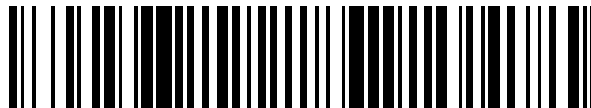


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 098**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2010 E 16175320 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3133167**

54 Título: **Métodos relacionados con las fusiones de ALK para diagnosticar el cáncer**

30 Prioridad:

15.05.2009 US 178937 P

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

14.02.2019

73 Titular/es:

**Insight Genetics, Inc. (100.0%)
111 10th Ave. South
Nashville, TN 37203, US**

72 Inventor/es:

**NICKOLS, JOSH;
DAHLHAUSER, ERIC;
HAUT, DAVID y
NORMAN, KIM**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 700 098 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 relacionados con las fusiones de ALK para diagnosticar el cáncer

5 **Antecedentes**

Se considera que las mutaciones de la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) están implicadas en el desarrollo de subconjuntos de numerosos cánceres, que incluyen i) carcinoma pulmonar no microcítico; ii) linfoma difuso de linfocitos B grandes; iii) carcinoma de células escamosas del esófago; iv) linfoma anaplásico de células grandes; v) neuroblastoma (un cáncer infantil que surge del sistema nervioso periférico en desarrollo); y vi) los sarcomas conocidos como tumores miofibroblásticos inflamatorios (TMI). Los resultados de los pacientes con muchos de estos tumores malignos son escasos, debido en parte a la detección tardía de los cánceres debido a la falta de métodos de diagnóstico clínico eficientes. La detección y diagnóstico tempranos de cánceres mediados por *ALK* aumentan dramáticamente las tasas de supervivencia en la población de pacientes; a modo de ejemplo, la detección temprana del linfoma anaplásico de células grandes *ALK*-positivo puede dar como resultado tasas de supervivencia de hasta el 83 % mientras que la detección tardía está asociada en algunos casos con la supervivencia de solo el 50 % de la población de pacientes. Una tecnología que permitiría la detección temprana de estos cánceres podría facilitar enormemente la gestión médica de los pacientes que los padecen, ayudando en última instancia a mejorar los resultados de sus tratamientos. Los datos clínicos preclínicos y clínicos tempranos indican que solo los cánceres que expresan las mutaciones de *ALK* activadoras que conducen su desarrollo y progreso exhiben respuestas antitumorales robustas a los inhibidores de moléculas pequeñas de *ALK*.

Dirks, et al (2002), Int. J. Cancer (100, 49-56), se refiere a la expresión y al análisis funcional del gen de la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en líneas celulares tumorales. Lamant, et al (2000), American Journal of Pathology (vol. 156, n.º 5), se refiere a la expresión del gen de la tirosina cinasa *ALK* en el neuroblastoma.

Breve resumen

La presente invención se refiere a un método para diagnosticar un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto, comprendiendo el método la realización de un proceso de amplificación de ácido nucleico en una muestra de tejido del sujeto y la detección de la presencia del ácido nucleico del dominio cinasa de *ALK* de tipo silvestre en la muestra de tejido usando un par de cebadores, en el que el par de cebadores usado en el proceso de amplificación consiste en un cebador directo y un cebador inverso que se hibridan específicamente con el dominio cinasa de tipo silvestre de *ALK*; y en el que la presencia de ácido nucleico en el dominio cinasa de *ALK* de tipo silvestre indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*; y en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, carcinoma colorrectal, carcinoma pulmonar no microcítico, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células escamosas del esófago, linfoma anaplásico de células grandes, tumores miofibroblásticos inflamatorios e histiocitosis maligna.

Los métodos y las composiciones divulgadas en el presente documento se refieren al campo de la detección o diagnóstico de la presencia de una enfermedad o afección tal como el cáncer; la evaluación de la susceptibilidad o del riesgo de una enfermedad o afección tal como el cáncer; el seguimiento de la progresión de la enfermedad para una enfermedad tal como el cáncer; y la determinación de la susceptibilidad o la resistencia a un tratamiento terapéutico de una enfermedad tal como el cáncer, en el que la enfermedad o afección es un cáncer asociado con una variación del ácido nucleico, truncamiento o fusión de genes del gen *ALK*. En el presente documento, se entiende y se contempla que los métodos divulgados en el presente documento permiten una detección rápida y sensible de mutaciones raras (es decir, variaciones de nucleótidos que son bajas en número) que incluyen mutaciones que comprenden las fusiones de polipéptidos en presencia de un exceso de ADN normal así como la detección de truncamientos raros y sobreexpresión aberrante de genes de tipo silvestre.

La presente divulgación, en un aspecto, se refiere a los métodos para detectar la presencia de un cáncer mediante la detección de una variación de nucleótidos dentro de un ácido nucleico de interés que comprende la realización de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) en ARNm extraído de una muestra de tejido de un sujeto con cáncer; en donde la presencia de producto de amplificación o un aumento en el producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de una fusión, variación de nucleótidos, truncamiento o expresión excesiva, detectando de este modo la presencia de un cáncer. En particular, la divulgación, en un aspecto, se refiere a métodos para detectar la presencia de una o más fusiones relacionadas con *ALK*, y/o la expresión regulada al alza de *ALK* de tipo silvestre como puede ocurrir en ciertos cánceres.

Las ventajas adicionales de los métodos y composiciones divulgados se expondrán en parte en la siguiente descripción y, en parte, se entenderán a partir de la descripción o se pueden aprender por la práctica del método y composiciones divulgados. Las ventajas de los métodos y composiciones divulgados se realizarán y alcanzarán mediante los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones anexas. Se debe entender que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada, son ejemplares y explicativas únicamente y no son restrictivas de la invención como se reivindica.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones del método y composiciones divulgados y en conjunto con la descripción, sirven para explicar los principios del método y composiciones divulgados.

La Figura 1 muestra proteínas de fusión de *ALK* representativas, los reordenamientos cromosómicos que las generan, su aparición en linfomas *ALK* positivos y sarcomas de tumores miofibroblásticos inflamatorios (TMI), y sus localizaciones subcelulares. Se muestra un listado parcial de las fusiones de *ALK* oncógenas más comunes (no mostradas: *ALO17-ALK*, *CARSALK*, *MYH9-ALK*, *SEC31L1-ALK*, *MSN-ALK* y *TFG_{XL}-ALK*). C: citosólico; N: nuclear; MC: membrana celular; MN: membrana nuclear. TPM3: tropomiosina-3; ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa; CLTC: cadena pesada de clatrina; TFG: gen fusionado a TRK; TPM4; tropomiosina-4; MSN: moesina; RanBP2: proteína 2 de unión a Ran; EML4: proteína 4 asociada a microtúbulos de equinodermos.

La Figura 2 muestra cebadores directos e inversos para las reacciones de RT-PCR para detectar fusiones de *ALK*. La Figura 3 muestra una posición aproximada de la sonda y la región de rotura de *ALK* de tipo silvestre y varias parejas de fusión que incluyen siete variantes de *EML4-ALK*, *NPM-ALK*, *MSN-ALK*, *CLTC-ALK*, *TPM-ALK*, y *KIF5B-ALK*.

La Figura 4 muestra la amplificación por RT-PCR de las dianas de fusión de *ALK*.

La Figura 5 muestra una detección de una fusión de *ALK* y la identificación de un amplicón por RT-PCR. La Figura 5A muestra que una muestra de un sujeto se puede obtener y evaluar para la presencia de fusiones de *ALK* (conocidas o no identificadas previamente), *ALK* de tipo silvestre, dominios cinasa de *ALK*, así como los controles de reacción para la normalización entre ensayos (*COX5B*) y controles de ensayo positivos y negativos. La Figura 5B muestra ejemplos de la identificación de fusiones o tipos silvestres por tamaño de amplicón.

Descripción detallada

Antes de que los presentes compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos se divulguen y se describan, debe entenderse que no se limitan a métodos sintéticos específicos o a métodos biotecnológicos recombinantes específicos, a menos que se especifique lo contrario, ni a reactivos particulares, a menos que se especifique lo contrario, ya que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea una limitación.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un transportador farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de dichos transportadores y similares.

Los intervalos se pueden expresar como desde "aproximadamente" un valor particular y /o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular constituye otra realización. Se entenderá adicionalmente que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final. Se entiende también que en el presente documento se divulga un número de valores y que cada valor se divulga también en el presente documento como "aproximadamente" este valor particular además del valor mismo. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", entonces se divulga también "aproximadamente 10". Se entiende también que cuando se divulga un valor que es "inferior o igual a" el valor, "superior o igual al valor" y posibles intervalos entre valores también se divulgan, como entiende apropiadamente un experto en la materia. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", se divulga también el valor "inferior o igual a 10" así como "superior o igual a 10". También se entiende que, en toda la solicitud, los datos se proporcionan en un número de distintos formatos, y que estos datos, representen puntos finales y puntos de partida, y los intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se divulgan un punto de dato particular "10" y un punto de dato particular "15", se entiende que superior a, superior o igual a, inferior a, inferior o igual a, e igual a 10 y 15 se consideran divulgados así como entre 10 y 15.

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que se presentan a continuación, se hará referencia a un número de términos que se definirán por tener los siguientes significados:

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no.

Un "aumento" puede referirse a cualquier cambio que da como resultado una cantidad mayor de una composición o compuesto, tal como un producto de amplificación con respecto a un control. Por tanto, por ejemplo, un aumento en los productos de amplificación puede incluir pero sin limitación un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de aumento. También se contempla en el presente documento que la detección de un aumento en la expresión o abundancia de un ADN, ARNm o proteína con respecto a un control incluye necesariamente la detección de la presencia del ADN, ARNm o proteína en situaciones en las que el ADN, ARNm o proteína no están presentes

en el control.

"Obtención de una muestra de tejido" u "obtener una muestra de tejido" significa recoger una muestra de tejido de un sujeto o medir un tejido en un sujeto. En el presente documento, se entiende y se contempla que las muestras de tejido se pueden obtener por cualquier medio conocido en la materia, incluidas las técnicas invasivas y no invasivas. Se entiende también que los métodos de medición pueden ser directos o indirectos. Ejemplos de métodos para obtener o medir una muestra de tejido pueden incluir, pero sin limitación, biopsia de tejido, lavado de tejido, aspiración, hisopo de tejido, punción lumbar, formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM), barrido por tomografía computarizada (CT), barrido por tomografía de emisión de positrones (PET) y rayos X (con y sin medio de contraste).

La detección sensible de una mutación en un sitio conocido en el ADN se realiza fácilmente con las tecnologías existentes. Los cebadores específicos de alelo pueden diseñarse para guiar una mutación en una ubicación conocida de manera que su señal pueda amplificarse preferentemente sobre el ADN de tipo silvestre. Desafortunadamente, esto no es posible con las mutaciones conocidas que pueden producirse en cualquier posición (base) en la secuencia diana.

Métodos de detección de un cáncer relacionado con *ALK*

Los métodos divulgados se refieren, en un aspecto, a los métodos de detección o diagnóstico de la presencia de una enfermedad o afección tal como el cáncer, la evaluación de la susceptibilidad o del riesgo de una enfermedad o afección tal como el cáncer, el seguimiento de la progresión de una enfermedad o afección tal como un cáncer, y la determinación de la susceptibilidad o resistencia al tratamiento terapéutico para una enfermedad o afección tal como un cáncer en un sujeto que comprende la detección de la presencia o la medición del nivel de expresión de ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde un aumento en la cantidad de producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer, y en donde el cáncer está asociado con una variación del ácido nucleico, truncamiento o fusión de genes de *ALK*.

Cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*)

El gen *ALK* codifica un receptor tirosina cinasa (RTK) denominado *ALK* (SEQ ID NO: 1) (n.º de registro Genbank U62540 (secuencia codificante humana)) y se expresa normalmente en primer lugar en los sistemas nerviosos centrales y periféricos. El polipéptido de *ALK* de 1620aa comprende un dominio extracelular de 1030aa que incluye una secuencia de péptido señal amino-terminal de 26aa y sitios de unión ubicados entre los restos 391 y 401. Adicionalmente, el polipéptido de *ALK* comprende un dominio cinasa (restos 1116-1383) que incluye tres tirosinas responsables de la autofosforilación dentro del bucle de activación en los restos 1278, 1282 y 1283. Se ha demostrado que las mutaciones de *ALK* activan de forma constitutiva la función catalítica de la cinasa de la proteína *ALK*, con el mutante desregulado *ALK* activando a su vez las proteínas de señalización celular cadena abajo en vías que promueven la proliferación celular aberrante. De hecho, las mutaciones que dan como resultado una actividad desregulada de la cinasa *ALK* están asociadas con varios tipos de cánceres.

Las fusiones de *ALK* representan la mutación más común de esta tirosina cinasa. Dichas fusiones incluyen, pero sin limitación, la nucleofosmina-*ALK* (NPM-*ALK*), 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa (ATIC-*ALK*), cadena pesada de clatrina-*ALK* (CLTC-*ALK*), gen de la cadena pesada de quinesina-1-*ALK* (KIF5B-*ALK*); proteína 2 de unión a Ran -*ALK* (RANBP2-*ALK*), SEC31L1-*ALK*, tropomiosina-3-*ALK* (TPM3-*ALK*), tropomiosina-4-*ALK* (TPM4-*ALK*), gen fusionado a TRK (grande) -*ALK* (TFG_L-*ALK*), gen fusionado a TRK (pequeño) -*ALK* (TFG_S-*ALK*), CARS-*ALK*, EML4-*ALK*, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa-*ALK* (ATIC-*ALK*), ALO17-*ALK*, moesina-*ALK* (MSN-*ALK*), gen de la cadena pesada de miosina no muscular-*ALK* (MYH9-*ALK*), y gen fusionado a TRK (extragrande) -*ALK* (TFG_{XL}-*ALK*). Seis fusiones de *ALK*, CARS-*ALK*, CLTC-*ALK*, RANBP2-*ALK*, SEC31L1-*ALK*, TPM3-*ALK*, y TPM4-*ALK* se han identificado en TMI. TPM3-*ALK*, Se han detectado las fusiones TPM4-*ALK* y CLTC-*ALK* tanto en linfomas clásicos linfocíticos T o linfocíticos nulos y sarcomas de TMI, mientras que CARS-*ALK*, RANBP2-*ALK*, y SEC31L1-*ALK* ocurren en TMI. CLTC-*ALK* y NPM-*ALK* también ocurren en linfomas linfocíticos B plasmablastos/inmunoblásticos. La fusión TPM4-*ALK* ocurre en los carcinomas de células escamosas esofágicas, y la fusión *ALK* EML4-*ALK*, TFG-*ALK* y KIF5B-*ALK* se encuentran en los cánceres no microcíticos de pulmón. Se ha identificado también recientemente EML4-*ALK* en carcinomas colorrectales y de mama igualmente. Por lo tanto, en un aspecto, se divulgan en el presente documento métodos para detectar la presencia de una fusión relacionada con *ALK* que comprende la detección de la presencia de o la medición de la cantidad de ácido nucleico asociada con una fusión de *ALK* de una muestra de tejido de un sujeto, mientras que la presencia de un ácido nucleico con respecto a un control indicó la presencia de una fusión de *ALK*.

Las fusiones de *ALK* están asociadas con varios tipos de cáncer conocidos. Se entiende que una o más fusiones de *ALK* pueden asociarse con un cáncer particular. Se entiende además que hay varios tipos de cáncer asociados con las fusiones de *ALK* que incluyen, pero sin limitación, el linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovarios, carcinoma colorrectal, carcinoma pulmonar no microcítico, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células escamosas del esófago, linfoma anaplásico de células grandes, neuroblastoma, tumores miofibroblásticos inflamatorios, histiocitosis maligna y glioblastomas.

ALCL. linfomas anaplásicos de células grandes comprenden ~2,5 % de todos los LNH (linfoma no Hodgkin); dentro del grupo de edad pediátrica específicamente, ~13 % de todos los LNH (30 - 40 % de todos los linfomas de células grandes infantiles) son de este tipo. Los estudios de todos los pacientes de ALCL ahora dividen este LNH en subconjuntos ALK-positivos y ALK-negativos; ~60 % de todos los ALCL están provocados por las fusiones de ALK. Por razones poco claras, los pacientes de ALCL ALK-positivos responden significativamente mejor después de la quimioterapia convencional multiagente basada en CHOP que aquellos con enfermedad ALK-negativa (con supervivencia general de 5 años del ~75 % contra ~35 %, respectivamente). Sin embargo, más de un tercio de los pacientes sufren múltiples recaídas después de la quimioterapia, por tanto, los 5 años de supervivencia *libre de enfermedad* de ALCL ALK-positivos es solo del ~40 %.

Linfoma difuso de linfocitos B grandes ALK+. En 2003, se demostró que las fusiones de ALK ocurrían en una forma no ALCL de LNH con la descripción de CLTC-ALK o NPM-ALK en los linfomas difusos de células B grandes (ALK+ DLBCL). En consonancia con su linaje B, estos LNH expresan marcadores citoplasmáticos de IgA y células plasmáticas y poseen morfología inmunoblástica. Los estudios de investigación traslacional aplicable revelaron los ARNm de t(2; 17) y *CLTC-ALK* en la mayoría de estos linfomas, mientras que el inmunomarcaje confirmó la tinción granular de ALK idéntica a la observada en ALCL CLTC-ALK-positivo. Como para todas las demás proteínas asociadas de fusión de ALK, un motivo de autoasociación en la porción de CLTC de CLTC-ALK media la autoasociación constitutiva y la activación de la cinasa de fusión para conducir la linfomagenesis. DLBCL ALK+ ocurren de manera predominante en adultos; sin embargo, el ARNm de t(2;5) y *NPM-ALK* en linfomas pediátricos son fenotípicamente idénticos a B-LNH adultos CLTC-ALK-positivos. Se considera que aproximadamente el 0,5-1 % de todos los DLBCL son ALK-positivos. La identificación de DLBCL causados por ALK mutante es importante porque los pacientes con estos linfomas tienen resultados que son muy inferiores a los pacientes de DLBCL ALK-negativos después de tratamientos basados en CHOP; por tanto, los pacientes de DLBCL ALK+ deberían considerarse como candidatos para la terapia específica con inhibidor de la cinasa de ALK.

Histiocitosis sistémica ALK+. Las fusiones de ALK se describieron en el año 2008 en otra histiocitosis sistémica de neoplasia hematopoyética. Tres casos de esta forma previamente no caracterizada de histiocitosis, que se presenta en la infancia temprana, exhibieron inmunorreactividad de ALK y el caso analizado molecularmente expresó TPM3-ALK.

Además de los tumores malignos hematológicos anteriormente mencionados en los que las fusiones de ALK activadas de manera constitutiva han demostrado ser un mecanismo causal en muchos casos, la génesis de subconjuntos de varios tumores sólidos en algunos casos, tumores humanos muy comunes tales como cáncer no microcítico de pulmón, cánceres colorrectales y de mama se ha demostrado que se deben a ALK de activación aberrante.

Tumor miofibroblástico inflamatorio. El primer tumor no hematopoyético que se descubrió que expresaba fusiones de ALK era el sarcoma conocido como tumor miofibroblástico inflamatorio (TMI), una proliferación de células fusiformes en las partes blandas y vísceras de niños y adultos jóvenes (edad media en el diagnóstico -10 años). Muchos TMI son indolentes y pueden curarse por resección. Sin embargo, los TMI localmente recurrentes, invasivos y metastáticos no son poco frecuentes y las quimio y radioterapias actuales son completamente ineficaces. Se divulga en el presente documento la implicación del cromosoma 2p23 (la ubicación del gen *ALK*) en TMI, así como la reordenación de los genes *ALK*. Se ha demostrado la inmunorreactividad de ALK en 7 de 11 TMI y TPM3-ALK y TPM4-ALK se identificaron en varios casos. Además, se identificaron dos fusiones de ALK adicionales en TMI, CLTC-ALK y RanBP2-ALK. Las fusiones de ALK se han examinado también por inmunotinción en 73 TMI, encontrando que el 60 % (44 de los 73 casos) eran ALK-positivos. Por tanto, la desregulación de ALK es de importancia patógena en la mayoría de TMI.

Carcinoma pulmonar no microcítico. La función de las fusiones de ALK en el cáncer se amplió aún más con la descripción de la nueva proteína quimérica EML4-ALK en 5 de 75 (6,7 %) pacientes de carcinoma pulmonar no microcítico japoneses. Poco después, la existencia de fusiones de ALK en el cáncer de pulmón se corroboró por un grupo diferente en el que se encontró que 6 de 137 (4,4 %) de los pacientes de cáncer de pulmón chinos expresaban fusiones de ALK (EML4-ALK, 3 pacientes; TFG-ALK, 1 paciente; X-ALK. Dos temas comunes surgieron - 1) las fusiones de ALK se producen predominantemente en pacientes con adenocarcinoma (aunque se observan NSCLC ALK-positivos de histologías escamosas o mixtas), principalmente en individuos con antecedentes mínimos/ninguno de fumador, y 2) las anomalías de ALK se producen normalmente excluyendo otras anomalías genéticas comunes (por ejemplo, mutaciones de EGFR y KRAS). El porcentaje exacto de NSCLC producido por las fusiones de ALK todavía no está claro pero las estimaciones basadas en los informes sobre literatura biomédica sugieren un intervalo del ~5-10 %.

Carcinoma de células escamosas del esófago. En 45 pacientes iraníes, un enfoque proteómico identificó proteínas infra o sobrerrepresentadas en carcinomas de células escamosas del esófago (ESCC); TPM4-ALK se encontraba entre estas proteínas sobrerrepresentadas. Un segundo estudio de ESCC basado en proteómica - en este caso, en pacientes chinos - también identificó TPM4-ALK en estos tumores.

Carcinoma colorrectal, cáncer de mama. Se examinaron tres tipos de tumores humanos - cáncer colorrectal, de mama y no microcítico de pulmón por la presencia de la fusión EML4-ALK (en este estudio no se evaluaron otras mutaciones de ALK). Además de confirmar la expresión de EML4-ALK en NSCLC (en 12 de 106 muestras estudiadas, 11,3 %),

todos los subconjuntos de carcinomas de mama (5 de 209 casos, 2,4 %) y colorrectal (2 de 83 casos, 2,4 %) fueron EML4-ALK-positivos. Además de las variantes conocidas de EML4-ALK 1 (E13; A20) y 2 (E20; A20), se encontró una nueva variante (E21; A20) en el carcinoma colorrectal.

- 5 *ALK en neuroblastoma familiar y esporádico.* El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común infantil, y deriva de la cresta neural en desarrollo. Un pequeño subconjunto (~1-2 %) de neuroblastomas exhiben una predisposición familiar con una herencia autosómica dominante. La mayoría de pacientes de neuroblastoma tienen una enfermedad agresiva asociada con probabilidades de supervivencia <40 % a pesar de la quimioterapia y la radioterapia intensivas, y la enfermedad representa ~15 % de la mortalidad por cáncer infantil. Se había encontrado
10 previamente que ALK se activaba de manera constitutiva también debido a un alto nivel de sobreexpresión como resultado de una amplificación génica en un pequeño número de líneas celulares de neuroblastoma, de hecho, la amplificación de ALK ocurre en ~15 % de neuroblastomas además de activar mutaciones puntuales. Estas mutaciones sin sentido en ALK se han confirmado como mutaciones activadoras que impulsan el crecimiento del neuroblastoma; además, la incubación de líneas celulares de neuroblastoma con inhibidores de moléculas pequeñas de ALK revela
15 que las células con activación de ALK (pero no las líneas celulares con niveles normales de expresión de ALK de tipo silvestre) exhiben respuestas citotóxicas robustas.

Estudios recientes demuestran que la inhibición de estas formas mutantes de ALK con fármacos candidatos de moléculas pequeñas anulan esta proliferación celular anormal y promueven la apoptosis en el neuroblastoma y otras
20 líneas celulares tumorales dirigidas por ALK. Estos descubrimientos subrayan la necesidad de un ensayo diagnóstico especializado para las mutaciones de *ALK* - un ensayo que tendría múltiples aplicaciones clínicas. Por ejemplo, un ensayo de este tipo se podría usar para detectar niños de familias afectadas por neuroblastoma hereditario para ayudar a facilitar la detección de tumores en un estadio más temprano cuando son más susceptibles al tratamiento. La detección y diagnóstico tempranos de cánceres mediados por ALK-aumentan dramáticamente las tasas de supervivencia en la población de pacientes. Por tanto, en el presente documento se divulgan en un aspecto métodos de detección o diagnóstico de la presencia de una enfermedad o afección tal como el cáncer, por ejemplo, un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) que comprende detectar la presencia de o medición del nivel o el ADN, ADNc o el nivel de expresión de ARNm asociado con una variación del ácido nucleico, truncamiento o fusiones
25 de *ALK* de una muestra de tejido del sujeto; en el que un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*. Se divulgan también métodos para evaluar la susceptibilidad o el riesgo de una enfermedad o afección, hacer un seguimiento de la progresión de la enfermedad o la determinación de la susceptibilidad o resistencia a un tratamiento terapéutico para el cáncer asociado con una variación del ácido nucleico, truncamiento o fusión de *ALK* en un sujeto que comprende detectar la presencia o medir el nivel o el ADN, ADNc o el nivel de expresión de ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en el que un aumento
30 en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*.

Por tanto, en un aspecto, la detección de las secuencias de fusión de *ALK* indica la presencia de un cáncer. Por lo tanto, en el presente documento se divulgan métodos para diagnosticar un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende detectar la presencia o medir el nivel de expresión de ARNm de una muestra de tejido de un sujeto; en donde el ARNm es específico para una fusión de *ALK*; y en donde un aumento en la cantidad de ARNm con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*.
40

Los cánceres relacionados con la fusión de ALK se pueden tratar con inhibidores de la cinasa de ALK. Sin embargo, también se han descubierto cánceres resistentes a los inhibidores de la cinasa de ALK. Estos cánceres son fusiones de ALK que comprenden además mutaciones puntuales de *ALK* en cánceres familiares y esporádicos (por ejemplo, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovarios, carcinoma colorrectal, carcinoma pulmonar no microcítico, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células escamosas del esófago, linfoma anaplásico de células grandes, neuroblastoma, tumores miofibroblásticos inflamatorios, histiocitosis maligna y glioblastomas). Las mutaciones en *ALK* dan como resultado una activación constitutiva de ALK. En consecuencia, los cánceres asociados con ALK son dirigidos por las mutaciones puntuales activadoras. Las mutaciones en el dominio catalítico de la tirosina cinasa M1166R, A1168P, I1171N, F11741, F1174L, R1192P, F1245C, F1245V, F1245L, F1245I, I1250T y R1275Q y en el dominio extracelular en V476A se asocian con el neuroblastoma. Las mutaciones en R401Q, A1168P y V757M se identificaron en los carcinomas colorrectales. Además, las mutaciones en L560F se identificaron en el cáncer de mama, y en A877S en el cáncer de ovarios. Por tanto, en un aspecto, la detección de la presencia de un cáncer se logra a través de la detección de mutaciones puntuales en la secuencia de *ALK* (por ejemplo, se identifica un cáncer relacionado con *ALK* mediante la detección de la mutación puntual). Por tanto, en el presente documento se divulgan métodos para detectar la presencia de un cáncer relacionado con ALK, en donde el cáncer comprende además una o más mutaciones puntuales en la regulación al alza de ALK o ALK de tipo silvestre.
55

Las fusiones de *ALK* divulgadas pueden causar también la desregulación de *ALK* de tipo silvestre. *ALK* de tipo silvestre de regulación errónea puede dar como resultado que se produzca un aumento en *ALK* de tipo silvestre así como la regulación errónea de la actividad catalítica de la cinasa. Como alternativa, un cáncer puede tener una patología molecular primaria procedente de otro receptor tirosina cinasa (RTK) tal como, cMET o IGFR, pero desarrollar resistencia a los inhibidores a través de la activación de rutas paralelas de las vías de señalización a través de ALK. Por tanto, otro medio para detectar la presencia de un cáncer es a través de la detección de un aumento en la expresión
60

65

de *ALK* de tipo silvestre. Además, los genes de *ALK* de tipo silvestre truncados a los que les faltan regiones reguladoras pueden dar como resultado una función catalítica de la cinasa *ALK* constitutiva. Por lo tanto, en el presente documento se divulgan métodos de diagnóstico de la presencia de un cáncer que comprenden detectar la presencia o el aumento relativo en la expresión de ARNm con respecto a una secuencia de *ALK* truncada.

5 Se entiende y se contempla en el presente documento que la causa de un cáncer relacionado con *ALK* puede deberse no solo a la regulación errónea de *ALK* de tipo silvestre o fusiones conocidas de *ALK*, sino a una o más fusiones de *ALK* no identificadas. Los métodos que son solo capaces de detectar las fusiones conocidas serían incapaces de detectar fusiones previamente desconocidas o mutaciones de *ALK*. Al detectar no solo la presencia de un truncamiento, variación del ácido nucleico de *ALK* o una fusión de *ALK*, sino también al detectar la presencia de *ALK* de tipo silvestre y la actividad cinasa de *ALK*, el experto puede determinar si el cáncer se debe a *ALK* de tipo silvestre de regulación errónea, una fusión de *ALK* conocida, o una fusión de *ALK* no identificada previamente o mutación de *ALK*. En consecuencia, se divulgan en el presente documento métodos para diagnosticar un cáncer, evaluar la susceptibilidad o el riesgo de un cáncer, o detectar la presencia de regulación errónea de *ALK* que comprende además la presencia de *ALK* de tipo silvestre, y métodos que comprenden además detectar la presencia de actividad cinasa de *ALK*. Por tanto, por ejemplo, se divulgan en el presente documento métodos para diagnosticar un cáncer relacionado con *ALK* que comprenden detectar la presencia del ácido nucleico asociado con una fusión de *ALK*, *ALK* de tipo silvestre y/o un dominio cinasa de *ALK* de una muestra de tejido de un sujeto.

20 Detección y cuantificación de ARNm

Los métodos divulgados en el presente documento se refieren a la detección de una variación del ácido nucleico en la forma de, por ejemplo, mutaciones puntuales y truncamientos, o la detección de la expresión de fusiones de *ALK*, expresión de *ALK* de tipo silvestre aberrante o la expresión de mutantes del truncamiento de *ALK*. Para estas últimas detecciones del nivel de expresión, los métodos comprenden detectar ya sea la abundancia o ya sea la presencia de ARNm, o ambas. Por tanto, se divulgan en el presente documento métodos y composiciones para diagnosticar un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprenden medir la presencia o nivel de ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde un aumento en la cantidad de ARNm con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*.

30 Existe un número de procedimientos ampliamente usados para detectar y determinar la abundancia de un ARNm particular en una muestra de ARN total o poli(A). Por ejemplo, los ARN específicos se pueden detectar usando el análisis de transferencia de Northern, ensayos de protección frente a nucleasas (NPA), hibridación in situ, o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y micromatriz.

35 En teoría, cada una de estas técnicas se puede usar para detectar los ARN específicos y para determinar con precisión su nivel de expresión. En general, el análisis de Northern es el único método que proporciona información sobre el tamaño del transcrito, mientras que los NPA son la manera más fácil de examinar simultáneamente múltiples mensajes. La hibridación in situ se utiliza para localizar la expresión de un gen particular dentro de un tejido o tipo de célula, y la RT-PCR es el método más sensible para detectar y cuantificar la expresión génica.

45 La RT-PCR permite la detección del transcrito de ARN de cualquier gen, independientemente de la escasez del material de partida o la abundancia relativa del ARNm específico. En la RT-PCR, un molde de ARN se copia en un ADN complementario (ADNc) usando una transcriptasa inversa retroviral. El ADNc se amplifica exponencialmente por PCR usando una ADN polimerasa. La transcripción inversa y las reacciones de PCR pueden ocurrir en los mismos tubos o diferentes. La RT-PCR es algo tolerante de ARN degradado. Mientras que el ARN esté intacto dentro de la región abarcada por los cebadores, la diana se amplificará.

50 La RT-PCR cuantitativa relativa implica amplificar un control interno simultáneamente con el gen de interés. El control interno se usa para normalizar las muestras. Una vez normalizadas, las comparaciones directas de la abundancia relativa de un ARNm específico pueden hacerse a través de las muestras. Es crucial elegir un control interno con un nivel constante de expresión a través de todas las muestras experimentales (es decir, no afectadas por el tratamiento experimental). Los controles internos usados comúnmente (por ejemplo, GAPDH, β -actina, ciclofilina) varían a menudo en la expresión y, por lo tanto, pueden no ser controles internos apropiados. Además, los controles internos más comunes se expresan a niveles mucho mayores que el ARNm que se está estudiando. Para que los resultados de la RT-PCR sean significativos, todos los productos de la reacción PCR deben analizarse en el intervalo lineal de amplificación. Esto se vuelve difícil para los transcritos de niveles de abundancia muy diferentes.

60 La RT-PCR competitiva se usa para la cuantificación absoluta. Esta técnica implica diseñar, sintetizar y cuantificar de manera precisa un ARN competidor que pueda distinguirse de la diana endógena por una pequeña diferencia de tamaño o secuencia. Las cantidades conocidas del ARN competidor se añaden a las muestras experimentales y se realiza la RT-PCR. Las señales de la diana endógena se comparan con las señales del competidor para determinar la cantidad de diana presente en la muestra.

65 Por tanto, en el presente documento, en un aspecto, se divulgan métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende realizar una reacción RT-PCR en un ARNm

de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; y en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*. Como los métodos divulgados pueden usarse para detectar *ALK* de tipo silvestre, fusiones de *ALK*, y actividad del dominio cinasa de *ALK*, en el presente documento también se divulgan métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) o para detectar la regulación errónea de una cinasa de *ALK* en un sujeto que comprende realizar una primera reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo en donde el cebador directo se hibrida específicamente con una pareja de fusión de *ALK*; una segunda reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador directo e inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK*; una tercera reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador directo e inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias del dominio cinasa de *ALK*; y en donde la presencia de un amplicón o el aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK* y la presencia de regulación errónea de la cinasa de *ALK*. Específicamente, la presencia de amplicón de fusión de *ALK* y un amplicón del dominio cinasa indica la presencia de una fusión de *ALK* conocida; la presencia de un amplicón de tipo silvestre, y un amplicón del dominio cinasa indica *ALK* de tipo silvestre, y la presencia de amplicón del dominio cinasa indica la presencia de una fusión de *ALK* no identificada previamente o de *ALK* mutado.

El análisis de Northern es el método más fácil para determinar el tamaño de los transcritos y para identificar transcritos empalmados alternativamente y miembros de la familia multigénica. Se puede usar también para comparar directamente la abundancia relativa de un mensaje dado entre las muestras en una transferencia. El procedimiento de transferencia de Northern es sencillo y proporciona oportunidades para evaluar el progreso en varios puntos (por ejemplo, la integridad de una muestra de ARN y la eficiencia con la que se transfirió a la membrana). Las muestras de ARN se separan en primer lugar por tamaños por medio de electroforesis en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. El ARN se transfiere después a una membrana, se reticula y se hibrida con una sonda marcada. Se pueden usar sondas radiomarcadas no isotópicas o de alta actividad específica incluyendo sondas de ADN cebadas al azar, producidas por desplazamiento de mella o generadas por PCR, sondas de ARN transcritas in vitro y oligonucleótidos. Además, se pueden usar como sondas secuencias con solo homología parcial (por ejemplo, ADNc de una especie diferente o fragmentos de ADN genómico que pueden contener un exón).

El ensayo de protección frente a nucleasas (NPA) (incluyendo tanto ensayos de protección frente a nucleasas como ensayos con nucleasa S1) es un método sensible para la detección y cuantificación de ARN específicos. La base del NPA es la hibridación de la solución de una sonda antisentido (radiomarcada o no isotópica) con una muestra de ARN. Tras la hibridación, la sonda monocatenaria y no hibridada y el ARN se degradan por las nucleasas. Los fragmentos protegidos restantes se separan en un gel de acrilamida. La solución de hibridación es normalmente más eficaz que la hibridación basada en membrana, y puede albergar hasta 100 µg de muestras de ARN, en comparación con los 20-30 µg máximo de hibridaciones de la transferencia. Los NPA son también menos sensibles a la degradación de las muestras de ARN que el análisis de Northern puesto que la escisión se detecta solamente en la región de superposición con la sonda (las sondas tienen normalmente una longitud de aproximadamente 100-400 bases).

Los NPA son el método de elección para la detección simultánea de varias especies de ARN. Durante la hibridación de la solución y el análisis posterior, las interacciones entre la sonda/diana individuales son completamente independientes unas de otras. Por tanto, varios ARN diana y controles apropiados pueden analizarse simultáneamente (se han usado hasta doce en la misma reacción), siempre que las sondas individuales sean de longitudes diferentes. Los NPA se usan también comúnmente para mapear con precisión los extremos del ARNm y las uniones de intrones/exones.

La hibridación in situ (HIS) es una herramienta potente y versátil para la localización de ARN específicos en las células o tejidos. A diferencia del análisis de Northern y los ensayos de protección frente a nucleasas, la HIS no requiere aislamiento o separación electroforética del ARN. La hibridación de la sonda tiene lugar dentro de la célula o tejido. Puesto que la estructura celular se mantiene a lo largo del procedimiento, la HIS proporciona información sobre la localización del ARNm dentro de la muestra del tejido.

El procedimiento comienza fijando las muestras en formalina neutra tamponada y sumergiendo el tejido en parafina. Las muestras se cortan después en secciones finas y se montan sobre portaobjetos de microscopio. (Alternativamente, el tejido se puede seccionar, congelar y fijar después en paraformaldehído). Después de una serie de lavados para desparafinar y rehidratar las secciones, se realiza una digestión con Proteinasa K para aumentar la accesibilidad de la sonda y luego se hibrida una sonda marcada con las mismas secciones de la muestra. Las sondas radiomarcadas se visualizan con película líquida secada en los portaobjetos, mientras que las sondas marcadas no isotópicamente se detectan convenientemente con reactivos colorimétricos o fluorescentes.

Debido a las limitaciones de la tecnología de secuenciación, especialmente, la sensibilidad, se han desarrollado

numerosas mutaciones conocidas a lo largo de los años: la cromatografía líquida de alto rendimiento con desnaturalización (dHPLC por sus siglas en inglés) de Xiao y Oefner, 2001, el barrido de secuencias por escisión de base (BESS por sus siglas en inglés), polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP por sus siglas en inglés) (Orita et.al., 1989), análisis de heterodúplex (HA) (Nagamine et.al. 1989), electroforesis en gel sensible a la conformación (CSGE por sus siglas en inglés) (Ganguly y Prockop, 1995; Ganguly et. al. 1993), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés) (Fodde y Losekoot, 1994), electroforesis en gel con desnaturalización constante (CDGE por sus siglas en inglés) (Hovig et al. 1991), electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE por sus siglas en inglés) (Chen et.al. 1999), escisión química de emparejamientos incorrectos (Cotton et al. 1988; Tabon et al. 2006), escisión enzimática de emparejamientos incorrectos (Winter et al., 1985; Myers et al. 1985) y enzimas de reparación de emparejamientos incorrectos (Oldenburg y Siebert, 2000; Babon et. al. 1999; Youil et. al. 1996; Brow et. al. 1996; Lu y Hsu, 1992). Estas tecnologías no han visto un uso extendido debido a que tienen una o más de las siguientes limitaciones: laboriosas, difíciles de automatizar (bajo rendimiento), baja sensibilidad o difíciles de reproducir. La mayoría de los ensayos de mutaciones puntuales actuales se centran en la detección de las mutaciones puntuales conocidas dentro de los sitios de genes diana. Para genes como ALK, sin embargo, surgen mutaciones puntuales espontáneas en grandes regiones del ADN que requieren una tecnología que pueda escanear varios cientos de pares de bases. Se han desarrollado varias tecnologías de mutaciones puntuales desconocidas pero la mayoría o todas tienen limitaciones que impiden su uso con la detección de mutaciones genéticas raras.

Por el contrario, la reacción de intercambio y extensión de moldes (Template Exchange and Extension Reaction, TEER™), utiliza en sus últimas etapas una amplificación selectiva para aumentar la sensibilidad de detección de mutaciones raras y desconocidas. Esta ventaja se traduce en la capacidad de detectar enfermedades temprano así como a la capacidad de controlar la acumulación de cambios mutacionales adicionales en cánceres a medida que continúan progresando y mutando. Además, TEER™ es adaptable a múltiples plataformas, incluyendo la PCR en tiempo real, análisis de fragmentos y electroforesis. Por ejemplo, TEER™ desde la adquisición de la muestra hasta la detección de los puntos finales de mutaciones puntuales activadoras de ALK raras de una pieza de muestra clínica mixta que contiene una abundancia de ADN normal de células no tumorales contaminantes. El proceso entero puede completarse en aproximadamente 5,5 horas.

La plataforma TEER™ consiste en 5 etapas básicas. 1. Se utilizar un oligonucleótido específico de alelo que contiene una etiqueta de fluoresceína fluorescente de secuenciación (FAM) y una etiqueta de biotina para la purificación de captura en fase sólida para la amplificación por PCR de un molde inicial de ALK de 270 pb que contiene mutaciones raras o nuevas. 2. El amplicón se desnaturaliza por calor y luego se deja hibridar junto con el molde de ALK de tipo silvestre desnaturalizado, permitiendo que ocurra el intercambio de moldes. 3. Cualquier nucleótido existente mal emparejado se escinde enzimáticamente usando la nucleasa monocatenaria, CEL 1.4. La cadena de ADN que contiene la base mal emparejada se extiende con *Taq* polimerasa. 5. Los cebadores de RT-PCR específicos se usan después para detectar solo la región 5' del molde extendido. La combinación de la amplificación y de la cuantificación de TEER™ permite la detección de alto rendimiento y sensible. Cualquier mutación potencial presente (o ausente) se amplifica y cuantifica usando un único sitio de cebador inverso presente solo en el molde purificado de TEER™ extendido. El fondo derivado de la contaminación de moldes de tipo silvestre se mantiene a un mínimo con el uso de una secuencia de captura de oligonucleótidos biotinilados en el cebador directo inicial y el uso de Exo III para digerir cualquier dúplex bicatenario que contenga un extremo 3' o 5' complementario (patente de EE.UU. n.º 6.150.105, que proporciona enseñanzas de reacción de intercambio y extensión de moldes).

El proceso TEER™ se desarrolló originalmente para satisfacer una necesidad en el campo de la oncología de una herramienta de alto rendimiento para detectar polimorfismos genéticos sin descubrir en moldes de células y tejidos malignos. TEER™ se demostró originalmente usando electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). TEER™ está diseñado para detectar variación genética en moldes de ADN que pueden contener mutaciones raras, conocidas o nuevas en comparación con un molde de ADN de control, no mutado. Basándose en el hecho de que los productos de secuenciación son únicos para el molde a partir del cual se generan, TEER™ se usó para comparar un molde de ADN "desconocido" que contenía potencialmente mutaciones con un molde que se confirmó que carecía de mutaciones. Cualquier cambio en los productos de secuenciación reflejó una mutación genética en el molde de ADN desconocido y podía visualizarse mediante electroforesis en gel. Más recientemente, el proceso TEER™ se adaptó a una plataforma de detección por microtitulación en fase sólida para permitir un análisis de alto rendimiento y mejorar la facilidad de uso. Los moldes de ADN de control y "desconocidos" se amplificaron usando un cebador biotinilado 5' para generar productos de PCR biotinilados. Posteriormente, se formó ADN homodúplex y heterodúplex mediante la hibridación de los amplicones de la PCR de los moldes de control y "desconocidos". Después de la hibridación, el ADN homodúplex y heterodúplex se fijó a la fase sólida mediante conjugación en pocillos de microplacas recubiertos con estreptavidina en los que todas las etapas del proceso TEER™ podrían realizarse fácilmente, simplificando enormemente la manipulación y procesamiento de las muestras. El proceso TEER™ es un ensayo de hibridación de oligonucleótidos específico de alelo y puede formar un complejo con una plataforma de PCR en tiempo real para obtener un alto rendimiento y una alta sensibilidad.

65 **Detección y cuantificación de ADN**

Los métodos divulgados en el presente documento se refieren a la detección de una variación del ácido nucleico en

- la forma de, por ejemplo, mutaciones puntuales y truncamientos, o la detección de la expresión de fusiones de *ALK*, la expresión de *ALK* de tipo silvestre aberrante o la expresión de mutantes del truncamiento de *ALK*. Para estas últimas detecciones del nivel de expresión, los métodos comprenden detectar ya sea la abundancia o ya sea la presencia de ARNm, o ambas. Como alternativa, la detección puede dirigirse a la abundancia o presencia de ADN, por ejemplo, ADNc. Por tanto, en el presente documento se divulgan métodos y composiciones para diagnosticar un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende medir la presencia o nivel de ADN de una muestra de tejido del sujeto; en donde un aumento en la cantidad de ADN con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*.
- Existe un número de procedimientos ampliamente usados para detectar y determinar la abundancia de un ADN particular en una muestra. Por ejemplo, la tecnología de PCR permite la amplificación y la posterior detección de cantidades diminutas de un ácido nucleico diana. Los detalles de la PCR se describen bien en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4,683,195 de Mullis et al., 4.683.202 de Mullis y 4.965.188 de Mullis et al. Generalmente, los cebadores oligonucleótidos se hibridan con las cadenas desnaturalizadas de un ácido nucleico diana, y los productos de extensión de los cebadores se forman mediante la polimerización de desoxinucleósido trifosfatos por una polimerasa. Un método de PCR típico implica ciclos repetitivos de desnaturalización de ácido nucleico del molde, la hibridación de cebadores y la extensión de los cebadores hibridados por la acción de una polimerasa termoestable. El proceso da como resultado una amplificación exponencial del ácido nucleico diana, y por tanto, permite la detección de dianas existentes en concentraciones muy bajas en una muestra. Se entiende y se contempla en el presente documento que existen métodos de PCR variantes conocidos en la materia que se pueden utilizar también en los métodos divulgados, por ejemplo, PCR cuantitativa (QPCR); micromatrices, PCT en tiempo real; PCR de inicio en caliente; PCR anidada; PCR específica de alelo; y PCR Touchdown.

Micromatrices

- Una matriz es una disposición ordenada de muestras, que proporciona un medio para hacer coincidir las muestras de ADN conocidas y desconocidas basadas en reglas de emparejamiento de bases y automatizar el proceso de identificación de las desconocidas. Un experimento de matrices puede usar sistemas de ensayo tales como microplacas o membranas de transferencia estándar y pueden crearse manualmente o usar la robótica para depositar la muestra. En general, las matrices se describen como macromatrices o micromatrices, la diferencia es el tamaño de las manchas de la muestra. Las micromatrices contienen tamaños de manchas de muestras de aproximadamente 300 micrómetros o más y pueden obtenerse imágenes fácilmente mediante los escáneres de geles y transferencias existentes. Los tamaños de las manchas de muestras en las micromatrices puede ser de 300 micrómetros o menos, pero típicamente menos de 200 micrómetros de diámetro y estas matrices contienen normalmente miles de manchas. Las micromatrices requieren robótica especializada y/o equipo de formación de imágenes que generalmente no están disponibles en el comercio como un sistema completo. Las terminologías que se han usado en la literatura para describir esta tecnología incluyen, pero sin limitación: biochip, chip de ADN, micromatriz de ADN, GeneChip® (Affymetrix, Inc que se refiere a sus matrices de ADN basadas en oligonucleótidos de alta densidad) y matriz génica.
- Las micromatrices de ADN o chips de ADN se fabrican por robótica de alta velocidad, generalmente en sustratos de vidrio o de nailon, para lo cual se utilizan las sondas con identidad conocida para determinar la unión complementaria, permitiendo así la expresión génica paralela masiva y los estudios de descubrimiento de genes. Un experimento con un solo chip de ADN puede proporcionar información sobre miles de genes simultáneamente. En el presente documento se contempla que las micromatrices divulgadas se pueden usar para controlar la expresión génica, el diagnóstico de enfermedades, el descubrimiento de genes, el descubrimiento de fármacos (farmacogenómica), y la investigación toxicológica o toxicogenómica.

- Existen dos variantes de la tecnología de micromatrices de ADN, en términos de la propiedad de la secuencia de ADN dispuesta en matriz con identidad conocida. Las micromatrices de Tipo I comprenden una sonda de ADNc (500~5.000 bases de largo) que se inmoviliza en una superficie sólida tal como vidrio usando la deposición robotizada y se expone a un conjunto de dianas por separado o en una mezcla. Este método se denomina tradicionalmente como micromatriz de ADN. Con las micromatrices de Tipo I, se inmovilizan múltiples copias localizadas de una o más secuencias de polinucleótidos, preferentemente copias de una única secuencia de polinucleótidos en una pluralidad de regiones definidas de la superficie del sustrato. Un polinucleótido se refiere a una cadena de nucleótidos que varía de 5 a 10.000 nucleótidos. Estas copias inmovilizadas de una secuencia de polinucleótidos son adecuadas para su uso como sondas en experimentos de hibridación.

- Para preparar perlas recubiertas con sondas inmovilizadas, se sumergen las perlas en una solución que contiene la secuencia de la sonda deseada y después se inmoviliza sobre las perlas por medios covalentes y no covalentes. Como alternativa, cuando las sondas se inmovilizan en bastones, se puede depositar una sonda dada en regiones definidas del bastón. Los dispensadores típicos incluyen una micropipeta que administra una solución al sustrato con un sistema robotizado para controlar la posición de la micropipeta con respecto al sustrato. Puede existir una multiplicidad de dispensadores de tal manera que los reactivos se puedan administrar a las regiones de la reacción simultáneamente. Una micromatriz se puede formar usando tecnología de inyección de tinta basada en el efecto piezoeléctrico, con lo que un tubo estrecho que contiene un líquido de interés, como los reactivos de síntesis de oligonucleótidos, está rodeado por un adaptador. Una carga eléctrica enviada a través del adaptador provoca que el adaptador se

expanda a una velocidad diferente que el tubo y fuerza una pequeña gota de líquido sobre un sustrato.

Las muestras pueden ser cualquier muestra que contenga polinucleótidos (polinucleótidos diana) de interés y obtenidas de cualquier fluido corporal (sangre, orina, saliva, flema, jugos gástricos, etc.), células cultivadas, biopsias u otras preparaciones de tejidos. Se puede aislar ADN o ARN de la muestra de acuerdo con un número de métodos bien conocidos por los expertos en la materia. En una realización, el ARN total se aísla usando el reactivo de aislamiento de ARN total TRIzol (Life Technologies, Inc., Rockville, Md.) y el ARN se aísla usando cromatografía en columna de oligo d(T) o perlas de vidrio. Después de la hibridación y procesamiento, las señales de hibridación obtenidas deberían reflejar con precisión las cantidades de polinucleótido diana de control añadido a la muestra.

La pluralidad de regiones definidas en el sustrato se puede disponer en una variedad de formatos. Por ejemplo, las regiones se pueden disponer perpendiculares o en paralelo a la longitud de la cubierta. Además, las dianas no tienen que estar directamente unidas al sustrato, sino que pueden unirse al sustrato a través de un grupo enlazador. Los grupos enlazadores pueden variar típicamente entre aproximadamente 6 a 50 átomos de largo. Los grupos enlazadores incluyen oligómeros de etilenglicol, diaminas, diácidos y similares. Los grupos reactivos sobre la superficie del sustrato reaccionan con una de las porciones terminales del enlazador para unir el enlazador con el sustrato. La otra porción terminal del enlazador se funcionaliza después para unir las sondas.

Los polinucleótidos de la muestra se pueden marcar con uno o más restos de marcaje para permitir la detección de complejos de polinucleótidos hibridados sonda/diana. Los restos del marcaje pueden incluir composiciones que pueden detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, bioelectrónicos, inmunológicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los restos de marcaje incluyen radioisótopos, tales como ^{32}P , ^{33}P o ^{35}S , compuestos quimioluminiscentes, proteínas de unión marcadas, átomos metálicos pesados, marcadores espectroscópicos, tales como marcadores y colorantes fluorescentes, marcadores magnéticos, enzimas enlazadas, etiquetas de espectrometría de masas, marcadores espín, donadores y aceptadores de transferencia de electrones, biotina y similares.

El marcaje se puede realizar durante una reacción de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa y las reacciones de transcripción in vitro o in vivo. Como alternativa, el resto de marcaje se puede incorporar después de la hibridación una vez que se ha formado el complejo sonda/diana. En una realización, la biotina se incorpora primero durante una etapa de amplificación como se ha descrito anteriormente. Después de la reacción de hibridación, los ácidos nucleicos no unidos se enjuagan de manera que la única biotina que queda unida al sustrato es la que se une a los polinucleótidos diana que se hibridan con las sondas de polinucleótidos. Después, se une un fluoróforo conjugado con avidina, tal como avidina-ficoeritrina, que se une con una biotina de alta afinidad.

La hibridación provoca que una sonda de polinucleótidos y una diana complementaria formen un dúplex estable a través del emparejamiento de bases. Los métodos de hibridación son bien conocidos por los expertos en la materia. Las condiciones rigurosas para la hibridación se pueden definir por concentración salina, temperatura y otras sustancias químicas y condiciones. Los parámetros adicionales variables, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente (dodecil sulfato de sodio, SDS) o disolvente (formamida), y la inclusión o exclusión de ADN transportador, son bien conocidos por los expertos en la materia. Las variaciones adicionales de estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

Los métodos para detectar la formación de complejos son bien conocidos por los expertos en la materia. En una realización, las sondas de polinucleótidos se marcan con un marcador fluorescente y la medición de niveles y patrones de formación de complejos se realiza por microscopía de fluorescencia, preferentemente, microscopía de fluorescencia confocal. Un láser de iones de argón excita el marcador fluorescente, las emisiones se dirigen a un fotomultiplicador y la cantidad de luz emitida se detecta y cuantifica. La señal detectada debería ser proporcional a la cantidad de complejo de polinucleótidos sonda/diana en cada posición de la micromatriz. El microscopio de fluorescencia se puede asociar con un dispositivo de escáner controlado por ordenador para generar una imagen bidimensional cuantitativa de intensidades de hibridación. La imagen escaneada se examina para determinar el nivel de abundancia/expresión de cada polinucleótido diana hibridado.

En un experimento de hibridación diferencial, los polinucleótidos diana de dos o más muestras biológicas diferentes se marcan con dos o más marcadores fluorescentes diferentes con diferentes longitudes de onda de emisión. Las señales fluorescentes se detectan por separado con fotomultiplicadores diferentes configurados para detectar longitudes de onda específicas. Se obtienen los niveles relativos de abundancias/expresión de los polinucleótidos diana en dos o más muestras. Típicamente, se pueden normalizar las intensidades de fluorescencia de las micromatrices para tener en cuenta las variaciones en las intensidades de hibridación cuando se usa más de una micromatriz en condiciones de ensayo similares. Las intensidades de hibridación de los complejos polinucleotídicos individuales sonda/diana se pueden normalizar usando las intensidades derivadas de los controles de normalización internos contenidos en cada micromatriz.

Las micromatrices de Tipo II comprenden una matriz de sondas de oligonucleótidos (20~80-meros oligonucleótidos) o de ácido nucleico peptídico (ANP) que se sintetiza in situ (en chip) o por síntesis convencional seguida de inmovilización en chip. La matriz se expone a ADN de muestra marcada, se hibrida y se determina la

identidad/abundancia de secuencias complementarias. Este método, "históricamente" llamado chips de ADN, se desarrolló en Affymetrix, Inc., que vende sus productos fabricados fotolitográficamente con la marca registrada GeneChip®.

5 El concepto básico detrás del uso de matrices de Tipo II para la expresión génica es simple: los ADNc o ARNc diana marcados derivados del ARNm de una muestra experimental se hibridan con sondas de ácidos nucleicos unidas al soporte sólido. Al controlar la cantidad de marcador asociada con cada ubicación de ADN, es posible inferir la
10 y crecientes de información de las secuencias, han ampliado enormemente la escala a la cual se puede estudiar la expresión génica.

La fabricación de micromatrices puede comenzar con un disco de cuarzo de 5 pulgadas cuadradas. Inicialmente el cuarzo se lava para asegurar la hidroxilación uniforme a través de su superficie. Debido a que el cuarzo se hidroxila
15 de manera natural, proporciona un excelente sustrato para la unión a sustancias químicas, tales como moléculas enlazadoras, que luego se usan para colocar las sondas en las matrices.

El disco se coloca en un baño de silano, que reacciona con los grupos hidroxilo del cuarzo y forma una matriz de moléculas enlazadas covalentemente. La distancia entre estas moléculas de silano determina la densidad de
20 empaquetamiento de las sondas, lo que permite que las matrices soporten más de 500.000 ubicaciones, o características, de las sondas, en tan solo 1,28 centímetros cuadrados. Cada una de estas características alberga millones de moléculas de ADN idénticas. La película de silano proporciona una densidad de hidroxilo uniforme para iniciar el ensamblaje de la sonda. Las moléculas enlazadoras, unidas a la matriz de silano, proporcionan una superficie que se puede activar espacialmente por la luz.

25 La síntesis de las sondas se produce en paralelo, lo que da como resultado la adición de un nucleótido A, C, T, o G a múltiples cadenas en crecimiento simultáneamente. Para definir qué cadenas de oligonucleótidos recibirá un nucleótido en cada etapa, se colocan máscaras fotolitográficas, con ventanas de 18 a 20 micrómetros cuadrados que corresponden a las dimensiones de las características individuales, y se colocan sobre el disco recubierto. Las
30 ventanas se distribuyen sobre la máscara en función de la secuencia deseada de cada prueba. Cuando la luz ultravioleta brilla sobre la máscara en la primera etapa de la síntesis, los enlazadores expuestos se vuelven desprotegidos y están disponibles para el acoplamiento de nucleótidos.

Una vez que se han activado las características deseadas, una solución que contiene un único tipo de desoxinucleótido con un grupo de protección removible se vierte sobre la superficie del disco. El nucleótido se une a los enlazadores
35 activados, iniciando el proceso de síntesis.

Aunque cada posición en la secuencia de un nucleótido puede estar ocupada por 1 de 4 nucleótidos, resultando en una necesidad aparente de 25 x 4, o 100, máscaras diferentes por disco, el proceso de síntesis se puede diseñar para
40 reducir significativamente este requisito. Los algoritmos que ayudan a minimizar el uso de máscaras calculan cómo coordinar mejor el crecimiento de la sonda ajustando tasas de síntesis de sondas individuales e identificando situaciones cuando se puede usar la misma máscara múltiples veces.

Algunos de los elementos clave de selección y diseño son comunes para la producción de todas las micromatrices, independientemente de su aplicación prevista. Las estrategias para optimizar la hibridación de las sondas, por ejemplo,
45 se incluyen invariablemente en el proceso de selección de las sondas. La hibridación en condiciones particulares de pH, sal y temperatura se pueden optimizar teniendo en cuenta las temperaturas de fusión y usando reglas empíricas que se correlacionan con los comportamientos de hibridación deseados.

50 Para obtener una imagen completa de una actividad génica, se seleccionan algunas sondas de regiones compartidas por múltiples variantes de empalme o poliadenilación. En otros casos, se prefieren las sondas únicas que distinguen entre variantes. La distancia entre sondas también se tiene en consideración en el proceso de selección.

Se utiliza un conjunto diferente de estrategias para seleccionar sondas para la genotipificación de matrices que se basan en sondas múltiples para interrogar nucleótidos individuales en una secuencia. La identidad de una base diana
55 se puede deducir usando cuatro sondas idénticas que varían solo en la posición diana, cada una conteniendo una de las cuatro bases posibles.

Como alternativa, la presencia de una secuencia de consenso se puede probar usando una o dos sondas que representan alelos específicos. Para genotipificar muestras heterocigotas o genéticamente mixtas, se pueden crear
60 matrices con muchas sondas para proporcionar información redundante, dando como resultado una genotipificación inequívoca. Además, las sondas genéricas se pueden usar en algunas aplicaciones para maximizar la flexibilidad. Algunas matrices de sondas, por ejemplo, permiten la separación y análisis de productos de reacción individuales de mezclas complejas, tales como las usadas en algunos protocolos para identificar polimorfismos de nucleótido único
65 (SNP, por sus siglas en inglés).

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real controla la fluorescencia emitida durante la reacción como un indicador de la producción del amplicón durante cada ciclo de la PCR (es decir, en tiempo real) por oposición a la detección del punto final. El progreso en tiempo real de la reacción se puede ver en algunos sistemas. La PCR en tiempo real no detecta el tamaño del amplicón y, por tanto, no permite la diferenciación entre amplificación de ADN y de ADNc, sin embargo, no está influenciado por la amplificación no específica a menos que se use SYBR Green. La cuantificación de la PCR en tiempo real elimina el procesamiento post-PCR de los productos de PCR. Esto ayuda a aumentar el rendimiento y a reducir las posibilidades de contaminación por arrastre. La PCR en tiempo real también ofrece un amplio intervalo dinámico de hasta 10^7 veces. El intervalo dinámico de cualquier ensayo determina cuánto puede variar la concentración objetivo y aún se puede cuantificar. Un amplio intervalo dinámico significa que se puede someter a ensayo un amplio intervalo de proporciones de diana y normalizador con sensibilidad y especificidad iguales. De ello se deduce que cuanto más amplio es el intervalo dinámico, más precisa será la cuantificación. Cuando se combina con RT-PCR, una reacción RT-PCR en tiempo real reduce el tiempo necesario para medir la cantidad de amplicón al proporcionar la visualización del amplicón a medida que avanza el proceso de amplificación.

El sistema de PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de un indicador fluorescente. Esta señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en una reacción. Al registrar la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible controlar la reacción PCR durante la fase exponencial en la que el primer aumento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de molde diana. Cuanto más alto es el número de copias de partida del ácido nucleico diana, antes se observa un aumento significativo en la fluorescencia. Un aumento significativo en fluorescencia por encima del valor basal medido durante los 3-15 ciclos puede indicar la detección de producto de PCR acumulado.

Un umbral de fluorescencia fijo se establece significativamente por encima del valor basal que puede alterarse por el operario. El parámetro C_T (ciclo umbral) se define como el número de ciclo en el cual la emisión de fluorescencia excede el umbral fijo.

Hay tres sistemas principales de control de la fluorescencia para la amplificación de ADN: (1) sondas de hidrólisis; (2) sondas de hibridación; y (3) agentes de unión al ADN. Las sondas de hidrólisis incluyen sondas TaqMan, Molecular Beacon y Scorpion. Utilizan la actividad 5' exonucleasa fluorogénica de Taq polimerasa para medir la cantidad de secuencias diana en las muestras de ADNc.

Las sondas TaqMan son oligonucleótidos más largos que los cebadores (20-30 bases de largo con un valor T_m de 10°C más alto) que contienen un colorante fluorescente normalmente en la base 5', y un colorante de desactivación (normalmente TAMRA) típicamente en la base 3'. Cuando se irradian, el colorante de fluorescencia excitado transfiere energía a la molécula de colorante de desactivación cercana en lugar de emitir fluorescencia (esto se denomina FRET = transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de Förster). Por tanto, la proximidad cercana del indicador o desactivador previene la emisión de cualquier fluorescencia mientras que la sonda está intacta. Las sondas TaqMan están diseñadas para hibridarse con una región interna de un producto de PCR. Cuando la polimerasa replica un molde sobre el cual se une una sonda TaqMan, su actividad 5' exonucleasa escinde la sonda. Esto finaliza la actividad del desactivador (no FRET) y el colorante indicador empieza a emitir fluorescencia que aumenta en cada ciclo proporcional a la tasa de escisión de la sonda. La acumulación de los productos de PCR se detecta controlando el aumento de fluorescencia del colorante indicador (obsérvese que los cebadores no están marcados). El ensayo TaqMan usa parámetros térmicos universales y condiciones de reacción PCR. Debido a que la escisión ocurre solo si la sonda se hibrida con la diana, el origen de la fluorescencia detectada es la amplificación específica. El proceso de hibridación y de escisión no interfiere con la acumulación exponencial del producto. Un requisito específico para las sondas fluorogénicas es que no haya G en el extremo 5'. Una 'G' adyacente al colorante indicador puede desactivar la fluorescencia del indicador incluso después de la escisión.

Las balizas moleculares también contienen colorantes fluorescentes (FAM, TAMRA, TET, ROX) y desactivadores (normalmente DABCYL) en cada extremo pero están diseñadas para adoptar una estructura de horquilla mientras que están libres en solución para llevar el colorante fluorescente y el desactivador cerca del FRET que se va a producir. Tienen dos brazos con secuencias complementarias que forman un híbrido o tallo muy estable. La proximidad cercana del indicador y el desactivador en esta configuración de horquilla suprime la fluorescencia del indicador. Cuando la baliza se hibrida con la diana durante la etapa de hibridación, el colorante indicador se separa del desactivador y el indicador emite fluorescencia (FRET no ocurre). Las balizas moleculares permanecen intactas durante la PCR y deben volver a unirse a una diana en cada ciclo para la emisión de fluorescencia. Esto se correlaciona con la cantidad de producto de PCR disponible. Todas las sustancias químicas de PCR en tiempo real permiten la detección de múltiples especies de ADN (multiplexación) diseñando cada sonda/baliza con un par espectralmente único de fluoróforo/desactivación siempre que la plataforma sea adecuada para el análisis de la curva de fusión si se usa SYBR Green. Mediante la multiplexación, la(s) diana(s) y control endógeno se pueden amplificar en un único tubo.

Con sondas Scorpion, el cebado específico de la secuencia y la detección del producto de PCR se logra usando un único oligonucleótido. La sonda Scorpion mantiene una configuración tallo-bucle en el estado no hibridado. El fluoróforo se une al extremo 5' y se desactiva por un resto acoplado al extremo 3'. La parte 3' del tallo también contiene

una secuencia que es complementaria al producto de extensión del cebador. Esta secuencia se enlaza al extremo 5' de un cebador específico por medio de un monómero no amplificable. Después de la extensión del cebador Scorpion, la secuencia de la sonda específica es capaz de unirse a su complemento dentro del amplicón extendido abriendo así el bucle de la horquilla. Esto previene que la fluorescencia se desactive y que se observe una señal.

5 Otra alternativa es la química del colorante de unión a ADN bicatenario, que cuantifica la producción de amplicón (incluyendo la amplificación no específica y el complejo cebador-dímero) mediante el uso de un agente de intercalación de fluorescencia no específico de secuencia (SYBR-Green I o bromuro de etidio). No se une a ADNmc. SYBR green es un colorante de unión al surco fluorogénico menor que exhibe poca fluorescencia cuando está en solución pero emite una fuerte señal fluorescente después de unirse al ADN bicatenario. Las ventajas de la PCR en tiempo real basada en SYBR green incluye el requisito de una optimización extensa. Además, las amplificaciones no específicas requieren ensayos de seguimiento (curva del punto de fusión o análisis de disociación) para la identificación del amplicón. El método se ha usado en la genotipificación de HFE-C282Y. Otro problema controlable es que los amplicones más largos crean una señal más fuerte (si se combina con otros factores, esto puede provocar la saturación de la cámara CDC, véase a continuación). Normalmente SYBR green se usa en reacciones uniplex, sin embargo cuando se acopla con análisis de punto de fusión, se puede usar para reacciones multiplex.

El ciclo umbral o el valor C_T es el ciclo al que un aumento significativo en ΔR_n se detecta primero (para definición de ΔR_n , véase a continuación). El ciclo umbral es cuando el sistema empieza a detectar el aumento en la señal que se asocia con un crecimiento exponencial del producto de PCR durante la fase log-lineal. Esta fase proporciona la información más útil sobre la reacción (ciertamente más importante que el punto final). La pendiente de la fase log-lineal es un reflejo de la eficiencia de la amplificación. La eficiencia (Ef) de la reacción se puede calcular por la fórmula: $Ef = 10^{(-1/pendiente)} - 1$. La eficiencia de la PCR debería ser 90 - 100 % ($3,6 > inclinación > 3,1$). Un número de variables puede afectar a la eficiencia de la PCR. Estos factores incluyen la longitud del amplicón, la estructura secundaria y la calidad del cebador. Aunque se pueden obtener datos válidos que quedan fuera del intervalo de eficiencia, la qRT-PCR debe optimizarse adicionalmente o diseñarse amplicones alternativos. Para que la pendiente sea un indicador de amplificación real (en lugar de la desviación de la señal), tiene que haber un punto de inflexión. Este es el punto en la curva de crecimiento cuando comienza la fase log-lineal. También representa la tasa de cambio más grande a lo largo de la curva de crecimiento. (La desviación de la señal se caracteriza por un aumento o disminución gradual de la fluorescencia sin amplificación del producto). El parámetro importante para la cuantificación es la C_T . Cuanto más alta es la cantidad inicial de ADN genómico, más rápido se detectará el producto acumulado en el proceso de PCR, y menor será el valor de C_T . El umbral debe colocarse por encima de cualquier actividad de línea basal y dentro de la fase de aumento exponencial (que parece lineal en la transformación logarítmica). Algún software permite la determinación del ciclo umbral (C_T) mediante un análisis matemático de la curva de crecimiento. Esto proporciona mejor reproducibilidad de ejecución a ejecución. Un valor C_T de 40 significa que no hay amplificación y este valor no se puede incluir en los cálculos. Además de usarse para la cuantificación, el valor C_T puede usarse para el análisis cualitativo como una medida de aprobación/desaprobación.

Los ensayos multiplex TaqMan se pueden realizar usando múltiples colorantes con distintas longitudes de onda de emisión. Los colorantes disponibles para este propósito son FAM, TET, VIC y JOE (los más caros). TAMRA está reservado como el desactivador en la sonda y ROX como la referencia pasiva. Para obtener mejores resultados, se recomienda la combinación de FAM (diana) y VIC (control endógeno) (tienen la mayor diferencia en la emisión máxima) mientras que JOE y VIC no deberían combinarse. Es importante que si la capa de colorante no se ha elegido correctamente, la máquina seguirá leyendo el otro espectro de colorante. Por ejemplo, tanto VIC como FAM emiten fluorescencia en un intervalo similar entre sí y cuando hacen un único colorante, los pocillos deben marcarse correctamente. En el caso de la multiplexación, la compensación espectral para el análisis después de la ejecución debería activarse (en ABI 7700: Instrumento/Diagnóstico/Opciones Avanzadas/Varios). La activación de la compensación espectral mejora la resolución espectral del colorante.

50 PCR anidada

Los métodos divulgados también pueden utilizar la PCR anidada. La PCR anidada aumenta la especificidad de la amplificación del ADN, reduciendo el fondo debido a la amplificación no específica del ADN. Dos conjuntos de cebadores se están usando en dos PCR sucesivas. En la primera reacción, se usa un par de cebadores para generar productos de ADN, que además de la diana prevista, puede consistir en fragmentos de ADN amplificados de manera no específica. El(los) producto(s) se usa(n) después en una segunda PCR con un conjunto de cebadores cuyos sitios de unión son completa o parcialmente diferentes y se localizan en 3' de cada uno de los cebadores usados en la primera reacción. La PCR anidada suele ser más exitosa en amplificar específicamente fragmentos de ADN largos que la PCR convencional, pero requiere un conocimiento más detallado de las secuencias diana.

60 Por tanto, en el presente documento, en un aspecto, se divulgan métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con una cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende realizar una reacción PCR en ADN de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción PCR comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; y en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*.

Cebadores y sondas

Como se usa en el presente documento, los "cebadores" son un subconjunto de sondas que son capaces de soportar algún tipo de manipulación enzimática y que se pueden hibridar con un ácido nucleico diana para que pueda ocurrir la manipulación enzimática. Se puede producir un cebador a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados o análogos de nucleótidos disponibles en la materia que no interfieran con la manipulación enzimática.

Como se usa en el presente documento, las "sondas" son moléculas capaces de interactuar con un ácido nucleico diana, típicamente de una manera específica de la secuencia, por ejemplo, a través de la hibridación. La hibridación de ácidos nucleicos se entiende bien en la materia y se describe en el presente documento. Típicamente, se puede producir una sonda a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados o análogos de nucleótidos disponibles en la materia.

Se divulgan composiciones que incluyen cebadores y sondas, que son capaces de interactuar con los ácidos nucleicos divulgados como la SEQ ID NO: 1 o su complemento. Los cebadores se pueden usar para soportar reacciones de extensión de ácidos nucleicos, reacciones de replicación de ácidos nucleicos y/o reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Típicamente, los cebadores serán capaces de ser extendidos de una manera específica de la secuencia. La extensión de un cebador de una manera específica de la secuencia incluye cualquier método en el que la secuencia y/o composición de la molécula de ácido nucleico con la que se hibrida el cebador o se asocia de otra manera dirige o influencia la composición o secuencia del producto producido por la extensión del cebador. La extensión del cebador de una manera específica de la secuencia incluye, por lo tanto, pero sin limitación, PCR, secuenciación de ADN, extensión de ADN, polimerización de ADN, transcripción de ARN o transcripción inversa. Se divulgan técnicas y condiciones que amplifican el cebador de una manera específica de la secuencia. Los cebadores se pueden usar para las reacciones de amplificación de ADN, como PCR o secuenciación directa. Se entiende que en algunas realizaciones, los cebadores se pueden extender también usando técnicas no enzimáticas, donde por ejemplo, los nucleótidos u oligonucleótidos usados para extender el cebador se modifican de tal manera que reaccionarán químicamente para extender el cebador de una manera específica de la secuencia. típicamente, los cebadores divulgados se hibridan con los ácidos nucleicos divulgados o región de los ácidos nucleicos o se hibridan con el complemento de los ácidos nucleicos o complemento de una región de los ácidos nucleicos. Como ejemplo del uso de cebadores, uno o más cebadores se pueden usar para crear productos de extensión a partir de un primer ácido nucleico que actúa como molde.

El tamaño de los cebadores o sondas para la interacción con los ácidos nucleicos puede ser cualquier tamaño que soporte la manipulación enzimática deseada del cebador, tal como la amplificación de ADN o la simple hibridación de la sonda o cebador. Un cebador o sonda típico sería al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, o 4000 nucleótidos de largo.

En otras realizaciones un cebador o sonda puede ser inferior a o igual a 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, o 4000 nucleótidos de largo.

Los cebadores para el ácido nucleico de interés típicamente se usarán para producir productos de extensión y/u otros productos replicados o amplificados que contienen una región del ácido nucleico de interés. El tamaño del producto puede ser tal que el tamaño se puede determinar con precisión dentro de 3, o 2 o 1 nucleótidos.

En ciertas realizaciones el producto puede ser, por ejemplo, al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, o 4000 nucleótidos de largo.

En otras realizaciones el producto puede ser, por ejemplo, inferior a o igual a 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, o 4000 nucleótidos de largo.

Por tanto, se entiende y se contempla en el presente documento que las reacciones de RT-PCR y PCR divulgadas

requieren cebadores directos e inversos para formar un par de cebadores. En el presente documento se divulga, que el cebador directo se puede seleccionar del grupo que consiste en, por ejemplo, el cebador directo puede ser un cebador de *ALK* intracelular tal como, por ejemplo, (cebador 100) 5'ACTACTGCTTTGCTGGCAAGACCT (SEQ ID NO: 6); un cebador de fusión *EML4-ALK* extracelular tal como, por ejemplo, (cebador 103) 5'TGTTCAAGATCGCCTGTCAGCTCT (SEQ ID NO: 3); un cebador de fusión *NPM-ALK* extracelular tal como, por ejemplo, (cebador 102); 5'TCTGTACAGCCAACGGTTCCCTT (SEQ ID NO: 4); un cebador de fusión *CTLC-ALK* extracelular tal como, por ejemplo, (cebador 105) 5'GAGAGTGCTTTGGAGCTTGTCTGT (SEQ ID NO: 5); o un cebador de *ALK* extracelular de tipo silvestre de una región de no homología tal como, por ejemplo, (cebador 104) 5'TTCCTTCATCAGTCCACTGGGCAT (SEQ ID NO: 2). Los cebadores directos e inversos se pueden usar en los métodos divulgados en el presente documento se pueden encontrar en la Tabla 3.

El cebador inverso puede ser, por ejemplo, cebador 101: 5' TCGTCCTGTTCAGAGCACACTTCA (SEQ ID NO: 7). Como alternativa, el cebador inverso puede ser la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 56, la SEQ ID NO: 57 o la SEQ ID NO: 58. Se entiende que los métodos comprenden al menos un cebador directo y un cebador inverso. Por tanto, se divulgan en el presente documento métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende realizar una reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; en donde el cebador directo se selecciona del grupo que consiste en el cebador *KIF5B-ALK*, cebador *NPM-ALK*, cebador *ATIC-ALK*, cebador *CLTC-ALK*, cebador *RANBP2-ALK*, cebador *SEC31L1-ALK*, cebador *TPM3-ALK*, cebador *TPM4-ALK*, cebador *TFG_L-ALK*, cebador *TFG_S-ALK*, cebador *CARS-ALK*, cebador *EML4-ALK*, cebador *ALO17-ALK*, cebador *MYH9-ALK*, cebador *MSN-ALK*, y cebador *TFG_{XL}-ALK*; y en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*. Por tanto, se divulgan también métodos en donde el cebador directo se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, la SEQ ID NO: 51, la SEQ ID NO: 52, la SEQ ID NO: 53, la SEQ ID NO: 54, la SEQ ID NO: 55 y la SEQ ID NO: 59. Por ejemplo, se divulgan en el presente documento métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende realizar una reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; en donde el cebador directo es un cebador de fusión *NPM-ALK* que comprende la SEQ ID NO: 4, y en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*.

Como ejemplos adicionales de pares de cebadores, se divulgan específicamente en el presente documento métodos en donde el cebador directo es un cebador de *ALK* de tipo silvestre y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *KIF5B-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *NPM-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *ATIC-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *CLTC-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *RANBP2-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *SEC31L1-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *TPM3-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *TPM4-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *TFG_L-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *TFG_S-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *CARS-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *EML4-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *ALO17-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; en donde el cebador directo es un cebador *MYH9-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7; o en donde el cebador directo es un cebador *TFG_{XL}-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 7. Se divulgan también métodos en donde el par de cebadores comprende las SEQ ID NOS: 2 y 7, las SEQ ID NOS: 3 y 7, las SEQ ID NOS: 4 y 7, las SEQ ID NOS: 5 y 7, o las SEQ ID NOS: 6 y 7.

Ejemplos adicionales de pares de cebadores, se divulgan específicamente en el presente documento métodos en donde el cebador directo es un cebador de *ALK* de tipo silvestre y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *KIF5B-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *NPM-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *ATIC-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *CLTC-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *RANBP2-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *SEC31L1-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *TPM3-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *TPM4-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *TFG_L-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *TFG_S-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *CARS-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *EML4-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46;

en donde el cebador directo es un cebador ALO17-*ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; en donde el cebador directo es un cebador *MYH9-ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46; o en el que el cebador directo es un cebador TFG_{XL}-*ALK* y el cebador inverso es la SEQ ID NO: 46. Se divulgan también métodos en donde el par de cebadores comprende las SEQ ID NOS: 2 y 46, las SEQ ID NOS: 3 y 46, las SEQ ID NOS: 4 y 46, las SEQ ID NOS: 5 y 46, las SEQ ID NOS: 6 y 46; las SEQ ID NOS: 33 y 46; las SEQ ID NOS: 34 y 46; las SEQ ID NOS: 35 y 46; las SEQ ID NOS: 36 y 46; las SEQ ID NOS: 37 y 46; las SEQ ID NOS: 38 y 46; las SEQ ID NOS: 39 y 46; las SEQ ID NOS: 40 y 46; las SEQ ID NOS: 41 y 46; las SEQ ID NOS: 42 y 46; las SEQ ID NOS: 43 y 46; las SEQ ID NOS: 44 y 46; las SEQ ID NOS: 45 y 46; las SEQ ID NOS: 48 y 46; las SEQ ID NOS: 49 y 46; las SEQ ID NOS: 50 y 46; las SEQ ID NOS: 51 y 46; las SEQ ID NOS: 52 y 46; las SEQ ID NOS: 53 y 46; las SEQ ID NOS: 54 y 46; o SEQ ID NOS: 55 y 46.

Se entiende y contempla en el presente documento que hay situaciones en las que puede ser ventajoso utilizar más de un par de cebadores para detectar la presencia de una fusión, truncamiento, o mutación de sobreexpresión. Tales reacciones de RT-PCR o PCR se pueden realizar por separado, o en una única reacción. Cuando se colocan pares de cebadores múltiples en una única reacción, esto se denomina "PCR multiplex". Por ejemplo, la reacción puede comprender un cebador *ALK* de tipo silvestre emparejado con un cebador inverso, así como, un cebador de fusión de *ALK* emparejado con el mismo cebador inverso. Por tanto, se divulgan en el presente documento métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende realizar una reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos dos cebadores directos; y en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*. De manera similar, se divulgan métodos que comprenden al menos tres cebadores directos. Se entiende y contempla en el presente documento que cualquier combinación de dos o más o tres o más de los cebadores directos divulgados en el presente documento se pueden usar en la reacción multiplex. Por tanto, por ejemplo, se divulgan en el presente documento métodos de diagnóstico en donde los cebadores directos con un cebador NPM-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*. También se divulgan, por ejemplo, métodos de diagnóstico en donde los cebadores directos son un cebador ELM4-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*.

Otros ejemplos de conjuntos de cebadores directos de PCR multiplex incluyen, pero sin limitación, un cebador de fusión KIF5B-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión CLTC -*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión RANBP2-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión ATIC -*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión SEC31L1-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión TPM3-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión TPM4-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión TFG_L-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión TFG_S-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión CARS -*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión ALO17-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión *MYH9-ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión MSN-*ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador truncado *ALK* y un cebador de tipo silvestre *ALK*, un cebador de fusión ELM4-*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión NPM-*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión CLTC -*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión RANBP2-*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión ATIC -*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión SEC31 L1-*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión TPM3-*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión TPM4-*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión TFG_L -*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión TFG_S -*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión CARS -*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión ALO17-*ALK* y un cebador truncado *ALK*, un cebador de fusión *MYH9-ALK* y un cebador truncado *ALK*, y un cebador de fusión MSN-*ALK* y un cebador truncado *ALK*.

Los ejemplos adicionales incluyen, pero sin limitación un cebador de fusión ELM4-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión NPM-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión CLTC -*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión RANBP2-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión ATIC -*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión SEC31L1-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión TPM3-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión TPM4-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión TFG_L -*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión TFG_S -*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión CARS-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión ALO17-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; un cebador de fusión *MYH9-ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*; y un cebador de fusión MSN-*ALK*, un cebador de tipo silvestre *ALK*, y un cebador truncado *ALK*.

Por tanto, en un aspecto, un único tubo de reacción puede incluir un cebador directo que se hibrida con una o más fusiones de *ALK*, un *ALK* de tipo silvestre, o un dominio cinasa de *ALK* y un cebador inverso que se hibridó con *ALK* de tipo silvestre. Se entiende que los métodos divulgados en el presente documento pueden comprender múltiples tubos de reacción. Por ejemplo, los métodos pueden incluir una primera reacción para detectar la presencia de una fusión de *ALK* conocida que comprende uno o más cebadores de fusión de *ALK* directos y un cebador de *ALK* inverso

que se hibrida con ALK de tipo silvestre (por ejemplo, los cebadores directos SEQ ID NOs 2, 3, 4, 5, 6, 34,35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 48, 49, 50, 51, 52, 53 y 59 y el cebador inverso SEQ ID NOs: 7, 32, 46, 47, 56, 57, o 58); un segundo tipo de reacción que comprende un cebador directo e inverso para la detección de ALK de tipo silvestre (por ejemplo, el cebador directo SEQ ID NOs: 33, 54, o 55 y el cebador inverso SEQ ID NOs: 7, 32, 46, 47, 56, 57, o 58);
 5 un cebador directo e inverso para detectar la presencia del dominio cinasa de ALK (por ejemplo, el cebador directo SEQ ID NOs: 45 o 48 y el cebador inverso SEQ ID NOs: 7, 32, 46, 47, 56, 57, o 58); un cebador directo e inverso para detectar un control; un cebador directo e inverso para un control de ADNc positivo; y un cebador directo e inverso para un control negativo de ADNc. En un método de tubo de reacción múltiple, el ARN se extrae de una muestra de tejido obtenida de un sujeto; el ARN se transcribe a la inversa para producir ADNc; el ADNc se divide entre uno o más tubos
 10 de reacción y se realizan ensayos de RT-PCR o de micromatriz. Suponiendo que los controles funcionen según lo diseñado, un experto en la materia puede detectar después un producto de amplificación en el tubo de fusión, tubo de tipo silvestre y tubo de cinasa. Un ensayo que resulta en la presencia de un amplicón en el tubo de fusión y tubo de cinasa, pero no en el tubo de tipo silvestre indica la presencia de una fusión de ALK conocida. Si el tubo de fusión es negativo, pero el tubo de tipo silvestre y tubo de cinasa son positivos, entonces solo está presente ALK de tipo silvestre.
 15 Si el tubo de tipo silvestre y de fusión son negativos, pero el tubo de cinasa es positivo, entonces está presente una fusión previamente desconocida. Si el tubo de cinasa es negativo, y el tubo de fusión o el tubo de tipo silvestre son positivos, no hay ALK funcional y la muestra de tejido no contiene un cáncer relacionado con ALK (véase Figura 5A). Se entiende que midiendo el tamaño del amplicón, se puede determinar la identidad de una fusión de ALK o ALK de tipo silvestre particular en una muestra (véase Figura 5B). Cuando un amplicón tiene un tamaño que no está asociado con una fusión de ALK o ALK de tipo silvestre particular, entonces el amplicón representa una fusión de ALK
 20 previamente desconocida.

Sondas y cebadores de cambios fluorescentes

25 Las sondas de cambios fluorescentes y los cebadores de cambios fluorescentes se refieren a todas las sondas y cebadores que implican un cambio en la intensidad o longitud de onda de la fluorescencia basándose en un cambio en la forma o conformación de la sonda o cebador y el ácido nucleico que se debe detectar, ensayar o replicar. Ejemplos de sondas y cebadores de cambios fluorescentes incluyen balizas moleculares, Amplifluors, sondas FRET, sondas FRET escindibles, sondas TaqMan, cebadores Scorpion, oligonucleótidos triplex fluorescentes que incluyen,
 30 pero sin limitación, balizas moleculares triplex o sondas FRET triplex, polímeros conjugados solubles en agua, sondas PNA y sondas QPNA.

Las sondas y cebadores de cambios fluorescentes se pueden clasificar de acuerdo con su estructura y/o función. Las sondas de cambios fluorescentes incluyen sondas desactivadas de horquilla, sondas desactivadas por escisión,
 35 sondas activadas por escisión y sondas activadas fluorescentes. Los cebadores de cambios fluorescentes incluyen cebadores desactivados de tallo y cebadores desactivados de horquilla.

Las sondas desactivadas de horquilla son sondas que cuando no se unen a una secuencia diana forman una estructura de horquilla (y, típicamente, un bucle) que aproxima un marcador fluorescente y un resto de desactivación de tal
 40 manera que se desactiva la fluorescencia del marcador. Cuando la sonda se une a una secuencia diana, el tallo se interrumpe, el resto de desactivación ya no está en la proximidad del marcador fluorescente y la fluorescencia aumenta. Los ejemplos de sondas desactivadas de horquilla son balizas moleculares, oligonucleótidos triplex fluorescentes, balizas moleculares triplex, sondas FRET triplex y sondas QPNA.

45 Las sondas activadas por escisión son sondas en las que la fluorescencia aumenta por la escisión de la sonda. Las sondas activadas por escisión pueden incluir un marcador fluorescente y un resto de desactivación en la proximidad, de modo que se desactiva la fluorescencia del marcador. Cuando la sonda se corta o digiere (típicamente por una actividad exonucleasa en 5'-3' de una polimerasa durante la amplificación), el resto de desactivación ya no está en la proximidad del marcador fluorescente y la fluorescencia aumenta. Las sondas TaqMan son un ejemplo de sondas
 50 activadas por escisión.

Las sondas desactivadas por escisión son sondas en las que la fluorescencia disminuye o se altera por la escisión de la sonda. Las sondas desactivadas por escisión pueden incluir un marcador fluorescente aceptador y un resto donador de tal manera que, cuando el aceptador y el donador están próximos, la transferencia de energía de la resonancia de
 55 fluorescencia desde el donador al aceptor provoca que el aceptor emita fluorescencia. Las sondas son, por tanto, fluorescentes, por ejemplo, cuando se hibridan con una secuencia diana. Cuando la sonda se corta o digiere (típicamente por una actividad exonucleasa en 5'-3' de una polimerasa durante la amplificación), el resto donador ya no está en la proximidad del marcador fluorescente del aceptador y la fluorescencia del aceptador disminuye. Si el resto donador es un marcador fluorescente en sí mismo, puede liberar energía como la fluorescencia (típicamente en longitudes de onda diferentes a la fluorescencia del aceptador) cuando no está en la proximidad de un aceptador. El efecto global sería entonces una reducción de la fluorescencia del aceptador y un aumento de la fluorescencia del donador. La fluorescencia del donador en el caso de sondas desactivadas por escisión es equivalente a la fluorescencia generada por sondas activadas por escisión, el aceptador siendo el resto de desactivación y el donador siendo el marcador fluorescente. Las sondas FRET escindibles (transferencia de energía por resonancia de
 60 fluorescencia) son un ejemplo de sondas desactivadas por escisión.
 65

Las sondas activadas fluorescentes son sondas o pares de sondas en donde la fluorescencia aumenta o se altera por hibridación de la sonda con una secuencia diana. Las sondas activadas fluorescentes pueden incluir un marcador fluorescente aceptador y un resto donador de tal manera que, cuando el aceptador y el donador están próximos (cuando las sondas se hibridan con una secuencia diana), la transferencia de energía de la resonancia de fluorescencia desde el donador al aceptor provoca que el aceptor emita fluorescencia. Las sondas activadas fluorescentes son típicamente pares de sondas diseñadas para hibridarse con las secuencias adyacentes de tal manera que el aceptador y el donador se aproximen. Las sondas activadas fluorescentes también pueden ser sondas únicas que contienen un donador y un aceptador en donde, cuando la sonda no se hibrida con una secuencia diana, el donador y el aceptador no están próximos, pero en donde el donador y el aceptador se aproximan cuando la sonda se hibrida con una secuencia diana. Esto puede conseguirse, por ejemplo, colocando el donador y el aceptador en extremos opuestos de la sonda y colocando secuencias diana de complemento en cada extremo de la sonda en donde las secuencias diana de complemento son complementarias a secuencias adyacentes en una secuencia diana. Si el resto donador de una sonda activada fluorescente es él mismo un marcador fluorescente, puede liberar energía como la fluorescencia (típicamente en longitudes de onda diferentes a la fluorescencia del aceptador) cuando no está en la proximidad de un aceptador (es decir, cuando las sondas no se hibridan con la secuencia diana). Cuando las sondas se hibridan con una secuencia diana, el efecto global sería entonces una reducción de la fluorescencia del donador y un aumento de la fluorescencia del aceptador. Las sondas FRET son un ejemplo de sondas activadas fluorescentes.

Los cebadores desactivados de tallo son cebadores que cuando no se hibridan con una secuencia complementaria forman una estructura de tallo (ya sea en una estructura de tallo intramolecular o una estructura de tallo intermolecular) que aproxima un marcador fluorescente y un resto de desactivación de tal manera que la fluorescencia del marcador se desactiva. Cuando el cebador se une a una secuencia complementaria, el tallo se interrumpe, el resto de desactivación ya no está en la proximidad del marcador fluorescente y la fluorescencia aumenta. En el método divulgado, los cebadores desactivados de tallo se usan como cebadores para la síntesis del ácido nucleico y, por lo tanto, se incorporan en el ácido nucleico sintetizado o amplificado. Ejemplos de cebadores desactivados de tallo son cebadores desactivados de ácido nucleico peptídico y cebadores desactivados de horquilla.

Los cebadores desactivados de ácido nucleico peptídico son cebadores asociados con un desactivador de ácido nucleico peptídico o un fluoróforo de ácido nucleico peptídico para formar una estructura de tallo. El cebador contiene un marcador fluorescente o un resto de desactivación y se asocia ya sea con un desactivador de ácido nucleico peptídico o un fluoróforo de ácido nucleico peptídico, respectivamente. Esto pone el marcador fluorescente en la proximidad del resto de desactivación. Cuando se replica el cebador, se desplaza el ácido nucleico peptídico, permitiendo así que el marcador fluorescente produzca una señal fluorescente.

Los cebadores desactivados de horquilla son cebadores que cuando no se hibridan con una secuencia complementaria forman una estructura de horquilla (y, típicamente, un bucle) que aproxima un marcador fluorescente y un resto de desactivación de tal manera que se desactiva la fluorescencia del marcador. Cuando el cebador se une a una secuencia complementaria, el tallo se interrumpe, el resto de desactivación ya no está en la proximidad del marcador fluorescente y la fluorescencia aumenta. Los cebadores desactivados de horquilla se usan típicamente como cebadores para la síntesis del ácido nucleico y, por lo tanto, se incorporan en el ácido nucleico sintetizado o amplificado. Los ejemplos de cebadores desactivados de horquilla son los cebadores Amplifluor y los cebadores Scorpion.

Los cebadores activados por escisión son similares a las sondas activadas por escisión con la excepción de que los cebadores se incorporan en cadenas replicadas y, después, se escinden posteriormente.

Marcadores

Para ayudar a la detección y cuantificación de ácidos nucleicos producidos usando los métodos divulgados, los marcadores se incorporan directamente en nucleótidos y ácidos nucleicos o se pueden acoplar con moléculas de detección tales como sondas o cebadores. Como se usa en el presente documento, un marcador es cualquier molécula que se puede asociar con un nucleótido o un ácido nucleico, directa o indirectamente, y que da como resultado una señal medible y detectable, ya sea directa o indirectamente. Muchos de estos marcadores para su incorporación en nucleótidos y ácidos nucleicos o acoplamiento con sondas de ácido nucleico son conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de marcadores adecuados para su uso en los métodos divulgados son isótopos radioactivos, moléculas fluorescentes, moléculas fosforescentes, enzimas, anticuerpos y ligandos. Los marcadores fluorescentes, especialmente en el contexto de sondas y cebadores de cambios fluorescentes, son útiles para la detección en tiempo real de la amplificación.

Ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5,6-carboximetil fluoresceína, Texas red, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo (NBD), cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, aminometil cumarina (AMCA), Eosina, Eritrosina, BODIPY®, CASCADE BLUE®, OREGON GREEN®, pireno, lisamina, xantenos, acridinas, oxazinas, ficoeritina, quelatos macrocíclicos de iones lantánidos tales como quantum dye™, colorantes de transferencia de energía fluorescente, tal como el heterodímero naranja de tiazol-etidio, y los colorantes de cianina Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7. Ejemplos de otros marcadores fluorescentes específicos incluyen ácido 3-hidroxipireno 5,8, 10-trisulfónico, 5-Hidroxi triptamina (5-HT), Fucsina ácida, Alizarin Complexon, Alizarin Red, Aloficocianina,

Aminocumarina, Antroil estearato, Astrazon Brilliant Red 4G, Astrazon Orange R, Astrazon Red 6B, Astrazon Yellow 7 GLL, Atabrina, Auramina, Aurofosfina, Aurofosfina G, BAO 9 (Bisaminofeniloxadiazol), BCECF, Sulfato de berberina, Bisbenzamida, Blancophor FFG Solution, Blancophor SV, Bodipy F1, Brilliant Sulphoflavin FF, Calcien Blue, Calcium Green, Solución de Calcofluor RW, Calcofluor White, Calcophor White ABT Solution, Calcophor White Standard Solution, Carbostirilo, Cascade Yellow, Catecolamina, Quinacrina, Corifosfina O, Cumarina-faloidina, CY3.1 8, CY5.1 8, CY7, Dans (Ácido 1-Dimetil Amino Nafalina 5 sulfónico), Dansa (Ácido Diamino Naftil Sulfónico), Dansil NH-CH₃, Diamino Fenil Oxidiazol (DAO), Ácido dimetilamino-5-sufónico, Difluoruro de dipirrometenoboro, Diphenyl Brilliant Flavine 7GFF, Dopamina, Eritrosina ITC, Eucricina, FIF (fluorescencia inducida por formaldehído), Flazo Orange, Fluo 3, Fluorescamina, Fura-2, Genacryl Brilliant Red B, Genacryl Brilliant Yellow 10GF, Genacryl Pink 3G, Genacryl Yellow 5GF, Ácido gloxálico, Granular Blue, Hematoporfirina, Indo-1, Intrawhite Cf Liquid, Leucophor PAF, Leucophor SF, Leucophor WS, Lissamine Rhodamine B200 (RD200), Lucifer Yellow CH, Lucifer Yellow VS, Magdala Red, Marina Blue, Maxilon Brilliant Flavin 10 GFF, Maxilon Brilliant Flavin 8 GFF, MPS (Verde de metilo pironina estilbeno), Mitramicina, NBD Amina, Nitrobenzoxadidol, Noradrenalina, Nuclear Fast Red, Nuclear Yellow, Nylosan Brilliant Flavin E8G, Oxadiazol, Pacific Blue, Pararosnilina (Feulgen), Phorwite AR Solution, Phorwite BKL, Phorwite Rev, Phorwite RPA, Fosfina 3R, Ftalocianina, Ficoeritrina R, Ficoeritrina B, Polyazaindacene Pontochrome Blue Black, Porfirina, Primulina, Procion Yellow, Pironina, Pironina B, Pyrozal Brilliant Flavin 7GF, Mostaza de quinacrina, Rodamina 123, Rodamina 5 GLD, Rodamina 6G, Rodamina B, Rodamina B 200, Rodamina B Extra, Rodamina BB, Rodamina BG, Rodamina WT, Serotonina, Sevron Brilliant Red 2B, Sevron Brilliant Red 4G, Sevron Brilliant Red B, Sevron Orange, Sevron Yellow L, SITS (Primulina), SITS (Ácido estilbeno isotiosulfónico), Estilbeno, Snarf 1, Sulfo Rodamina B Can C, Sulfo Rodamina G Extra, Tetraciclina, Thiazine Red R, Tioflavina S, Tioflavina TCN, Tioflavina 5, Thiolyte, Thiozol Orange, Tinopol CBS, True Blue, Ultralite, Uranine B, Uvitex SFC, Xylene Orange y XRITC.

Los máximos de absorción y emisión, respectivamente, para algunos de estos fluoróforos son: FITC (490 nm; 520 nm), Cy3 (554 nm; 568 nm), Cy3.5 (581 nm; 588 nm), Cy5 (652 nm; 672 nm), Cy5.5 (682 nm; 703 nm) y Cy7 (755 nm; 778 nm), permitiendo así su detección simultánea. Otros ejemplos de colorantes de fluoresceína incluyen 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), 2',7'-dimetoxi-4', 5'-dicloro-6-carboxirodamina (JOE), fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína 2'-cloro-5'-fluoro-7',8'-fusionada (NED), y 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC). Se pueden obtener marcadores fluorescentes de una variedad de fuentes comerciales, incluyendo Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Molecular Probes, Eugene, OR; y Research Organics, Cleveland, Ohio.

Marcadores adicionales de interés incluyen aquellos que proporcionan una señal solo cuando la sonda con la que están asociados está unida específicamente a una molécula diana, donde dichos marcadores incluyen: "balizas moleculares" como se describen en Tyagi & Kramer, Nature Biotechnology (1996) 14:303 y en el documento EP 0 070 685 B1. Otros marcadores de interés incluyen los descritos en la patente de los Estados Unidos n.º 5.563.037.

Los nucleótidos marcados son una forma de marcador que se puede incorporar directamente en los productos de amplificación durante la síntesis. Ejemplos de marcadores que se pueden incorporar en ácidos nucleicos amplificados incluyen nucleótidos análogos tales como BrdUrd, aminoalildesoxiuridina, 5-metilcitosina, bromouridina, y nucleótidos modificados con biotina o con haptenos adecuados tales como digoxigenina. Los nucleótidos marcados por fluorescencia adecuados son Fluoresceína-isotiocianato-dUTP, Cianina-3-dUTP y Cianina-5-dUTP. Un ejemplo de un nucleótido análogo para ADN es BrdUrd (bromodesoxiuridina, BrdUrd, BrdU, BUdR, Sigma-Aldrich Co). Otros ejemplos de nucleótidos análogos para la incorporación de marcador en ADN son AA-dUTP (aminoalil-desoxiuridina trifosfato, Sigma-Aldrich Co.), y 5-metil-dCTP (Roche Molecular Biochemicals). Un ejemplo de un nucleótido análogo para la incorporación de un marcador en ARN es biotina-16-UTP (biotina-16-uridina-5'-trifosfato, Roche Molecular Biochemicals). Fluoresceína, Cy3, y Cy5 pueden enlazarse a dUTP para el marcaje directo. Cy3.5 y Cy7 están disponibles como conjugados de avidina o anti-digoxigenina para la detección secundaria de sondas marcadas con biotina o digoxigenina.

Los marcadores que se incorporan en ácido nucleico amplificado, tales como la biotina, pueden detectarse posteriormente usando métodos sensibles bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la biotina se puede detectar usando el conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Tropix, Inc.), que se une a la biotina y posteriormente se detecta por quimioluminiscencia de sustratos adecuados (por ejemplo, sustrato quimioluminiscente CSPD: disodio, 3-(4-metoxispiro-[1,2,-dioxetano-3-2'-(5'-cloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decanol]-4-il) fenil fosfato; Tropix, Inc.). Los marcadores también pueden ser enzimas, como la fosfatasa alcalina, peroxidasa de soja, peroxidasa de rábano y polimerasas, que se pueden detectar, por ejemplo, con amplificación de señal química o usando un sustrato para la enzima que produce luz (por ejemplo, un sustrato de 1,2-dioxetano quimioluminiscente) o señal fluorescente.

Las moléculas que combinan dos o más de estos marcadores se consideran también marcadores. Cualquiera de los marcadores conocidos se puede usar con las sondas divulgadas, etiquetas y método para marcar y detectar ácido nucleico amplificado usando el método divulgado. Los métodos para detectar y medir las señales generadas por los marcadores también son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los isótopos radioactivos se pueden detectar por recuento de centelleo o visualización directa; las moléculas fluorescentes se pueden detectar con espectrofotómetros fluorescentes; las moléculas fosforescentes se pueden detectar con un espectrofotómetro o visualizar directamente con una cámara; las enzimas pueden detectarse por detección o visualización del producto de una reacción catalizada por la enzima; los anticuerpos pueden detectarse detectando un marcador secundario acoplado al anticuerpo. Como se usa en el presente documento, las moléculas de detección son moléculas que

interactúan con el ácido nucleico amplificado y a las que se acoplan uno o más marcadores.

Se entiende y contempla en el presente documento que un método para evaluar si se ha producido un aumento en un ARNm particular o expresión de ARNm o si un ARNm particular está presente es mediante comparación con una muestra de control. Por lo tanto, se contemplan en el presente documento métodos para diagnosticar un cáncer en un sujeto que comprenden realizar una reacción RT-PCR o PCR con ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*; y en donde el tejido de control que se obtiene es un tejido no canceroso. Se entiende adicionalmente que con respecto a los cánceres relacionados con *ALK*, el uso de un control de tejido no canceroso puede utilizarse pero no es necesario ya que se puede usar también tejido canceroso de un cáncer no relacionado con *ALK*. Por tanto, se divulga en el presente documento el diagnóstico de un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende realizar una reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; y en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*; y en donde el tejido de control que se obtiene es un tejido canceroso no relacionado con *ALK*.

Los métodos divulgados se pueden usar para diagnosticar cualquier enfermedad en la que se produce una proliferación celular descontrolada, denominada en el presente documento "cáncer". Una lista no limitante de distintos tipos de cánceres relacionados con *ALK* es la siguiente: linfomas (Hodgkins y no Hodgkins), leucemias, carcinomas, carcinomas de tejidos sólidos, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, sarcomas, gliomas, gliomas de alto grado, blastomas, neuroblastomas, plasmacitomas, histiocitomas, melanomas, adenomas, tumores hipóxicos, mielomas, linfomas o sarcomas relacionados con SIDA, cánceres metastásicos o cánceres en general.

Una lista representativa, pero sin limitación, de cánceres en los cuales se pueden usar los métodos divulgados para el diagnóstico es la siguiente: linfoma, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, micosis fungoide, enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer del sistema nervioso, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico, neuroblastoma/glioblastoma, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de hígado, melanoma, carcinomas de células escamosas de la boca, garganta, laringe y pulmón, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, carcinoma de cuello uterino, cáncer de mama y/o cáncer epitelial, cáncer renal, cáncer genitourinario, cáncer pulmonar, carcinoma esofágico, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de intestino grueso, cánceres hematopoyéticos; cáncer testicular; cánceres de colon y rectales, cáncer de próstata o cáncer de páncreas.

Por tanto, se divulgan en el presente documento métodos de diagnóstico de un cáncer en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma pulmonar no microcítico, linfoma difuso de linfocitos B grandes, histiocitosis sistémica, cáncer de mama, carcinoma colorrectal, carcinoma de células escamosas del esófago, linfoma anaplásico de células grandes, neuroblastoma y tumores miofibroblásticos inflamatorios (TMI). Por ejemplo, se divulgan en el presente documento métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) en un sujeto que comprende realizar una reacción RT-PCR en ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; en donde un aumento en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control indica la presencia de un cáncer relacionado con *ALK*, y en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en carcinoma pulmonar no microcítico, linfoma difuso de linfocitos B grandes, , histiocitosis sistémica, cáncer de mama, carcinoma colorrectal, carcinoma de células escamosas del esófago, linfoma anaplásico de células grandes, neuroblastoma y tumores miofibroblásticos inflamatorios (TMI).

Métodos para evaluar la idoneidad de tratamientos dirigidos a *ALK*

Aunque sin desear quedar ligado a las teorías actuales, se cree que estas formas de genes *ALK* con fármacos candidatos de moléculas pequeñas anulan la proliferación celular anormal relacionada y promueve la apoptosis en el neuroblastoma y otras líneas celulares tumorales relacionadas con *ALK*; además, tanto los modelos animales preclínicos como la experiencia clínica temprana con estos inhibidores indican que los inhibidores de moléculas pequeñas de *ALK* no solo poseen actividad antitumoral marcada contra los cánceres relacionados con *ALK* sino que también se toleran muy bien sin toxicidades limitantes asociadas a la diana.

Estos descubrimientos resaltan la necesidad de una prueba de diagnóstico especializada para mutaciones de *ALK*. Por ejemplo, un ensayo de este tipo se puede usar para detectar niños de familias afectadas por neuroblastoma hereditario para ayudar a facilitar la detección de tumores en un estadio más temprano cuando los tumores son más susceptibles al tratamiento. En consecuencia, se divulgan en el presente documento métodos de evaluación de la idoneidad de un tratamiento inhibidor de *ALK* para un cáncer en un sujeto que comprende medir el ARNm de una muestra de tejido del sujeto; en donde un aumento en la cantidad de secuencia de ARNm de *ALK* con respecto a un

control indica que un cáncer puede ser tratado con un inhibidor de *ALK*.

Se entiende y contempla en el presente documento que cualquiera de las técnicas de medición de ARNm divulgadas en el presente documento puede usarse en estos métodos. Por tanto, por ejemplo, se divulgan en el presente documento métodos de evaluación de la idoneidad de un tratamiento inhibidor de *ALK* para un cáncer en un sujeto que comprende realizar una reacción RT-PCR con ARNm o una reacción PCR con ADN de una muestra de tejido de un sujeto; en donde la reacción RT-PCR comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; y en donde un aumento en la cantidad de producto de amplificación con respecto a un control indica un cáncer que puede tratarse con un inhibidor de *ALK*. Se entiende además que los métodos divulgados pueden comprender además cualquiera de los cebadores divulgados en el presente documento y utilizan las técnicas de PCR de multiplexación divulgadas.

Métodos de diagnóstico de un cáncer relacionado con *ALK* desarrollado a partir de mutaciones puntuales de *ALK* y métodos de evaluación de la resistencia a inhibidores de *ALK*.

La importancia y relevancia pronósticas para influir en las decisiones de tratamiento posteriores de la detección de la enfermedad residual mínima (ERM) después de la terapia de cánceres relacionados con *ALK* pueden aumentarse por un ensayo diagnóstico altamente sensible y realizado fácilmente como aquellos propuestos en el presente documento. Los estudios preclínicos han identificado un espectro de mutaciones puntuales del dominio cinasa de *ALK* que confieren resistencia a inhibidores de moléculas pequeñas tales como NVP-TAE684 y PF-2341066. Dichos ensayos se conocen por ser altamente predictivos de mutaciones de resistencia al inhibidor clínicamente relevantes basándose en su uso para la predicción de mutaciones que confieren resistencia a inhibidores tales como Gleevec que se han usado clínicamente durante varios años.

Las presentes divulgaciones comprenden métodos y composiciones para ensayos diagnósticos de *ALK* sensibles y específicos que se pueden usar para dirigir y guiar selectivamente la terapia farmacológica a los pacientes. Se pueden usar numerosas tecnologías de barrido para mutaciones desconocidas en los métodos divulgados en el presente documento tales como: cromatografía líquida de alto rendimiento con desnaturalización (dHPLC), barrido de secuencias por escisión de base (BESS), polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), análisis de heterodúplex (HA), electroforesis en gel sensible a la conformación (CSGE), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), electroforesis en gel desnaturalizante constante (CDGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TGGE), polimorfismos de longitud de fragmentos producidos por digestión de clivasa (CFLP), escisión química de emparejamientos incorrectos, escisión enzimática de emparejamientos incorrectos y enzimas reparadoras de emparejamientos incorrectos. En un aspecto, se divulgan en el presente documento métodos de identificación de nucleótido único u otros cambios mutacionales relacionados con el gen *ALK* usando la tecnología de reacción de intercambio y extensión de moldes (Template Exchange Extension Reaction, TEER™) para detectar mutaciones oncógenas dentro de *ALK* o mutaciones que confieren resistencia a los fármacos para los cánceres relacionados con *ALK*. La tecnología TEER™ puede identificar dichas mutaciones de *ALK* presentes en cánceres con *ALK* de estadio temprano y resistentes a los fármacos, incluyendo incluso mutaciones raras y nuevas. La tecnología TEER se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.610.486; en la patente de Estados Unidos n.º 6.150.105 y en la solicitud de los Estados Unidos n.º 12/152.512 que proporcionan enseñanzas sobre la detección de la variación de nucleótidos.

Los métodos para la detección de la variación del ácido nucleico relacionado con *ALK* divulgados en el presente documento tienen muchos usos incluyendo, pero sin limitación, la detección o diagnóstico de la presencia de una enfermedad o afección como el cáncer, la evaluación de la susceptibilidad o del riesgo de una enfermedad o afección asociada con una variación del ácido nucleico, el control de la progresión de la enfermedad y la determinación de la susceptibilidad o resistencia al tratamiento terapéutico.

Se entiende y contempla en el presente documento que puede haber ocasiones en las que se distinga entre mutantes del mismo tipo (es decir, entre dos mutaciones puntuales o entre dos fusiones de *EML4-ALK*). Por tanto, se entiende que cualquiera de los métodos divulgados de diagnóstico del cáncer o de evaluación de la idoneidad de un tratamiento puede comprender además la secuenciación de cualquier Amplicón que resulte del método.

Métodos de detección

Las fusiones y las mutaciones puntuales de *ALK* divulgadas en el presente documento son dianas para los tratamientos contra el cáncer. Por tanto, se divulgan en el presente documento métodos de detección de un agente que inhibe un cáncer relacionado con *ALK* en un sujeto que comprende

- a) obtener una muestra de tejido de un sujeto con un cáncer relacionado con *ALK*;
- b) poner en contacto la muestra de tejido con el agente
- c) extraer ARNm de la muestra de tejido;
- d) realizar una reacción RT-PCR en el ARNm de la muestra de tejido;

en donde la reacción RT-PCR comprende un cebador inverso capaz de hibridarse específicamente con una o más

secuencias de *ALK* y al menos un cebador directo; y en donde una reducción en la cantidad del producto de amplificación con respecto a un control no tratado indica un agente que puede inhibir un cáncer relacionado con *ALK*.

Ácidos nucleicos

5 El método y composiciones divulgados usan varios ácidos nucleicos. En general, cualquier ácido nucleico que se puede usar en el método divulgado. Por ejemplo, los ácidos nucleicos divulgados de interés y los ácidos nucleicos divulgados de referencia se pueden elegir basándose en el análisis deseado y en la información que se va a obtener o evaluar. Los métodos divulgados también producen ácidos nucleicos nuevos y alterados. La naturaleza y estructura
10 de dichos ácidos nucleicos se establecerán por la manera en la que se producen y manipulan en los métodos. Por tanto, por ejemplo, los productos de extensión y ácidos nucleicos de hibridación se producen en los métodos divulgados. Como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos de hibridación son híbridos de los productos de extensión y el segundo ácido nucleico.

15 Se entiende y se contempla en el presente documento que un ácido nucleico de interés puede ser cualquier ácido nucleico para el cual se desea la determinación de la presencia o ausencia de variación de nucleótidos. Por tanto, por ejemplo, el ácido nucleico de interés puede comprender una secuencia que corresponde a la secuencia de tipo silvestre del ácido nucleico de referencia. Se divulga adicionalmente en el presente documento que los métodos divulgados pueden realizarse en donde el primer ácido nucleico es un ácido nucleico de referencia y el segundo ácido
20 nucleico es un ácido nucleico de interés o en donde el primer ácido nucleico es el ácido nucleico de interés y el segundo ácido nucleico es el ácido nucleico de referencia.

Se entiende y contempla en el presente documento que un ácido nucleico de referencia puede ser cualquier ácido nucleico con el cual se comparará un ácido nucleico de interés. Típicamente, el ácido nucleico de referencia tiene una
25 secuencia conocida (y/o se conoce por tener una secuencia de interés como referencia). Aunque no es necesario, es útil si la secuencia de referencia tiene una relación cercana conocida o sospechada con el ácido nucleico de interés. Por ejemplo, si se desea detectar una variación de un único nucleótido, la secuencia de referencia puede elegirse útilmente para que sea un homólogo o una coincidencia estrecha con el ácido nucleico de interés, tal como un ácido nucleico derivado del mismo gen o elemento genético del mismo o de un organismo o individuo relacionado. Por tanto,
30 por ejemplo, se contempla en el presente documento que el ácido nucleico de referencia puede comprender una secuencia de tipo silvestre o alternativamente puede comprender una mutación conocida que incluye, por ejemplo, una mutación cuya presencia o ausencia está asociada con una enfermedad o resistencia al tratamiento terapéutico. Por tanto, por ejemplo, se contempla que los métodos divulgados se pueden usar para detectar o diagnosticar la presencia de mutaciones conocidas en un ácido nucleico de interés comparando el ácido nucleico de interés con un
35 ácido nucleico de referencia que comprende una secuencia de tipo silvestre (es decir, se sabe que no posee la mutación) y examinando la presencia o ausencia de variación en el ácido nucleico de interés, en donde la ausencia de variación indicaría la ausencia de una mutación. Como alternativa, el ácido nucleico de referencia puede poseer una mutación conocida. Por tanto, por ejemplo, se contempla que los métodos divulgados se pueden usar para detectar susceptibilidad a una enfermedad o afección comparando el ácido nucleico de interés con un ácido nucleico
40 de referencia que comprende una mutación conocida que indica susceptibilidad a una enfermedad y examinando la presencia o ausencia de la mutación, en donde la presencia de la mutación indica una enfermedad.

En el presente documento, la expresión "variación de nucleótidos" se refiere a cualquier cambio o diferencia en la
45 secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de interés con respecto a la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de referencia. Por tanto, se dice que ocurre una variación de nucleótidos cuando las secuencias entre el ácido nucleico de referencia y el ácido nucleico de interés (o su complemento, según sea apropiado en el contexto) difieren. Por tanto, por ejemplo, una sustitución de una adenina (A) por una guanina (G) en una posición particular en un ácido nucleico sería una variación de nucleótido siempre que el ácido nucleico de referencia comprenda una A en la posición correspondiente. Se entiende y contempla en el presente documento que la determinación de una variación se basa
50 en el ácido nucleico de referencia y no indica si una secuencia es o no de tipo silvestre. Por tanto, por ejemplo, cuando un ácido nucleico con una mutación conocida se usa como el ácido nucleico de referencia, un ácido nucleico que no posee la mutación (incluido un ácido nucleico de tipo silvestre) se consideraría que posee una variación de nucleótido (con respecto al ácido nucleico de referencia).

55 Nucleótidos

Los métodos y composiciones divulgados usan varios nucleótidos. A lo largo de esta solicitud y los métodos divulgados en el presente documento se hace referencia al tipo de base para un nucleótido. Se entiende y contempla en el presente documento que cuando se hace referencia a un tipo de base, se refiere a una base que en un nucleótido en
60 una cadena de ácido nucleico es capaz de hibridarse (unirse) a un conjunto definido de una o más de las bases canónicas. Por tanto, por ejemplo, cuando se hace referencia a los productos de extensión extendidos en presencia de tres tipos de nucleótidos resistentes a las nucleasas y no en presencia de nucleótidos que comprenden el mismo tipo de base que los nucleótidos modificados, esto significa que si, por ejemplo, la base del nucleótido modificado fuera una adenina (A), los nucleótidos resistentes a las nucleasas pueden ser, por ejemplo, guanina (G), timina (T) y citosina
65 (C). Cada una de estas bases (que representan las cuatro bases canónicas) es capaz de hibridarse con una diferente de las cuatro bases canónicas y, por lo tanto, cada una se califica como un tipo diferente de base como se define en

el presente documento. Como otro ejemplo, la base de inosina se empareja principalmente con adenina y citosina (en el ADN) y, por lo tanto, se puede considerar un tipo diferente de base de adenina y de citosina, base que se empareja con timina y guanina, respectivamente, pero no un tipo de base diferente de guanina o timina, base que se empareja con citosina y adenina, respectivamente, porque el emparejamiento de bases de guanina y timina se superpone (es decir, no es diferente de) el patrón de hibridación de inosina.

Cualquier tipo de base modificada o alternativa se puede usar en los métodos y composiciones divulgados, generalmente limitados solo por las capacidades de las enzimas usadas para usar dichas bases. Se conocen muchos nucleótidos y bases modificados y alternativos, algunos de los cuales se describen a continuación y en otras partes del presente documento. El tipo de base que dichas bases modificadas y alternativas representan puede determinarse mediante el patrón de emparejamiento de bases para esta base según se describe en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, si el nucleótido modificado era adenina, cualquier base análoga, derivada, modificada, o variante que se emparejara principalmente con timina se consideraría el mismo tipo de base que la adenina. En otras palabras, siempre que la análoga, derivada, modificada o variante tenga el mismo patrón de emparejamiento de bases que otra base, se puede considerar el mismo tipo de base. Se pueden hacer modificaciones en los grupos de azúcar o fosfato de un nucleótido. Generalmente, dichas modificaciones no cambiarán el patrón de emparejamiento de bases de la base. Sin embargo, el patrón de emparejamiento de bases de un nucleótido en una cadena de ácido nucleico determina el tipo de base de la base en el nucleótido.

Los nucleótidos modificados para ser incorporados en los productos de extensión y para ser eliminados selectivamente por los agentes divulgados en los métodos divulgados pueden ser cualquier nucleótido modificado que funcione según sea necesario en el método divulgado según se describe en otra parte en el presente documento. Los nucleótidos modificados pueden producirse también en las cadenas existentes del ácido nucleico, tales como productos de extensión, mediante, por ejemplo, modificación química, modificación enzimática o una combinación.

Se conocen muchos tipos de nucleótidos resistentes a las nucleasas y se pueden usar en los métodos divulgados. Por ejemplo, los nucleótidos que tienen grupos fosfato modificados y/o grupos de azúcar modificados pueden ser resistentes a una o más nucleasas. La resistencia a las nucleasas se define en el presente documento como la resistencia a la eliminación de un ácido nucleico por una o más nucleasas. En general, la resistencia a las nucleasas de un nucleótido particular se puede definir en términos de una nucleasa relevante. Por tanto, por ejemplo, si se usa una nucleasa particular en el método divulgado, los nucleótidos resistentes a las nucleasas solo necesitan ser resistentes a esta nucleasa particular. Los ejemplos de nucleótidos resistentes a las nucleasas útiles incluyen los tionucleótidos modificados y los nucleótidos modificados con borano.

Existe una variedad de moléculas divulgadas en el presente documento que están basadas en ácidos nucleicos. En el presente documento se tratan ejemplos no limitantes de estas y otras moléculas. Se entiende que, por ejemplo, un nucleótido es una molécula que contiene un resto de base, un resto de azúcar y un resto de fosfato. Los nucleótidos pueden unirse entre sí a través de sus restos de fosfato y sus restos de azúcar creando un enlace internucleósido. El resto de base de un nucleótido puede ser adenin-9-ilo (adenina, A), citosin-1-ilo (citosina, C), guanin-9-ilo (guanina, G), uracil-1-ilo (uracilo, U), y timin-1-ilo (timina, T). El resto de azúcar de un nucleótido es una ribosa o una desoxirribosa. El resto de fosfato de un nucleótido es un fosfato pentavalente. Un ejemplo no limitante de un nucleótido sería 3'-AMP (3'-adenosina monofosfato) o 5'-GMP (5'-guanosina monofosfato).

Un análogo de nucleótido es un nucleótido que contiene algún tipo de modificación en el resto de la base, de azúcar o de fosfato. Las modificaciones en el resto de la base incluirían modificaciones naturales y sintéticas de A, C, G, y T/U así como diferentes bases de purina o pirimidina, tales como uracil-5-ilo (ψ), hipoxantin-9-ilo (inosina, I) y 2-aminoadenin-9-ilo. Una base modificada incluye, pero sin limitación, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente, 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Se pueden encontrar modificaciones de bases adicionales, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 3.687.808, que proporciona enseñanzas de modificaciones de bases. Ciertos análogos de nucleótidos, tales como pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. La 5-metilcitosina puede aumentar la estabilidad de la formación de dúplex. A menudo, las modificaciones de bases pueden combinarse con, por ejemplo, una modificación de azúcar, tal como 2'-O-metoxietilo, para conseguir propiedades únicas tales como mayor estabilidad de dúplex. Hay numerosas patentes de los Estados Unidos, tales como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; y 5.681.941, que detallan y describen un rango de modificaciones de bases.

Los análogos de nucleótidos pueden incluir también modificaciones del resto de azúcar. Las modificaciones del resto de azúcar incluirían modificaciones naturales de la ribosa y desoxirribosa así como modificaciones sintéticas. Las modificaciones de azúcar incluyen, pero sin limitación, las siguientes modificaciones en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; O-, S- o N-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino

pueden ser alquilo C1 a C10 sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino C2 a C10. Las modificaciones del azúcar en 2' incluyen también, pero sin limitación, $-O[(CH_2)_n O]_m CH_3$, $-O(CH_2)_n OCH_3$, $-O(CH_2)_n NH_2$, $-O(CH_2)_n CH_3$, $-O(CH_2)_n -ONH_2$, y $-O(CH_2)_n ON[(CH_2)_n CH_3]_2$, en donde n y m son de 1 a aproximadamente 10.

5 Otras modificaciones en la posición 2' incluyen, pero sin limitación: alquilo inferior de C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH3, OCN, C1, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2, CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalante, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. También pueden producirse modificaciones similares en otras posiciones sobre el azúcar, particularmente, la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en oligonucleótidos enlazados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los azúcares modificados incluirían también aquellos que contienen modificaciones en el oxígeno del anillo puente, tal como CH2 y S. Los análogos de azúcar del nucleótido pueden tener también miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar de azúcar pentofuranosilo. Hay numerosas patentes de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas tales como 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

20 Los análogos de nucleótidos también pueden modificarse en el resto fosfato. Los restos fosfato modificados incluyen, pero sin limitación, aquellos que se pueden modificar de modo que el enlace entre dos nucleótidos contenga un fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, fosfonatos de metilo y otros alquil fosfonatos que incluyen fosfonatos de 3'-alqueno y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos. Se entiende que este enlace fosfato o fosfato modificado entre dos nucleótidos puede ser a través de un enlace 3'-5' o un enlace 2'-5', y el enlace puede contener polaridad invertida tal como 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. Varias sales, sales mixtas y formas de ácidos libres están también incluidas. Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan cómo hacer y usar los nucleótidos que contienen fosfonatos modificados e incluyen, pero sin limitación, 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Se entiende que los análogos de nucleótidos necesitan contener solo una modificación única, pero también contienen modificaciones múltiples dentro de uno de los restos o entre restos diferentes.

35 Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a los nucleótidos, pero que no contienen un resto fosfato, como el ácido nucleico peptídico (ANP). Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que reconocerán los ácidos nucleicos de manera Watson-Crick o Hoogsteen, pero que se unen entre sí a través de un resto distinto de un resto fosfato. Los sustitutos de nucleótidos son capaces de conformar una estructura de tipo de doble hélice cuando interactúan con el ácido nucleico diana apropiado.

Los sustitutos de nucleótidos son nucleótidos o análogos de nucleótidos en los que se ha reemplazado el resto fosfato y/o los restos de azúcar. Los sustitutos de nucleótidos no contienen un átomo de fósforo estándar. Los sustitutos del fosfato pueden ser, por ejemplo, enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos de heteroátomos mixtos y de alquilo o cicloalquilo o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; sulfuro, cadenas principales de sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetoilo y tioformacetoilo; cadenas principales de metileno formacetoilo y tioformacetoilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes de componentes mixtos de N, O, S y CH2. Numerosas patentes de los Estados Unidos divulgan cómo hacer y usar estos tipos de sustituciones de fosfato e incluyen, pero sin limitación 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

Se entiende también que en un sustituto de nucleótido se pueden reemplazar los restos de azúcar y de fosfato del nucleótido, mediante, por ejemplo, un enlace de tipo amida (aminoetilglicina) (ANP). Las patentes de Estados Unidos 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262 enseñan cómo hacer y usar las moléculas de ANP.

60 También es posible enlazar otros tipos de moléculas (conjugados) con los nucleótidos o análogos de nucleótidos. Los conjugados se pueden enlazar químicamente con el nucleótido o análogos de nucleótidos. Dichos conjugados incluyen, pero sin limitación, restos de lípidos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un ticoesterol, una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o restos undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol o ácido adamantanoacético, un resto de palmitilo o un resto de octadecilamina o de

5 hexilamino-carbonil-oxi colesterol. Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan la preparación de dichos conjugados e incluyen, pero sin limitación, las patentes de los Estados Unidos n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

10 Una interacción de Watson-Crick es al menos una interacción con la cara Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido. La cara Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido incluye las posiciones C2, N1, y C6 de un nucleótido basado en purina, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido y las posiciones C2, N3, y C4 de un nucleótido basado en pirimidina, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido.

15 Una interacción de Hoogsteen es la interacción que tiene lugar en la cara Hoogsteen de un nucleótido o análogo de nucleótido, que se expone en el surco principal del ADN bicatenario. La cara Hoogsteen incluye la posición N7 y los grupos reactivos (NH₂ u O) en la posición C6 de los nucleótidos de purina.

20 Hibridación/hibridación selectiva

El término hibridación típicamente significa una interacción dirigida por secuencia entre al menos dos moléculas de ácido nucleico, tal como un cebador o una sonda y un gen. Una interacción dirigida por secuencia significa una interacción que se produce entre dos nucleótidos o análogos de nucleótidos o derivados de nucleótidos de una manera específica de los nucleótidos. Por ejemplo, G interactuando con C o A interactuando con T son interacciones dirigidas por secuencia. Típicamente, las interacciones dirigidas por secuencia se producen sobre la cara Watson-Crick o Hoogsteen del nucleótido. La hibridación de dos ácidos nucleicos está afectada por un número de condiciones y parámetros conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las concentraciones de sal, pH y temperatura de la reacción afectan todas en si dos moléculas de ácido nucleico se hibridarán.

30 Los parámetros para la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones las condiciones de hibridación selectiva se pueden definir como condiciones rigurosas de hibridación. Por ejemplo, la restricción de la hibridación se controla tanto por la temperatura como la concentración de sal de una o ambas etapas de hibridación y lavado. Por ejemplo, las condiciones de hibridación para lograr la hibridación selectiva pueden implicar la hibridación en una solución de alta fuerza iónica (6X SSC o 6X SSPE) a una temperatura que está aproximadamente 12-25 °C por debajo de la T_m (la temperatura de fusión a la que la mitad de las moléculas se disocian de sus parejas de hibridación), seguido por el lavado a una combinación de temperatura y concentración de sal elegida de manera que la temperatura de lavado está aproximadamente 5 °C a 20 °C por debajo de la T_m. La temperatura y las condiciones de sal se determinan fácilmente de manera empírica en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN de referencia inmovilizadas en filtros se hibridan con un ácido nucleico marcado de interés y después se lavan en condiciones de restricciones diferentes. Las temperaturas de hibridación son típicamente más altas para las hibridaciones ADN-ARN y ARN-ARN. Se pueden usar las condiciones como se describe anteriormente para lograr la restricción, o como se conoce en la materia. Una condición rigurosa de hibridación preferente para la hibridación ADN:ADN puede ser aproximadamente 45 68 °C (en solución acuosa) en 6X SSC o 6X SSPE seguido del lavado a 68 °C. La restricción de la hibridación y lavado, si se desea, se puede reducir en consecuencia a medida que disminuye el grado de complementariedad deseado, y además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se busque la variabilidad. Del mismo modo, la restricción de la hibridación y el lavado, si se desea, se puede aumentar en consecuencia a medida que aumenta la homología deseada, y además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en la que se desee alta homología, todo según se conoce en la materia.

Otra manera de definir la hibridación selectiva es observando la cantidad (porcentaje) de uno de los ácidos nucleicos unidos al ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 55 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento del ácido nucleico limitante está unido al ácido nucleico no limitante. Típicamente, el cebador no limitante es, por ejemplo, 10 o 100 o 1000 veces en exceso. Este tipo de ensayo se puede realizar en condiciones en las que tanto el cebador limitante como no limitante están por ejemplo, 10 veces o 100 veces o 1000 veces por debajo de su K_d, o donde solo una de las moléculas de ácido nucleico está 10 veces o 100 veces o 1000 veces o donde una o ambas moléculas de ácido nucleico están por encima de su K_d.

60 Otra manera de definir la hibridación selectiva es observando el porcentaje de cebador que se manipula enzimáticamente en condiciones en las que se requiere la hibridación para promover la manipulación enzimática deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 65 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento del cebador se manipula enzimáticamente bajo condiciones que promueven la manipulación enzimática, por ejemplo, si la manipulación enzimática es la extensión de ADN, entonces las condiciones

de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento de las moléculas de cebador están extendidas. Las condiciones también incluyen aquellas sugeridas por el fabricante o indicadas en la materia como apropiadas para la enzima que realiza la manipulación.

5 Al igual que con la homología, se entiende que existe una variedad de métodos divulgados en el presente documento para determinar el nivel de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico. Se entiende que estos métodos y condiciones pueden proporcionar diferentes porcentajes de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico, pero a
10 si se requiere un 80 % de hibridación y siempre que se produzca la hibridación dentro de los parámetros requeridos en cualquiera de estos métodos, se considera divulgado en el presente documento.

15 Se entiende que los expertos en la materia entienden que si una composición o métodos cumple cualquiera de estos criterios para determinar la hibridación de forma colectiva o individual, es una composición o método que se divulga en el presente documento.

Kits

20 En el presente documento se divulgan kits que se preparan para los reactivos que se pueden usar para practicar los métodos divulgados en el presente documento. En particular, los kits pueden incluir cualquier reactivo o combinación de reactivos expuestos en el presente documento o que se entendería que son necesarios o beneficiosos para la práctica de los métodos divulgados. Por ejemplo, los kits podrían incluir uno o más cebadores divulgados en el presente documento para realizar las reacciones de extensión, replicación y amplificación expuestas en ciertas realizaciones de los métodos, así como los tampones y enzimas requeridos para usar los cebadores como se pretende.

25 Se entiende que para detectar una fusión relacionada con ALK, se puede usar un cebador inverso que se hibride con ALK de tipo silvestre. Por tanto, en el presente documento se divulgan kits que incluyen al menos un cebador inverso en el que el cebador inverso se hibrida con una porción de ALK de tipo silvestre tal como el dominio cinasa de ALK de tipo silvestre. Ejemplos de cebadores inversos que se pueden usar en los kits divulgados incluyen, pero sin limitación,
30 la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 56 y la SEQ ID NO: 57. Además, se entiende que los kits divulgados en el presente documento pueden incluir uno o más cebadores directos que se hibridan específicamente con una pareja de fusión de ALK o ALK de tipo silvestre. Por tanto, por ejemplo, el cebador directo puede hibridarse con ALK de tipo silvestre, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formyltransferasa/IMP ciclohidrolasa (ATIC), cadena pesada de clatrina (CLTC), Proteína 2 de unión a Ran (RANBP2),
35 SEC31L1, tropomiosina-3 (TPM3), tropomiosina-4 (TPM4), gen fusionado a TRK (Grande) (TFG_L), gen fusionado a TRK (Pequeño) (TFG_S), CARS, ALO17, moesina (MSN), gen de la cadena pesada de miosina no muscular (MYH9), o gen fusionado a TRK (Extra Grande) (TFG_{XL}). Una lista no limitante de cebadores directos que se pueden usar en los kits divulgados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO:
40 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, la SEQ ID NO: 51, la SEQ ID NO: 52, la SEQ ID NO: 53, la SEQ ID NO: 54, la SEQ ID NO: 55 y la SEQ ID NO: 59. Un experto en la materia apreciará que es adecuado tener un kit que comprenda más de un solo par de cebadores y podría incluir, por ejemplo, un único cebador inverso, como la SEQ ID NO: 7, y múltiples cebadores inversos. Por tanto, en el presente documento se contemplan
45 específicamente los kits que incluyen uno o más cebadores directos que se hibridan específicamente con ALK de tipo silvestre, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formyltransferasa/IMP ciclohidrolasa (ATIC), cadena pesada de clatrina (CLTC), Proteína 2 de unión a Ran (RANBP2), SEC31L1, tropomiosina-3 (TPM3), tropomiosina-4 (TPM4), gen fusionado a TRK (Grande) (TFG_L), gen fusionado a TRK (Pequeño) (TFG_S), CARS, ALO17, moesina (MSN), gen de la cadena pesada de miosina no muscular (MYH9), o gen fusionado a TRK (Extra Grande) (TFG_{XL}) y al menos un
50 cebador inverso, en el que el cebador inverso es un cebador inverso de ALK de tipo silvestre como la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 56, la SEQ ID NO: 57 y la SEQ ID NO: 58.

Se entiende que los kits divulgados pueden incluir también controles para asegurar que los métodos divulgados en el presente documento están funcionando adecuadamente y para normalizar los resultados entre los ensayos. Por tanto,
55 por ejemplo, en el presente documento se divulgan controles de ADN positivos, controles de ADNc negativos, y pares de cebadores de control. Por ejemplo, los kits divulgados pueden incluir un par de cebadores de control para la detección de ATP sintasa de Homo sapiens, el transporte de H⁺, el complejo F1 mitocondrial, la subunidad O (ATP5O), el gen nuclear que codifica el ARNm de la proteína mitocondrial; el subcomplejo alfa de NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 de Homo sapiens, 2,8 kDa (NDUFA2), ARNm; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH),
60 ARNm; H3 histona de Homo sapiens, familia 3A (H3F3A), ARNm; subunidad de proteasoma (prosome, macropaina) de Homo sapiens, tipo beta, 4 (PSMB4), ARNm; proteína S27a ribosomal (RPS27A) de Homo sapiens, variante 1 de transcrito, ARNm; factor 4A de iniciación de la traducción eucariótico de Homo sapiens, isoforma 2 (EIF4A2), ARNm; proteína L18 ribosomal (RPL18) de Homo sapiens, ARNm; adenosina desaminasa de Homo sapiens, específica de ARN (ADAR), variante 1 de transcrito, ARNm; o subunidad Vb de citocromo c oxidasa (COX5B) de Homo sapiens,
65 mRNA. Ejemplos de pares de cebadores incluyen, pero sin limitación, los pares de cebadores encontrados en la Tabla 1.

TABLA 1

Nombre de la secuencia	Cebador sentido	Cebador antisentido
ATP50	GCGTTTCTCTCTTCCCCTC	GGCATAGCGACCTTCAATACC
NDUFA 2	GCCTGAAGACCTGGAATTGG	CTGACATAAGTGGATGCGAATC
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GCTGATGATCTTGAGGCTGTTG
H3F3A	CCAGCCGAAGGAGAAGGG	AGGGAAGTTTGCGAATCAGAAG
PSMB4	TACCGCATTCCGTCCACTC	GCTCCTCATCAATCACCATCTG
RPS27A	CGGCAGTCAGGCATTTGG	CCACCACGAAGTCTCAACAC
EIF4A2	CTCTCCTTCGTGGCATCTATG	GGTCTCCTTGAACCTCAATCTCC
RPL18	GGACATCCGCCATAACAAGG	ACAACCTCTTCAACACAACCTG
ADAR	AGACGGTCATAGCCAAGGAG	GCAGAGGAGTCAGACACATTG
COX5B	ACGCAATGGCTTCAAGGTTAC	CGCTGGTATTGTCCTCTTAC

- Además, se entiende que los kits divulgados pueden incluir dichos otros reactivos y material para realizar los métodos divulgados tales como enzimas (por ejemplo, polimerasas), tampones, agua estéril, tubos de reacción. Adicionalmente, los kits pueden incluir también nucleótidos modificados, nucleótidos resistentes a las nucleasas, y/o nucleótidos marcados. Además, los kits divulgados pueden incluir instrucciones para realizar los métodos divulgados en el presente documento y software para permitir el cálculo de la presencia de una mutación de ALK.
- En un aspecto, los kits divulgados pueden comprender material suficiente en un único ensayo ejecutado simultáneamente o por separado para llevar a cabo los métodos para determinar si una muestra contiene un ALK de tipo silvestre, una fusión de ALK conocida, o una fusión de ALK no identificada previamente. Los kits pueden incluir también material suficiente para ejecutar reacciones de control. Por tanto, en un aspecto, en el presente documento se divulgan kits que comprenden un tubo de reacción de control de ADNc positivo, un tubo de reacción de control de ADNc negativo, un tubo de reacción de cebador de control, un tubo de reacción para detectar fusiones de ALK conocidas, un tubo de reacción para detectar ALK de tipo silvestre y un tubo de reacción para detectar actividad de cinasa.
- En otra configuración, el kit divulgado puede usarse para determinar el estado de ALK - ya sea expresión de tipo silvestre, sobreexpresión del dominio cinasa, o sobreexpresión de mutación de fusión - sobre la base de mediciones realizadas con respecto a los genes de control interno. Se entiende que los genes de control interno, descritos en otra parte en esta divulgación, se expresan de manera estable y constitutiva, independientemente del ciclo celular, el desarrollo o los factores ambientales. Por lo tanto, en un aspecto, el estado de ALK se puede determinar por medio de una ecuación de ALK (numerador)/control interno (denominador) en la que el cociente resultante es un intervalo de resultados que indican que los tejidos, líneas celulares u otras muestras evaluados son ALK positivos o ALK negativos. Entendiendo que ciertos tejidos expresan transcritos de control interno en diferentes niveles, la relación y el cociente determinados para indicar el estado de ALK positivo o negativo se establecerán por separado para cada tipo de tejido y de muestra.
- Las composiciones divulgadas en el presente documento y las composiciones necesarias para realizar los métodos divulgados pueden hacerse usando cualquier método conocido por los expertos en la materia para un reactivo particular o compuesto a menos que se especifique lo contrario.

Síntesis de ácidos nucleicos

- Los ácidos nucleicos divulgados, tales como, los oligonucleótidos que se usarán como cebadores pueden hacerse usando métodos de síntesis química estándar o pueden producirse usando métodos enzimáticos o cualquier otro método conocido. Dichos métodos pueden variar desde una digestión enzimática seguida de aislamiento de fragmentos de nucleótidos hasta métodos puramente sintéticos, por ejemplo, mediante el método de cianoetil fosforamida usando un sintetizador de ADN Milligen o Beckman System 1Plus (por ejemplo, el sintetizador automatizado Modelo 8700 de Milligen-Bioscience, Burlington, MA o ABI Modelo 380B).

Ejemplos

- Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo se elaboran y se evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados en el presente documento, y pretenden ser puramente ejemplares y no pretenden limitar la divulgación. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o es una temperatura ambiente, y la presión está en o cerca de la atmosférica.

A. Ejemplo 1: Genes de fusión de ALK en tumores malignos hematológicos y tumores sólidos (linfoma anaplásico de células grandes, linfoma difuso de linfocitos B grandes de ALK+, histiocitosis sistémica de ALK+, sarcoma de TMI, carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma de células escamosas del esófago, cáncer de mama, carcinoma colorrectal).

5 Aunque las mutaciones puntuales de ALK se producen en el neuroblastoma, las denominadas "fusiones de ALK" representan realmente la mutación más común de esta tirosina cinasa (Figura 1). Los subconjuntos de cada uno de los tumores hematológicos (derivados del sistema sanguíneo) y tumores sólidos enumerados anteriormente en el encabezado están causados por las fusiones de ALK. Como ejemplo, la nueva proteína de fusión EML4-ALK se encuentra en casi un 7 % de los pacientes de carcinoma pulmonar no microcítico japoneses. Para realizar la detección por RT-PCR de secuencias de fusión de ALK, se obtienen muestras de tejido de un sujeto con cáncer. Se extrae el ARNm de las muestras de tejido. La reacción RT-PCR utiliza al menos un cebador directo y un cebador inverso. La Figura 2 muestra ejemplos de varios tipos de emparejamientos de cebadores. Por ejemplo, el cebador directo puede ser un cebador de ALK intracelular (cebador 100) 5'ACTACTGCTTTGCTGGCAAGACCT (SEQ ID NO: 6); un cebador de fusión EML4-ALK extracelular (cebador 103) 5'TGTTCAAGATCGCCTGTCAGCTCT (SEQ ID NO: 3); un cebador de fusión NPM-ALK extracelular (cebador 102); 5'TCTGTACAGCCAACGGTTTCCCTT (SEQ ID NO: 4); un cebador de fusión CTLC-ALK extracelular (cebador 105) 5'GAGAGTGCTTTGGAGCTTGTCTGT (SEQ ID NO: 5); o un cebador de ALK de tipo silvestre extracelular de una región de no homología (cebador 104) 5'TTCCTTCATCAGTCCACTGGGCAT (SEQ ID NO: 2). El cebador inverso puede ser el cebador 101: 5'TCGTCCTGTTTCAGAGCACACTTCA (SEQ ID NO: 7). La reacción RT-PCR da como resultado productos de amplificación (es decir, amplicones) de los tamaños mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2

Par de cebadores	Producto de PCR	Tamaño de amplicón (pb)
104/101	Ts (Intra y Extra)	615
100/101	Ts (Intra solo)	200
103/101	EML4-ALK v1	1740
103/101	EML4-ALK v2	2500
103/101	EML4-ALK v3a	920
103/101	EML4-ALK v3b	955
103/101	EML4-ALKv4	2490
103/101	EML4-ALKv5a	691
103/101	EML4-ALKv5b	577
102/101	NPM-ALK	410
105/101	CLTC-ALK	529

B. Ejemplo 2: Reacción de intercambio y extensión de moldes (TEER)

La reacción de intercambio y extensión de moldes (TEER) se refiere a una clase de métodos que pueden comparar un molde de ácido nucleico desconocido o no secuenciado con un molde secuenciado para determinar si son idénticos. Esto se basa en el hecho de que los productos de secuenciación son únicos para el molde a partir del cual se generan. Los métodos y composiciones divulgados implican formas particulares de TEER.

Originalmente, la reacción de intercambio y extensión de moldes (TEER) se desarrolló para detectar la línea germinal desconocida y las mutaciones somáticas presentes en un estado homocigoto o heterocigoto. Esto se demostró por electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de detección quimioluminiscente. El proceso se convirtió en un formato de detección basado en microtitulación. En un formato de placa de microtitulación, tiene un rendimiento mucho mayor y puede usarse para detectar rápidamente las mutaciones de ADN antes de la secuenciación del ADN. Como método de barrido de secuencias, es útil detectar grandes poblaciones de la muestra en las que la probabilidad de una mutación en un gen particular para una muestra dada fue bastante baja. TEER realiza una detección rápida de las muestras y marca las que contenían una mutación de modo que pudieran secuenciarse para identificar la mutación.

Se mostró que TEER detectaba mutaciones en un formato de microplaca. Los pocillos de las microplacas recubiertos con estreptavidina se usan para unir un producto de PCR biotinilado con la fase sólida. Las moléculas homo y heterodúplex se forman durante la hibridación en la fase sólida. Cada etapa del proceso se realiza fácilmente en la placa de microtitulación, esto simplifica enormemente la manipulación y el procesamiento de las muestras.

C. Ejemplo 3: Detección de inserciones y deleciones

TEER puede detectar rápidamente las inserciones y las deleciones. Estas mutaciones crean un emparejamiento incorrecto en el punto de la inserción/delección o solo en 3' de la mutación (sobre la cadena de extensión de tipo silvestre) donde se desplaza el marco de la secuencia. La detección de estas mutaciones puede verse obstaculizada en áreas en las que están presentes largos tramos del mismo nucleótido o secuencias repetidas. Por ejemplo, cuando un tramo es suficientemente largo, puede empezar a formarse un bucle de horquilla de tal manera que la inserción o

delección se expulse y no se detecte. Las inserciones o delecciones cerca de la mitad de estos tramos son más problemáticas de detectar que aquellas de los extremos.

D. Ejemplo 4: Detección por PCR en tiempo real de mutación seleccionada por TEER

Durante la transición de la química a las microplacas, fue evidente que TEER estaba seleccionando una señal mutante sobre la señal normal o de tipo silvestre. Estaba generando una señal de un "mutante" de 60 extensiones de base única "normal". El aumento en la señal de los heterodúplex sobre los homodúplex no fue dramático, aproximadamente 4 veces, pero proporcionó evidencia de que el proceso estaba funcionando. Esto, junto con la necesidad de aumentar la relación señal a ruido de la detección de microplacas, para determinar si la PCR podría usarse para amplificar la mutación de tal manera que se pueda caracterizar aún más mediante la secuenciación del ADN. La utilización de la PCR para amplificar la mutación permite primero la detección rápida y sensible de mutaciones raras. Las muestras que son positivas pueden secuenciarse para localizar e identificar la mutación. Cada una de las 4 bases se guía en una reacción separada de tal manera que se analiza cada base de la secuencia. Una vez que ha tenido lugar la selección por TEER, los cuatro productos de reacción de una muestra pueden combinarse juntos y analizarse en una reacción de detección por PCR en tiempo real.

La primera etapa en TEER es el intercambio de moldes. El ADN de tipo silvestre amplificado por PCR que se ha modificado aleatoriamente en una base específica se hibrida con el ADN amplificado de una muestra con una mutación potencial. El ADN bicatenario tiene emparejamientos incorrectos en un extremo para evitar la degradación con Exo III y el extremo opuesto tiene un extremo rebajado en 3' para permitir la ligadura de una sonda enlazadora para la unión en la fase sólida. El enlazador asegura que toda la diana se hibrida con su complemento y que es un producto de extensión de longitud completa. Cualquier producto de extensión incompleto no se ligará y se eliminará fácilmente de la placa usando un lavado riguroso. El ADN heterodúplex se trata con enzimas o sustancias químicas que escinden específicamente en el nucleótido modificado en la cadena de tipo silvestre únicamente. La cadena complementaria que contiene potencialmente una mutación no está afectada. Esto crea un subconjunto de sitios abásicos representativos de cada aparición de la base en la secuencia. Esencialmente, se trata de una escala de secuenciación, menos la base diana, en un molde intacto de longitud completa.

La siguiente etapa en TEER es una reacción de extensión con nucleótidos resistentes a las exonucleasas. En este caso, se están usando los alfa-tionucleótidos. Se entiende y contempla en el presente documento que se pueden usar también los nucleótidos con boro. Una mezcla de tres alfa-tio desoxinucleótido trifosfatos (dNTP) que representan las tres posibles mutaciones de nucleótidos, se usa en la reacción de extensión con Termosecuensasa. Un dNTP que coincida con la base diana no está presente. Por ejemplo, cuando la timina (a través de uracilo) era la base diana, entonces los nucleótidos de extensión serían alfa-tio dATP, dCTP y dGTP.

Se puede usar la exonucleasa III para seleccionar mutaciones. Los productos de extensión terminados con tionucleótidos representan mutaciones y son resistentes a la exonucleasa III. Se degrada un molde de tipo silvestre no protegido.

La cadena de tipo silvestre editada contiene ahora una copia de la mutación. A medida que la polimerasa extiende el ADN utiliza el desplazamiento de la cadena, o una exonucleasa de 5' a 3' dependiendo de la polimerasa, para avanzar hasta el final del molde mutante. Este proceso libera el dúplex mutante desde la fase sólida. El ADN liberado se puede transferir desde la microplaca directamente en una reacción PCR en tiempo real.

El molde mutante seleccionado se amplifica usando un cebador directo fluorescente en tiempo real y un cebador inverso. Por ejemplo, se puede usar el colorante SYBR green o el cebador de horquilla fluorogénico que emite fluorescencia solo después de haber sido extendido como un cebador LUX (Invitrogen, Carlsbad, CA). El uso de sondas de hibridación interna para la PCR en tiempo real tales como las sondas Taqman o FRET doblemente marcadas no se recomienda puesto que se desconoce el sitio de la mutación.

E. Ejemplo 5: Diseño y fabricación de micromatrices

Aquí se describe el desarrollo de un diagnóstico de micromatrices para la identificación de las mutaciones de ALK específicas. En el presente documento se divulga la fabricación de una micromatriz de ADN compuesta por 47 elementos únicos que son capaces de detectar 12 mutaciones posibles y ALK de tipo silvestre como un control interno. Se pueden perseguir dos escenarios para optimizar empíricamente la sonda de ácido nucleico de entrada, que implica la transcripción inversa, o la transcripción inversa y la PCR (RT-PCR). La viabilidad in vitro basada en la detección precisa de fusiones y variantes de ALK puede demostrarse a partir de construcciones de plásmidos, y usando varias líneas celulares de cáncer humanas que contienen una fusión de ALK mutante entremezcladas en un intervalo de relaciones con líneas celulares que contienen ALK de tipo silvestre. Las mutaciones de ALK se pueden identificar a partir de piezas de biopsia de cáncer de pulmón. Este trabajo puede incluir estudios comparativos de evaluación comparativa con los estándares de diagnóstico disponibles, un ensayo de FISH de ALK e inmunohistoquímica anti-ALK (IHC).

1. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñó una estrategia para identificar mutaciones de *ALK* y sus subvariantes a través de la detección de regiones 5' únicas de parejas de fusión de *ALK*. En general, la estrategia se basó en la transcripción inversa y extensión y/o amplificación desde la región dentro de la región 3' intracelular de ARNm de *ALK*, a través del sitio de unión y en la porción 5' de la pareja de fusión. ADNc generado o ADN amplificado se marcan posteriormente con una fluorosonda enlazada de manera covalente y sirven como entrada para la micromatriz. Dos sondas complementarias a diferentes regiones dentro de la región 5' de la pareja de fusión o ADNc de *ALK*, impresas por triplicado, sirven como el ADN de captura de la micromatriz. La posición de la hibridación y detección de la señal identifica la presencia de *ALK* y/o mutaciones de *ALK* y su expresión con respecto a un conjunto de diez transcritos de control interno constitutivos (Figura 3 y Tabla 3).

5

10

Tabla 3

Número ID	Definición de secuencia	Secuencia sonda	TM (°C)	Letra ID	Definición de secuencia	Cebadores	TM (°C)
1	EML4-ALK V1PRO<	TGTGCTAAAGGGCGCT TTGGCTGATGTT (SEQ ID NO: 8)	64,5	A	Cebador inverso de ALK universal	GGTCTTGCCAGCAA AGCAGTAGTT (SEQ ID NO: 32)	59,9
2	CLTC-ALK	TCACCTGAGAAAAGAA GAAGAACAAGCTACA GAGACACAACCCA (SEQ ID NO: 9)	65,1	B	Directo de ALK de tipo silvestre	TCGGTTCTAGGGCT AAACGGCAAT (SEQ ID NO: 33)	60,4
3	EML4-ALK V2<	TACATCACACACCTTG ACTGGTCCCAGACAA CAAGTAT (SEQ ID NO: 10)	65,7	C	Variante 2 de EML4-ALK directo	AGCAGATATGGAAG GTGCACTGGA (SEQ ID NO: 34)	60,1
4	EML4-ALK V2-2<	TATTGTACTTGTACCG CCGGAAGCACCCAG (SEQ ID NO: 11)	63,1	D	Directo de Variante 3A de EML4-ALK	TCTCAAAGTAAAGTG TACCGCCGGA (SEQ ID NO: 35)	59,7
5	EML4-ALK V3A<	TGTGCTAAAGGGCGCT TTGGCTGATGTT (SEQ ID NO: 12)	64,2	E	Directo de Variante 3B de EML4-ALK	ACCTCGACCATCAT GACCGACTACAA (SEQ ID NO: 36)	61,1
6	EML4-ALK V3A-2<	AAITCACTGTGCTAAAAG GCGGCTTTGGCT (SEQ ID NO: 13)	64,1	F	Directo de Variante 4 de EML4-ALK	AGATATGCTGGATG AGCCCTGAGT (SEQ ID NO: 37)	59,6
7	EML4-ALK V3B<	AAACAGCCAAAGTGA CCGCCGGAAG (SEQ ID NO: 14)	63,2	G	Directo de Variante 5B de EML4-ALK	GAAATGGCCTGTGT AGTGCTTCAA (SEQ ID NO: 38)	59,4
8	EML4-ALK V4	TATGCTGGATGAGCCC TGAGTACAAGCTGA (SEQ ID NO: 15)	63,5	H	Directo de Variante 6 de EML4-ALK	AAAGGAAAGTGGCCT GTGTAGTGTCT (SEQ ID NO: 39)	60,6

Número ID	Definición de secuencia	Secuencia sonda	TM (°C)	Letra ID	Definición de secuencia	Cebadores	TM (°C)
9	EML4-ALK V4-2<	AGAGATATGCTGGAT GAGCCCTGAGT (SEQ ID NO: 16)	60,6	I	Directo de Variante 7 de EML4-ALK	AGAAATAGAGCACC AGGAGCTGCAAG (SEQ ID NO: 40)	60,6
10	EML4-ALK V5B<	GGAGGATATGGAGAT CCAGGGAGGCTTCCTG TAGGAA (SEQ ID NO: 17)	66,7	J	Directo de NPM-ALK	GCAGAGGCAATGAA TTACGAAGGC (SEQ ID NO: 59)	70,2
11	EML4-ALK V5B-2<	TGTGTAGTGTCTCAAG GGCCAGGCT (SEQ ID NO: 18)	64,1	K	Directo de KIF5B-ALK	TGCATCTCGTGATC GCAAACGCTA (SEQ ID NO: 41)	60,9
12	EML4-ALK V6	TGTGTAGTGTCTCAAG GGCCAGGCT (SEQ ID NO: 19)	64,1	L	Directo de TMP4-ALK	AAACTGAAAGAGGC TGAGACCCGT (SEQ ID NO: 42)	60,3
13	EML4-ALK V6-2	TGGGAAAGGACCTAA AGGAAAGTGGCTGT (SEQ ID NO: 20)	64,2	M	Directo de MSN-ALK	TCAGGAACAGCTGG CCTTGGAAAT (SEQ ID NO: 43)	61,0
14	EML4-ALK V7<	CTGAAAAGAGAAATAG AGCACAGGAGCTGC AAGCCAT (SEQ ID NO: 21)	65,8	N	Directo de CLTC-ALK	TTGTTTATGTGTACC GCCGGAAAGC (SEQ ID NO: 44)	59,8
15	EML4-ALK V7-2<	AGAAATAGAGCACC GGAGCTGCAAGCCAT (SEQ ID NO: 22)	64,4	O	Cebador de punto de rotura en 3'	TGTACCCGCCGGAAG CACCAGGAG (SEQ ID NO: 45)	65,3
16	KIF5B-ALK	CTATCAGCAAGAAGT AGATCGCATAAAAGGA AGCAGTCAGGTCA (SEQ ID NO: 23)	65,0		Universal Inverso C	TTGCTCAGCTTGTA CTCAGGGCT (SEQ ID NO: 46)	60,5

Número ID	Definición de secuencia	Secuencia sonda	TM (°C)	Letra ID	Definición de secuencia	Cebadores	TM (°C)
17	KIF5B-ALK 2	ATGGCCAGAAGAGGG CATTCTGCACAGATT (SEQ ID NO: 24)	64,7		Universal Inverso B	AGGCCTCCATGAG GAAATCCAGT (SEQ ID NO: 47)	60,2
18	MSN-ALK	TGACAGCTCGAATCTC CCAGCTGGAGAT (SEQ ID NO: 25)	63,9		Cebador F1 de Tubo 3 (punto de rotura en 3')	TGTACCCGCCGGAAG CACCAGGAG (SEQ ID NO: 48)	65,3
19	MSN-ALK 2	TGGCCTTGAAATGGC AGAGCTGACA (SEQ ID NO: 26)	64,2		Cebador F2 de tubo 4 (Var 3A)	GATGAAATCACTGT GCTAAAAGGGCGC (SEQ ID NO: 49)	72,5
20	TMP4-ALK	CGTGTGAATTTGCAG AGAGAACGGTTGCA (SEQ ID NO: 27)	64,0		Cebador F3 de Tubo 4 (Var 3B)	GCAGACAAGCATAA AGATGTCATCATC (SEQ ID NO: 50)	56,3
21	TMP4-ALK 2	AAAGAGGCTGAGACC CGTGTGAATTTGCA (SEQ ID NO: 28)	64,8		Cebador F4 de Tubo 4 (Var 6)	CCACACCTGGGAAA GGACCTAAAAGG (SEQ ID NO: 51)	61,1
22	NPM-ALK	AAATGCTGTACAGCCA ACGGTTTCCCTTGG (SEQ ID NO: 29)	63,5		Cebador F8 de tubo 4 (CLTC)	TGCCATGCCCTATT CATCCAGGT (SEQ ID NO: 52)	59,8
23	NPM-ALK 2	AAGGTTGAAGTGTGGT TCAGGCCAGT (SEQ ID NO: 30)	63,7		Cebador F9 de Tubo 4 (NPM)	GCAGAGGCAATGAA TTACGAAAGGC (SEQ ID NO: 53)	70,2
24	ALK de tipo silvestre	ATGTCACATGGACCCCT GAAAGCCACAAGGT (SEQ ID NO: 31)	64,6		Cebador F de tubo 5 (tipo silvestre)	ACCTGAAAGCCAC AAGTCACTCT (SEQ ID NO: 54)	69,7
25	ALK universal Inverso A	TCGTCTGTTCAGAGC ACACTTCA (SEQ ID NO: 58)	60,1		Cebador F de Tubo 6 (tipo silvestre)	ACGCAATGGCTTCA AGGTTAC (SEQ ID NO: 55)	55,4

Número ID	Definición de secuencia	Secuencia sonda	TM (°C)	Letra ID	Definición de secuencia	Cebadores	TM (°C)
					Cebador R de tubo 6 (Cox5B)	CGCTGGTATTGTCC TCTTCAC (SEQ ID NO: 56)	54,7
					Cebador R de Tubo 10 (Inverso de ALK Universal)	AGGTCTTGCCAGCA AAGCAGTAGTT (SEQ ID NO: 57)	59,9

Sondas de control interno			
Número ID	Nombre	Longitud	TM (°C)
25	(ATP50)	TGCGATGCTTCAGTACCTCTGTGGTCAG	63,3
26	(NDUFA2)	CGACTTCGATATTAACAAGGATGGCGGCG	62,4
27	(GAPDH)	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATT	63,4
28	(H3F3A)	GTCCACTGAACTTCTGATTTCGAAACTTCCC	62,3
29	(PSMB4)	TTTACCGCATTCCGTCCACTCCCGATT	63,6
30	(RPS27A)	CCAGGCTAGGGAGAGGAGAAACGAAGTTC	62,9
31	(EIF4A2)	GCAACAGTTGGAGATTGAGTTCAAGGAGACC	62,1
32	(RPL18)	GCCAGAAGAACCAACTCCACATTCAACCAG	62,6
33	(ADAR)	ATCTGCGACTATCTCTTCAATGTGTCTGACTCC	61,8
34	(COX5B)	CGGACGCAATGGCTTCAAGGTTACTTCG	63,1

Definición de secuencia	Secuencia sonda	Definición de secuencia	Cebadores
Tipo silvestre	AGGATGGCGTCTCCTGCATTGTG TCA	Directo de Tipo silvestre	CTGAAAGCCACAAGGTCATCT GCT
Rotura en 3'	TGTATGAAGGCCAGGTGTCCGGA AT	Inverso de Tipo silvestre	CAATCATGATGCCGGAGAAAG CCA
Cox 5B	TCAGGCACCAGGGAAGACCCTA ATTT	Directo de Rotura en 3'	AACTACTGCTTTGCTGGCAAGA CCTC (SEQ ID NO: 67)
ADAR	AACTCAGACCCAGGTTTGGAAACC TGA	Inverso de Rotura en 3'	TCGTCCTGTTTCAGAGCACACTT CA (SEQ ID NO: 7)
EIF4A2	TCCTTCGTGGCATCTATGCTTAC GGT	Directo de Cox 5B	TGCAAAGAAGGGACTGGACCC ATA
		Inverso de Cox 5B	TTGTCCTCTTCACAGATGCAGC CT
		Directo de ADAR	AGACCAGACAGTCATAGCCAA GGA
		Inverso de ADAR	AAGGCAGATGTGGAGTTGCTG TCT
		Directo de EIF4A2	TATAACAGAGAACATGGCGGC CCA

5 Cada sonda sintetizada se optimizó a una temperatura de fusión de 65 °C y una única región de hibridación dentro del socio de fusión en 5' o ALK usando el programa OLIGOANLYZER 3.1®. La temperatura de fusión y longitud aproximada de 30 nucleótidos se seleccionaron basándose en informes de condiciones optimizadas de micromatrices. Un enlazador 5' monometoxitritilo C6 amino se ha añadido a las sondas para permitir su purificación y conjugación a portaobjetos de vidrio preparados. Este enlazador se seleccionó basándose en la optimización química. Por último, dos sondas para cada pareja de fusión de ALK, idealmente en diferentes regiones de la pareja de fusión, se sintetizaron para proporcionar un método alternativo de identificación en el caso de que se impidiera que una sonda se uniera a una región mediante una restricción conformacional de la estructura del ADN terciario. Estos criterios se aplicaron también al diseño de los controles internos.

Cebadores de PCR

15 Cada cebador sintetizado se optimizó de nuevo a una temperatura de fusión teórica de 60 °C y regiones únicas tanto dentro de la pareja de fusión 5' como en el dominio intracelular de ALK 3' usando el programa OLIGOANLYZER 3.1®. El cebador definido como "cebador inverso de ALK universal" sirve como un cebador común para la etapa de transcripción inversa. Los otros cebadores enumerados permiten etapas de PCR posteriores y la amplificación de

posibles dianas. Estos criterios se aplicaron también al diseño de los controles internos.

Optimización de cebadores de RT-PCR

5 Los cebadores para RT-PCR se han optimizado para una Tm de unión de 60 °C para la generación de ADN diana supuesto. Estos cebadores se han optimizado como reacciones de amplificación único; sin embargo, varios o todos se pueden agrupar para permitir la multiplexación de ADN diana supuesto. La Figura 4 muestra la electroforesis en gel de ADN diana amplificados de cada variante y fusión de ALK de interés. El protocolo de amplificación por PCR utilizó
10 35 ciclos con 95 °C durante 15 minutos; 94 °C durante 30 segundos; 52 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 15 minutos, y 4 °C.

Se entiende que el método y composiciones divulgados no están limitados a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no se pretende que limite el alcance de la
15 presente invención que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A lo largo de la descripción y reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, la palabra "comprender" y variaciones de la palabra, tales como "que comprende" y "comprende", significa "incluyendo, pero sin limitación" y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.
20

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando únicamente la experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas del método y de las composiciones descritas en el presente documento.

25 Referencias

Babon JJ, McKenzie M, Cotton RG. Mutation detection using fluorescent enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Electrophoresis* 1999;20(6):1162-70.

30 Brow MA, Oldenburg MC, Lyamichev V, et al. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):3129-37.

35 Chen TJ, Boles RG, Wong LJ. Detection of mitochondrial DNA mutations by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Clin Chem* 1999;45(8 Pt 1):1162-7.

Cotton RG, Rodrigues NR, Campbell RD. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(12):4397-401.
40

Fodde R, Losekoot M. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mutat* 1994;3(2):83-94.

45 Ganguly A, Prockop DJ. Detection of mismatched bases in double stranded DNA by gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1995; 16(10):1830-5.

Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(21):10325-9.
50

Gleason BC, Hornick JL. *J Clin Pathol* 2008 Apr;61(4):428-37.

55 Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide micromatrices. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl):42-7.

Hovig E, Smith-Sorensen B, Brogger A, Borresen AL. Constant denaturant gel electrophoresis, a modification of denaturing gradient gel electrophoresis, in mutation detection. *Mutat Res* 1991;262(1):63-71.

60 Labeit S, Lehrach H, Goody RS. A new method of DNA sequencing using deoxynucleoside alpha-thiotriphosphates. *Dna* 1986;5(2):173-7.

Labeit S, Lehrach H, Goody RS. DNA sequencing using alpha-thiodeoxynucleotides. *Methods Enzymol* 1987;155:166-77.

65 Lamant L et al., *Genes Chromosomes Cancer*. Agosto de 2003;37(4):427-32

Li R, Morris SW., Med Res Rev. 2008 May;28(3):372-412.

Lu AL, Hsu IC. Detection of single DNA base mutations with mismatch repair enzymes. Genomics 1992; 14(2):249-55.

5

Mano H., Cancer Sci. 2008 Dec;99(12):2349-55

Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. Science 1985;230(4731):1242-6.

10

Nagamine CM, Chan K, Lau YF. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. Am J Hum Genet 1989;45(2):337-9.

Nakamaye KL, Gish G, Eckstein F, Vosberg HP. Direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA fragments through the incorporation of deoxynucleoside alpha-thiotriphosphates. Nucleic Acids Res 1988;16(21):9947-59.

15

Novack DF, Casna NJ, Fischer SG, Ford JP. Detection of single base-pair mismatches in DNA by chemical modification followed by electrophoresis in 15% polyacrylamide gel. Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83(3):586-90.

20

Oldenburg MC, Siebert M. New Cleavase Fragment Length Polymorphism method improves the mutation detection assay. Biotechniques 2000;28(2):351-7.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989;5(4):874-9.

25

Pincas H, Pingle MR, Huang J, et al. High sensitivity EndoV mutation scanning through real-time ligase proofreading. Nucleic Acids Res 2004;32(19):e148.

Porter KW, Briley JD, Shaw BR. Direct PCR sequencing with boronated nucleotides. Nucleic Acids Res 1997;25(8):1611-7.

30

Rudzki Z et al., Pol J Pathol. 2005;56(1):37-45

Takeuchi K et al., Clin Cancer Res. 2009 May 1; 15(9): 3143-9

35

Winter E, Yamamoto F, Almoguera C, Perucho M. A method to detect and characterize point mutations in transcribed genes: amplification and overexpression of the mutant c-Ki-ras allele in human tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82(22):7575-9.

40

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. Hum Mutat 2001;17(6):439-74.

Youil R, Kemper B, Cotton RG. Detection of 81 of 81 known mouse beta-globin promoter mutations with T4 endonuclease VII--the EMC method. Genomics 1996;32:431-5.

45

SECUENCIAS

Cinasa de linfoma anaplásico (ALK) SEQ ID NO: 1

1 mgaigllwll plllstaavg sgmgtgqrag spaagpplqp replsysrlq rkslavdfvv
 61 pslfrvyard lllppsssel kagrpeargs laldcapllr llgpapgvsw tagspapaea
 121 rtlsrvlkgg svrklrrakq lvlelgeeai legcvgppge aavgllqfnl selfswwirq
 181 gegrlrirlm pekkasevgr egrlsaaira sqprllfqif gtghsslesp tnmppspsdy
 241 ftwnltwimk dsfpflshrs ryglecsfdf pceleysppl hdlrnqswsw rripseeasq
 301 mdlldgpgae rskemprgsf lllntsadsk htispwmrs ssehctlavv vhrhlqpsgr
 361 yiaqllphne aareillmpt pgkhgwtvlq grigrpdnpf rvaleyissg nrslsavdff
 421 alkcncsegts pgskmalqss ftcwngtvlq lgqacdfhqd caqgedesqm crklpvgfyc
 481 nfedgfcgwt qgtlsphtpq wqvrtlkdar fqdhqdhall lsttdvpase satvtsatfp
 541 apiksspcel rmswlrivl rgnvslvlve nktgkeqgrm vwhvaayegl slwqwmvplpl
 601 ldvsdrfwlq mvawwgqgsr aivafdnisi sldcyltisg edkilqntap ksrnlfernp
 661 nkelkpgens prqtpifdpt vhwlfttcga sgphgptqag cnnayqnsnl svevgsegpl
 721 kgiqiwbkpa tdtysisgyg aaggkqgknt mmrshgsvl gifnlekddm lyilvgqqge
 781 dacpstnqli qkvcigennv ieeeirvnrs vhwagggggg gggatyvfkm kdgvvpvlii
 841 aaggggrayg aktdtfhper lennssvlgl ngnsaaggg ggwndntsll wagkslqega
 901 tgghsqcpam kkwgwetrgg fggggggcss ggggggyigg naasndpem dgedgvsfis
 961 plgilytpal kvmeghgevn ikhylvncshc evdechmdpe shkvicfcdh gtvlaedgvs
 1021 civsptpeph lplslilsvv tsalvaalvl afsgimivyr rkhqelqamq melqspeykl
 1081 sklrtstimt dynpnycfag ktssisdlike vprkntlir glghgafgev yegqvsgmpn
 1141 dpsplqvavk tlpevcseqd eldfmeali iskfnhqniv rcigvslqsl prfillelma
 1201 ggdlksflre trprpsqps lamldllhva rdiacgcqyl eenhfihrdi aarnclltcp
 1261 gpgrvakigd fgwardiyra syyrkqgcam lpvkwmppea fmegiftskt dtwsfgvllw
 1321 eifslgympy psksnqevle fvtsggrmdp pknpcgpyvr imtqcwqhqp edrpnfail
 1381 erieyctqdp dvintalpie ygplveeeek vpvprkdpeg vplllvsqqa kreeerspaa
 1441 ppplpttssg kaakkptaae isvrprgpa vegghvnmaf sqsnppselh kvhgsrnkpt
 1501 slwnptygsw ftekptkkn piakkephdr gnlglegsc vppnvatgrl pgasllleps
 1561 sltanmkevp lfrlrhfpcg nvnygyqqgg lpleaatap aghyedtilk sknsnmqpgp

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar un cáncer relacionado con la cinasa de linfoma anaplásico (ALK) en un sujeto, comprendiendo el método la realización de un proceso de amplificación de ácido nucleico en una muestra de tejido del sujeto y la detección de la presencia del ácido nucleico del dominio cinasa de ALK de tipo silvestre en la muestra de tejido usando un par de cebadores, en el que el par de cebadores usado en el proceso de amplificación consiste en un cebador directo y un cebador inverso que se hibridan específicamente con el dominio cinasa de tipo silvestre de ALK; y en el que la presencia de ácido nucleico en el dominio cinasa de ALK de tipo silvestre indica la presencia de un cáncer relacionado con ALK; y en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, carcinoma colorrectal, carcinoma pulmonar no microcítico, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células escamosas del esófago, linfoma anaplásico de células grandes, tumores miofibroblásticos inflamatorios e histiocitosis maligna.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de amplificación de ácido nucleico es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o PCR en tiempo real.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el cebador directo es
ACTACTGCTTTGCTGGCAAGACCT (SEQ ID NO: 6),
TGTACCGCCGGAAGCACCAGGAG (SEQ ID NO: 45), o
TGTACCGCCGGAAGCACCAGGAG (SEQ ID NO: 48).
4. El método de la reivindicación 3, en el que el cebador inverso es
TCGTCCTGTTCAGAGCACACTTCA (SEQ ID NO: 7),
GGTCTTGCCAGCAAAGCAGTAGTT (SEQ ID NO: 32),
TTGCTCAGCTTGACTCAGGGCT (SEQ ID NO: 46),
AGGGCTCCATGAGGAAATCCAGT (SEQ ID NO: 47),
AGGTCTTGCCAGCAAAGCAGTAGTT (SEQ ID NO: 57), o
TCGTCCTGTTCAGAGCACACTTCA (SEQ ID NO: 58).
5. El método de la reivindicación 2, en el que el cebador directo es
AACTACTGCTTTGCTGGCAAGACCTC (SEQ ID NO: 67).
6. El procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que el cebador inverso es
TCGTCCTGTTCAGAGCACACTTCA (SEQ ID NO: 7).
7. El método de la reivindicación 1, en el que al menos un cebador es un cebador Scorpion.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además la secuenciación del producto de amplificación del dominio cinasa de ALK.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el cáncer es:
- (A) un cáncer colorrectal que tiene una o más mutaciones puntuales asociadas con ALK seleccionadas entre el grupo que consiste en R401Q, A1 168P y V757M;
(B) un cáncer de mama que tiene una mutación puntual asociada con ALK y en el que la mutación puntual es L560F; o
(C) es un cáncer de ovarios que tiene una mutación puntual asociada con ALK, y en el que la mutación puntual es A877S.

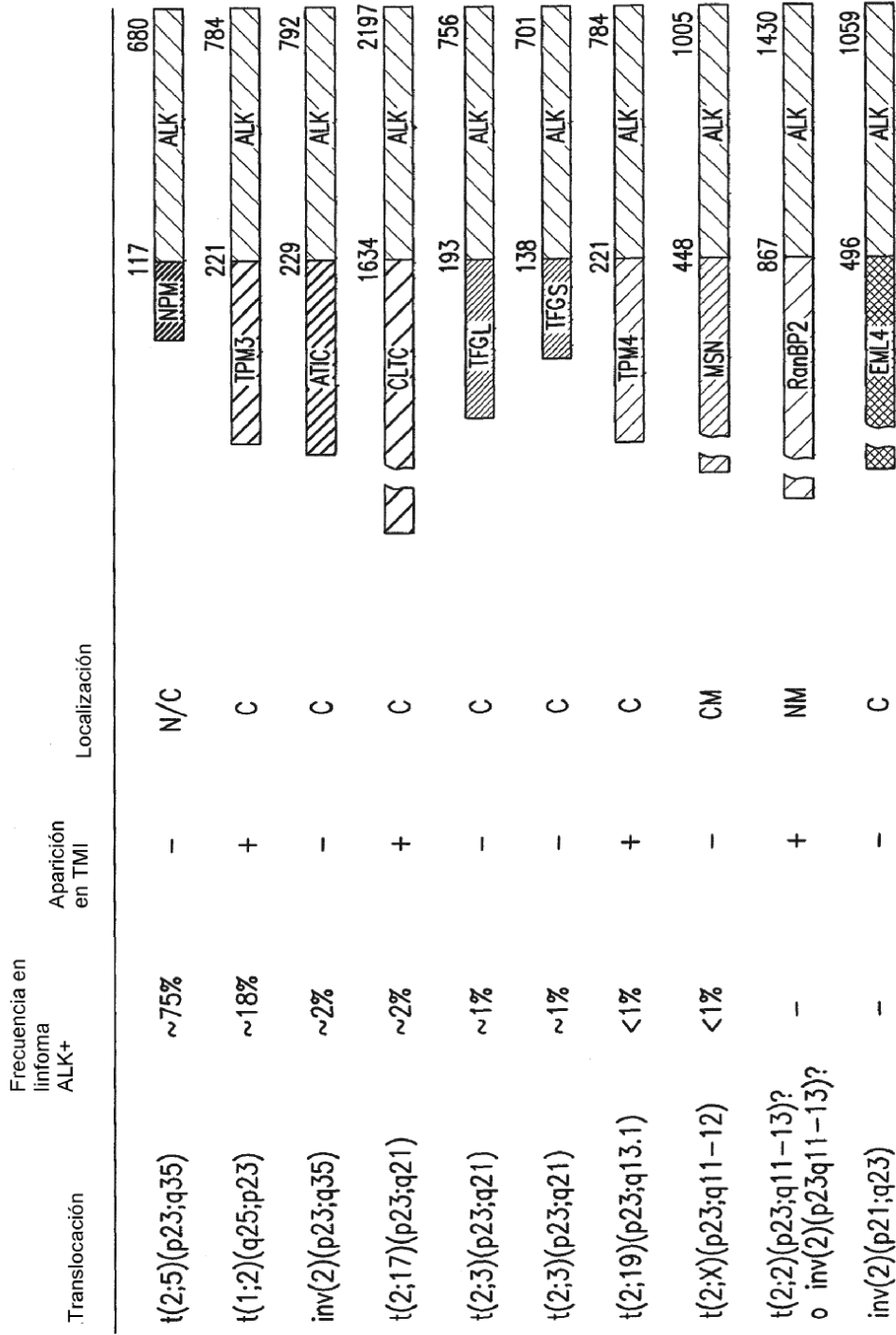


FIG. 1

Esquema basado en RT-PCR para fusión de ALK, detección y detección de amplificación de tipo silvestre

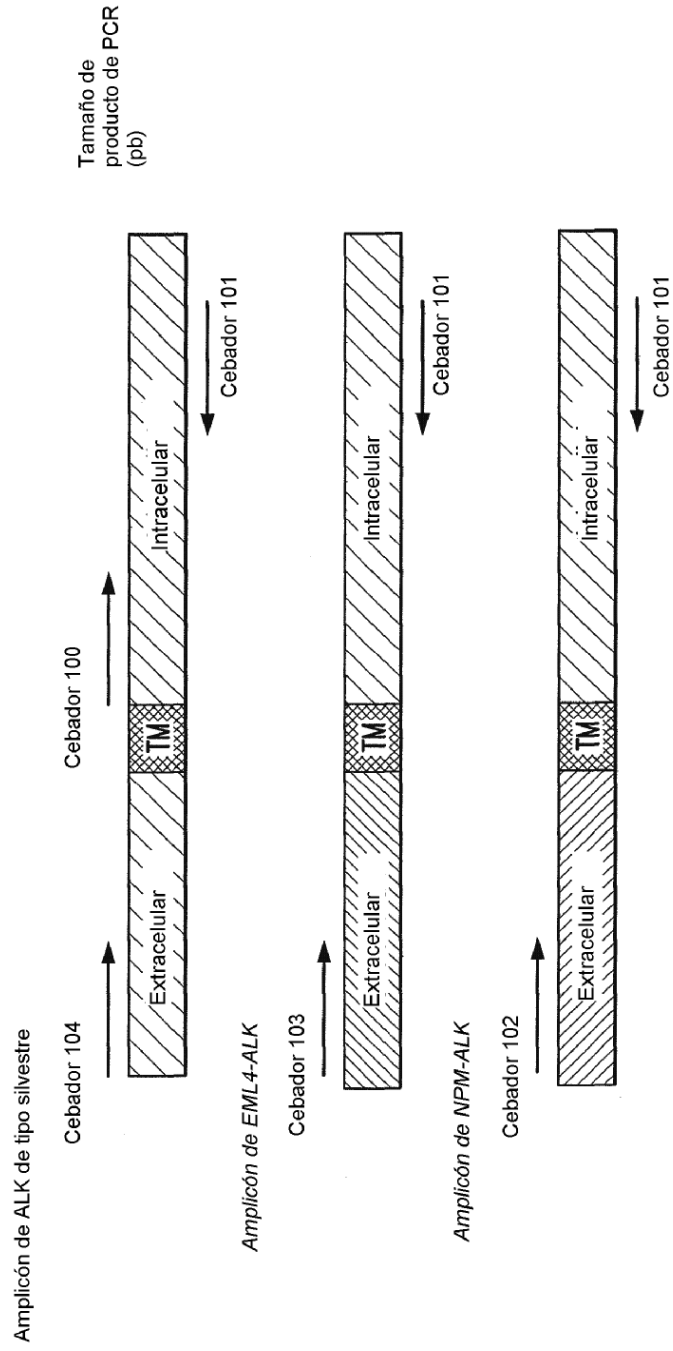


FIG. 2

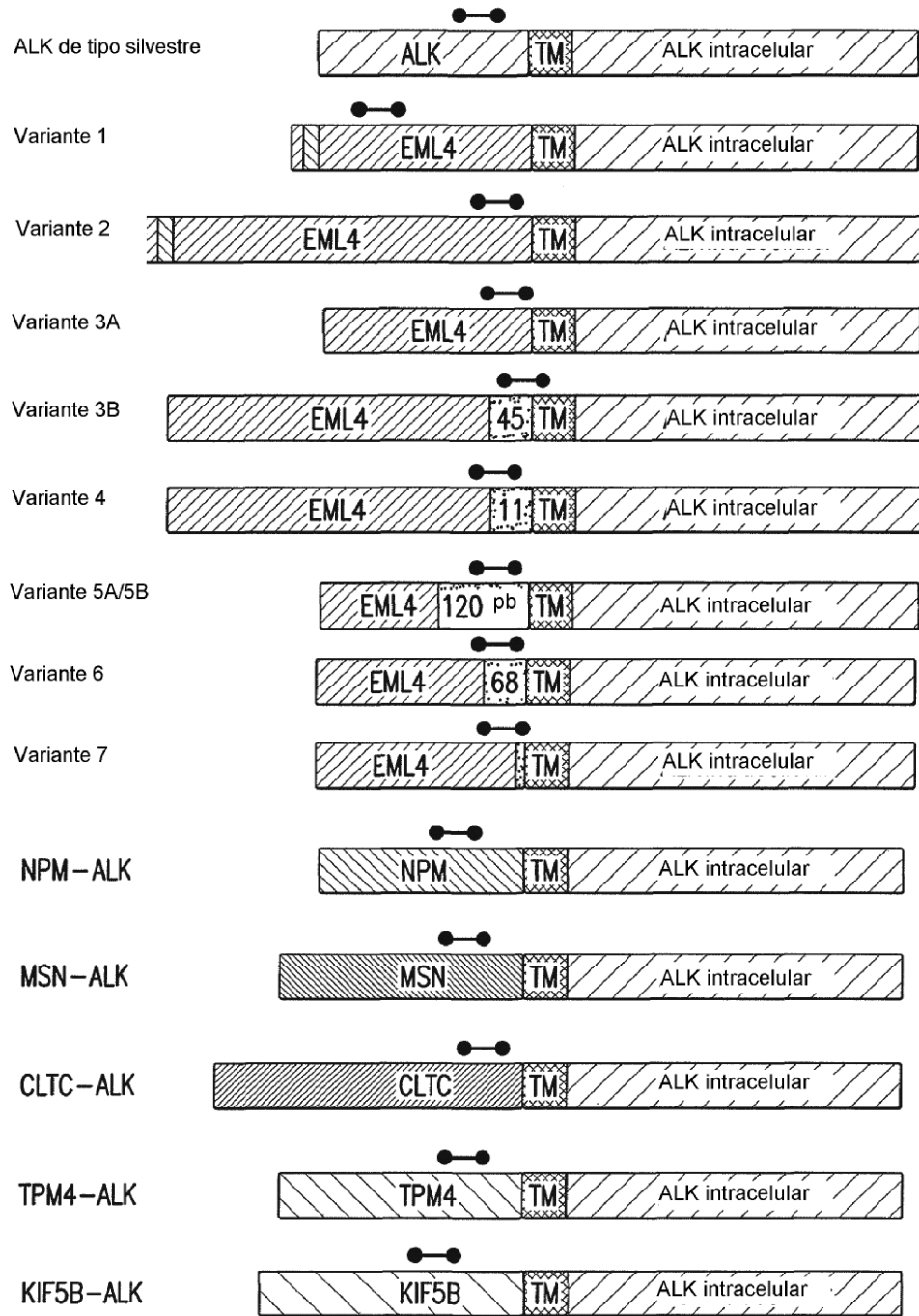


FIG. 3



FIG. 4

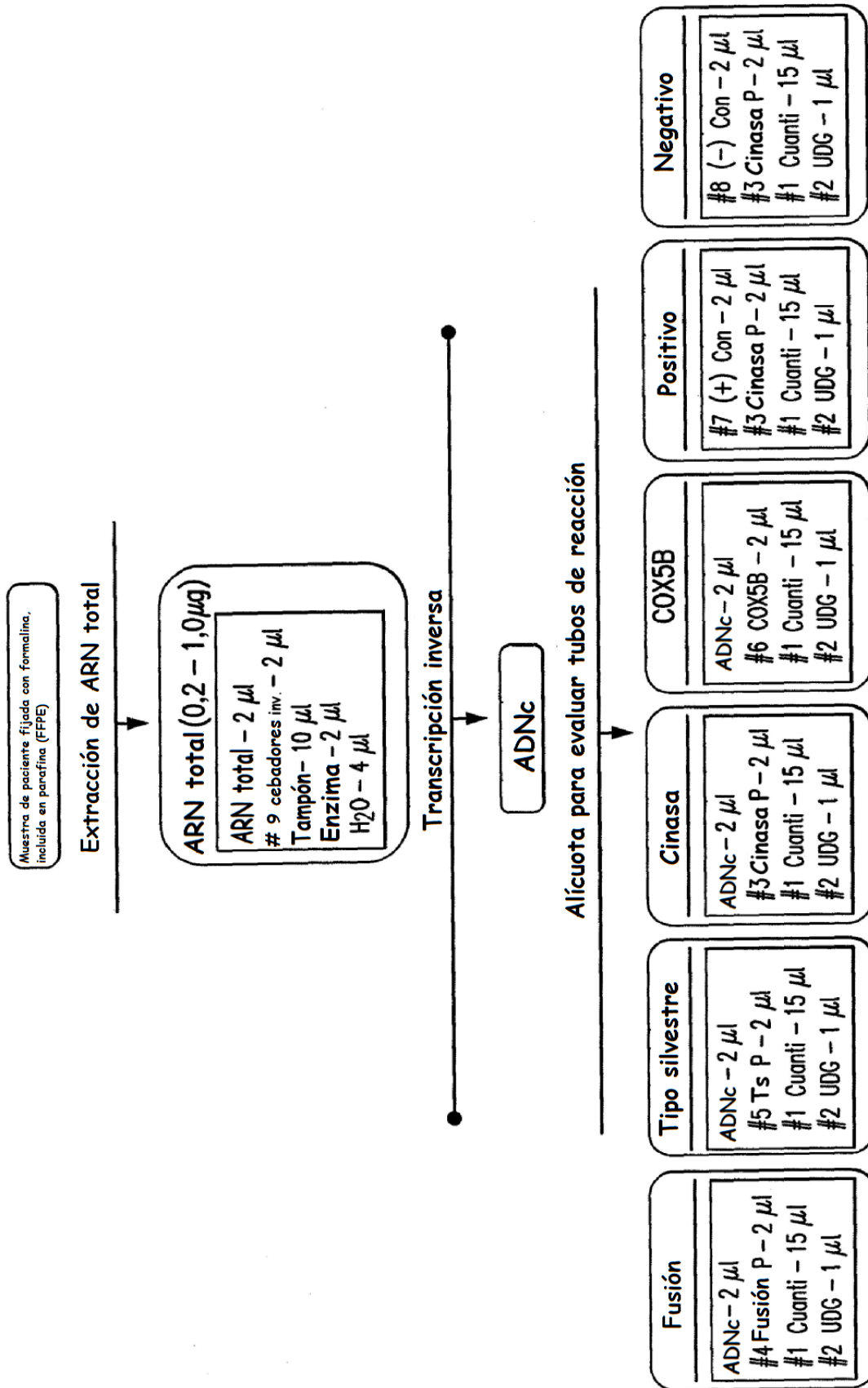
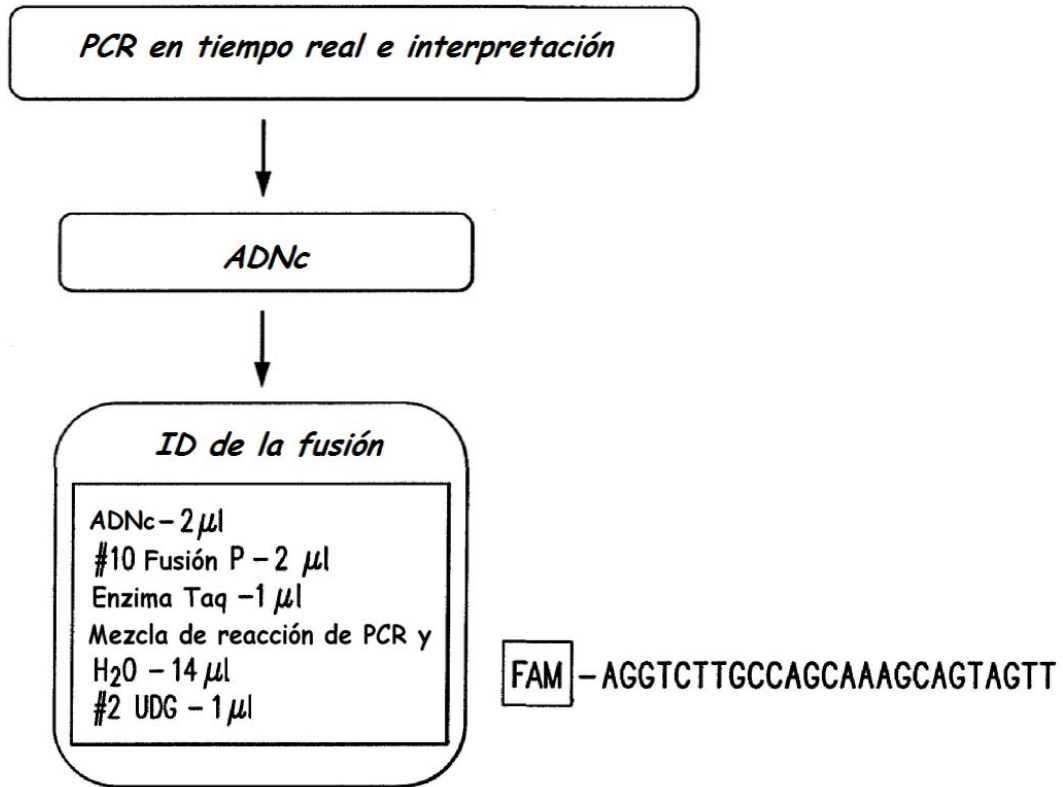


FIG. 5A



	Tamaño de frag. exp.	Tamaño de frag. (03.04.10)	SD	Valor de N
H3122 v1	158	156,156	-	2
v2	224	224,224	-	2
v3a	237	233,233	-	2
v3b	201	199,199	-	2
v4	-	-	-	-
v5b	-	-	-	1
v6	227	224,224	-	2
v7	-	-	-	1
CLTC	256	252,252,252	-	3
NPM	318	300,300,300,300	-	4
KIF5B	235	232,231,230	2	3
MSN	216	220,219,220	1	2
TPM4	219	212,211,212	1	3
W+	-	-	-	1
H2228 v3A&v3B	237/201	200,201	1	2
293	-	-	-	1

FIG. 5B