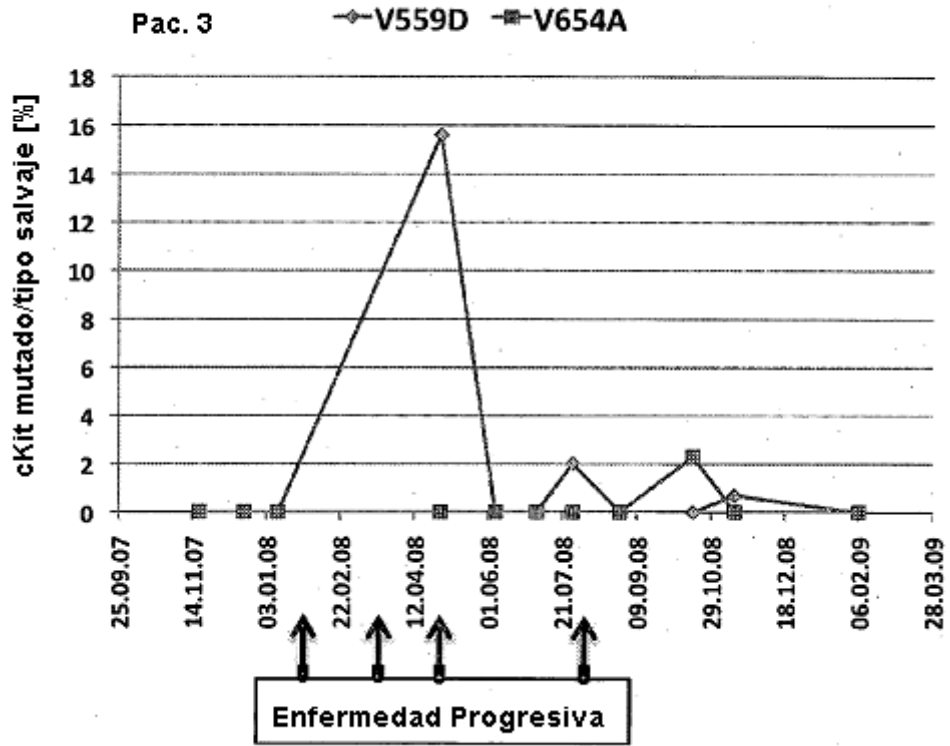


**Inicio Imatinib**

**FIGURA 5**

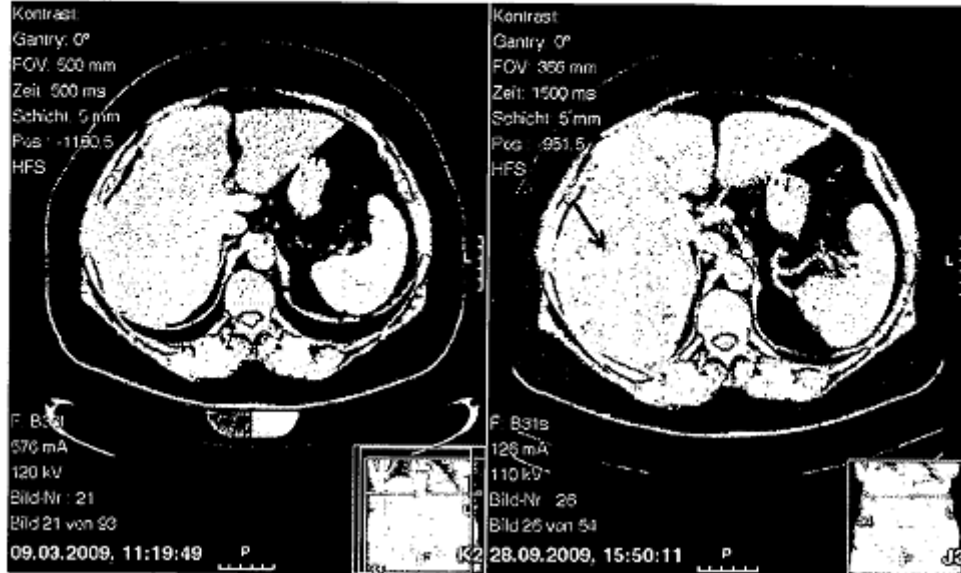


**FIGURA 6**



**FIGURA 7**

**A**

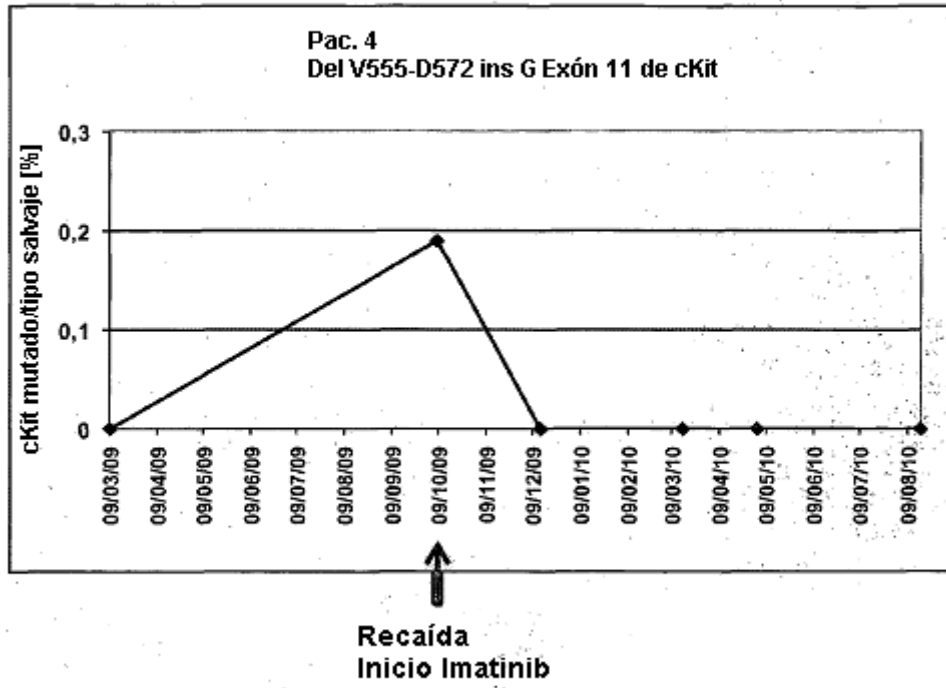


**B**





**FIGURA 8**



**FIGURA 9**

atgagaggcgtcgcggcgcctgggattttctctgcttctgctcactgctcgcgtccagacaggctcttcaacctctgtgagtc  
caggggaaaccgtctccaccatccatccatccagaaaatcagacttaatagtccgcgtggcgcgacgagattaggctgttatgcactgat  
ccgggctttgtcaaatggacttttgatcctggatgaaacgaatgagaataagcagaatgaatggatcacggaaaaaggcagaagcca  
ccaacaccggcaaatcacgtgcaccaacaacacggcctaagcaattccattatgtgtttgttagatcctgccaagccttctctgtt  
gaccgctcctgtatgggaaagaagacaacgacacgctgtccgctgctcctcagaccagaagtgaaccaattatccctcaagg  
ggtgccaagggaagcctctcccaaggacttgaggttattcctgaccccaaggcggcgcacatgatcaaaagtgtgaaacgcgccta  
ccatcggcctctgtctgactgttctgtgaccaggaggcgaagtcagtgtctgcaaaaaattcatcctgaaagtggccagcctca  
agctgtcctgttgtctgtgtccaaaagcaagctatctttaggggaagggaagaattcacagtacgtgcacaataaaagtgtgtct  
agttctgtgtactcaacgtggaaaagagaaaacagtcagactaaactacaggagaataataatagctgcatcacgggtactcaattat  
gaacgtcaggcaacgttgactatcagttcagcgaaggttaatgaltctggaggtgtcatgtgttatgccaataatacttttgatcagcaaat  
gtcacaacaaccttggaagtagtagataaaggattcattaatatcttcccataaactactacagtattgtaaacgatggagaaaatgt  
agatttgattgtgaatatgaagcattccccaaacctgaaacaccagcagtgatctatatgaacagaaccttcactgataaatgggaagat  
tatcccaagctctgagaatgaagtaatacagatacgttaagtgaacttcatcaacgagattaaaaggcaccgaaggaggcacttacac  
attcctagtgtccaaactctgacgtcaatgctgccatagcafttaattgtttatgtgaalacaaaaccagaaatcctgacttacgacaggctcgt  
gaatggcatgctccaatgtgtggcagcaggattcccagagcccacaatagattggtattttgtccaggaaactgagcagagatgctctgc  
ttctgtactgccagtgagtgagacactaaactcatctggccaccgttggaagcctagtggttcaagattctatagattctagtgcatt  
caagcacaatggcagcgttgaatgtaaggcttacaacgatgtggcaagactctgctctatttaactttgcatttaaaggtaacaacaaa  
gagcaaatccatccccacacctgttactccttctgctgattggttcgtaatcgtactggcatgatgtgcattattgtgatgattctgacct  
acaaatattacagaaccatgatgaaagtacagtggaagggttgaggagataaatggaacaattatgtttacatgacccaacaca  
actccttatgatcacaaatgggagttccagaacaaggctgagtttgggaaaacctgggtgctggagcttccgggaaagggttga  
ggcaactgcttatggcctaataagtcagatggcccatgactgtcgtgtaagatgctcaagccgagtgcccattgacaagaacggg  
aagccctcatgtctgaactcaaaagtcctgagttacctggtaatacatgaatattgtgaatctactggagcctgcaccattggagggcc  
caccctggtcattacagaatattgtgctatggtgatctttgaaatgttgagaagaaaacgtgattcattattgttcaaaagcaggaagatc  
atgcagaagctgcactttataagaatctctgactcaaaaggagtctcctgacgagatagtactaatgagtcacatggacatgaaacctgg  
agtttcttatgttgccecaacaaaggccgacaaaaggagatctgtgagaataggctcatacagaagagatgtgactcccgccatcat  
ggaggatgacgagttggccctgacttaagaactgtgagcttttctaccagggtgcaaaaggcatggcttctcctccctcaagaa  
ttgtatcacagagacttgcaagccaataatcctcctactcatgctggatcacaagattgtgattttgtctagccagagacatca  
agaatgattctaattatgtgttaaaggaaacgctcactacctgtgaaagtggatggcacctgaaagcattttcaactgtgtatacacgtt  
gaaagtgcagctcggcctatgggattttcttgggagctgttctctttaggaagcagcccctatcctggaatgccgctgattctaagttc  
tacaagatgatcaaggaaaggcttcggatgctcagccctgaacacgcacctgctgaaatgtatgacataatgaagactgctgggatgc  
agatcccctaaaaagaccaacattcaagcaaatgttcagctaatgagaagcagatttcagagagcaccatcatatttactccaactta  
gcaaaactgcagcccacaccgacagaagcccgtgtagaccattctgtcggatcaattctgtcggcagcaccgcttctcctcccaagc  
ctctgttgtgcacgacgatgtctga

**FIGURA 10**

aagagcaaaaagcgaaggcgcaatctggacactgggagatfcggagcgcagggagttgagagaaacttttattttgaaagagaccaa  
ggltgagggggggcttatttctgacagctatttacttagagcaaatgattagttttgaaaggatggactataacattgaatcaattacaaaa  
cgcgggttttgagcccattactgttggagctacaggagagaaacagaggaggagactgcagagatcattggagggcgtgggcacg  
ctcttactccatgtgtgggacattcattgcggaataacatcggaggaagaatttcccagagctatggggacttcccacccggcgttctg  
gtcttaggctgtcttctcagggctgagcctaactctgccagcttccattaccctctatccctccaaatgaaaatgaaaagggttgcag  
ctgaattcaiccttttctgagatgcttggggagagtgaaagtgaagctggcagtaacccatgctgaaagagagagctccgatgtgga  
aatcagaaatgaagaaaaacaagcggccttttggacggcttggaaagtgaagcagtcctcggcggccacacaggggtgtacactt  
gctattacaaccacactcagacagaagagaatgagcttgaaggcagccacattacatctatgtccagaccagatgtgacctttgtac  
ctctaggaatgacggattattttagtcatcgtggaggatgattctgcccattataccttctgcacaactgacccgagactcctgtaacct  
tacacaacagtgaggggggtgtacctgctcctacgacagcagacaggcctttaaaggacaccttactgtaggccctatctgtgag  
gccaccgtcaagggaagaaagtccagaccatcccattaatgtttatgctttaaagcaacatcagagctggatctagaaatggaagct  
cttaaaccgtgtataagtcaggggaaacgattgtgtcacctgtgctgttttaacaatgaggtggtgaccttcaatggacttaccctgg  
agaagtgaaggcaaggcacaatgctgggaagaaatcaaagtcccatccatcaaattggtgtacactttgacgggtcccggagggcc  
acgggtgaaagacagtgagattacgaatgtctgcccggcaggtaccaggggcctcaagaaatgaagaaagtcactatttctgtcc  
atgagaaaagggttcattgaaatcaaacccaccttcagccagttggaagctgtcaacctgcatgaagtcacaactttgtttagaggtgcg  
ggcctacccacctcccaggatctcctggctgaaaaacaatctgactctgattgaaaatcactgagatcaccactgatgtgaaaagat  
tcaggaaataaggtatcgaagcaaatgaaagctgatccgtgtaaggaaagacagtgccattatactattgtagctcaaaatgaa  
atgctgtgaaagctatactttgaaactgtaactcaagttccttcatccattctggacttggctgatgacccatggctcaactgggggac  
agacgggtgaggtgcacagctgaaggcacgccgcttctgattgagtgatgatgcaagatattaagaatgtaataatgaaactt  
cctggactattttggccaaatgctcaaacatcatcagggagatccactcccagacagaggtaccgtggaggccggtgtgacttcc  
ggcaaaagtggaggagaccatgccgtgcgatgctggcctaagaatccttggagctgagaaccagagctgaaagctggtggtcctcc  
acctgcgttctgaaactcacgggtgctgctgagctcctgctgttgggtgattgtgatctcacttattgtcctggtgtcatttggaaac  
agaaaccgaggtatgaaatfcgctggagggtcaltgaaacaaacagccagatggacatgaaatatttattgtgaccgatgagctg  
ccttatgactcaagatgggagtttcaagagatggactagcttggctggcttctgggctctggagcgtttgggaaaggtggtgaaagg  
acagcctatggattaagccgggtcccaacctgtcatgaaagtgacgtgaaagatgctaaaaccacggccagatccagtgaaaaacaag  
ctctcatgctgaaactgaaataatgactcacctggggccacattgaaactgtgaaactgctgggagcctgcaccaagtcagggccca  
tttacctatcacagagatgcttctatggagatttggtaactattgcataagaataggatagcttctgagccaccaccagagaag  
ccaaagaagagctggatcttggattgaaacctgctgatgaaagcacacggagctatgttattttatcttttgaacaatggtgacta  
catggacatgaagcagctgatactacacagatgtccccatgctagaaaggaaagggttctaaatattccgacatccagagatcact  
ctatgatcgtccagcctcatataagaagaaatctatgttagactcagaagtcacaaaccttccagatgataactcagaagccttacttt  
altggatttggagcttccctatcaagttgcccggaggaatggagttttggcttcaaaaattgtgtccaccgtgatctgctgctcgc  
cgtcctcctggcacaaggaaaaattgtgaagatctgacttggcctggccagacatcatgcatgattcgaactatgtctgaaagg  
cagtaaccttctgccgtgaaaggatgctcctgagagcatctttgacaacctctacaccaactgagtgatgtctggcttattggcattc  
tgctctgggagatctttcccttgggtggcacccttaccocggcatgatggtggattctactttctacaataagatcaagagtggtgaccgg

atgccaaacctgaccacgctaccagtgaagtctacgagatcatggtgaatgctggaacagtgagccggagaagagaccctccttt  
accacctgagtgagattgtggagaatctgctgcctggacaataaaaaagagttatgaaaaaattcacctggacttctgaagagtgacc  
atcctgctgtggcacgcatgctgtggactcagacaatgacatacattggtgtcacctacaaaaacgaggaagacaagctgaaggactg  
ggagggtggtctggatgagcagagactgagcgtgacagtggttacatcattcctctgctgacattgacctgtccctgaggaggag  
gacctgggcaagaggaaacagacacagctcgcagacctgaaagagagtgccattgagacgggtccagcagttccacctcatcaag  
agagaggacgagaccattgaagacatcgacatgatggatgacatcggc atagactctcagacctggtggaagacagcttctgtaac  
tggcggattcaggggtccttccacttctggggccacctctggatcccgttcagaaaaccatttattgcaatgcaaggttgagagga  
ggacttgggtgatgttaaaagagaagttcccagccaaagggcctcggggagcgttctaaatgaaatgggataatgtgaaatgaactt  
tgcagtgttgcctcttgaatgcctcagtagcatctcagtggtgtggaagttggagatagatggataaggaataataggccacagaa  
ggtgaactttgtctcaagacattggtgagagtgcaacagacacaatttatactgcgacagaacttcagcattgtaattatgtaataac  
tctaaccaagctgtgttagattgtattaactatcttcttggacttctgaagagaccactcaatccatccatgacttccctctgaaacctg  
atgtcagctgctgtgaacttttaagaaagtcatgaaaaaccattttgaaaccttaaaaggactgtactatagcattttgctatctttta  
gtgttaagagataaagaataataataaccaacctgttaatagatgtgggtcatttagaagcctgacaactcattttcatattgtaactat  
gtttataactactactgttatcagtaagtctaaatgtgtaataatgtaacatgattccctccagagaaagcacaatttaaacaaactctac  
taagtaggtgatgattgacagttttgacatttataataaacatgttctcctataaagatggtaataagctttagtgaattaaatttagttg  
gcatagagaacaaagtaaaagtgtgttccagggaagtcagaatttttaactgtactgaataggttcccaatccatcgtaltaaaaaac  
aattaactgccctctgaataatgggattagaacaacaaactcttaagtctaaaagttcfaatgtagaggcataaacctgtgctga  
acataacttctcatgtatattaccaatggaataataatgatcagcaaaaagactggattgcagaagtttttttttttttcttcatgctgat  
gaaagcttggcgaccccaatatagtatttttgaactctatgaacctgaaaagggtcagaaggatgccagacatcagcctccttcttca  
ccccttaccacaaagagaaaagtgttgaactcagaccataaagatattcttagtgaggctggatgtgcattagcctggtacctcag  
tctcaaatgtgtgtggcagccaggatgactagatcctgggttccatccttgagattctgaaatgagctgagggaaccagagtctg  
tatttttcaaacctcctgctgttctgatcggccagtttctgaaacactgacttaggttcaggaagttgccatgggaaacaaataattga  
actttggaacagggttgcaatcaaccacgaggaagcctactatftaatccttggcttcaggttagtgacatttaagccatctagctag  
caattgagaccttaattaaacttccagctcttagctgaggctgagaaaagctaaagttgtttgacagggtttccaaaagtaaatgctact  
tcccactgtatgggggagattgaacttccccgtctcccgtctctgctcccactccataccccgccaaggaaagcagatgacaaaatt  
atgcaattcagtggtccaagctctgtgtaaccaactcagtggtttgggtgaaaaaacatttaagtttactgataattgaggttagatggga  
ggatgaattgcacatctatccacactgtcaaacagggtggtgtgggttcattggcattctttgcaactgcttaattgctgataccataga  
atgaaacatgggctgtgattactgcaatcactgtgctatcggcagatgatgctttggaagatgcagaagcaataataaagtactgactac  
ctactggtgtaatctaatcaagccccacttcttccaacttttcatagtaagtgcgaagactgagccagattggccaattaaaaac  
gaaaaactgactagggtctgtagaccaattagacttgaataacgtttgtttctagaatcacagctcaagcattctgtttatcgtcactct  
ccctgtacagccttattttgtgtgctttgcaatttgatattgctgtgagcctgcatgacatcatgaggccggatgaaacttctcagtcag  
cagttccagctcaacaaatgctcccactgaattgtatgatgactgcaattgtgtgtgtgtgtgttttcagcaaatccagattgttctct  
ttggcctcctgcaaagtctcagaagaaaattgccaactttctactttctattttatgatgacaaatcaagccggcctgagaacactat  
ttgtgacttttaaacgattagtgatgctttaaagtgtgtctgccaactctgacaaaatggtctattttgtgaaagaggacataagataa  
aatgatgttatacatcaaatgtatataatgtttctatatagacttgagaatactgcaaaaactttatgacaagctgtatcactgcctctgtt  
tataatttttaactgtgataatccccacaggcacatfaactgttgcacttttgaaatgtccaaaattatatttgaataataaaaagaagat  
acttacatgttccaaaacaatggtgtgtgaaatgtgtgagaaaaactaactgatagggtctaccaatacaaaaatgtattacgaatgcc  
ctgttcatgttttttttaaacgtgtaaatgaagatctttatattcaataaatgataataatttaagtta