(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 704 126**

(51) Int. CI.:

C07K 14/82 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2012 PCT/US2012/051978**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13028817**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2012 E 12825669 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2748192**

(54) Título: **Moléculas de fusión KIF5B-RET y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

23.08.2011 US 201161526613 P
20.09.2011 US 201161537024 P
30.09.2011 US 201161542112 P
03.02.2012 US 201261594739 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2019

(73) Titular/es:

FOUNDATION MEDICINE, INC. (100.0%)
150 Second Street
Cambridge, MA 02141, US

(72) Inventor/es:

LIPSON, DORON;
STEPHENS, PHILIP JAMES;
PARKER, ALEXANDER N.;
DOWNING, SEAN R. y
HAWRYLUK, MATTHEW J.

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

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

Moléculas de fusión KIF5B-RET y usos de las mismas

SOLICITUDES RELACIONADAS

ANTECEDENTES

[0001] El cáncer representa el punto final fenotípico de múltiples lesiones genéticas que dotan a las células con un amplio intervalo de propiedades biológicas requeridas para la tumorigénesis. De hecho, una característica genómica distintiva de muchos cánceres, incluyendo, por ejemplo, cáncer de células B, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas y cáncer de colon, es la presencia de numerosas aberraciones estructurales cromosómicas complejas, incluyendo translocaciones, inversiones intracromosómicas, mutaciones puntuales, deleciones, cambios en el número de copias de genes, cambios en el nivel de expresión génica y mutaciones en la línea germinal, entre otros.

[0002] Ulahannan y col., 2011 (Cancer Investigation, Vol. 29(4), p. 325-337) se refieren a procedimientos de tratamiento del cáncer de pulmón. Beaudry y col., 2008 (Molecular Cancer Therapeutics, vol. 7(2), p. 418-424) se refieren a tratamientos de neuroblastoma. Carlomagno y col., 2002 (Cancer Research, vol. 62(24)p.7284-729) se refieren a la inhibición de la actividad de la tirosina quinasa. Arighi y col., 2005 (Cytokine And Growth Factor Reviews, vol.16 (4-5) p. 441-467) se refieren a la señalización de la tirosina quinasa RET. El documento WO 2007/087245 A2 se refiere a la inhibición de la tirosina quinasa RET. El documento KR 20040075272 se refiere a procedimientos de identificación de material anticáncer. El documento EP2 599 878 A1 es citable bajo el Artículo 54(3) EPC y se refiere a la detección de una fusión KIF5B-RET.

[0003] Todavía existe la necesidad de identificar nuevas lesiones genéticas asociadas con el cáncer. Dichas lesiones genéticas pueden ser una estrategia eficaz para desarrollar composiciones, procedimientos y ensayos para evaluar y tratar pacientes con cáncer.

RESUMEN

[0004] Basada en la descripción que está contenida en esta solicitud, la presente invención proporciona un agente anticáncer para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer colorrectal con una fusión del miembro de la familia de la quinesina-5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET), en el que el procedimiento comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente anticáncer, tratando de ese modo el cáncer colorrectal en el sujeto, en el que el agente anticáncer se selecciona de: (i) un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET; o (ii) una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en moléculas antisentido, ribozimas, ARNip y moléculas de triple hélice, en el que la molécula de ácido nucleico se hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, bloqueando o reduciendo así la expresión del ARNm de la molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET.

[0005] La presente invención proporciona además un agente anticáncer para su uso en un procedimiento de tratamiento a un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende: adquirir un conocimiento de la presencia de una fusión del miembro de la familia quinesina 5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET) en dicho sujeto por secuenciación, por ejemplo, secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) o secuenciación por espectrometría de masas; y administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente anticáncer, tratando de ese modo el cáncer en el sujeto, en el que el agente anticáncer se selecciona de: (i) un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET; o (ii) una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en moléculas antisentido, ribozimas, ARNip y moléculas de triple hélice, en el que la molécula de ácido nucleico se hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, bloqueando o reduciendo así la expresión del ARNm de la molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, y en el que el cáncer es un cáncer colorrectal o un cáncer de pulmón.

[0006] La presente invención proporciona además un procedimiento de determinación de la presencia de una fusión del miembro de la familia quinesina 5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET), que comprende adquirir un conocimiento por secuenciación, por ejemplo, secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) o secuenciación por espectrometría de masas, en la que una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET o un polipéptido de fusión KIF5B-RET está presente en una muestra de un sujeto que tiene cáncer, en el que el cáncer se elige de entre un cáncer colorrectal o un cáncer de pulmón, opcionalmente en el que el cáncer de pulmón es un NSCLC, un SCLC, un SCC, (por sus siglas en inglés), o una combinación de los mismos, y en el que responde a la adquisición de conocimiento de la presencia de la fusión KIF5B-RET: (i) el sujeto está clasificado como candidato para recibir tratamiento con un agente anticáncer; y/o (ii) se identifica al sujeto como probable que responda a un tratamiento que comprende un agente anticáncer, en el que el agente anticáncer se selecciona de: (a) un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET; o (b) una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en moléculas antisentido, riboximas, ARNip y moléculas de triple hélice, en el

que la molécula de ácido nucleico se hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, bloqueando o reduciendo así la expresión del ARNm de la molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, dicho procedimiento comprende opcionalmente además proporcionar un informe a otra parte, en el que dicho informe comprende: información sobre el papel de una fusión KIF5B-RET, o secuencia de tipo natural, en la enfermedad; información sobre el pronóstico, la resistencia, o las opciones terapéuticas potenciales o sugeridas para el sujeto; información sobre la eficacia probable de una opción terapéutica, la aceptabilidad de una opción terapéutica o la conveniencia de aplicar una opción terapéutica al sujeto; o información, o una recomendación sobre, la administración de un fármaco al sujeto.

[0007] La presente invención proporciona además un agente anticáncer, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer colorrectal o de pulmón que tiene una fusión del miembro de la familia quinesina 5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET), en el que el procedimiento comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente anticáncer, tratando de este modo el cáncer en el sujeto, en el que el agente anticáncer se elige de entre lenvatinib, NVP-AST487, regorafenib, motesanib, cabozantinib, apatinib o DCC-2157.

[0008] La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

[0009] La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevos eventos de inversión que incluyen un fragmento de un gen KIF5B («miembro de la familia quinesina 5B-proto-oncogén RET») y un fragmento de un proto-oncogén RET en un cáncer, por ejemplo, un cáncer de pulmón, referido en esta invención como «KIF5B-RET». El término «KIF5B-RET» o «fusión KIF5B-RET» se utiliza genéricamente en esta invención, e incluye cualquier molécula de fusión (por ejemplo, gen, producto génico (por ejemplo, ADNc, ARNm o polipéptido, y una variante de la misma) que incluye un fragmento de KIF5B y un fragmento de RET, que incluye, por ejemplo, un 5'KIF5B-3'RET.

[0010] En una realización, una fusión KIF5B-RET incluye una fusión en marco de un exón de KIF5B (por ejemplo, uno o más exones que codifican un dominio motor de quinesina o un fragmento del mismo) y un exón de RET (por ejemplo, uno o más exones que codifican un dominio de la tirosina quinasa RET o un fragmento del mismo). Por ejemplo, la fusión KIF5B-RET puede incluir una fusión en marco de al menos el exón 15 de KIF5B o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 1-15 de KIF5B o un fragmento del mismo) con al menos el exón 12 de RET o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 12-20 de RET o un fragmento del mismo). En ciertas realizaciones, la fusión KIF5B-RET está en una configuración 5'-KIF5B a 3′-RET referida en esta invención como «5′KIF5B-3′RET». Un polipéptido de fusión KIF5B-RET codificado por un ácido nucleico 5'KIF5B-3'RET se refiere a veces en esta memoria como un polipéptido 5'KIF5B-3'RET. En una realización, la fusión 5'KIF5B-3'RET comprende una secuencia suficiente KIF5B y suficiente RET, de modo que la fusión 5′KIF5B-3′RET tiene una actividad quinasa, por ejemplo, tiene una actividad elevada, por ejemplo, una actividad quinasa, en comparación con el RET de tipo natural, por ejemplo, en una célula de un cáncer referida en esta invención. En una realización, la fusión 5'KIF5B-3′RET comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 u 11 exones de KIF5B y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10, exones de RET. En una realización, el polipéptido de fusión 5'KIF5B-3'RET incluye un dominio motor de quinesina, un dominio de hélice superenrollada, o un fragmento funcional del mismo, y un dominio tirosina quinasa de RET o un fragmento funcional del mismo.

[0011] El proto-oncogén RET está asociado con fenotipos cancerosos, incluidos los carcinomas papilares de tiroides (PTC, por sus siglas en inglés), neoplasias endocrinas múltiples (MEN, por sus siglas en inglés), feocromocitomas, entre otros. Por ejemplo, se sabe que los reordenamientos cromosómicos que generan un gen de fusión que resulta en la yuxtaposición de la región C-terminal de la proteína RET con una porción N-terminal de otra proteína (conocida como RET/PTC) están asociados con PTC (Nikiforov, YE (2002) Endocr. Pathol. 13 (1):3-16). Se ha demostrado que RET/PTC causa la activación constitutiva del dominio de la quinasa RET, que probablemente contribuye a la tumorigenicidad. Las fusiones KIF5B-RET descritas en esta invención (por ejemplo, las fusiones 5'-KIF5B a 3'-RET que incluyen un dominio de tirosina quinasa RET) están asociadas con cánceres, por ejemplo, cáncer de pulmón. La expresión elevada del extremo 3' de RET que comienza en el exón 12 se detecta en muestras tumorales de pulmón, lo que sugiere que el transcripto de la fusión KIF5B-RET puede dar como resultado la sobreexpresión del dominio de quinasa RET.

[0012] En otras realizaciones, la fusión KIF5B-RET incluye una fusión en marco de al menos el exón 11 de RET o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 1-11 de RET o un fragmento de los mismos) con al menos el exón 16 o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 16-25 de KIF5B o un fragmento de los mismos). En ciertas realizaciones, la fusión KIF5B-RET está en una configuración 5'-RET a 3′-KIF5B referida en esta invención como «5′RET-3′KIF5B»). No se cree que la configuración 5'RET-3′KIF5B de la molécula de fusión se exprese.

[0013] Por consiguiente, la descripción proporciona procedimientos de: identificación, determinación o detección de una fusión KIF5B-RET; procedimientos de identificación, determinación, evaluación y/o tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer que tiene una fusión KIF5B-RET; moléculas de ácido nucleico KIF5B-RET aisladas, construcciones de ácido nucleico, células huésped que contienen las moléculas de ácido nucleico; polipéptidos de KIF5B-RET purificados y agentes de unión; reactivos de detección (por ejemplo, sondas,

cebadores, anticuerpos, kits, capaces, por ejemplo, de una detección específica de un ácido nucleico o proteína de KIF5B-RET); los ensayos de cribado para identificar moléculas que interactúan con, por ejemplo, inhibir, las fusiones 5'KIF5B-3'RET, por ejemplo, nuevos inhibidores de quinasa; así como ensayos y kits para evaluar, identificar, determinar y/o tratar a un sujeto que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer que tiene una fusión KIF5B-RET. Las composiciones y procedimientos identificados en esta invención se pueden utilizar, por ejemplo, para identificar nuevos inhibidores de KIF5B-RET; para evaluar, identificar o seleccionar un sujeto, por ejemplo, un paciente con cáncer; y para tratar o prevenir un cáncer.

Moléculas de ácido nucleico de KIF5B-RET

[0014] En un aspecto, la descripción presenta una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico aislada o purificada) que incluye un fragmento de un gen KIF5B y un fragmento de un proto-oncogén RET. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una fusión, por ejemplo, una fusión en marco, de un exón de KIF5B (por ejemplo, uno más exones que codifican un dominio motor de quinesina o un fragmento del mismo), y un exón de RET (por ejemplo, uno o más exones que codifican un dominio de tirosina quinasa RET o un fragmento del mismo).

[0015] En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico 5'KIF5B-3'RET comprende una secuencia suficiente KIF5B y suficiente RET para que la fusión 5'KIF5B-3'RET codificada tenga actividad quinasa, por ejemplo, tenga actividad elevada, por ejemplo, actividad quinasa, en comparación con RET de tipo natural, por ejemplo, en una célula de un cáncer al que se hace referencia en esta invención. En un ejemplo, la fusión 5'KIF5B-3'RET codificada comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 u 11 exones de KIF5B y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 exones de RET. En un ejemplo, el polipéptido de fusión 5'KIF5B-3'RET codificada incluye un dominio motor, un dominio de hélice superenrollada de quinesina, o un fragmento funcional del mismo, y un dominio de tirosina quinasa de RET o un fragmento funcional del mismo.

[0016] En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que tiene una fusión en marco del exón 15 de KIF5B con el exón 12 de RET (por ejemplo, una secuencia dentro de una inversión pericéntrica de 11 MB en el cromosoma 10). En otros ejemplos, las moléculas de ácido nucleico incluyen una secuencia de nucleótidos en la región de 32,316,376-32,316,416 del cromosoma 10 acoplada a (por ejemplo, yuxtapuesta a) nucleótidos en la región de los nucleótidos 43,611,042-43,611,118 del cromosoma 10. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que incluye un punto de ruptura, por ejemplo, un punto de ruptura identificado en las FIGs. 1, 2 y 3A-3D. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que incluye la unión de fusión entre el transcrito de KIF5B y el transcrito de RET, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que incluye una porción de la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos en los exones 1-15 de un gen KIF5B y 12-20 de un gen RET) (por ejemplo, una porción de la SEQ ID NO:1 que comprende los nucleótidos 1720-1731, 1717-1734, o 1714-1737 de la SEQ ID NO:1 (véase la FIG. 3B)).

[0017] En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico incluye una fusión KIF5B-RET que tiene una configuración mostrada en las FIGs. 2B y 3A-3D. Por ejemplo, la fusión KIF5B-RET puede incluir una fusión en marco de al menos el exón 15 de KIF5B o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 1-15 de KIF5B o un fragmento de los mismos) con al menos el exón 12 de RET o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 12-20 de RET o un fragmento de los mismos). En ciertos ejemplos, la fusión KIF5B-RET está en una configuración 5'-KIF5B a 3′-RET referida en esta invención como «5′KIF5B-3′RET»). En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia nucleotídica de los nucleótidos 1-1725 de la SEQ ID NO:1 (correspondiente a los exones 1-15 del gen KIF5B), o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia nucleotídica de los nucleótidos 1726-2934 de la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, correspondiente a los exones 12-20 del gen RET), o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos mostrada en las FIGs. 3A-3D (por ejemplo, SEQ ID NO:1) o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico es complementaria a al menos una porción de una secuencia de nucleótidos descrita en esta invención, por ejemplo, es capaz de hibridarse en una condición de rigurosidad descrita en esta invención con la SEQ ID NO:1 o un fragmento de la misma. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico se hibrida a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una porción de una secuencia de nucleótidos descrita en esta invención, por ejemplo, es capaz de hibridarse en una condición de rigurosidad descrita en esta invención a una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO:1 o un fragmento de la misma. La secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una fusión 5'KIF5B-3'RET ejemplar se muestra en la SEQ ID NO:1, y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:2.

[0018] En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET que incluye un fragmento de un gen KIF5B y un fragmento de un proto-oncogén RET. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET que incluye un dominio motor de quinesina o un fragmento funcional del mismo, y un dominio de tirosina quinasa RET o un

fragmento funcional del mismo. En otro ejemplo, la secuencia de nucleótidos codifica un fragmento del polipéptido KIF5B que incluye la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-575 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio motor de quinesina del polipéptido de fusión KIF5B-RET que incluye los aminoácidos 6-325 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento del mismo. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento del gen RET que codifica la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 576-977 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio quinasa RET de un polipéptido de fusión KIF5B-RET que incluye los aminoácidos 587-868 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en las FIGs. 3A-3D (por ejemplo, SEQ ID NO:2) o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

[0019] En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una fusión KIF5B-RET que tiene la configuración mostrada en las FIGs. 2A y 4A-4D. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que incluye una unión de fusión entre el transcrito RET y el transcrito KIF5B, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos dentro de la SEQ ID NO:3 (por ejemplo, una secuencia que comprende los nucleótidos 2131-2142, 2128). 2145, o 2125-2148 de la SEQ ID NO:3 (véase la FIG. 4B)). En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una fusión, por ejemplo, una fusión en marco, de al menos el exón 11 de RET o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 1-11 de RET o un fragmento de los mismos), y al menos el exón 16 o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 16-25 de KIF5B o un fragmento de los mismos). En ciertos ejemplos, la fusión KIF5B-RET está en una configuración 5'-RET a 3′-KIF5B referida en esta invención como «5′RET-3′KIF5B»). En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos de 1-2136 de la SEQ ID NO:3 (correspondiente a los exones 1-11 de un gen RET) o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos de 2137-3360 de la SEQ ID NO:3 (correspondiente a los exones 16-25 de un gen KIF5B) o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos mostrada en las FIGs. 4A-4D (por ejemplo, SEQ ID NO:3) o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico es complementaria a al menos una porción de una secuencia de nucleótidos descrita en esta invención, por ejemplo, es capaz de hibridarse en una condición de rigurosidad descrita en esta invención con la SEQ ID NO:3 o un fragmento de la misma. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico se hibrida a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una porción de una secuencia de nucleótidos descrita en esta invención, por ejemplo, es capaz de hibridarse en una condición de rigurosidad a una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO:3 o un fragmento de la misma. La secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una fusión 5'RET-3'KIF5B ejemplar se muestra en la SEQ ID NO:3, y la secuencia de aminoácidos prevista se muestra en la SEQ ID NO:4. Los estudios de RT-PCR han demostrado que el exón 11 de RET y el exón 16 de KIF5B no produjeron un producto de transcripción.

[0020] En un ejemplo relacionado, la descripción presenta construcciones de ácido nucleico que incluyen las moléculas de ácido nucleico KIF5B-RET descritas en esta invención. En ciertos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico están enlazadas operativamente a una secuencia reguladora nativa o heteróloga. También se incluyen vectores y células huésped que incluyen las moléculas de ácido nucleico KIF5B-RET descritas en esta invención, por ejemplo, vectores y células huésped adecuadas para producir las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos descritos en esta invención.

[0021] En un ejemplo relacionado, también se describen los procedimientos de producción de las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos descritos en esta invención.

[0022] En otro ejemplo, la descripción presenta moléculas de ácido nucleico que reducen o inhiben la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención. Ejemplos de tales moléculas de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, moléculas antisentido, ribozimas, ARNi, moléculas de triple hélice que se hibridan con un ácido nucleico que codifica KIF5B-RET, o una región reguladora de la transcripción de KIF5B-RET, y bloquean o reducen la expresión del ARNm de KIF5B-RET.

Detección de ácido nucleico y reactivos de captura

[0023] La descripción también presenta una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico, adecuado como sonda, cebador, cebo o miembro de la biblioteca que incluye, flancos, que se hibrida con, que son útiles para identificar, o están basados de otro modo en, las fusiones de KIF5B-RET descritas en esta invención. En ciertos ejemplos, la molécula de sonda, cebador o cebo es un oligonucleótido que permite la captura, detección o aislamiento de una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET descrita en esta invención. El oligonucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a un fragmento de las moléculas de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET descritas en esta invención. La identidad de secuencia entre el fragmento de ácido nucleico, por ejemplo, el oligonucleótido, y la secuencia KIF5B-RET diana no necesita

ser exacta, siempre que las secuencias sean lo suficientemente complementarias para permitir la captura, detección o aislamiento de la secuencia diana. En un ejemplo, el fragmento de ácido nucleico es una sonda o cebador que incluye un oligonucleótido entre aproximadamente 5 y 25, por ejemplo, entre 10 y 20, o 10 y 15 nucleótidos de longitud. En otros ejemplos, el fragmento de ácido nucleico es un cebo que incluye un oligonucleótido entre aproximadamente 100 a 300 nucleótidos, 130 y 230 nucleótidos, o 150 y 200 nucleótidos, en longitud.

[0024] En unos ejemplos, el fragmento de ácido nucleico se puede utilizar para identificar o capturar, por ejemplo, mediante hibridación, una fusión KIF5B-RET. Por ejemplo, el fragmento de ácido nucleico puede ser una sonda, un cebador o un cebo, para su uso en la identificación o captura, por ejemplo, mediante hibridación, de una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención. En un ejemplo, el fragmento de ácido nucleico puede ser útil para identificar o capturar un punto de ruptura de KIF5B-RET, por ejemplo, como se identifica en la FIG. 1. En un ejemplo, el fragmento de ácido nucleico se hibrida a una secuencia de nucleótidos dentro de un reordenamiento cromosómico que crea una fusión en marco del exón 15 de KIF5B con el exón 12 de RET (por ejemplo, una secuencia dentro de una inversión pericéntrica de 11 MB en el cromosoma 10). En un ejemplo, el fragmento de ácido nucleico se hibrida a una secuencia de nucleótidos en la región de 32,316,376-32,316,416 del cromosoma 10 acoplada a (por ejemplo, yuxtapuesta a) nucleótidos en la región de los nucleótidos 43,611,042-43,611,118 del cromosoma 10. En un ejemplo, el fragmento de ácido nucleico se hibrida a una secuencia de nucleótidos que incluye un punto de ruptura, por ejemplo, un punto de ruptura que se identifica en las FIGs. 1, 2 y 3A-3D. Por ejemplo, el fragmento de ácido nucleico puede hibridarse a una secuencia de nucleótidos que incluye la unión de fusión entre el transcrito de KIF5B y el transcrito de RET, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que incluye una porción de la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos dentro de los exones 1-15 de un gen KIF5B y 12-20 de un gen RET) (por ejemplo, una porción de la SEQ ID NO:1 que comprende los nucleótidos 1720-1731, 1717-1734, o 1714-1737 de la SEQ ID NO:1 (véase la FIG. 3B)).

[0025] Las sondas o cebadores descritos en esta invención se pueden utilizar, por ejemplo, para la detección por FISH o la amplificación por PCR. En un ejemplo ejemplar, en el que la detección se basa en PCR, la amplificación de la unión de fusión KIF5B-RET se puede realizar utilizando un cebador o un par de cebadores, por ejemplo, para amplificar una secuencia que flanquea las uniones de fusión KIF5B-RET descritas en esta invención, por ejemplo, las mutaciones o la unión de un reordenamiento cromosómico descritas en esta invención. En un ejemplo, un par de cebadores oligonucleotídicos aislados puede amplificar una región que contiene o es adyacente a una posición en la fusión KIF5B-RET. Por ejemplo, los cebadores directos pueden diseñarse para hibridarse con una secuencia de nucleótidos dentro de la secuencia genómica o de ARNm de KIF5B (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos dentro de los exones 1-15 de un gen KIF5B, o los nucleótidos 1-1725 de la SEQ ID NO:1), y los cebadores inversos pueden diseñarse para hibridarse con una secuencia de nucleótidos dentro de RET (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos dentro de los exones 12-20 de RET, o nucleótidos 1725-2934 de la SEQ ID NO:1).

[0026] En otro ejemplo, los fragmentos de ácido nucleico pueden utilizarse para identificar, por ejemplo, mediante hibridación, una fusión 5'RET-3′KIF5B. En un ejemplo, el fragmento de ácido nucleico se hibrida a una secuencia de nucleótidos que incluye una unión de fusión entre el transcrito RET y el transcrito KIF5B, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos dentro de la SEQ ID NO:3 (por ejemplo, una secuencia que comprende los nucleótidos 2131-2142, 2128-2145, o 2125-2148 de la SEQ ID NO:3 (véase la FIG. 4B)).

[0027] En otros ejemplos, el fragmento de ácido nucleico incluye un cebo que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET descrita en esta invención, y por lo tanto permite la captura o el aislamiento de dicha molécula de ácido nucleico. En un ejemplo, un cebo es adecuado para la hibridación en fase de solución. En otros ejemplos, un cebo incluye una entidad de unión, por ejemplo, una etiqueta de afinidad, que permite la captura y separación, por ejemplo, mediante la unión a una entidad de unión, de un híbrido formado por un cebo y un ácido nucleico hibridado con el cebo.

[0028] En otros ejemplos, el fragmento de ácido nucleico incluye un miembro de biblioteca que comprende una molécula de ácido nucleico de KIF5B-RET descrita en esta invención. En un ejemplo, el miembro de la biblioteca incluye un reordenamiento que da como resultado una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención.

[0029] El fragmento de ácido nucleico puede marcarse de manera detectable con, por ejemplo, un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador bioluminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador de par de unión, o puede incluir un marcador de afinidad; una etiqueta o un identificador (por ejemplo, un adaptador, código de barras u otro identificador de secuencias).

Polipéptidos de fusión KIF5B-RET

[0030] En otro ejemplo, la descripción presenta un polipéptido de fusión KIF5B-RET (por ejemplo, un polipéptido de fusión KIF5B-RET purificado), un fragmento biológicamente activo o antigénico del mismo, así como reactivos (por ejemplo, moléculas de anticuerpos que se unen a un polipéptido de fusión KIF5B-RET), procedimientos de modulación de la actividad de un polipéptido de KIF5B-RET y detección de un polipéptido de

KIF5B-RET.

[0031] En un ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET tiene al menos una actividad biológica, por ejemplo, una actividad quinasa RET, y/o una actividad de dimerización o multimerización. En un ejemplo, al menos una actividad biológica del polipéptido de fusión KIF5B-RET es reducida o inhibida por un fármaco anticáncer, por ejemplo, un inhibidor de quinasa (por ejemplo, un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET). En un ejemplo, al menos una actividad biológica del polipéptido de fusión KIF5B-RET se reduce o inhibe por un inhibidor de la quinasa elegido de entre lenvatinib (E7080), sorafenib (NEXAVAR®), sunitinib (SUTENT®, SU11248), vandetanib (CAPRELSA®, ZACTIMA®, ZD6474), NVP-AST487, regorafenib (BAY-73-4506), motesanib (AMG 706), cabozantinib (XL-184), apatinib (YN-968D1) o DCC-2157.

[0032] En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye un fragmento de un polipéptido de KIF5B y un fragmento de un polipéptido de RET. En un ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye los aminoácidos 578-575 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma (por ejemplo, los aminoácidos 1-575 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma) y los aminoácidos 576-624 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma (por ejemplo, los aminoácidos 576-977 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de los mismos). En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una fusión en marco de los aminoácidos 578-575 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma (por ejemplo, los aminoácidos 1-575 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma), y los aminoácidos 576-624 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma (por ejemplo, los aminoácidos 576-977 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma).

[0033] En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye un dominio motor quinesina KIF5B o un fragmento del mismo, y un dominio quinasa RET o un fragmento del mismo. En otro ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-575 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. Por ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET puede incluir un dominio motor de quinesina de KIF5B que incluye los aminoácidos 6-325 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma. En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 576-977 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. Por ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET puede incluir un dominio quinasa RET que incluye los aminoácidos 587-868 de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma. En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en las FIGs. 3A-3D (por ejemplo, SEQ ID NO:2) o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

[0034] En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET está codificado por una molécula de ácido nucleico descrita en esta invención. En un ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET está codificado por una fusión en marco del exón 15 de KIF5B con el exón 12 de RET (por ejemplo, una secuencia dentro de una inversión pericéntrica de 11 MB en el cromosoma 10). En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET está codificado por una secuencia de nucleótidos en la región de 32,316,376-32,316,416 del cromosoma 10 acoplada a (por ejemplo, yuxtapuesta a) nucleótidos en la región de los nucleótidos 43,611,042-43,611,118 del cromosoma 10. En otro ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una unión de fusión entre el transcrito KIF5B y el transcrito RET, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que incluye una porción de la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos dentro de los exones 1-15 de un gen KIF5B y 12-20 de un gen RET) (por ejemplo, una porción de la SEQ ID NO:1 que comprende los nucleótidos 1720-1731, 1717-1734 o 1714-1737 de la SEQ ID NO:1 (véase la FIG. 3B)).

[0035] En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET está codificado por una molécula de ácido nucleico 5'-RET a 3'-KIF5B descrita en esta invención. En un ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET está codificado por una secuencia de nucleótidos que incluye una unión de fusión entre el transcrito RET y el transcrito KIF5B, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos dentro de la SEQ ID NO:3 (por ejemplo, una secuencia que comprende los nucleótidos 2131-2142, 2128-2145, o 2125-2148 de la SEQ ID NO:3 (véase la FIG. 4B)). En otros ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET está codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en las Figs. 4A-4D (por ejemplo, SEQ ID NO:3) o un fragmento de la misma, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

[0036] En una realización, el polipéptido de fusión 5'KIF5B-3'RET comprende una secuencia suficiente KIF5B y suficiente RET para que tenga actividad quinasa, por ejemplo, tenga una actividad elevada, por ejemplo, actividad quinasa, en comparación con RET de tipo natural, por ejemplo, en una célula de un cáncer referido en esta invención. En un ejemplo, el polipéptido de fusión 5'KIF5B-3'RET comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 u 11 exones de KIF5B y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10, exones de RET. En un ejemplo, el polipéptido de fusión 5'KIF5B-3'RET incluye un dominio motor de quinesina o un fragmento funcional del mismo, y un dominio tirosina quinasa RET o un fragmento funcional del mismo. En un ejemplo relacionado, la descripción presenta el polipéptido de fusión KIF5B-RET o fragmentos enlazados operativamente a polipéptidos heterólogos para formar proteínas de fusión.

[0037] En otro ejemplo, el polipéptido o fragmento de fusión KIF5B-RET es un péptido, por ejemplo, un péptido o proteína inmunogénica, que contiene una unión de fusión descrita en esta invención. Tales péptidos o proteínas inmunogénicas pueden utilizarse para generar anticuerpos específicos para la proteína de fusión. En otros ejemplos, tales péptidos o proteínas inmunogénicas pueden utilizarse para la preparación de vacunas. La preparación de vacuna puede incluir otros componentes, por ejemplo, un adyuvante.

[0038] En otro ejemplo, la descripción presenta moléculas de anticuerpos que se unen a un polipéptido o fragmento de fusión KIF5B-RET descrito en esta invención. En algunos ejemplos, el anticuerpo puede distinguir RET (o KIF5B) de tipo natural de KIF5B-RET.

Procedimientos de reducción de una actividad KIF5B-RET

[0039] En otro ejemplo, la descripción presenta un procedimiento de reducción de la actividad de una fusión KIF5B-RET. El procedimiento incluye poner en contacto la fusión KIF5B-RET, o una célula que expresa KIF5B-RET, con un agente que inhibe una actividad o expresión de KIF5B-RET (por ejemplo, un inhibidor de la quinasa). En un ejemplo, la etapa de contacto puede efectuarse *in vitro*, por ejemplo, en un lisado celular o en un sistema reconstituido. Alternativamente, el procedimiento puede realizarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. En otros ejemplos, el procedimiento se puede realizar en células que expresan KIF5B-RET presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). En un ejemplo, el procedimiento se practica en un sujeto animal (por ejemplo, un modelo animal *in vivo*). En ciertos ejemplos, la fusión KIF5B-RET es una molécula de ácido nucleico o un polipéptido como se describe en esta invención.

[0040] En un ejemplo relacionado, se proporciona un procedimiento de inhibición, reducción o tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, por ejemplo, un cáncer, en un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto un agente terapéutico preseleccionado, por ejemplo, un agente anticáncer (por ejemplo, un inhibidor de la quinasa), como un agente único o en combinación, en una cantidad suficiente para reducir, inhibir o tratar la actividad o expresión de KIF5B-RET (por ejemplo, una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención), inhibiendo, reduciendo o tratando así el trastorno hiperproliferativo en el sujeto. «Tratamiento», como se utiliza en esta invención, incluye, pero no se limita a, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la masa tumoral, reducir el tamaño o el número de lesiones metastásicas, inhibir el desarrollo de nuevas lesiones metastásicas, supervivencia prolongada, supervivencia prolongada libre de progresión, tiempo prolongado para progresión, y/o calidad de vida mejorada.

[0041] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa se administra con base en una determinación de que una fusión KIF5B-RET está presente en un sujeto, por ejemplo, con base en si está presente en una muestra de un sujeto. Por lo tanto, el tratamiento puede combinarse con un procedimiento de detección o evaluación de KIF5B-RET, por ejemplo, como se describe en esta invención, o administrarse en respuesta a una determinación hecha por un procedimiento de detección o evaluación de KIF5B-RET, por ejemplo, como se describe en esta invención. En ciertos ejemplos, el inhibidor de quinasa se administra en respuesta a la adquisición de conocimientos o información de la presencia de la fusión KIF5B-RET en un sujeto. En un ejemplo, el inhibidor de quinasa se administra en respuesta a la adquisición de conocimiento o información sobre el genotipo del sujeto, por ejemplo, la adquisición de conocimiento o información de que el genotipo del paciente tiene una fusión KIF5B-RET. En otros ejemplos, el inhibidor de quinasa se administra en respuesta a recibir una comunicación (por ejemplo, un informe) de la presencia de la fusión KIF5B-RET en un sujeto (por ejemplo, una muestra de un sujeto). En otros ejemplos, el inhibidor de quinasa se administra en respuesta a la información obtenida de una colaboración con otra parte que identifica la presencia de la fusión KIF5B-RET en un sujeto (por ejemplo, una muestra de un sujeto). En otros ejemplos, el inhibidor de quinasa se administra en respuesta a una determinación de que la fusión KIF5B-RET está presente en un sujeto. En un ejemplo, la determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET se lleva a cabo utilizando uno o más de los procedimientos, por ejemplo, los procedimientos de secuenciación, descritos en esta invención. En otros ejemplos, la determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET incluye recibir información sobre el genotipo de fusión KIF5B-RET del sujeto, por ejemplo, de otra parte o fuente.

[0042] Los procedimientos pueden, opcionalmente, incluir además la(s) etapa(s) de identificación (por ejemplo, evaluación, diagnóstico, cribado y/o selección) de un sujeto en riesgo de tener, o que tiene, una fusión KIF5B-RET. En un ejemplo, el procedimiento incluye además uno o más de: adquisición de conocimiento o información de la presencia de la fusión KIF5B-RET en un sujeto (por ejemplo, una muestra de un sujeto); adquisición de conocimiento o información sobre el genotipo del sujeto, por ejemplo, adquisición del conocimiento o información de que el genotipo del paciente tiene una fusión KIF5B-RET; recepción de una comunicación (por ejemplo, un informe) de la presencia de la fusión KIF5B-RET en un sujeto (por ejemplo, una muestra de un sujeto); o colaboración con otra parte que identifique la presencia de la fusión KIF5B-RET en un sujeto.

[0043] En un ejemplo, el sujeto tratado tiene una fusión KIF5B-RET; por ejemplo, el sujeto tiene un tumor o cáncer que alberga una fusión KIF5B-RET. En otros ejemplos, el sujeto ha sido identificado previamente por tener una fusión KIF5B-RET. En otros ejemplos, se ha identificado previamente al sujeto como probable o poco probable de que responda al tratamiento con un inhibidor de la proteína quinasa, por ejemplo, un sujeto que ha participado previamente en un ensayo clínico. En otros ejemplos, el sujeto ha sido identificado previamente como probable o

poco probable de que responda al tratamiento con un inhibidor de la proteína quinasa, con base en la presencia de la fusión KIF5B-RET. En un ejemplo, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En un ejemplo, el sujeto tiene, o está en riesgo de tener un cáncer en cualquier estadio de la enfermedad. En otros ejemplos, el sujeto es un paciente, por ejemplo, un paciente con cáncer.

[0044] En otros ejemplos, el sujeto tratado es un paciente con cáncer que ha participado en un ensayo clínico. Por ejemplo, el sujeto participó en un ensayo clínico que evaluó un inhibidor de quinasa (por ejemplo, un inhibidor de múltiples quinasas, un inhibidor de quinasa RET). En otros ejemplos, el sujeto participó en un ensayo clínico que evalúa las dianas de RET aguas arriba o aguas abajo. En un ejemplo, dicho paciente con cáncer respondió al inhibidor de quinasa evaluado.

[0045] En ciertos ejemplos, el cáncer es un tumor sólido, un tumor de tejidos blandos o una lesión metastásica. En un ejemplo, el cáncer se elige de entre un cáncer de pulmón, un cáncer de páncreas, un melanoma, un cáncer colorrectal, un cáncer esofágico-gástrico, un cáncer de tiroides o un adenocarcinoma. En otros ejemplos, el cáncer de pulmón se elige de entre uno o más de los siguientes: cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés), carcinoma de células escamosas (SCC, por sus siglas en inglés), adenocarcinoma de pulmón, carcinoma broncogénico o una combinación de los mismos. En un ejemplo, el cáncer de pulmón es NSCLC o SCC.

[0046] En un ejemplo, el agente anticáncer es un inhibidor de la quinasa. Por ejemplo, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET. En un ejemplo, el inhibidor de la quinasa se elige de entre lenvatinib (E7080) (Eisai Co.), sorafenib (NEXAVAR®), sunitinib (SUTENT®, SU11248), vandetanib (CAPRELSA®, ZACTIMA®, ZD6474), NVP-AST487 (BAY-73-4506), motesanib (AMG 706), cabozantinib (XL-184), apatinib (YN-968D1) o DCC-2157.

[0047] En otros ejemplos, el agente anticáncer es un antagonista de KIF5B-RET que inhibe la expresión del ácido nucleico que codifica KIF5B-RET. Los ejemplos de dichos antagonistas de KIF5B-RET incluyen moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, moléculas antisentido, ribozimas, ARNi, moléculas de triple hélice que se hibridan a un ácido nucleico que codifica KIF5B-RET, o una región reguladora de la transcripción, y bloquean o reducen la expresión del ARNm de KIF5B-RET.

[0048] En otros ejemplos, el inhibidor de la quinasa se administra en combinación con un segundo agente terapéutico o una modalidad terapéutica diferente, por ejemplo, agentes anticánceres, y/o en combinación con procedimientos quirúrgicos y/o de radiación. Por ejemplo, el segundo agente terapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. Los agentes citotóxicos ejemplares incluyen agentes antimicrotúbulos, inhibidores de la topoisomerasa, o taxanos, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, agentes intercalantes, agentes capaces de interferir con una vía de transducción de señales, agentes que promueven la apoptosis y la radiación. En otros ejemplos, los procedimientos pueden utilizarse en combinación con agentes inmunoduladores, por ejemplo, IL-1, 2, 4, 6, o 12, o interferón alfa o gamma, o factores de crecimiento de células inmunes tales como GM-CSF.

Procedimientos de cribado

[0049] En otro ejemplo, la descripción presenta un procedimiento, o ensayo, para cribar agentes que modulan, por ejemplo, inhiben, la expresión o actividad de una fusión KIF5B-RET, por ejemplo, una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención. El procedimiento incluye poner en contacto una fusión KIF5B-RET, o una célula que expresa una fusión KIF5B-RET, con un agente candidato; y detectar un cambio en un parámetro asociado con una fusión KIF5B-RET, por ejemplo, un cambio en la expresión o una actividad de la fusión KIF5B-RET. El procedimiento puede incluir, opcionalmente, comparar el parámetro tratado con un valor de referencia, por ejemplo, una muestra de control (por ejemplo, comparar un parámetro obtenido de una muestra con el agente candidato con un parámetro obtenido de una muestra sin el agente candidato). En un ejemplo, si se detecta una disminución en la expresión o actividad de la fusión KIF5B-RET, el agente candidato se identifica como un inhibidor. En otro ejemplo, si se detecta un aumento en la expresión o actividad de la fusión KIF5B-RET, el agente candidato se identifica como un activador. En ciertos ejemplos, la fusión KIF5B-RET es una molécula de ácido nucleico o un polipéptido como se describe en esta invención.

[0050] En un ejemplo, la etapa de contacto se efectúa en un sistema libre de células, por ejemplo, un lisado celular o en un sistema reconstituido. En otros ejemplos, la etapa de contacto se efectúa en una célula en cultivo, por ejemplo, una célula que expresa una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula tumoral o una estirpe celular, una célula recombinante). En otros ejemplos, la etapa de contacto se efectúa en una célula *in vivo* (una célula que expresa KIF5B-RET presente en un sujeto, por ejemplo, un sujeto animal (por ejemplo, un modelo animal *in vivo*).

[0051] Los parámetros ejemplares evaluados incluyen uno o más de:

(i) un cambio en la actividad de unión, por ejemplo, la unión directa del agente candidato a un polipéptido de fusión

KIF5B-RET; una competición de unión entre un ligando conocido y el agente candidato a un polipéptido de fusión KIF5B-RET;
(ii) un cambio en la actividad de la quinasa, por ejemplo, los niveles de fosforilación de un polipéptido de fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una autofosforilación aumentada o disminuida); o un cambio en la fosforilación de una diana de una quinasa RET, por ejemplo, quinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés), persefina o factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). En ciertos ejemplos, cualquier cambio en la actividad de la quinasa, por ejemplo, la fosforilación, se detecta por cualquier membrana Western (por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-KIF5B o anti-RET; un anticuerpo específico de fósforo, que detecta un cambio en el peso molecular de un polipéptido de fusión KIF5B-RET), espectrometría de masas, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, perlas inmunomagnéticas, entre otros;
(iii) un cambio en una actividad de una célula que contiene una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula tumoral o una célula recombinante), por ejemplo, un cambio en la proliferación, morfología o tumorigenicidad de la célula;
(iv) un cambio en el tumor presente en un sujeto animal, por ejemplo, tamaño, apariencia, proliferación del tumor; o
(v) un cambio en el nivel, por ejemplo, el nivel de expresión, de un polipéptido de fusión KIF5B-RET o una molécula de ácido nucleico.

[0052] En un ejemplo, se evalúa un cambio en un ensayo libre de células en presencia de un agente candidato. Por ejemplo, se puede detectar una actividad de una fusión KIF5B-RET, o la interacción de una fusión KIF5B-RET con un ligando aguas abajo. En un ejemplo, un polipéptido de fusión KIF5B-RET se pone en contacto con un ligando, por ejemplo, en solución, y un agente candidato se controla para determinar su capacidad para modular, por ejemplo, inhibir, una interacción, por ejemplo, unión, entre el polipéptido de fusión KIF5B-RET y el ligando.

[0053] En otros ejemplos, se detecta un cambio en una actividad de una célula en una célula en cultivo, por ejemplo, una célula que expresa una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula tumoral o una estirpe celular, una célula recombinante). En un ejemplo, la célula es una célula recombinante que se modifica para expresar un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET, por ejemplo, es una célula recombinante transfectada con un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET. La célula transfectada puede mostrar un cambio en respuesta a la fusión de KIF5B-RET expresada, por ejemplo, aumento de la proliferación, cambios en la morfología, aumento de la tumorigenicidad y/o un fenotipo transformado adquirido. Se puede detectar un cambio en cualquiera de las actividades de la célula, por ejemplo, la célula recombinante, en presencia del agente candidato. Por ejemplo, una disminución en uno o más de: proliferación, tumorigenicidad, morfología transformada, en presencia del agente candidato puede ser indicativo de un inhibidor de una fusión KIF5B-RET. En otros ejemplos, se detecta un cambio en la actividad de unión o fosforilación como se describe en esta invención.

[0054] En otros ejemplos, se detecta un cambio en un tumor presente en un sujeto animal (por ejemplo, un modelo animal *in vivo*). En un ejemplo, el modelo animal es un animal que contiene un tumor o un xenoinjerto que comprende células que expresan una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, células tumorigénicas que expresan una fusión KIF5B-RET). El agente candidato puede administrarse al sujeto animal y se detecta un cambio en el tumor. En un ejemplo, el cambio en el tumor incluye uno o más de un crecimiento del tumor, se evalúa el tamaño del tumor, la carga del tumor, la supervivencia. Una disminución en uno o más del crecimiento del tumor, el tamaño del tumor, la carga del tumor o un aumento de la supervivencia es indicativo de que el agente candidato es un inhibidor.

[0055] En otros ejemplos, un cambio en la expresión de una fusión KIF5B-RET puede controlarse detectando los niveles de ácido nucleico o proteína, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en esta invención.

[0056] En ciertos ejemplos, los procedimientos de cribado descritos en esta invención pueden repetirse y/o combinarse. En un ejemplo, un agente candidato que se evalúa en una célula libre o a base de células descrito en esta invención puede probarse adicionalmente en un sujeto animal.

[0057] En un ejemplo, el agente candidato es un compuesto de molécula pequeña, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa, un ácido nucleico (por ejemplo, antisentido, ARNip, aptámero, ribozimas, microARN), una molécula de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une a KIF5B5 o RET). El agente candidato puede obtenerse a partir de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca comercial de inhibidores de la quinasa) o diseñarse racionalmente (por ejemplo, con base en el dominio quinasa RET).

Procedimientos de detección de fusiones KIF5B-RET

[0058] En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento de determinación de la presencia de una fusión KIF5B-RET, por ejemplo, una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención. En una realización, la fusión KIF5B-RET se detecta en una molécula de ácido nucleico o un polipéptido. El procedimiento incluye detectar si una molécula o polipéptido de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET está presente en una célula (por ejemplo, una célula circulante), un tejido (por ejemplo, un tumor) o una muestra, por ejemplo, una muestra tumoral, de un sujeto. En una realización, la muestra es una muestra de ácido nucleico. En una realización, la muestra de ácido nucleico

comprende ADN, por ejemplo, ADN genómico o ADNc, o ARN, por ejemplo, ARNm. En otras realizaciones, la muestra es una muestra de proteína.

[0059] En una realización, la muestra está, o ha sido, clasificada como no maligna utilizando otras técnicas de diagnóstico, por ejemplo, inmunohistoquímica.

[0060] En una realización, la muestra se adquiere de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un cáncer, por ejemplo, un paciente), o alternativamente, el procedimiento incluye además adquirir una muestra del sujeto. La muestra se puede elegir de entre uno o más de: tejido, por ejemplo, tejido canceroso (por ejemplo, una biopsia del tejido), sangre entera, suero, plasma, raspado bucal, esputo, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, células tumorales circulantes, ácidos nucleicos circulantes, o médula ósea. En ciertas realizaciones, la muestra es un tejido (por ejemplo, una biopsia del tumor), una célula tumoral circulante o ácido nucleico.

[0061] En algunos ejemplos, el tumor procede de un cáncer descrito en esta invención, por ejemplo, se elige de entre un cáncer de pulmón, un cáncer colorrectal, un cáncer esofágico-gástrico, un cáncer de tiroides, un adenocarcinoma o un melanoma. En una realización, el tumor procede de un cáncer de pulmón, por ejemplo, un NSCLC, un SCLC, un SCC, o una combinación de los mismos.

[0062] En una realización, el sujeto está en riesgo de tener, o tiene un cáncer (por ejemplo, un paciente con un cáncer descrito en esta invención). Por ejemplo, en una realización, el sujeto está en riesgo de tener, o tiene un cáncer de pulmón.

[0063] En otras realizaciones, la fusión KIF5B-RET se detecta en una molécula de ácido nucleico mediante un procedimiento elegido de entre uno o más de: ensayo de hibridación de ácido nucleico, ensayos basados en amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), ensayo PCR-RFLP, PCR en tiempo real, secuenciación, análisis de cribado (incluido el análisis citogenético de metafase mediante procedimientos de cariotipo estándar, FISH (por ejemplo, FISH de desacoplamiento), cariotipo espectral o MFISH, hibridación genómica comparativa), hibridación *in situ*, SSP, HPLC o genotipado por espectrometría de masas.

[0064] En una realización, el procedimiento incluye: poner en contacto una muestra de ácido nucleico, por ejemplo, una muestra de ADN genómico (por ejemplo, una muestra cromosómica o una muestra fraccionada, enriquecida o pretratada) o un producto genético (ARNm, ADNc), obtenido del sujeto, con un fragmento de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda o cebador como se describe en esta invención (por ejemplo, una sonda o cebador específico de exón) en condiciones adecuadas para la hibridación, y determinar la presencia o ausencia de la molécula de ácido nucleico KIF5B-RET. El procedimiento puede, opcionalmente, incluir el enriquecimiento de una muestra para el gen o el producto génico.

[0065] En un aspecto relacionado, se proporciona un procedimiento de determinación de la presencia de una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET. El procedimiento incluye: adquirir una secuencia para una posición en una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, secuenciar al menos un nucleótido de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, secuenciar al menos un nucleótido en la molécula de ácido nucleico que comprende la fusión KIF5B-RET), determinando así que la fusión KIF5B-RET está presente en la molécula de ácido nucleico. Opcionalmente, la secuencia adquirida se compara con una secuencia de referencia o una secuencia de referencia de tipo natural. En una realización, la molécula de ácido nucleico procede de una célula (por ejemplo, una célula circulante), un tejido (por ejemplo, un tumor) o cualquier muestra de un sujeto (por ejemplo, muestra de sangre o plasma). En otras realizaciones, se secuencia la molécula de ácido nucleico de una muestra de tumor (por ejemplo, una muestra de tumor o cáncer). En una realización, la secuencia se determina mediante un procedimiento de secuenciación de próxima generación. El procedimiento además puede incluir adicionalmente adquirir, por ejemplo, adquirir directa o indirectamente, una muestra, por ejemplo, una muestra de tumor o cáncer, de un sujeto (por ejemplo, un paciente). En ciertos ejemplos, el cáncer se elige de entre un cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer esofágico-gástrico o melanoma.

[0066] En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento de análisis de un tumor o una célula tumoral circulante. El procedimiento incluye la adquisición de una muestra de ácido nucleico del tumor o de la célula circulante; y la secuenciación, por ejemplo, mediante un procedimiento de secuenciación de próxima generación, una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que incluye una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención.

[0067] En otra realización, se detecta un polipéptido de fusión KIF5B-RET. El procedimiento incluye: poner en contacto una muestra de proteína con un reactivo que se une específicamente a un polipéptido de fusión KIF5B-RET; y detectar la formación de un complejo del polipéptido de fusión KIF5B-RET y el reactivo. En una realización, el reactivo se marca con un grupo detectable para facilitar la detección del reactivo unido y no unido. En una realización, el reactivo es una molécula de anticuerpo, por ejemplo, se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, y un derivado de anticuerpo, y un fragmento de anticuerpo.

[0068] En otra realización, se evalúa el nivel (por ejemplo, el nivel de expresión) o la actividad de la fusión KIF5B-RET. Por ejemplo, el nivel (por ejemplo, el nivel de expresión) o la actividad de la fusión KIF5B-RET (por ejemplo, ARNm o polipéptido) se detecta y (opcionalmente) se compara con un valor predeterminado, por ejemplo, un valor de referencia (por ejemplo, una muestra de control).

[0069] En otra realización, la fusión KIF5B-RET se detecta antes de iniciar, durante o después, un tratamiento en un sujeto, por ejemplo, un tratamiento con un inhibidor de la quinasa. En una realización, la fusión KIF5B-RET se detecta en el momento del diagnóstico con un cáncer. En otra realización, la fusión KIF5B-RET se detecta en un intervalo predeterminado, por ejemplo, un primer punto en el tiempo y al menos en un punto posterior en el tiempo.

[0070] En ciertas realizaciones, en respuesta a una determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET, el procedimiento incluye además uno o más de:

(1) estratificar una población de pacientes (por ejemplo, asignar un sujeto, por ejemplo, un paciente, a un grupo o clase);
(2) identificar o seleccionar al sujeto como probable o improbable que responda a un tratamiento, por ejemplo, un tratamiento con un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención;
(3) seleccionar una opción de tratamiento, por ejemplo, administrar o no administrar un agente terapéutico preseleccionado, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención; o
(4) pronosticar la evolución temporal de la enfermedad en el sujeto (por ejemplo, evaluar la probabilidad de aumento o disminución de la supervivencia del paciente).

[0071] En ciertas realizaciones, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de la quinasa múltiple o un inhibidor específico de RET. En una realización, el inhibidor de la quinasa se elige de entre lenvatinib (E7080), sorafenib (NEXAVAR®), sunitinib (SUTENT®, SU11248), vandetanib (CAPRELSA®, ZACTIMA®, ZD6474), NVP-AST487, regorafenib (BAY-73-4506), motesanib (AMG 706), cabozantinib (XL-184), apatinib (YN-968D1) o DCC-2157.

[0072] En ciertas realizaciones, en respuesta a la determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET, el sujeto se clasifica como candidato para recibir tratamiento con un inhibidor de la quinasa, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención. En una realización, en respuesta a la determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET, el sujeto, por ejemplo, un paciente, puede asignarse además a una clase particular si se identifica una fusión KIF5B-RET en una muestra del paciente. Por ejemplo, un paciente identificado con una fusión KIF5B-RET puede clasificarse como candidato para recibir tratamiento con un inhibidor de la quinasa, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención. En una realización, el sujeto, por ejemplo, un paciente, se asigna a una segunda clase si la mutación no está presente. Por ejemplo, un paciente que tiene un tumor de pulmón que no contiene una fusión KIF5B-RET, puede determinarse que no es un candidato para recibir un inhibidor de la quinasa, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención.

[0073] En otra realización, en respuesta a la determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET, se identifica al sujeto como probable que responda a un tratamiento que comprende un inhibidor de la quinasa, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención.

[0074] En otra realización, en respuesta a la determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET, el procedimiento incluye administrar al sujeto un inhibidor de la quinasa, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención.

Procedimiento de evaluación de un tumor o un sujeto

[0075] En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento de evaluación de un sujeto (por ejemplo, un paciente), por ejemplo, por riesgo de tener o desarrollar un cáncer, por ejemplo, un cáncer de pulmón, cáncer colorrectal. El procedimiento incluye: adquirir información o conocimiento de la presencia de una fusión KIF5B-RET en un sujeto (por ejemplo, adquirir información del genotipo del sujeto que identifica una fusión KIF5B-RET como presente en el sujeto); adquirir una secuencia para una molécula de ácido nucleico identificada en esta invención (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de fusión KIF5B-RET); o detectar la presencia de un ácido nucleico o polipéptido de fusión KIF5B-RET en el sujeto), en el que la presencia de la fusión KIF5B-RET se correlaciona positivamente con un mayor riesgo de tener un cáncer asociado con la fusión KIF5B-RET.

[0076] El procedimiento puede incluir además la(s) etapa(s) que consiste(n) en identificar (por ejemplo, evaluar, diagnosticar, cribar y/o seleccionar) al sujeto que está correlacionado positivamente con un mayor riesgo de tener un cáncer asociado con la fusión KIF5B-RET. En una realización, el sujeto se identifica o se selecciona como probable o improbable de que responda a un tratamiento, por ejemplo, un tratamiento inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención.

[0077] El procedimiento puede incluir además tratar al sujeto con un inhibidor de la quinasa, por ejemplo, un

inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención.

[0078] El procedimiento puede incluir además adquirir, por ejemplo, directa o indirectamente, una muestra de un paciente y evaluar la muestra para la presencia de una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención.

[0079] En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente o una población de pacientes que ha participado en un ensayo clínico. En una realización, el sujeto ha participado en un ensayo clínico para evaluar un inhibidor de la quinasa (por ejemplo, un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor de RET). En una realización, el ensayo clínico se suspende o termina. En otras realizaciones, el sujeto ha participado en un ensayo clínico que evalúa una quinasa RET, un inhibidor de KIF5B (por ejemplo, un inhibidor de la quinesina), un componente aguas arriba o aguas abajo de RET o KIF5B. En una realización, el sujeto respondió favorablemente al ensayo clínico, por ejemplo, experimentó una mejora en al menos un síntoma de un cáncer (por ejemplo, disminuyó el tamaño del tumor, la tasa de crecimiento del tumor, aumento de la supervivencia). En otras realizaciones, el sujeto no respondió de manera detectable al ensayo clínico.

[0080] En un aspecto relacionado, se proporciona un procedimiento de evaluación de un paciente o una población de pacientes. El procedimiento incluye: identificar, seleccionar u obtener información o conocimiento de que el paciente o la población de pacientes ha participado en un ensayo clínico;
adquirir información o conocimiento de la presencia de una fusión KIF5B-RET en el paciente o la población de pacientes (por ejemplo, adquirir información del genotipo del sujeto que identifica una fusión KIF5B-RET como presente en el sujeto); adquirir una secuencia para una molécula de ácido nucleico identificada en esta invención (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de fusión KIF5B-RET); o detectar la presencia de un ácido nucleico o polipéptido de fusión KIF5B-RET en el sujeto), en el que la presencia de la fusión KIF5B-RET identifica al paciente o la población de pacientes que tienen un mayor riesgo de tener un cáncer asociado con la fusión KIF5B-RET.

[0081] En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente o una población de pacientes que ha participado en un ensayo clínico. En una realización, el sujeto ha participado en un ensayo clínico para evaluar un inhibidor de la quinasa (por ejemplo, un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor de RET). En una realización, el ensayo clínico se suspende o termina. En otras realizaciones, el sujeto ha participado en un ensayo clínico que evalúa una quinasa RET, un inhibidor de KIF5B (por ejemplo, un inhibidor de quinesina), un componente aguas arriba o aguas abajo de RET o KIF5B. En una realización, el sujeto respondió favorablemente al ensayo clínico, por ejemplo, experimentó una mejora en al menos un síntoma de un cáncer (por ejemplo, disminuyó el tamaño del tumor, la tasa de crecimiento del tumor, aumento de la supervivencia). En otras realizaciones, el sujeto no respondió de manera detectable al ensayo clínico.

[0082] En algunos ejemplos, el procedimiento incluye además tratar al sujeto con un inhibidor de la quinasa, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa como se describe en esta invención.

Información

[0083] Los procedimientos descritos en esta invención pueden incluir proporcionar un informe, tal como, en formato electrónico, en línea o en papel, al paciente o a otra persona o entidad, por ejemplo, un cuidador, por ejemplo, un médico, por ejemplo, un oncólogo, un hospital, una clínica, una pagador externo, una compañía de seguros o una oficina gubernamental. El informe puede incluir la salida del procedimiento, por ejemplo, la identificación de los valores de los nucleótidos, la indicación de presencia o ausencia de una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención, o la secuencia de tipo natural. En una realización, se genera un informe, tal como en papel o en forma electrónica, que identifica la presencia o ausencia de una alteración descrita en esta invención, y opcionalmente incluye un identificador para el paciente del cual se obtuvo la secuencia.

[0084] El informe también puede incluir información sobre el papel de una secuencia, por ejemplo, una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención, o una secuencia de tipo natural, en la enfermedad. Dicha información puede incluir información sobre el pronóstico, la resistencia o las opciones terapéuticas posibles o sugeridas. El informe puede incluir información sobre la efectividad probable de una opción terapéutica, la aceptabilidad de una opción terapéutica o la conveniencia de aplicar la opción terapéutica a un paciente, por ejemplo, un paciente que tenga una secuencia, alteración o mutación identificada en la prueba, y en realizaciones, identificadas en el informe. Por ejemplo, el informe puede incluir información, o una recomendación, sobre la administración de un fármaco, por ejemplo, la administración con una dosis preseleccionada o en un régimen de tratamiento preseleccionado, por ejemplo, en combinación con otros fármacos, al paciente. En una realización, no todas las mutaciones identificadas en el procedimiento se identifican en el informe. Por ejemplo, el informe se puede limitar a mutaciones en genes que tienen un nivel de correlación preseleccionado con la ocurrencia, el pronóstico, el estadio o la susceptibilidad del cáncer al tratamiento, por ejemplo, con una opción terapéutica preseleccionada. El informe se puede entregar, por ejemplo, a una entidad descrita en esta invención, en un plazo de 7, 14 o 21 días a partir de la recepción de la muestra por parte de la entidad que practica el procedimiento.

[0085] En otro ejemplo, la descripción presenta un procedimiento para generar un informe, por ejemplo, un informe personalizado de tratamiento del cáncer, mediante la obtención de una muestra, por ejemplo, una muestra del tumor, de un sujeto, que detecta una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención en la muestra y selección de un tratamiento en función de la mutación identificada. En un ejemplo, se genera un informe que anota el tratamiento seleccionado, o que enumera, por ejemplo, en orden de preferencia, dos o más opciones de tratamiento basados en la mutación identificada. En otro ejemplo, al sujeto, por ejemplo, a un paciente, se le administra además el procedimiento de tratamiento seleccionado.

[0086] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta invención tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta invención se pueden utilizar en la práctica o el ensayo de la invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, los procedimientos y el ejemplo son solo ilustrativos y no tienen por objeto ser limitativos.

[0087] Los detalles de una o más realizaciones presentadas en la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas presentadas en la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0088]

FIG. 1 es una instantánea de las lecturas de secuencia que ilustran que hay pares de lectura RET que se asignan en un extremo a 5′KIF5B y en el otro extremo a 3′RET, y otros pares de lectura RET que se asignan en un extremo a 5′RET y en el otro extremo a 3′KIFB.

FIGs. 2A y 2B son diagramas esquemáticos que ilustran el evento de inversión que reúne el exón 15 de KIF5B y el exón 12 de RET.

FIGs. 3A a 3D son la secuencia de ADNc predicha (SEQ ID NO:1) y la secuencia proteica de la fusión KIF5B-RET (SEQ ID NO:2). La porción KIF5B de la secuencia de ADNc es equivalente a los nucleótidos 471-2195 de RefSeq NM_004521.2, y la porción KIF5B de la secuencia proteica es equivalente a los aminoácidos 1-575 de RefSeq NP_004512. Las porciones KIF5B de las secuencias de ADNc y de proteínas están subrayadas. La porción RET de la secuencia de ADNc es equivalente a los nucleótidos 2327-3535 de RefSeq NM_020975, y la porción RET de la secuencia de proteína es equivalente a los aminoácidos 713-1114 de RefSeq NP_066124.1. El dominio de tirosina quinasa intacto de RET se representa mediante un recuadro gris (véase la FIG. 3C).

FIGs. 4A a 4D son la secuencia de ADNc predicha (SEQ ID NO:3) y la secuencia proteica de la fusión RET-KIF5B (SEQ ID NO:4). La secuencia de ADNc de la porción RET del transcrito de fusión es equivalente a los nucleótidos 190-2326 de RefSeq NM_020975, y la secuencia de proteína es equivalente a los aminoácidos 1-712 de RefSeq NP_066124.1. La secuencia de ADNc de la porción KIF5B del transcrito de fusión es equivalente a los nucleótidos 2196-3362 de RefSeq NM_004521.2, y la porción de proteína es equivalente a los aminoácidos 576-963 de RefSeq NP_004512. Las porciones KIF5B del ADNc y las secuencias de proteínas están subrayadas.

FIG. 5 es un resumen de las alteraciones del ADN identificadas en células de cáncer colorrectal.

FIG. 6A proporciona una representación esquemática de la inversión de 11,294,741 pb en NSCLC que genera una fusión de genes KIF5B-RET en marco (no a escala). La región invertida del cromosoma 10 comienza a 32,316,377 pbs (dentro del intrón 15 de KIF5B) y termina en 43,611,118 pbs (dentro del intrón 11 de RET).

FIG. 6B es un esquema de la estructura del dominio de la proteína de las fusiones de los genes *RET-KIF5B* y *KIF5B-RET*. El dominio de cadherina de *RET* se incluye en la proteína *RET-KIF5B* predicha. La quinesina y los dominios de hélice superenrollada de *KIF5B* y el dominio tirosina quinasa de *RET* se incluyen en la proteína de fusión *KIF5B-RET*. La RT-PCR del cebador diseñado para el exón 11 de *RET* y el exón 16 de *KIF5B* no produjo ningún producto. La RT-PCR del cebador diseñado para el exón 15 de KIF5B y el exón 12 de RET produjo un producto fuerte (datos no mostrados).

FIG. 6C es una fotografía que representa la distribución de la expresión de RET en el caso de NSCLC con fusión de RET confirmada en la secuenciación de ADN por NGS. Tenga en cuenta la inmunorreactividad citoplásmica moderada focal para la expresión de la proteína RET (avidina-biotina peroxidasa X 200). El detalle de gran aumento de la inmunotinción citoplásmica para RET se muestra en el inserto en la parte inferior derecha.

FIG. 6D es un resumen de los exones presentes o ausentes en la fusión KIF5B-RET.

FIG. 7A proporciona otra representación esquemática de la fusión KIF5B-RET. Esta variante se identificó en 8 casos de CRC, en los que el exón 15 de KIF5B se fusiona en marco con el exón 12 de RET. La proteína de fusión de longitud completa predicha tiene una longitud de 977 aminoácidos, con los aminoácidos 1-575 derivados de KIF5B y los aminoácidos 576-977 derivados de RET (mostrado anteriormente). La confirmación de la secuencia capilar de los límites de la unión del exón derivados del ADNc se muestra a continuación.

Figura 7B es otra representación de la secuencia de aminoácidos variante de KIF5B-RET predicha.

FIG. 8 es un gráfico que muestra los efectos de diferentes fármacos en células Ba/F3 transfectadas con construcciones de fusión KIF5B-RET.

FIG. 9 es una membrana Western que muestra los efectos de sunitinib y gefitinib sobre la fosforilación de RET en

células Ba/R3 que expresan KIF5B-RET.

[0089] Las Tablas se describen en esta invención.

[0090] La Tabla 1 es un resumen de la distribución de 125 mutaciones de CRC en 21 genes de cáncer mutados.

[0091] La Tabla 2 proporciona un resumen de los pacientes con CPNM analizados por inmunohistoquímica de RET.

[0092] La Tabla 1a complementaria proporciona un listado de los 145 genes secuenciados en toda la secuencia de codificación.

[0093] La Tabla 1b complementaria proporciona un listado de los 14 genes secuenciados entre los intrones seleccionados.

[0094] La Tabla 2a complementaria proporciona un resumen detallado de las alteraciones detectadas en 40 casos de cáncer colorrectal.

[0095] La Tabla 2b complementaria proporciona un resumen detallado de las alteraciones detectadas en 24 casos de NSCLC.

[0096] La Tabla complementaria 3 proporciona un resumen de las alteraciones que podrían estar vinculadas con una opción de tratamiento clínico o un ensayo clínico de nuevas terapias dirigidas.

[0097] La Tabla 4 complementaria proporciona una distribución de 51 mutaciones en 21 genes de NSCLC mutados.

[0098] La Tabla 5 complementaria proporciona un resumen de las alteraciones de NSCLC que podrían estar vinculadas a una opción de tratamiento clínico o un ensayo clínico o nuevas terapias dirigidas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0099] La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de un nuevo evento de inversión cromosómica y su asociación con el cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón. En una realización, los solicitantes han descubierto una inversión en el cromosoma 10 que da como resultado una fusión en marco de un fragmento de un gen KIF5B y un fragmento de un gen RET.

[0100] El término «KIF5B-RET» o «fusión KIF5B-RET» se utiliza genéricamente en esta invención, e incluye cualquier molécula de fusión (por ejemplo, gen, producto génico (por ejemplo, ADNc, ARNm, polipéptido), y una variante de la misma) que incluye un fragmento de KIF5B y un fragmento de RET, en cualquier configuración, que incluye, por ejemplo, una molécula de fusión 5'KIF5B-3′RET o 5'RET-3′KIF5B.

[0101] En una realización, una fusión KIF5B-RET incluye una fusión en marco de un exón de KIF5B (por ejemplo, uno o más exones que codifican un dominio motor de quinesina o un fragmento del mismo) y un exón de RET (por ejemplo, uno o más exones que codifican un dominio de tirosina quinasa RET o un fragmento del mismo). Por ejemplo, la fusión KIF5B-RET puede incluir una fusión en marco de al menos el exón 15 de KIF5B o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 1-15 de KIF5B o un fragmento de los mismos) con al menos el exón 12 de RET o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 12-20 de RET o un fragmento de los mismos). En ciertas realizaciones, la fusión KIF5B-RET está en una configuración 5'-KIF5B a 3′-RET referida en esta invención como «5′KIF5B-3′RET».

[0102] En otras realizaciones, la fusión KIF5B-RET incluye una fusión en marco de al menos el exón 11 de RET o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 1-11 de RET o un fragmento del mismo) con al menos el exón 16 o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 16-25 de KIF5B o un fragmento de los mismos). En ciertas realizaciones, la fusión KIF5B-RET está en una configuración 5'-RET a 3′-KIF5B referida en esta invención como «5′RET-3′KIF5B»).

[0103] Se sabe que el proto-oncogén RET está asociado con fenotipos cancerosos, que incluyen carcinomas papilares de tiroides (PTC, por sus siglas en inglés), neoplasias endocrinas múltiples (MEN, por sus siglas en inglés), feocromocitoma, entre otros. Por ejemplo, se sabe que los reordenamientos cromosómicos que generan un gen de fusión que resulta en la yuxtaposición de la región C-terminal de la proteína RET con una porción N-terminal de otra proteína (conocida como RET/PTC) están asociados con PTC (Nikiforov, YE (2002) Endocr. Pathol. 13 (1):3-16). Así, las fusiones KIF5B-RET descritas en esta invención (por ejemplo, las fusiones 5'-KIF5B a 3'-RET que incluyen un dominio tirosina quinasa RET) están probablemente asociadas con cánceres, por ejemplo, cáncer de pulmón.

[0104] Por consiguiente, la descripción proporciona, al menos en parte, moléculas de ácido nucleico KIF5B-RET aisladas, construcciones de ácido nucleico, células huésped que contienen las moléculas de ácido nucleico; polipéptidos KIF5B-RET purificados y agentes de unión; reactivos de detección (por ejemplo, sondas, cebadores, anticuerpos, kits); ensayos de cribado para identificar nuevos inhibidores de quinasa; así como los procedimientos, ensayos y kits para evaluar, identificar, determinar y/o tratar a un sujeto que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer que tiene una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención. Las composiciones y procedimientos identificados en esta invención se pueden utilizar, por ejemplo, para identificar nuevos inhibidores de KIF5B-RET; para tratar o prevenir un cáncer; así como procedimientos o ensayos para evaluar un cáncer (p. ej., evaluar uno o más de: progresión del cáncer, en respuesta al tratamiento del cáncer o resistencia al tratamiento del cáncer; seleccionar una opción de tratamiento, estratificar una población de pacientes y/o controlar más eficazmente, tratar o prevenir un cáncer).

[0105] Ciertos términos se definen primero. Los términos adicionales se definen a lo largo de la memoria descriptiva.

[0106] Como se utiliza en esta invención, los artículos «uno» y «una» se refieren a uno o más de uno (por ejemplo, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo.

[0107] El término «o» se utiliza en esta invención para significar, y se utiliza indistintamente con el término «y/o», a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0108] «Sobre» y «aproximadamente» significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), generalmente, dentro del 10 %, y más normalmente, dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado.

[0109] «Adquirir» o «adquisición» según los término que se utilizan en esta invención, se refiere a obtener una posesión de una entidad física, o un valor, por ejemplo, un valor numérico, mediante la «adquisición directa» o la «adquisición indirecta» de la entidad física o el valor. «Adquirir directamente» significa realizar un procedimiento (por ejemplo, realizar un procedimiento sintético o analítico) para obtener la entidad física o el valor. «Adquirir indirectamente» se refiere a recibir la entidad física o el valor de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de terceros que adquirió directamente la entidad física o el valor). Adquirir directamente una entidad física incluye realizar un procedimiento que incluye un cambio físico en una sustancia física, por ejemplo, un material de partida. Los cambios ejemplares incluyen hacer una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cortar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, realizar una reacción química que incluya romper o formar un enlace covalente o no covalente. La adquisición directa de un valor incluye realizar un procedimiento que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo, realizar un procedimiento analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, por ejemplo, una muestra, analito o reactivo (algunas veces referido en esta invención como «análisis físico»), que realiza un procedimiento analítico, por ejemplo, un procedimiento que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, por ejemplo, un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, de otra sustancia; combinar un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, por ejemplo, un tampón, disolvente o reactivo; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo, rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiar la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo, rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

[0110] «Adquirir una secuencia» como el término que se utiliza en esta invención, se refiere a obtener la posesión de una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, mediante la «adquisición directa» o la «adquisición indirecta» de la secuencia. «Adquirir una secuencia directamente» significa realizar un procedimiento (por ejemplo, realizar un procedimiento sintético o analítico) para obtener la secuencia, tal como realizar un procedimiento de secuenciación (por ejemplo, un procedimiento de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés)). «Adquirir una secuencia indirectamente» se refiere a recibir información o conocimiento de, o recibir, la secuencia de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de un tercero que adquirió la secuencia directamente). La secuencia adquirida no necesita ser una secuencia completa, por ejemplo, la secuenciación de al menos un nucleótido, u obtener información o conocimiento, que identifique una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención ya que estar presente en un sujeto constituye la adquisición de una secuencia.

[0111] La adquisición directa de una secuencia incluye realizar un procedimiento que incluye un cambio físico en una sustancia física, por ejemplo, un material de partida, como una muestra de tejido, por ejemplo, una biopsia, o una muestra de ácido nucleico aislado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cambios ejemplares incluyen crear una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cortando o fragmentando una sustancia, tal como un fragmento de ADN genómico; separar o purificar una sustancia (por ejemplo, aislar una muestra de ácido nucleico de un tejido); combinando dos o más entidades separadas en una mezcla, realizando una reacción química que incluye

romper o formar un enlace covalente o no covalente. La adquisición directa de un valor incluye la realización de un procedimiento que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia como se describe anteriormente.

[0112] «Adquirir una muestra», como se utiliza en esta invención, se refiere a obtener la posesión de una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de ácido nucleico, mediante la «adquisición directa» o la «adquisición indirecta» de la muestra. «Adquirir directamente una muestra» significa realizar un procedimiento (por ejemplo, realizar un procedimiento físico como una cirugía o extracción) para obtener la muestra. «Adquirir una muestra indirectamente» se refiere a recibir la muestra de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de un tercero que adquirió la muestra directamente). La adquisición directa de una muestra incluye la realización de un procedimiento que incluye un cambio físico en una sustancia física, por ejemplo, un material de partida, como un tejido, por ejemplo, un tejido en un paciente humano o un tejido que se aisló previamente de un paciente. Los cambios ejemplares incluyen crear una entidad física a partir de un material de partida, diseccionar o raspar un tejido; separar o purificar una sustancia (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de ácido nucleico); combinar dos o más entidades separadas en una mezcla; realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. La adquisición directa de una muestra incluye la realización de un procedimiento que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo, como se describió anteriormente.

[0113] «Entidad de unión» significa cualquier molécula a la que se puede unir directa o indirectamente etiquetas moleculares que sean capaces de unirse específicamente a un analito. La entidad de unión puede ser una etiqueta de afinidad en una secuencia de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la entidad de unión permite la separación del ácido nucleico de una mezcla, tal como una molécula de avidina, o un anticuerpo que se une al hapteno o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Las entidades de unión ejemplares incluyen, pero no se limitan a, una molécula de biotina, un hapteno, un anticuerpo, un fragmento de unión al anticuerpo, un péptido y una proteína.

[0114] «Complementario» se refiere a la secuencia complementaria entre regiones de dos cadenas de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico. Se sabe que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno específicos («apareamiento de bases») con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalelo a la primera región si el residuo es timina o uracilo. De manera similar, se sabe que un residuo de citosina de una primera cadena de ácido nucleico es capaz de emparejar bases con un residuo de una segunda cadena de ácido nucleico que es antiparalelo a la primera cadena si el residuo es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria de una segunda región del mismo ácido nucleico o un ácido nucleico diferente si, cuando las dos regiones están dispuestas de forma antiparalela, al menos un residuo de nucleótido de la primera región es capaz de emparejar bases con un residuo de la segunda región. En ciertas realizaciones, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo que, cuando las primera y segunda porciones están dispuestas de forma antiparalela, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 % de los residuos de nucleótidos de la primera porción son capaces de aparear bases con residuos de nucleótidos en la segunda porción. En otras realizaciones, todos los residuos de nucleótidos de la primera porción son capaces de aparear bases con residuos de nucleótidos en la segunda porción.

[0115] El término «cáncer» o «tumor» se utiliza indistintamente en esta invención. Estos términos se refieren a la presencia de células que poseen características típicas de las células que causan cáncer, como la proliferación no controlada, la inmortalidad, el potencial metastásico, el rápido crecimiento y la tasa de proliferación, y ciertas características morfológicas características. Las células cancerosas a menudo se encuentran en forma de un tumor, pero tales células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden ser una célula cancerosa no tumorigénica, como una célula leucémica. Estos términos incluyen un tumor sólido, un tumor de tejidos blandos o una lesión metastásica. Como se utiliza en esta invención, el término «cáncer» incluye cánceres premalignos así como malignos.

[0116] El cáncer se «inhibe» si al menos un síntoma del cáncer se alivia, se anula, se reduce o se evita. Como se utiliza en esta invención, el cáncer también se «inhibe» si la recurrencia o metástasis del cáncer se reduce, disminuye, retrasa o previene.

[0117] «Agente quimioterapéutico» significa una sustancia química, como un agente citotóxico o citostático, que se utiliza para tratar una afección, en particular el cáncer.

[0118] Como se utiliza en esta invención, «terapia contra el cáncer» y «tratamiento contra el cáncer» son términos sinónimos.

[0119] Como se utiliza en esta invención, «quimioterapia» y «quimioterapéutico» y «agente quimioterapéutico» son términos sinónimos.

[0120] Los términos «homología» o «identidad», como se utilizan indistintamente en esta invención, se

refieren a la similitud de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos o entre dos secuencias de polipéptidos, siendo la identidad una comparación más estricta. Las frases «porcentaje de identidad u homología» y «% de identidad u homología» se refieren al porcentaje de similitud de secuencia que se encuentra en una comparación de dos o más secuencias de polinucleótidos o dos o más secuencias de polipéptidos. «Similitud de secuencia» se refiere al porcentaje de similitud en la secuencia de pares de bases (según lo determinado por cualquier procedimiento adecuado) entre dos o más secuencias de polinucleótidos. Dos o más secuencias pueden ser de 0-100 % similares, o cualquier valor entero entre ellas. La identidad o similitud se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base de nucleótidos o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre secuencias de polinucleótidos es una función del número de nucleótidos idénticos o coincidentes en posiciones compartidas por las secuencias de polinucleótidos. Un grado de identidad de las secuencias polipeptídicas es una función del número de aminoácidos idénticos en las posiciones compartidas por las secuencias polipeptídicas. Un grado de homología o similitud de secuencias polipeptídicas es una función del número de aminoácidos en posiciones compartidas por las secuencias polipeptídicas. El término «sustancialmente idéntico», como se utiliza en esta invención, se refiere a una identidad u homología de al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.

[0121] «Probable» o «mayor probabilidad», como se utiliza en esta invención, se refiere a una mayor probabilidad de que ocurra un artículo, objeto, cosa o persona. Así, en un ejemplo, un sujeto que es probable que responda al tratamiento con un inhibidor de la quinasa, solo o en combinación, tiene una mayor probabilidad de responder al tratamiento con el inhibidor solo o en combinación, en relación con un sujeto o un grupo de sujetos de referencia.

[0122] «Poco probable que» se refiere a una menor probabilidad de que ocurra un evento, artículo, objeto, cosa o persona con respecto a una referencia. Por lo tanto, un sujeto que es poco probable que responda al tratamiento con un inhibidor de la quinasa, solo o en combinación, tiene una menor probabilidad de responder al tratamiento con un inhibidor de la quinasa, solo o en combinación, en relación con un sujeto o grupo de sujetos de referencia.

[0123] La «secuenciación» de una molécula de ácido nucleico requiere determinar la identidad de al menos 1 nucleótido en la molécula. En realizaciones, se determina la identidad de menos de todos los nucleótidos en una molécula. En otras realizaciones, se determina la identidad de una mayoría o todos los nucleótidos en la molécula.

[0124] «Secuenciación de próxima generación o NGS o secuenciación NG», como se utiliza en esta invención, se refiere a cualquier procedimiento de secuenciación que determina la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico individuales (por ejemplo, en la secuenciación de una sola molécula) o proxies clonalmente expandidos para moléculas de ácido nucleico individuales en un forma altamente paralela (p. ej., más de 10^5 moléculas se secuencian simultáneamente). En una realización, la abundancia relativa de las especies de ácido nucleico en la biblioteca puede estimarse contando el número relativo de ocurrencias de sus secuencias relacionadas en los datos generados por el experimento de secuenciación. Los procedimientos de secuenciación de próxima generación son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Metzker, M. (2010) Nature Biotechnology Reviews 11:31-46. La secuenciación de próxima generación puede detectar una variante presente en menos del 5 % de los ácidos nucleicos en una muestra.

[0125] «Muestra», «muestra de tejido», «muestra de paciente», «muestra de tejido o célula de paciente» o «espécimen» se refiere a una colección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido como un órgano fresco, congelado y/o preservado, muestra de tejido, biopsia o aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como fluido cefalorraquídeo, fluido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial; o células de cualquier momento de gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede contener compuestos que no se mezclan naturalmente con la naturaleza del tejido, como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares. En una realización, la muestra se conserva como una muestra congelada o como preparación de tejido embebido en parafina y fijado con formaldehído o paraformaldehído (FFPE). Por ejemplo, la muestra se puede embeber en una matriz, por ejemplo, un bloque de FFPE o una muestra congelada.

[0126] Una «muestra de ácido nucleico tumoral», como se utiliza en esta invención, se refiere a moléculas de ácido nucleico de una muestra de tumor o cáncer. Normalmente, es ADN, por ejemplo, ADN genómico o ADNc derivado de ARN, de un tumor o muestra de cáncer. En ciertas realizaciones, la muestra de ácido nucleico tumoral se purifica o se aísla (por ejemplo, se elimina de su estado natural).

[0127] Una «muestra de ácido nucleico» de «control» o «referencia» como se utiliza en esta invención, se refiere a las moléculas de ácido nucleico de una muestra de control o referencia. Normalmente, es ADN, por ejemplo, ADN genómico o ADNc derivado de ARN, que no contiene la alteración o variación en el gen o producto génico, por ejemplo, que no contiene una fusión KIF5B-RET. En ciertas realizaciones, la muestra de ácido nucleico

de referencia o de control es una secuencia de tipo natural o no mutada. En ciertas realizaciones, la muestra de ácido nucleico de referencia se purifica o se aísla (por ejemplo, se elimina de su estado natural). En otras realizaciones, la muestra de ácido nucleico de referencia procede de una muestra no tumoral, por ejemplo, un control de sangre, un tumor adyacente normal (NAT, por sus siglas en inglés), o cualquier otra muestra no cancerosa del mismo sujeto o un sujeto diferente.

[0128] Los encabezados, por ejemplo, (a), (b), (i) etc., se presentan simplemente para facilitar la lectura de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. El uso de encabezados en la memoria descriptiva o las reivindicaciones no requiere que las etapas o elementos se realicen en orden alfabético o numérico o en el orden en que se presentan.

[0129] Varios aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación. Definiciones adicionales se establecen a lo largo de la memoria descriptiva.

Moléculas de ácido nucleico aislado

[0130] Un ejemplo de la descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico aislado que incluyen una fusión KIF5B-RET, incluyendo ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión KIF5B-RET o una porción de dicho polipéptido. Las moléculas de ácido nucleico incluyen aquellas moléculas de ácido nucleico que residen en regiones genómicas identificadas en esta invención. Como se utiliza en esta invención, el término «molécula de ácido nucleico» incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generado utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria; en ciertos ejemplos, la molécula de ácido nucleico es ADN bicatenario.

[0131] Las moléculas de ácido nucleico aisladas también incluyen moléculas de ácido nucleico suficientes para utilizarse como sondas de hibridación o cebadores para identificar moléculas de ácido nucleico que corresponden a una fusión KIF5B-RET, por ejemplo, aquellas adecuadas para su uso como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico.

[0132] Una molécula de ácido nucleico «aislada» es aquella que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. En ciertos ejemplos, una molécula de ácido nucleico «aislada» está libre de secuencias (como las secuencias codificantes de proteínas) que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, las secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversos ejemplos, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kB, menos de aproximadamente 4 kB, menos de aproximadamente 3 kB, menos de aproximadamente 2 kB, menos de aproximadamente 1 kB, menos de aproximadamente 0,5 kB o menos de aproximadamente 0,1 kB de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico «aislada», como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

[0133] El lenguaje «sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo» incluye preparaciones de moléculas de ácido nucleico en las que la molécula se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o produce de forma recombinante. Así, la molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de molécula de ácido nucleico que tiene menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 5 % (en peso seco) de otro material celular o medio de cultivo.

[0134] Una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET se puede aislar utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de la secuencia en los registros de la base de datos descritos en esta invención. Utilizando todas o una porción de tales secuencias de ácido nucleico, las moléculas de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET pueden aislarse utilizando técnicas estándar de hibridación y clonación (por ejemplo, como se describe en Sambrook y col., Ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

[0135] Una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET se puede amplificar utilizando ADNc, ARNm o ADN genómico como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados según las técnicas de amplificación por PCR estándar. Las moléculas de ácido nucleico así amplificadas pueden clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la totalidad o a una porción de una molécula de ácido nucleico de la descripción se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

[0136] En otro ejemplo, una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET comprende una molécula de

ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET o a la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión KIF5B-RET. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos dada es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos dada que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos dada formando así un dúplex estable.

[0137] Además, una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET puede comprender solo una porción de una secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de ácido nucleico de longitud completa o que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar, por ejemplo, como una sonda o cebador. La sonda/cebador se utiliza normalmente como uno o más oligonucleótidos sustancialmente purificados. El oligonucleótido comprende normalmente una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1 kb, al menos aproximadamente 2 kb, al menos aproximadamente 3 kb, al menos aproximadamente 4 kb, al menos aproximadamente 5 kb, al menos aproximadamente 6 kb, al menos aproximadamente 7 kb, al menos aproximadamente 8 kb, al menos aproximadamente 9 kb, al menos aproximadamente 10 kb, al menos aproximadamente 15 kb, al menos aproximadamente 20 kb, al menos aproximadamente 25 kb, al menos aproximadamente 30 kb, al menos aproximadamente 35 kb, al menos aproximadamente 40 kb, al menos aproximadamente 45 kb, al menos aproximadamente 50 kb, al menos aproximadamente 60 kb, al menos aproximadamente 70 kb, al menos aproximadamente 80 kb, al menos aproximadamente 90 kb, al menos aproximadamente 100 kb, al menos una aproximadamente 200 kb, al menos aproximadamente 300 kb, al menos aproximadamente 400 kb, al menos aproximadamente 500 kb, al menos aproximadamente 600 kb, al menos aproximadamente 700 kb, al menos aproximadamente 800 kb, al menos aproximadamente 900 kb, al menos aproximadamente 1 mb, al menos aproximadamente 2 mb, al menos aproximadamente 3 mb, al menos aproximadamente 4 mb, al menos aproximadamente 5 mb, al menos aproximadamente 6 mb, al menos aproximadamente 7 mb, al menos aproximadamente 8 mb, al menos aproximadamente 9 mb, al menos aproximadamente 10 mb o más nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET.

[0138] La descripción abarca además moléculas de ácido nucleico que son sustancialmente idénticas a las mutaciones genéticas y/o productos genéticos descritos en esta invención, por ejemplo, fusión KIF5B-RET que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o 2, o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 o 4) de modo que sean al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o más. En otros ejemplos, la descripción abarca además moléculas de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas a las mutaciones del gen de fusión KIF5B-RET y/o productos génicos descritos en esta invención, de manera que difieren en solo o al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600 nucleótidos o cualquier intervalo intermedio.

[0139] En otro ejemplo, una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET aislada es al menos 7, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 550, al menos 650, al menos 700, al menos 800, al menos 900, al menos 1000, al menos 1200, al menos 1400, al menos 1600, al menos 1800, al menos 2.000, al menos 2.200, al menos 2.400, al menos 2.600, al menos 2.800, al menos 3.000 o más nucleótidos de longitud y se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET o a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína correspondiente a un marcador de la descripción.

[0140] Como se utiliza en esta invención, el término «se hibrida en condiciones rigurosas» tiene por objeto describir las condiciones para la hibridación y el lavado en las que las secuencias de nucleótidos son al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 % o al menos 85 % idénticas entre sí permanecen normalmente hibridadas entre sí. Tales condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la materia y se pueden encontrar en las secciones 6.3.1-6.3.6 de Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). Otro ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en 6X de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 ºC, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 50-65 ºC.

[0141] La descripción también incluye moléculas de ácido nucleico de baliza molecular que tienen al menos una región que es complementaria a una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET, de modo que la baliza molecular es útil para cuantificar la presencia de la molécula de ácido nucleico de la descripción en una muestra. Un ácido nucleico de «baliza molecular» es una molécula de ácido nucleico que comprende un par de regiones complementarias y que tiene un fluoróforo y un extintor fluorescente asociado con el mismo. El fluoróforo y el extintor están asociados con diferentes porciones del ácido nucleico en una orientación tal que cuando las regiones complementarias se aparean unas con otras, la fluorescencia del fluoróforo es extinguida por el extintor. Cuando las regiones complementarias de las moléculas de ácido nucleico no están apareadas unas con otras, la fluorescencia del fluoróforo se extingue en menor grado. Las moléculas de ácido nucleico de baliza molecular se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.876.930.

Sondas

[0142] La descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico KIF5B-RET aisladas útiles como sondas.

[0143] Las sondas basadas en la secuencia de una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET se pueden utilizar para detectar transcritos o secuencias genómicas correspondientes a uno o más marcadores de la descripción. La sonda comprende un grupo marcador unido al mismo, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor de enzima. Dichas sondas se pueden utilizar como parte de un kit de prueba para identificar células o tejidos que expresan la proteína KIF5B-RET, tal como al medir los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína en una muestra de células de un sujeto, por ejemplo, detectar niveles de ARNm o determinar si un gen que codifica la proteína ha sido mutado o delecionado.

[0144] Las sondas presentadas en la descripción incluyen aquellas que se hibridarán específicamente a una secuencia de genes descrita en el Ejemplo, por ejemplo, una fusión KIF5B-RET. Normalmente, estas sondas tienen una longitud de 12 a 20, por ejemplo, de 17 a 20 nucleótidos (más largas para grandes inserciones) y tienen la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región de las mutaciones en sus ubicaciones de nucleótidos respectivas en la secuencia del gen. Dichas moléculas pueden marcarse según cualquier técnica conocida en la técnica, tal como con radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores de secuencia, biotina, otros ligandos, etc. Como se utiliza en esta invención, una sonda que «se hibrida específicamente» a una secuencia del gen de fusión KIF5B-RET se hibridará en condiciones de alta rigurosidad.

[0145] Una sonda contendrá normalmente una o más de las mutaciones específicas descritas en esta invención. Normalmente, una sonda de ácido nucleico abarcará solo una mutación. Dichas moléculas pueden estar marcadas y pueden utilizarse como sondas específicas de alelos para detectar la mutación de interés.

[0146] En un ejemplo, la descripción presenta una sonda o conjunto de sondas que se hibrida específicamente a un ácido nucleico que comprende una inversión que da como resultado una fusión KIF5B-RET.

[0147] También se proporcionan pares aislados de sondas oligonucleotídicas específicas del alelo, en los que la primera sonda del par se hibrida específicamente al alelo mutante, y la segunda sonda del par se hibrida específicamente al alelo de tipo natural. Por ejemplo, en un par de sondas ejemplar, una sonda reconocerá la unión de fusión en la fusión KI5B-RET, y la otra sonda reconocerá una secuencia aguas abajo o aguas arriba de KIF5B o RET, ninguna de las cuales incluye la unión de fusión. Estas sondas específicas de alelos son útiles para detectar una mutación somática de RET en una muestra de tumor, por ejemplo, una muestra de tumor de pulmón.

Cebadores

[0148] La descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas útiles como cebadores.

[0149] El término «cebador», como se utiliza en esta invención, se refiere a una secuencia que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, por ejemplo, más de tres y más de ocho, o al menos 20 nucleótidos de un gen descrito en el Ejemplo, en el que la secuencia corresponde a una secuencia que flanquea una de las mutaciones o una secuencia de tipo natural de un gen identificado en el Ejemplo, por ejemplo, un gen KIF5B o RET. Los cebadores pueden utilizarse para iniciar la síntesis de ADN mediante la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o un procedimiento de secuenciación. Los cebadores presentados en la descripción incluyen las secuencias recitadas y las secuencias complementarias que se aparearán con la cadena de ADN opuesta de la muestra diana. Dado que ambas cadenas de ADN son complementarias y se reflejan entre sí, se amplificará el mismo segmento de ADN.

[0150] Los cebadores pueden utilizarse para secuenciar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico aislado descrito en esta invención, tal como por un procedimiento de NGS, o para amplificar un gen descrito en el Ejemplo, tal como por PCR. Los cebadores pueden hibridarse específicamente, por ejemplo, con los extremos de los

exones o con los intrones que flanquean los exones. El segmento amplificado puede a continuación analizarse para determinar la presencia de la mutación, tal como mediante un procedimiento de secuenciación. Los cebadores son útiles para dirigir la amplificación de un polinucleótido diana antes de la secuenciación. En otro ejemplo, la descripción presenta un par de cebadores oligonucleotídicos que amplifican una región que contiene o es adyacente a una unión de fusión identificada en el Ejemplo. Tales cebadores son útiles para dirigir la amplificación de una región diana que incluye una unión de fusión identificada en el Ejemplo, por ejemplo, antes de la secuenciación. El cebador contiene normalmente 12 a 20, o 17 a 20, o más nucleótidos, aunque un cebador puede contener menos nucleótidos.

[0151] Un cebador es normalmente monocatenario, por ejemplo, para su uso en procedimientos de secuenciación o amplificación, pero puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se puede tratar primero para separar sus cadenas antes de utilizarlo para preparar productos de extensión. Un cebador ha de ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor para la polimerización. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluidos las aplicaciones (por ejemplo, procedimiento de amplificación), temperatura, tampón y composición de nucleótidos. Un cebador contiene normalmente 12-20 o más nucleótidos, aunque un cebador puede contener menos nucleótidos.

[0152] Los cebadores se diseñan normalmente para ser «sustancialmente» complementarios a cada cadena de un *locus* genómico que se amplificará. Por lo tanto, los cebadores han de ser lo suficientemente complementarios para hibridarse específicamente con sus respectivas cadenas en condiciones que permitan que el agente de polimerización se realice. En otras palabras, los cebadores deben tener suficiente complementariedad con las secuencias 5 'y 3' que flanquean la mutación para hibridarse con ellas y permitir la amplificación del locus genómico.

[0153] El término «sustancialmente complementario a» o «sustancialmente la secuencia» se refiere a secuencias que se hibridan con las secuencias proporcionadas en condiciones rigurosas y/o secuencias que tienen suficiente homología con una secuencia que comprende una unión de fusión identificada en el Ejemplo, o la secuencia homóloga de tipo natural, de modo que los oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con la secuencia. En un ejemplo, una secuencia es sustancialmente complementaria a una unión de fusión en un evento de inversión, por ejemplo, a una unión de fusión en la SEQ ID NO:1. «Sustancialmente lo mismo», al igual que se refiere a secuencias de oligonucleótidos, también se refiere a la capacidad funcional de hibridarse o aparearse con suficiente especificidad para distinguir entre la presencia o ausencia de la mutación. Esto se puede medir porque la temperatura de fusión es lo suficientemente diferente para permitir una fácil identificación de si el oligonucleótido se está uniendo a la secuencia del gen normal o mutante identificada en el Ejemplo.

[0154] En un ejemplo, la descripción presenta un cebador o conjunto de cebadores para amplificar un ácido nucleico que comprende una inversión que da como resultado una fusión KIF5B-RET.

[0155] También se proporcionan pares aislados de cebadores oligonucleotídicos específicos del alelo, en los que el primer cebador del par se hibrida específicamente con el alelo mutante, y el segundo cebador del par se hibrida específicamente con una secuencia aguas arriba o aguas abajo de una mutación, o una unión de fusión resultante de, por ejemplo, una inversión, duplicación, deleción, inserción o translocación. Por ejemplo, en un par de cebadores ejemplares, una sonda reconocerá una inversión KIF5B-RET, tal como mediante la hibridación a una secuencia en la unión de fusión entre los transcritos KIF5B y RET, y el otro cebador reconocerá una secuencia aguas arriba o agua abajo de la unión de fusión. Estos cebadores específicos de alelo son útiles para amplificar una secuencia de fusión KIF5B-RET de una muestra tumoral, por ejemplo, un adenocarcinoma, tal como un adenocarcinoma de pulmón.

[0156] En otro par de cebadores ejemplares, un cebador puede reconocer una inversión RET-KIF5B (por ejemplo, el recíproco de la inversión KIF5B-RET), tal como mediante la hibridación con una secuencia en la unión de fusión entre los transcritos RET y KIF5B, y el otro cebador reconocerá una secuencia aguas arriba o aguas abajo de la unión de fusión. Estos cebadores específicos de alelo son útiles para amplificar una secuencia de fusión RET-KIF5B de una muestra tumoral, por ejemplo, un adenocarcinoma, tal como un adenocarcinoma de pulmón.

[0157] Los cebadores pueden prepararse utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como los procedimientos convencionales de fosfotriéster y fosfodiéster o ejemplos automatizados de los mismos. En uno de tales ejemplos automatizados, las dietilfosforamiditas se utilizan como materiales de partida y pueden sintetizarse como describen Beaucage, y col., Tetrahedron Letters, 22: 1859-1862, (1981). Un procedimiento para sintetizar oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.458.066.

[0158] Una sonda de oligonucleótido o cebador que se hibrida con un alelo mutante o de tipo natural se dice que es el complemento del alelo. Como se utiliza en esta invención, una sonda exhibe una «complementariedad completa» cuando cada nucleótido de la sonda es complementario al correspondiente nucleótido del alelo. Se dice que dos polinucleótidos son «mínimamente complementarios» si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente para permitir que permanezcan apareados entre sí en al menos condiciones convencionales de «baja rigurosidad». De manera similar, se dice que los polinucleótidos son «complementarios» si pueden hibridarse entre

sí con la estabilidad suficiente para permitir que permanezcan apareados entre sí en condiciones convencionales de «alta rigurosidad». Los expertos en la materia conocen las condiciones de rigurosidad convencionales y se pueden encontrar, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition Volumes 1, 2 y 3. J. F. Sambrook, D. W. Russell y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

[0159] Por lo tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que tales desviaciones no impidan completamente la capacidad de una sonda para hibridarse con un alelo. Por lo tanto, para que un polinucleótido sirva como cebador o sonda, solo necesita ser suficientemente complementario en su secuencia para poder formar una estructura monocatenaria estable bajo el disolvente particular y las concentraciones de sal empleadas. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN son, por ejemplo, 6,0 X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 ºC, seguido de un lavado de 2,0 X SSC a 50 ºC. Estas condiciones son conocidas por los expertos en la materia y se pueden hallar, por ejemplo en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). La concentración de sal y la temperatura en la etapa de lavado se pueden ajustar para alterar la rigurosidad de la hibridación. Por ejemplo, las condiciones pueden variar desde una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 X SSC a 40 ºC hasta condiciones moderadamente rigurosas de aproximadamente 2,0 X SSC a 50 ºC hasta condiciones de alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 X SSC a 50 ºC.

Proteínas de fusión KIF5B-RET y anticuerpos

[0160] Un ejemplo de la descripción pertenece a polipéptidos de fusión KIF5B-RET purificados, y a sus partes biológicamente activas. En un ejemplo, el polipéptido de fusión KIF5B-RET nativo puede aislarse de fuentes de células o tejidos mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas de purificación de proteínas estándar. En otro ejemplo, un polipéptido de fusión KIF5B-RET se produce mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, un polipéptido de fusión KIF5B-RET puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos estándar.

[0161] Una proteína «aislada» o «purificada» o una porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la cual se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje «sustancialmente libre de material celular» incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o produce de forma recombinante. Por lo tanto, la proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 10 % o menos de aproximadamente 5 % (en peso seco) de proteínas heterólogas (también referidas en esta invención como una «proteína contaminante»). Cuando la proteína o la porción biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, puede estar sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación de la proteína. Cuando la proteína se produce por síntesis química, puede estar sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas, es decir, está separada de los precursores químicos u otras sustancias químicas que participan en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés.

[0162] Las porciones biológicamente activas de un polipéptido de fusión KIF5B-RET incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión KIF5B-RET, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y exhiben al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente, por ejemplo, una actividad quinasa, o una actividad de dimerización o multimerización. Una porción biológicamente activa de una proteína de la descripción puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Además, otras porciones biológicamente activas, en las cuales se delecionan otras regiones de la proteína, pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de un polipéptido.

[0163] En ciertos ejemplos, el polipéptido de fusión KIF5B-RET tiene una secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico descrita en esta invención. Otras proteínas útiles son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 86, al menos 87, al menos 88, al menos 89, a al menos 90, al menos 91, al menos 92, al menos 93, al menos 94, al menos 95, al menos 96, al menos 97, al menos 98, al menos 99, al menos 99,5 % o más) a una de estas secuencias y retienen la actividad funcional de la proteína de la proteína de longitud completa correspondiente, pero difieren en la secuencia de aminoácidos.

[0164] Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios

en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes o las posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) X 100). En un ejemplo, las dos secuencias tienen la misma longitud.

[0165] La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl Acad Sci. USA 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl Acad Sci. USA 90: 5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, y col. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la descripción. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la descripción. Para obtener alineaciones con espacios con fines de comparación, Gapped BLAST puede utilizarse como se describe en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, se puede utilizar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase en línea en ncbi.nlm.nih.gov. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, (1988) Comput Appl Biosci, 4: 11-7. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete informático de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Otro algoritmo útil para identificar regiones de similitud y alineación de secuencias locales es el algoritmo FASTA que se describe en Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85: 2444-2448. Cuando se utiliza el algoritmo FASTA para comparar secuencias de nucleótidos o aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, por ejemplo, con un valor de K-tupla de 2.

[0166] El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin espacios vacíos. Al calcular el porcentaje de identidad, solo se cuentan las coincidencias exactas.

[0167] Se puede utilizar un polipéptido de fusión KIF5B-RET aislado, o un fragmento del mismo, como un inmunógeno para generar anticuerpos utilizando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se puede utilizar el polipéptido de fusión KIF5B-RET de longitud completa o, alternativamente, la descripción proporciona fragmentos de péptidos antigénicos para su uso como inmunógenos. El péptido antigénico de una proteína de la descripción comprende al menos 8 (o al menos 10, al menos 15, al menos 20, o al menos 30 o más) residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de la descripción, y abarca un epítopo de la proteína de manera que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmune específico con un marcador de la descripción al que corresponde la proteína. Los epítopos ejemplares abarcados por el péptido antigénico son regiones que están localizadas en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas. El análisis de secuencia de hidrofobicidad, el análisis de secuencia de hidrofilicidad o análisis similares se pueden utilizar para identificar regiones hidrófilas.

[0168] Un inmunógeno se utiliza normalmente para preparar anticuerpos inmunizando un sujeto adecuado (es decir, inmunocompetente) como un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero o vertebrado. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, un polipéptido expresado de forma recombinante o sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulador similar.

[0169] Por consiguiente, otro ejemplo de la descripción pertenece a anticuerpos dirigidos contra un polipéptido de fusión KIF5B-RET. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo se une específicamente a la fusión KIF5B-RET, por ejemplo, se une específicamente a un epítopo formado por la fusión KIF5B-RET. En ejemplos, el anticuerpo puede distinguir RET de tipo natural (o KIF5B) de KIF5B-RET.

[0170] Los términos «anticuerpo» y «molécula de anticuerpo», como se utilizan de manera intercambiable en esta invención, se refieren a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno, como un polipéptido de la descripción. Una molécula que se une específicamente a un polipéptido dado de la descripción es una molécula que se une al polipéptido, pero no se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que contiene naturalmente el polipéptido. Los ejemplos de porciones

inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y $F(ab')_2$ que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. La descripción proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales. El término «anticuerpo monoclonal» o «composición de anticuerpo monoclonal», como se utiliza en esta invención, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítopo particular.

[0171] Los anticuerpos policlonales se pueden preparar como se describió anteriormente mediante la inmunización de un sujeto adecuado con un polipéptido de la descripción como un inmunógeno. Las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497, la técnica de hibridoma de células B humanas (véase Kozbor y col., 1983, Immunol. Today 4:72), la técnica de hibridoma-EBV (véase Cole y col., pp. 77-96 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (véase en general Current Protocols in Immunology, Coligan y col. ed., John Wiley & Sons, New York, 1994). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la descripción se detectan cribando los sobrenadantes del cultivo de hibridoma de anticuerpos que se unen al polipéptido de interés, por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA estándar.

[0172] Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal cribando una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de expresión en fagos de anticuerpos) con el polipéptido de interés. Los kits para generar y cribar bibliotecas de expresión en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; y Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, Catalog No. 240612). Adicionalmente, se pueden encontrar ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente susceptibles de ser utilizados para generar y cribar bibliotecas de expresión en anticuerpos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.223.409; publicación PCT n.º WO 92/18619; publicación PCT n.º WO 91/17271; publicación PCT n.º WO 92/20791; publicación PCT n.º WO 92/15679; publicación PCT n.º WO 93/01288; publicación PCT n.º WO 92/01047; publicación PCT n.º WO 92/09690; publicación PCT n.º WO 90/02809; Fuchs y col. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay y col. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse y col. (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths y col. (1993) EMBO J. 12:725-734.

[0173] Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, pueden prepararse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en la publicación PCT n.º WO 87/02671; solicitud de patente europea 184.187; solicitud de patente europea 171.496; solicitud de patente europea 173.494; publicación PCT n.º WO 86/01533; patente de EE. UU. n.º 4.816.567; solicitud de patente europea 125.023; Better y col. (1988) Science 240:1041-1043; Liu y col. (1987) Proc. Natl Acad Sci. USA 84:3439-3443; Liu y col. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y col. (1987) Proc. Natl Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura y col. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood y col. (1985) Nature 314:446-449; y Shaw y col. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi y col. (1986) Bio/Techniques 4:214; patente de EE. UU. n.º 5.225.539; Jones y col. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan y col. (1988) Science 239:1534; y Beidler y col. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

[0174] Pueden producirse anticuerpos completamente humanos utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadenas pesadas y ligeras humanas. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.625.126; patente de EE. UU. n.º 5.633.425; patente de EE. UU. n.º 5.569.825; patente de EE. UU. n.º 5.661.016; y la patente de EE. UU. n.º 5.545.806. Además, empresas como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), pueden comprometerse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

[0175] Se puede utilizar un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de fusión KIF5B-RET (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) para aislar el polipéptido mediante técnicas estándar, como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, dicho anticuerpo se puede utilizar para detectar el marcador (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) para evaluar el nivel y el patrón de expresión del marcador. Los anticuerpos también se pueden utilizar diagnósticamente para controlar los niveles de proteínas en tejidos o fluidos corporales (por ejemplo, en un fluido corporal que contiene células tumorales) como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para determinar, por ejemplo, la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los

ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye, pero no se limita a, luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen, pero no se limitan a, luciferasa, luciferina y aequorina, y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S o ^{3}H.

Antígenos y vacunas

[0176] Los ejemplos de la descripción incluyen preparaciones, por ejemplo, preparaciones antigénicas, de la fusión completa o un fragmento de la misma, por ejemplo, un fragmento capaz de generar anticuerpos específicos para la proteína de fusión, por ejemplo, una unión de fusión que contiene un fragmento (referido colectivamente en esta invención como polipéptidos específicos de fusión o FSP, por sus siglas en inglés). La preparación puede incluir un adyuvante u otro componente.

[0177] Un FSP se puede utilizar como un antígeno o vacuna. Por ejemplo, un FSP puede utilizarse como un antígeno para inmunizar a un animal, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o rata, conejo, caballo, cabra, perro o primate no humano, para obtener anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos específicos de una proteína de fusión. En un ejemplo, una molécula de anticuerpo específica de fusión es una molécula de anticuerpo descrita en esta invención, por ejemplo, policlonal. En otros ejemplos, una molécula de anticuerpo específica de fusión es monoespecífica, por ejemplo, una molécula de anticuerpo monoclonal, humana, humanizada, quimérica u otra monoespecífica. Las moléculas de anticuerpo específicas de la proteína de fusión se pueden utilizar para tratar a un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en esta invención.

[0178] Los ejemplos de la descripción incluyen preparaciones de vacuna que comprenden un FSP capaz de estimular una respuesta inmune en un sujeto, por ejemplo, generando, en el sujeto, anticuerpos específicos para la proteína de fusión. La preparación de vacuna puede incluir otros componentes, por ejemplo, un adyuvante. Las preparaciones de vacuna se pueden utilizar para tratar a un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en esta invención.

Vectores de expresión, células huésped y células recombinantes

[0179] En otro ejemplo, la descripción incluye vectores (por ejemplo, vectores de expresión), que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET descrito en esta invención. Como se utiliza en esta invención, el término «vector» se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado y puede incluir un vector plasmídico, cósmido o viral. El vector puede ser capaz de replicación autónoma o puede integrarse en un ADN huésped. Los vectores virales incluyen, por ejemplo, replicación defectuosa de retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados.

[0180] Un vector puede incluir un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Preferentemente, el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras vinculadas operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. El término «secuencia reguladora» incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos, así como secuencias reguladoras y/o inducibles específicas de tejido. El diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada y similares. Los vectores de expresión pueden introducirse en células huésped para producir de este modo el polipéptido de fusión KIF5B-RET, incluyendo proteínas o polipéptidos de fusión codificados por ácidos nucleicos como se describe en esta invención, formas mutantes de los mismos y similares).

[0181] El término «célula huésped recombinante» (o simplemente «célula huésped» o «célula recombinante»), como se utiliza en esta invención, tiene por objeto referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos tienen por objeto referirse no solo a la célula sujeto en particular, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún está incluida dentro del alcance del término «célula huésped», como se utiliza en esta invención.

[0182] Los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para la expresión del polipéptido de fusión KIF5B-RET en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los polipéptidos de la descripción se pueden expresar en *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamíferos. Las células huésped adecuadas se discuten más a fondo en Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, utilizando secuencias

reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

[0183] La expresión de proteínas en procariotas se realiza con mayor frecuencia en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de no fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, generalmente al extremo amino terminal de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión sirven normalmente para tres fines: 1) aumentar la expresión de proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, DB y Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a la maltosa E, o la proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

[0184] Los polipéptidos de fusión KIF5B-RET purificados se pueden utilizar en ensayos de actividad (por ejemplo, ensayos directos o ensayos competitivos descritos en detalle a continuación), o para generar anticuerpos específicos de polipéptidos de fusión KIF5B-RET.

[0185] Maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad disminuida para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S., (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico para insertarse en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada y col., (1992) *Nucleic Acids Res*. 20:2111-2118). Dicha alteración de las secuencias de ácido nucleico de la descripción se puede llevar a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN estándar.

[0186] El vector de expresión del polipéptido de fusión KIF5B-RET puede ser un vector de expresión de levadura, un vector para la expresión en células de insecto, por ejemplo, un vector de expresión de baculovirus o un vector adecuado para la expresión en células de mamíferos.

[0187] Cuando se utiliza en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión pueden ser proporcionadas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados se derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus y virus simio 40.

[0188] En otro ejemplo, el promotor es un promotor inducible, por ejemplo, un promotor regulado por una hormona esteroide, por una hormona polipeptídica (por ejemplo, por medio de una vía de transducción de señales), o por un polipéptido heterólogo (por ejemplo, los sistemas inducibles por tetraciclina), «Tet-On» y «Tet-Off»; véase, por ejemplo, Clontech Inc., CA, Gossen y Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547, y Paillard (1989) Human Gene Therapy 9: 983).

[0189] En otro ejemplo, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejidos adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico del hígado; Pinkert y col. (1987) Genes Dev. 1:268-277), promotores específicos de linfoides (Calame y Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji y col. (1983) Cell 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) Cell 33:741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund y col. (1985) Science 230:912-916), y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo, promotor de suero de leche; patente de Estados Unidos n.º 4.873.316 y publicación de solicitud europea n.º 264.166). Los promotores regulados por el desarrollo también están incluidos, por ejemplo, los promotores hox murinos (Kessel y Gruss (1990) Science 249:374-379) y el promotor de la α-fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

[0190] La descripción proporciona además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la descripción clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Se pueden elegir secuencias reguladoras (por ejemplo, promotores y/o potenciadores víricos) vinculados operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido que dirigen la expresión constitutiva, específica del tejido o específica del tipo de célula del ARN antisentido en una variedad de tipos celulares. El vector de expresión antisentido puede encontrarse en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado.

[0191] Otro ejemplo de la descripción proporciona una célula huésped que incluye una molécula de ácido nucleico descrita en esta invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET dentro de un

vector de expresión recombinante o una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET que contiene secuencias que le permiten la recombinación homóloga en un sitio específico del genoma de la célula huésped.

[0192] Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de fusión KIF5B-RET puede expresarse en células bacterianas (como *E. coli*), células de insecto, levadura o mamífero (como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS, por ejemplo, células COS-7), células SV40 de origen CV-1; Gluzman (1981) Cell 23:175-182). Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

[0193] El ADN del vector se puede introducir en las células huésped mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se utiliza en esta invención, los términos «transformación» y «transfección» tienen por objeto referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la materia para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluida la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por dextrano-DEAE, lipofección o electroporación.

[0194] Se puede utilizar una célula huésped para producir (por ejemplo, expresar) un polipéptido de fusión KIF5B-RET. Por consiguiente, la descripción proporciona además procedimientos de producción de un polipéptido de fusión KIF5B-RET utilizando las células huésped. En un ejemplo, el procedimiento incluye cultivar la célula huésped de la descripción (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET) en un medio adecuado de manera que se produzca un polipéptido de fusión KIF5B-RET. En otro ejemplo, el procedimiento incluye además aislar un polipéptido de fusión KIF5B-RET del medio o la célula huésped.

[0195] En otro ejemplo, la descripción presenta una célula o preparación purificada de células que incluyen un transgén de fusión KIF5B-RET, o que de otro modo expresan incorrectamente la fusión KIF5B-RET. La preparación celular puede consistir en células humanas o no humanas, por ejemplo, células de roedor, por ejemplo, células de ratón o rata, células de conejo o células de cerdo. En ejemplos, la célula o las células incluyen un transgén de fusión KIF5B-RET, por ejemplo, una forma heteróloga de una fusión KIF5B-RET, por ejemplo, un gen derivado de seres humanos (en el caso de una célula no humana). El transgén de fusión KIF5B-RET puede expresarse incorrectamente, por ejemplo, sobreexpresarse o subexpresarse. En otros ejemplos preferidas, la célula o las células incluyen un gen que expresa erróneamente una fusión KIF5B-RET endógena, por ejemplo, un gen cuya expresión se interrumpe, por ejemplo, una desactivación. Dichas células pueden servir como modelo para estudiar trastornos que están relacionados con alelos de fusión KIF5B-RET mutados o expresados incorrectamente (por ejemplo, cánceres) o para su uso en el cribado de fármacos, como se describe en esta invención.

Procedimientos terapéuticos

[0196] Alternativamente, o en combinación con los procedimientos descritos en esta invención, la descripción presenta un procedimiento de tratamiento de un cáncer o tumor que alberga una fusión KIF5B-RET descrita en esta invención. Los procedimientos incluyen administrar un agente anticáncer, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa, solo o en combinación, por ejemplo, en combinación con otros agentes o procedimientos quimioterapéuticos, en una cantidad suficiente para reducir o inhibir el crecimiento de células tumorales, y/o tratar o prevenir el(los) cáncer(es), en el sujeto.

[0197] «Tratar», «tratamiento» y otras formas de esta palabra se refieren a la administración de un inhibidor de la quinasa, solo o en combinación con un segundo agente para impedir el crecimiento de un cáncer, para provocar que el cáncer se reduzca por peso o volumen, para extender el tiempo de supervivencia esperado del sujeto y/o el tiempo hasta la progresión del tumor o similares. En esos sujetos, el tratamiento puede incluir, pero no se limita a, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la masa tumoral, reducir el tamaño o el número de lesiones metastásicas, inhibir el desarrollo de nuevas lesiones metastásicas, supervivencia prolongada, supervivencia prolongada libre de progresión, tiempo prolongado para progresión, y/o calidad de vida mejorada.

[0198] Como se utiliza en esta invención, a menos que se especifique lo contrario, los términos «prevenir», «que previene» y «prevención» contemplan una acción que se produce antes de que un sujeto comience a sufrir el recrecimiento del cáncer y/o que inhibe o reduce la gravedad del cáncer.

[0199] Como se utiliza en esta invención, y a menos que se especifique lo contrario, una «cantidad terapéuticamente eficaz» de un compuesto es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión del cáncer, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con el cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión del cáncer. El término «cantidad terapéuticamente eficaz» puede abarcar una cantidad que mejora la terapia general, reduce o evita los síntomas o causas del cáncer, o potencia la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

[0200] Como se utiliza en esta invención, y a menos que se especifique lo contrario, una «cantidad

profilácticamente eficaz» de un compuesto es una cantidad suficiente para prevenir el recrecimiento del cáncer, o uno o más síntomas asociados con el cáncer, o prevenir su recurrencia. Una cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad del compuesto, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención del cáncer. El término «cantidad profilácticamente eficaz» puede abarcar una cantidad que mejora la profilaxis general o potencia la eficacia profiláctica de otro agente profiláctico.

[0201] Como se utiliza en esta invención, el término «paciente» o «sujeto» se refiere a un animal, normalmente un ser humano (es decir, un hombre o una mujer de cualquier grupo de edad, por ejemplo, un paciente pediátrico (por ejemplo, un bebé, niño, adolescente) o un paciente adulto (por ejemplo, adulto joven, adulto de mediana edad o adulto mayor) u otro mamífero, como un primate (por ejemplo, mono cynomolgus, mono rhesus); mamíferos comercialmente relevantes como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, cabras, gatos y/o perros y/o aves, incluidas aves comercialmente relevantes, como pollos, patos, gansos y/o pavos, que serán o han sido objeto de tratamiento, observación y/o experimento. Cuando el término se utiliza junto con la administración de un compuesto o fármaco, entonces el paciente ha sido objeto de tratamiento, observación y/o administración del compuesto o fármaco.

[0202] En ciertos ejemplos, el cáncer incluye, pero no se limita a, un tumor sólido, un tumor de tejidos blandos y una lesión metastásica (por ejemplo, un cáncer como se describe en esta invención). En un ejemplo, el cáncer se elige de entre un cáncer de pulmón, un cáncer de páncreas, un melanoma, un cáncer colorrectal, un cáncer esofágico-gástrico, un cáncer de tiroides o un adenocarcinoma. En otros ejemplos, el cáncer de pulmón se elige de entre uno o más de los siguientes: cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), carcinoma de células escamosas (SCC), adenocarcinoma de pulmón, carcinoma broncogénico o una combinación de los mismos. En un ejemplo, el cáncer de pulmón es NSCLC o SCC.

[0203] En otros ejemplos, el cáncer se elige de entre cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, melanoma, cáncer de células B, cáncer de mama, cáncer de bronquios, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de tejidos hematológicos, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer esofágico-gástrico, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de hígado, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de glándula salival, cáncer de intestino delgado o de apéndice, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino o endometrial, tumores miofibroblásticos inflamatorios, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y similares.

[0204] En un ejemplo, el agente anticáncer es un inhibidor de quinasa. Por ejemplo, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET. Los inhibidores de la quinasa ejemplares incluyen, pero no se limitan a, axitinib (AG013736), bosutinib (SKI-606), cediranib (RECENTIN™, AZD2171), dasatinib (SPRYCEL®, BMS-354825), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA®), imatinib (Gleevec®, CGP57148B, STI-571), lapatinib (TYKERB®, TYVERB®), lestaurtinib (CEP-701), lenvatinib (E7080), neratinib (HKI-272), nilotinib (TASIGNA®), semaxinib (semaxinib SU5416), sunitinib (SUTENT®, SU11248), toceranib (PALLADIA®), vandetanib, vatalanib (PTK787, PTK/ZK), sorafenib (NEXAVAR®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, dovitinib lactato (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOKTM™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, tivozanib (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, y XL228.

[0205] En un ejemplo, el inhibidor de la quinasa se elige de entre lenvatinib (E7080), sorafenib (NEXAVAR®), sunitinib (SUTENT®, SU11248), vandetanib (CAPRELSA®, ZACTIMA®, ZD6474), NVP-AST487, regorafenib (BAY-73-4506), motesanib (AMG 706), cabozantinib (XL-184), apatinib (YN-968D1), DCC-2157 o AST-487.

[0206] En otros ejemplos, el agente anticáncer es un antagonista de KIF5B-RET que inhibe la expresión del ácido nucleico que codifica KIF5B-RET. Los ejemplos de dichos antagonistas de KIF5B-RET incluyen moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, moléculas antisentido, ribozimas, ARNi, moléculas de triple hélice que se hibridan a un ácido nucleico que codifica KIF5B-RET, o una región reguladora de la transcripción, y bloquea o reduce la expresión del ARNm de KIF5B-RET.

[0207] En otros ejemplos, el inhibidor de la quinasa se administra en combinación con un segundo agente terapéutico o una modalidad terapéutica diferente, por ejemplo, agentes anticánceres, y/o en combinación con procedimientos quirúrgicos y/o de radiación.

[0208] Por «en combinación con», no se tiene por objeto implicar que la terapia o los agentes terapéuticos han de administrarse al mismo tiempo y/o formularse para la administración conjunta, aunque estos procedimientos de administración están dentro del alcance de la invención. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse simultáneamente, antes o después de una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. Se apreciará además que el agente terapéutico adicional utilizado en esta combinación puede administrarse conjuntamente en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. La combinación particular que se empleará

en un régimen tendrá en cuenta la compatibilidad de la composición farmacéutica de la invención con el agente terapéuticamente activo adicional y/o el efecto terapéutico que se desea lograr.

[0209] Por ejemplo, el segundo agente terapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. Los agentes citotóxicos ejemplares incluyen agentes antimicrotúbulos, inhibidores de topoisomerasa, o taxanos, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, agentes intercalantes, agentes capaces de interferir con una vía de transducción de señales, agentes que promueven la apoptosis y la radiación. En otros ejemplos, los procedimientos pueden utilizarse en combinación con agentes inmunoduladores, por ejemplo, IL-1, 2, 4, 6, o 12, o interferón alfa o gamma, o factores de crecimiento de células inmunes tales como GM-CSF.

[0210] Los agentes anticáncer, por ejemplo, los inhibidores de la quinasa, utilizados en los procedimientos terapéuticos de la invención pueden evaluarse utilizando los ensayos de cribado descritos en esta invención. En un ejemplo, los agentes anticáncer se evalúan en un sistema libre de células, por ejemplo, un lisado celular o en un sistema reconstituido. En otros ejemplos, los agentes anticáncer se evalúan en una célula en cultivo, por ejemplo, una célula que expresa una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula tumoral o una estirpe celular, una célula recombinante). En otros ejemplos, los agentes anticáncer evalúan células *in vivo* (una célula que expresa KIF5B-RET presente en un sujeto, por ejemplo, un sujeto animal (por ejemplo, un modelo animal *in vivo*).

[0211] Los parámetros ejemplares evaluados incluyen uno o más de:

(i) un cambio en la actividad de unión, por ejemplo, la unión directa del agente candidato a un polipéptido de fusión KIF5B-RET; una competición de unión entre un ligando conocido y el agente candidato a un polipéptido de fusión KIF5B-RET;
(ii) un cambio en la actividad de la quinasa, por ejemplo, los niveles de fosforilación de un polipéptido de fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una autofosforilación aumentada o disminuida); o un cambio en la fosforilación de una diana de una quinasa RET, por ejemplo, quinasa de adhesión focal (FAK), persefina o factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF);
(iii) un cambio en una actividad de una célula que contiene una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula tumoral o una célula recombinante), por ejemplo, un cambio en la proliferación, morfología o tumorigenicidad de la célula;
(iv) un cambio en el tumor presente en un sujeto animal, por ejemplo, tamaño, apariencia, proliferación del tumor; o
(v) un cambio en el nivel, por ejemplo, el nivel de expresión, de un polipéptido de fusión KIF5B-RET o una molécula de ácido nucleico.

[0212] En un ejemplo, se evalúa un cambio en un ensayo libre de células en presencia de un agente candidato. Por ejemplo, se puede detectar una actividad de una fusión KIF5B-RET, o la interacción de una fusión KIF5B-RET con un ligando aguas abajo.

[0213] En otros ejemplos, se detecta un cambio en una actividad de una célula en una célula en cultivo, por ejemplo, una célula que expresa una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula tumoral o una estirpe celular, una célula recombinante). En un ejemplo, la célula es una célula recombinante que se modifica para expresar un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET, por ejemplo, es una célula recombinante transfectada con un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET. La célula transfectada puede mostrar un cambio en respuesta a la fusión de KIF5B-RET expresada, por ejemplo, aumento de la proliferación, cambios en la morfología, aumento de la tumorigenicidad y/o adquirir un fenotipo transformado. Se puede detectar un cambio en cualquiera de las actividades de la célula, por ejemplo, la célula recombinante, en presencia del agente candidato. Por ejemplo, una disminución en uno o más de: proliferación, tumorigenicidad, morfología transformada, en presencia del agente candidato puede ser indicativo de un inhibidor de una fusión KIF5B-RET. En otros ejemplos, se detecta un cambio en la actividad de unión o fosforilación como se describe en esta invención.

[0214] En otros ejemplos, se detecta un cambio en un tumor presente en un sujeto animal (por ejemplo, un modelo animal *in vivo*). En un ejemplo, el modelo animal es un animal que contiene un tumor o un xenoinjerto que comprende células que expresan una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, células tumorigénicas que expresan una fusión KIF5B-RET). Los agentes anticáncer pueden administrarse al sujeto animal y se detecta un cambio en el tumor. En un ejemplo, el cambio en el tumor incluye uno o más de un crecimiento del tumor, se evalúa el tamaño del tumor, la carga del tumor, la supervivencia. Una disminución en uno o más del crecimiento del tumor, el tamaño del tumor, la carga del tumor o un aumento de la supervivencia es indicativo de que el agente candidato es un inhibidor.

[0215] Los procedimientos y ensayos de cribado se describen con más detalle a continuación.

Procedimientos de cribado

[0216] En otro ejemplo, la descripción presenta un procedimiento, o ensayo, para cribar agentes que modulan, por ejemplo, inhiben, la expresión o actividad de una fusión KIF5B-RET, por ejemplo, una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención. El procedimiento incluye poner en contacto una fusión KIF5B-RET, o una

célula que expresa una fusión KIF5B-RET, con un agente candidato; y detectar un cambio en un parámetro asociado con una fusión KIF5B-RET, por ejemplo, un cambio en la expresión o una actividad de la fusión KIF5B-RET. El procedimiento puede incluir, opcionalmente, comparar el parámetro tratado con un valor de referencia, por ejemplo, una muestra de control (por ejemplo, comparar un parámetro obtenido de una muestra con el agente candidato con un parámetro obtenido de una muestra sin el agente candidato). En un ejemplo, si se detecta una disminución en la expresión o actividad de la fusión KIF5B-RET, el agente candidato se identifica como un inhibidor. En otro ejemplo, si se detecta un aumento en la expresión o actividad de la fusión KIF5B-RET, el agente candidato se identifica como un activador. En ciertos ejemplos, la fusión KIF5B-RET es una molécula de ácido nucleico o un polipéptido como se describe en esta invención.

[0217] En un ejemplo, la etapa de contacto se efectúa en un sistema sin células, por ejemplo, un lisado celular o en un sistema reconstituido. En otros ejemplos, la etapa de contacto se efectúa en una célula en cultivo, por ejemplo, una célula que expresa una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula tumoral o una estirpe celular, una célula recombinante). En otros ejemplos, la etapa de contacto se efectúa en una célula *in vivo* (una célula que expresa KIF5B-RET presente en un sujeto, por ejemplo, un sujeto animal (por ejemplo, un modelo animal *in vivo*).

[0218] Los parámetros ejemplares evaluados incluyen uno o más de:

(i) un cambio en la actividad de unión, por ejemplo, la unión directa del agente candidato a un polipéptido de fusión KIF5B-RET; una competición de unión entre un ligando conocido y el agente candidato a un polipéptido de fusión KIF5B-RET;
(ii) un cambio en la actividad de la quinasa, por ejemplo, los niveles de fosforilación de un polipéptido de fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una autofosforilación aumentada o disminuida); o un cambio en la fosforilación de una diana de una quinasa RET, por ejemplo, quinasa de adhesión focal (FAK), persefina o factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). En ciertos ejemplos, cualquier cambio en la actividad de la quinasa, por ejemplo, fosforilación, se detecta por cualquier membrana Western (por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-KIF5B o anti-RET; un anticuerpo específico de fósforo, que detecta un cambio en el peso molecular de un polipéptido de fusión KIF5B-RET), espectrometría de masas, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, bolas inmunomagnéticas, entre otros;
(iii) un cambio en una actividad de una célula que contiene una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula tumoral o una célula recombinante), por ejemplo, un cambio en la proliferación, morfología o tumorigenicidad de la célula;
(iv) un cambio en el tumor presente en un sujeto animal, por ejemplo, tamaño, apariencia, proliferación del tumor; o
(v) un cambio en el nivel, por ejemplo, el nivel de expresión, de un polipéptido de fusión KIF5B-RET o una molécula de ácido nucleico.

[0219] En un ejemplo, se evalúa un cambio en un ensayo libre de células en presencia de un agente candidato. Por ejemplo, se puede detectar una actividad de una fusión KIF5B-RET, o la interacción de una fusión KIF5B-RET con un ligando aguas abajo. En un ejemplo, un polipéptido de fusión KIF5B-RET se pone en contacto con un ligando, por ejemplo, en solución, y un agente candidato se controla para determinar su capacidad para modular, por ejemplo, inhibir, una interacción, por ejemplo, unión, entre el polipéptido de fusión KIF5B-RET y el ligando. En un ensayo ejemplar, la proteína de fusión KIF5B-RET purificada se pone en contacto con un ligando, por ejemplo, en solución, y se controla un agente candidato para determinar su capacidad para inhibir la interacción de la proteína de fusión con el ligando, o para inhibir la fosforilación del ligando mediante la proteína de fusión. Un efecto sobre una interacción entre la proteína de fusión y un ligando puede controlarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, como la absorbancia, y un efecto sobre la fosforilación del ligando puede analizarse, por ejemplo, mediante membrana de Western, inmunoprecipitación o perlas inmunomagnéticas.

[0220] En otros ejemplos, se detecta un cambio en una actividad de una célula en una célula en cultivo, por ejemplo, una célula que expresa una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula tumoral o una estirpe celular, una célula recombinante). En un ejemplo, la célula es una célula recombinante que se modifica para expresar un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET, por ejemplo, es una célula recombinante transfectada con un ácido nucleico de fusión KIF5B-RET. La célula transfectada puede mostrar un cambio en respuesta a la fusión de KIF5B-RET expresada, por ejemplo, aumento de la proliferación, cambios en la morfología, aumento de la tumorigenicidad y/o adquirir un fenotipo transformado. Se puede detectar un cambio en cualquiera de las actividades de la célula, por ejemplo, la célula recombinante, en presencia del agente candidato. Por ejemplo, una disminución en uno o más de: proliferación, tumorigenicidad, morfología transformada, en presencia del agente candidato puede ser indicativo de un inhibidor de una fusión KIF5B-RET. En otros ejemplos, se detecta un cambio en la actividad de unión o fosforilación como se describe en esta invención.

[0221] En un ensayo basado en células ejemplar, un ácido nucleico que comprende una fusión KIF5B-RET puede expresarse en una célula, tal como una célula (por ejemplo, una célula de mamífero) en cultivo. La célula que contiene un ácido nucleico que expresa la fusión KIF5B-RET se puede poner en contacto con un agente candidato, y la célula se controla para determinar el efecto del agente candidato. Se puede determinar que un agente candidato que causa una disminución de la proliferación celular o la muerte celular es un candidato para tratar un tumor (por ejemplo, un cáncer) que porta una fusión KIF5B-RET.

[0222] En un ejemplo, una célula que contiene un ácido nucleico que expresa una fusión KIF5B-RET puede controlarse para determinar la expresión de la proteína de fusión KIF5B-RET. La expresión de proteínas se puede controlar mediante procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo, por espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas en tándem), un ensayo informador (por ejemplo, un ensayo basado en fluorescencia), membrana de Western e inmunohistoquímica. Por un procedimiento, se detecta una expresión disminuida de KIF5B-RET. Se puede determinar que un agente candidato que causa una expresión disminuida de la proteína de fusión KIF5B-RET en comparación con una célula que no contiene la fusión de ácido nucleico KIF5B-RET es un candidato para tratar un tumor (por ejemplo, un cáncer) que porta una fusión KIF5B-RET.

[0223] Una célula que contiene un ácido nucleico que expresa una fusión KIF5B-RET puede controlarse para determinar la actividad quinasa KIF5B-RET alterada. La actividad de la quinasa puede analizarse midiendo el efecto de un agente candidato en una proteína diana de la quinasa RET conocida, como la quinasa de adhesión focal (FAK), la persefina o el GDNF (factor neurotrófico derivado de la línea celular glial).

[0224] En otro ejemplo, se detecta un cambio en un tumor presente en un sujeto animal (por ejemplo, un modelo animal *in vivo*). En un ejemplo, el modelo animal es un animal que contiene un tumor o un xenoinjerto que comprende células que expresan una fusión KIF5B-RET (por ejemplo, células tumorigénicas que expresan una fusión KIF5B-RET). El agente candidato puede administrarse al sujeto animal y se detecta un cambio en el tumor. En un ejemplo, el cambio en el tumor incluye uno o más de un crecimiento del tumor, se evalúa el tamaño del tumor, la carga del tumor, la supervivencia. Una disminución en uno o más del crecimiento del tumor, el tamaño del tumor, la carga del tumor o un aumento de la supervivencia es indicativo de que el agente candidato es un inhibidor.

[0225] En un modelo animal ejemplar, se crea un xenoinjerto inyectando células en el ratón. Se administra un agente candidato al ratón, por ejemplo, mediante inyección (tal como inyección subcutánea, intraperitoneal o en la vena de la cola, o mediante inyección directamente en el tumor) o administración oral, y se observa que el tumor determina el efecto anticáncer del agente candidato. La salud del animal también se controla, por ejemplo, para determinar si un animal tratado con un agente candidato sobrevive durante más tiempo. Un agente candidato que hace que el crecimiento del tumor disminuya o se detenga, o que el tumor se reduzca de tamaño, o que disminuya la carga del tumor, o que aumente el tiempo de supervivencia, puede considerarse un candidato para tratar un tumor (por ejemplo, un cáncer) que lleva una fusión KIF5B-RET.

[0226] En otro ensayo animal ejemplar, las células que expresan una fusión KIF5B-RET se inyectan en la vena de la cola, por ejemplo, de un ratón, para inducir metástasis. Se administra un agente candidato al ratón, por ejemplo, mediante inyección (tal como inyección subcutánea, intraperitoneal o en la vena de la cola, o mediante inyección directamente en el tumor) o administración oral, y se observa que el tumor determina el efecto del anticáncer del agente candidato. Se puede considerar que un agente candidato que inhibe o previene o reduce la metástasis, o aumenta el tiempo de supervivencia, es un candidato para tratar un tumor (por ejemplo, un cáncer) que porta una fusión KIF5B-RET.

[0227] La proliferación celular puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, como el ensayo de PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), la incorporación de 5-bromodeoxiuridina (BrdUrd), el ensayo Ki-67, la respiración mitocondrial o la tinción con yoduro de propidio. Las células también pueden medirse para la apoptosis, como mediante el uso de un ensayo TUNEL (marcado del extremo libre por dUTP (por desoxi-transferasa terminal)). Las células también pueden analizarse para detectar la presencia de angiogénesis utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como midiendo la formación de tubos endoteliales o midiendo el crecimiento de vasos sanguíneos de tejido subcutáneo, como en un gel sólido de membrana basal.

[0228] En otros ejemplos, un cambio en la expresión de una fusión KIF5B-RET puede controlarse detectando los niveles de ácido nucleico o proteína, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en esta invención.

[0229] En ciertos ejemplos, los procedimientos de cribado descritos en esta invención pueden repetirse y/o combinarse. En un ejemplo, un agente candidato que se evalúa en una célula libre o se basa en células descrito en esta invención puede probarse adicionalmente en un sujeto animal.

[0230] En un ejemplo, el agente candidato se identifica y se vuelve a probar en el mismo ensayo o en otro diferente. Por ejemplo, un compuesto de prueba se identifica en un sistema *in vitro* o libre de células, y se vuelve a probar en un modelo animal o un ensayo basado en células. Se puede utilizar cualquier orden o combinación de ensayos. Por ejemplo, un ensayo de alto rendimiento se puede utilizar en combinación con un modelo animal o cultivo de tejidos.

[0231] Los agentes candidatos adecuados para su uso en los ensayos de cribado descritos en esta invención incluyen, por ejemplo, compuestos de moléculas pequeñas, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNip, aptámeros, ARN de horquilla corta, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, antagomirs, imitadores de microARN o ADN, por ejemplo, para terapia génica) o polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o

fragmentos de unión a antígeno de los mismos, fragmentos Fab o fragmentos scFv). Los agentes anticáncer candidatos pueden obtenerse de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca comercial), o pueden diseñarse racionalmente, como para dirigir un sitio activo en un dominio funcional de RET (por ejemplo, el dominio quinasa de RET), o un dominio funcional de KIF5B (por ejemplo, el dominio de oligomerización o el dominio de quinesina).

[0232] En otros ejemplos, el procedimiento o ensayo incluye proporcionar una etapa basada en la generación de señales dependientes de la proximidad, por ejemplo, un ensayo de dos híbridos que incluye una primera proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión KIF5B-RET) y una segunda proteína de fusión (por ejemplo, un ligando), que pone en contacto el ensayo de dos híbridos con un compuesto de prueba, en condiciones en las que dicho ensayo híbrido detecta un cambio en la formación y/o estabilidad del complejo, por ejemplo, la formación del complejo inicia la activación de la transcripción de un gen indicador.

[0233] En un ejemplo no limitativo, la estructura tridimensional del sitio activo de la fusión KIF5B-RET se determina cristalizando el complejo formado por la fusión KIF5B-RET y un inhibidor conocido. El diseño racional de los fármacos se utiliza para identificar nuevos agentes de prueba al efectuar alteraciones en la estructura de un inhibidor conocido o al diseñar compuestos de moléculas pequeñas que se unen al sitio activo de la fusión KIF5B-RET.

[0234] Los agentes candidatos pueden obtenerse utilizando cualquiera de las numerosas estrategias en procedimientos de biblioteca combinatoria conocidas en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con un nuevo esqueleto no peptídico que es resistente a la degradación enzimática pero que, sin embargo, siguen siendo bioactivos; véase, por ejemplo, Zuckermann, R.N. y col. (1994) J. Med. Chem. 37:2678-85); bibliotecas de fase sólida o de fase de solución paralelas espacialmente direccionables; procedimientos de biblioteca sintética que requieren la deconvolución; el procedimiento de la biblioteca «una perla un compuesto»; y procedimientos de biblioteca sintética que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. Las estrategias de biblioteca biológica y biblioteca peptoide están limitadas a bibliotecas de péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias son aplicables a bibliotecas de compuestos peptídicos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145).

[0235] Se pueden encontrar ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo en: DeWitt y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422; Zuckermann y col. (1994). J. Med. Chem. 37:2678; Cho y col. (1993) Science 261:1303; Carrell y col. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell y col. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y Gallop y col. (1994) J. Med. Chem. 37:1233.

[0236] Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421), o en perlas (Lam (1991) Nature 354:82-84), chips (Fodor (1993) Nature 364:555-556), bacterias (Ladner, patente de EE. UU. n.º 5.223.409), esporas (Ladner, patente de EE. UU. n.º 5.223.409), plásmidos (Cull y col. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) Science 249:386-390; Devlin (1990) Science 249:404-406; Cwirla y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310; Ladner *supra*).

[0237] La interacción entre dos moléculas también se puede detectar, por ejemplo, utilizando transferencia de energía de fluorescencia (FET, por sus siglas en inglés) (véase, por ejemplo, Lakowicz y col., patente de EE. UU. 5.631.169; Stavrianopoulos, y col., patente de EE. UU. n.º 4.868.103). Una etiqueta de fluoróforo en la primera molécula «donante» se selecciona de tal manera que su energía fluorescente emitida será absorbida por una etiqueta fluorescente en una segunda molécula «aceptora», que a su vez es capaz de emitir fluorescencia debido a la energía absorbida. Alternativamente, la molécula de proteína «donante» puede simplemente utilizar la energía fluorescente natural de los residuos de triptófano. Se eligen las etiquetas que emiten diferentes longitudes de onda de la luz, de modo que la etiqueta de la molécula «aceptora» se puede diferenciar de la del «donante». Dado que la eficiencia de la transferencia de energía entre las etiquetas está relacionada con la distancia que separa las moléculas, se puede evaluar la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la que se produce una unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la etiqueta de la molécula «aceptora» en el ensayo debe ser máxima. Un evento de unión a FET puede medirse convenientemente a través de medios de detección fluorométricos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando un fluorímetro).

[0238] En otro ejemplo, la determinación de la capacidad de la proteína de fusión KIF5B-RET para unirse a una molécula diana se puede lograr utilizando el análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA, por sus siglas en inglés) (véase, por ejemplo, Sjolander, S y Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo y col. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). La «resonancia de plasmón superficial» o «BIA» detecta las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactivos (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativo de un evento de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés)), lo que resulta en una señal detectable que se puede utilizar como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Inhibidores de ácido nucleico

[0239] En otra realización, el inhibidor de fusión KIF5B-RET inhibe la expresión del ácido nucleico que codifica una fusión KIF5B-RET. Los ejemplos de dichos inhibidores de fusión KIF5B-RET incluyen moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, moléculas antisentido, ribozimas, ARNip, moléculas de triple hélice que se hibridan a un ácido nucleico que codifica una fusión KIF5B-RET, o una región reguladora de la transcripción, y bloquea o reduce la expresión de ARNm de la fusión KIF5B-RET.

[0240] En una realización, el antagonista de ácido nucleico es un ARNip que se dirige al ARNm que codifica la fusión KIF5B-RET. También se pueden utilizar otros tipos de ácidos nucleicos antagonistas, por ejemplo, un ARNbc, una ribozima, un formador de triple hélice o un ácido nucleico antisentido. Por consiguiente, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que son inhibidores de ácido nucleico, por ejemplo, antisentido, ARNi, a una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET.

[0241] Un ácido nucleico «antisentido» puede incluir una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico «sentido» que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena de codificación de una molécula de ADNc bicatenario o complementaria a una secuencia de ARNm. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena codificante de fusión KIF5B-RET completa, o solo a una porción de la misma. En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido para una «región no codificante» de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica la fusión KIF5B-RET (por ejemplo, las regiones no traducidas 5' y 3'). Los agentes antisentido pueden incluir, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleótidos), por ejemplo, aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases, o aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS, por sus siglas en inglés) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los compuestos antisentido pueden incluir un tramo de al menos ocho nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen diana. Un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido se puede hibridar específicamente cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para causar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a las secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos.

[0242] La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm puede interferir con una o más de las funciones normales del ARNm. Las funciones del ARNm a interferir incluyen todas las funciones clave como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, la traducción de proteínas del ARN, el corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm y la función catalítica que puede ser involucrada por el ARN. La unión de proteínas específicas al ARN también puede interferirse mediante la hibridación de oligonucleótidos antisentido con el ARN.

[0243] Los compuestos antisentido ejemplares incluyen secuencias de ADN o ARN que se hibridan específicamente con el ácido nucleico diana, por ejemplo, el ARNm que codifica la fusión KIF5B-RET. La región complementaria puede extenderse entre aproximadamente 8 y aproximadamente 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas. Las nucleobases modificadas son conocidas en la técnica. También están disponibles descripciones de agentes de ácido nucleico modificados. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.987.071; 5.116.742; y 5.093.246; Woolf y col. (1992) Proc Natl Acad Sci USA; ARN y ADN antisentido, D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); 89:7305-9; Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334:585-59; Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6:569-84; Helene (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; y Maher (1992) Bioassays 14:807-15.

[0244] Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la descripción se administran normalmente a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección directa en un sitio del tejido), o se generan *in situ* de modo que se hibriden con o se unan a ARNm celular y/o ADN genómico que codifica un KIF5B-RET fusión para inhibir así la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden modificarse para dirigirse a las células seleccionadas y a continuación administrarse sistémicamente. Para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de manera que se unan específicamente a los receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, vinculando las moléculas de ácido nucleico antisentido a los péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores o antígenos de la superficie celular. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden administrarse a células utilizando los vectores descritos en esta invención. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren las construcciones de vectores en las que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

[0245] En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido de la descripción es una molécula de ácido nucleico α-anomérica. Una molécula de ácido nucleico α-anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, a diferencia de las unidades β habituales, las cadenas se ejecutan paralelas entre sí (Gaultier y col. (1987) Nucleic Acids. Res. 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y col. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue y col. (1987) FEBS Lett. 215:327-330).

[0246] Los ARNip son pequeños ARN bicatenarios (ARNbc) que, opcionalmente, incluyen salientes. Por ejemplo, la región dúplex de un ARNip tiene una longitud de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos. Normalmente, las secuencias de ARNip son exactamente complementarias al ARNm diana. Los ARNbc y los ARNip en particular se pueden utilizar para silenciar la expresión de genes en células de mamíferos (por ejemplo, células humanas). Los ARNip también incluyen ARN de horquilla corta (ARNh) con tallos de 29 bases y salientes de 2-nucleótidos 3'. Véase, por ejemplo, Clemens y col. (2000) Proc. Natl. Acad Sci. USA 97:6499-6503; Billy y col. (2001) Proc. Natl Sci. USA 98:14428-14433; Elbashir y col. (2001) Nature. 411:494-8; Yang y col. (2002) Proc. Natl Acad Sci. USA 99: 9942-9947; Siolas y col. (2005), Nat. Biotecnol. 23(2):227-31; documento s20040086884; US 20030166282; 20030143204; 20040038278; y 20030224432.

[0247] En otra realización, un ácido nucleico antisentido de la descripción es una ribozima. Una ribozima que tiene especificidad por un ácido nucleico que codifica una fusión KIF5B-RET puede incluir una o más secuencias complementarias a la secuencia de nucleótidos de un ADNc de fusión KIF5B-RET descrito en esta invención (es decir, SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3), y una secuencia que tiene una secuencia catalítica conocida responsable de la escisión del ARNm (véase la patente de EE. UU. n.º 5.093.246 o Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334:585-591). Por ejemplo, se puede construir un derivado de un ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que se escindirá en un ARNm que codifica la fusión KIF5B-RET. Véase, por ejemplo, Cech y col. patente de EE. UU. n.º 4.987.071; y Cech y col. patente de EE. UU. n.º 5.116.742. Alternativamente, el ARNm de fusión KIF5B-RET se puede utilizar para seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418.

[0248] La expresión del gen de fusión KIF5B-RET puede inhibirse dirigiéndose a secuencias de nucleótidos complementarias de la región reguladora de la fusión KIF5B-RET para formar estructuras helicoidales triples que impiden la transcripción del gen de fusión KIF5B-RET en células diana. Véase en general, Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6:569-84; Helene, C. i (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; y Maher, L.J. (1992) Bioassays 14:807-15. Las secuencias potenciales que pueden ser dirigidas para la formación de la triple hélice se pueden aumentar creando una molécula de ácido nucleico llamada «vía en zigzag». Las moléculas de vía en zigzag se sintetizan alternativamente en 5′-3 ′, 3′-5 ′, de manera que se emparejan con una primera hebra de un dúplex y a continuación el otro, eliminando la necesidad de un tramo considerable de purinas o pirimidinas para estar presente en una hebra de un dúplex.

[0249] La descripción también proporciona moléculas de cebador y sonda de oligonucleótidos marcadas de manera detectable. Normalmente, tales etiquetas son quimioluminiscentes, fluorescentes, radioactivas o colorimétricas.

[0250] Una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET puede modificarse en el resto de base, resto de azúcar o esqueleto de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad de la molécula. Para ejemplos no limitativos de oligonucleótidos sintéticos con modificaciones, véase Toulmé (2001) Nature Biotech. 19:17 y Faria y col. (2001) Nature Biotech. 19:40-44. Tales oligonucleótidos de fosforamidita pueden ser agentes antisentido eficaces.

[0251] Por ejemplo, el esqueleto de fosfato de desoxirribosa de las moléculas de ácido nucleico puede modificarse para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup B. y col. (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4: 5-23). Como se utiliza en esta invención, los términos «ácido nucleico peptídico» o «PNA», por sus siglas en inglés se refieren a un imitador de ácido nucleico, por ejemplo, un imitador de ADN, en el que el esqueleto de fosfato de desoxirribosa se reemplaza con un esqueleto pseudopeptídico y solo se conservan las cuatro nucleobases naturales. El esqueleto neutro de un PNA puede permitir una hibridación específica con el ADN y el ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA se puede realizar utilizando protocolos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en Hyrup B. y col. (1996) *supra* y Perry-O'Keefe y col. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675.

[0252] Los PNA de las moléculas de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET se pueden utilizar en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, los PNA pueden utilizarse como agentes antisentido o antigénicos para la modulación específica de secuencias de la expresión génica, por ejemplo, induciendo la detención de la transcripción o traducción o inhibiendo la replicación. Los PNA de las moléculas de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET también se pueden utilizar en el análisis de mutaciones de un solo par de bases en un gen (por ejemplo, mediante pinzamiento por PCR dirigido a PNA); como «enzimas de restricción artificial» cuando se utilizan en

combinación con otras enzimas, (por ejemplo, nucleasas S1 (Hyrup B. y col. (1996) *supra*)); o como sondas o cebadores para la secuenciación o hibridación de ADN (Hyrup B. y col. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *supra*).

[0253] En otros ejemplos, el oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirse a receptores de células huésped *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, el documento WO 89/10134). Además, los oligonucleótidos pueden modificarse con agentes de escisión desencadenados por hibridación (véase, por ejemplo, Krol y col. (1988) BioTechniques 6:958-976) o agentes de intercalación (véase, por ejemplo, Zon (1988) Pharm. Res. 5:539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula (por ejemplo, un péptido, un agente de reticulación desencadenado por hibridación, un agente de transporte o un agente de escisión desencadenado por hibridación).

Evaluación de sujetos

[0254] Los sujetos, por ejemplo, pacientes, pueden ser evaluados por la presencia de una fusión KIF5B-RET. Un paciente puede ser evaluado, por ejemplo, determinando la secuencia genómica del paciente, por ejemplo, mediante un procedimiento NGS. Alternativamente, o además, la evaluación de un paciente puede incluir analizar directamente la presencia de una fusión KIF5B-RET en el paciente, tal como mediante un ensayo para detectar un ácido nucleico KIF5B-RET (por ejemplo, ADN o ARN), tal como por membrana Southern, membrana Northern o RT-PCR, por ejemplo, qRT-PCR. Alternativamente, o además, se puede evaluar a un paciente para determinar la presencia de una fusión de proteínas KIF5B-RET, como por ejemplo mediante inmunohistoquímica, membrana Western, inmunoprecipitación o ensayo de perlas inmunomagnéticas.

[0255] La evaluación de un paciente también puede incluir un ensayo citogenético, tal como mediante hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés), para identificar el reordenamiento cromosómico que resulta en la fusión KIF5B-RET. Por ejemplo, para realizar FISH, al menos una primera sonda etiquetada con una primera etiqueta detectable puede diseñarse para dirigirse a KIF5B, como en uno o más de los exones 1-15 de KIF5B (por ejemplo, los exones que contienen la parte de la proteína que incluye el dominio motor de quinesina y el dominio oligomérico, y al menos una segunda sonda etiquetada con una segunda etiqueta detectable puede diseñarse para dirigirse a RET, como en uno o más de los exones 12-25 de RET (por ejemplo, los exones que contienen la parte de la proteína que incluye el dominio tirosina quinasa). La al menos una primera sonda y la al menos una segunda sonda estarán más juntas en pacientes que portan la fusión KIF5B-RET que en pacientes que no portan la fusión KIF5B-RET.

[0256] Procedimientos adicionales para la detección de fusión KIF5B-RET se proporcionan a continuación.

[0257] En un aspecto, los resultados de un ensayo clínico, por ejemplo, un ensayo clínico exitoso o no exitoso, pueden ser reutilizados para identificar agentes que se dirigen a una fusión KIF5B-RET. Por un procedimiento ejemplar, un agente candidato utilizado en un ensayo clínico puede ser reevaluado para determinar si el agente en el ensayo se dirige a una fusión KIF5B-RET, o es efectivo para tratar un tumor que contiene una fusión KIF5B-RET. Por ejemplo, se pueden identificar los sujetos que participaron en un ensayo clínico para un agente, como un inhibidor de la quinasa. Los pacientes que experimentaron una mejoría en los síntomas, por ejemplo, los síntomas del cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón), como la disminución del tamaño del tumor o la disminución de la tasa de crecimiento del tumor, pueden evaluarse para detectar la presencia de una fusión KIF5B-RET. Los pacientes que no experimentaron una mejoría en los síntomas del cáncer también pueden ser evaluados para detectar la presencia de una fusión KIF5B-RET. Cuando los pacientes que portan una fusión KIF5B-RET tienen más probabilidades de responder al agente de prueba que los pacientes que no portaron una fusión KIF5B-RET, se determina que el agente es una opción de tratamiento adecuada para un paciente que porta la fusión KIF5B-RET.

[0258] La «reevaluación» de los pacientes puede incluir, por ejemplo, determinar la secuencia genómica de los pacientes, o un subconjunto de los pacientes del ensayo clínico, por ejemplo, mediante un procedimiento NGS. Alternativamente, o además, la reevaluación de los pacientes puede incluir analizar directamente la presencia de una fusión KIF5B-RET en el paciente, tal como por un ensayo para detectar un ácido nucleico KIF5B-RET (por ejemplo, ARN), tal como por RT-PCR, por ejemplo, qRT-PCR. Alternativamente, o además, se puede evaluar a un paciente para determinar la presencia de una fusión de proteínas KIF5B-RET, como por ejemplo mediante inmunohistoquímica, membrana de Western, inmunoprecipitación o ensayo de perlas inmunomagnéticas.

[0259] Los ensayos clínicos adecuados para la reutilización como se describió anteriormente incluyen ensayos que probaron los inhibidores de RET, los inhibidores de la tirosina quinasa, los inhibidores de múltiples quinasas y los fármacos que supuestamente actúan aguas arriba o aguas abajo de RET en una vía que involucra RET. Otros ensayos clínicos adecuados para la reutilización, como se describió anteriormente, incluyen ensayos que probaron los inhibidores de KIF5B, los inhibidores de quinesina, los inhibidores del tráfico celular y los fármacos que supuestamente actúan aguas arriba o aguas abajo de KIF5B en una vía que involucra a KIF5B.

Procedimientos de detección de los ácidos nucleicos y polipéptidos de fusión KIF5B-RET

[0260] Los expertos en la materia conocen procedimientos para evaluar un gen KIF5B-RET, mutaciones y/o productos genéticos. En una realización, la fusión KIF5B-RET se detecta en una molécula de ácido nucleico mediante un procedimiento elegido de entre uno o más de: ensayo de hibridación de ácido nucleico, ensayos basados en amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), ensayo PCR-RFLP, PCR en tiempo real, secuenciación, análisis de cribado (incluido el análisis citogenético de metafase mediante procedimientos de cariotipo estándar, FISH (por ejemplo, FISH de desacoplamiento), cariotipo espectral o MFISH, hibridación genómica comparativa), hibridación *in situ*, SSP, HPLC o genotipado por espectrometría de masas.

[0261] Los procedimientos ejemplares adicionales incluyen, los procedimientos tradicionales de «sonda directa», tales como las membranas de Southern o la hibridación *in situ* (por ejemplo, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) y FISH más SKY), y se pueden utilizar los procedimientos de «sonda comparativa», tales como la hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés), por ejemplo, CGH basado en ADNc o basado en oligonucleótidos. Los procedimientos se pueden utilizar en una amplia variedad de formatos que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos unidos a sustratos (por ejemplo, membrana o vidrio) o estrategias basadas en matrices.

[0262] En ciertas realizaciones, los procedimientos de evaluación incluyen las sondas/cebadores descritos en esta invención.

[0263] En una realización, las sondas/cebadores pueden diseñarse para detectar una fusión KIF5B/RET. Las sondas/cebadores KIF5B pueden ser de los nucleótidos 1-1725 de la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, pueden hibridarse con los nucleótidos que codifican los exones 1-15 de la proteína KIF5B). Estas sondas/cebadores son adecuados, por ejemplo, para la amplificación por FISH o PCR. Las sondas/cebadores de RET pueden ser de los nucleótidos 1726-2934 de la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, pueden hibridarse con los nucleótidos que codifican los exones 12-20 de la proteína RET). Estas sondas/cebadores son adecuados, por ejemplo, para la amplificación por FISH o PCR. Por PCR, por ejemplo, para amplificar la región que incluye la unión de fusión KIF5B/RET, los cebadores directos pueden diseñarse para hibridarse con la secuencia KIF5B de los nucleótidos 1-1725 de la SEQ ID NO:1, y los cebadores inversos pueden diseñarse para hibridarse con los nucleótidos 1726-2934 de la SEQ ID NO:1.

[0264] En otra realización, las sondas/cebadores pueden diseñarse para detectar una fusión RET/KIF5B. Las sondas/cebadores de RET pueden ser de los nucleótidos 1-2138 de la SEQ ID NO:3 (es decir, pueden hibridarse con los nucleótidos que codifican los exones 1-11 de la proteína RET). Estas sondas/cebadores son adecuados, por ejemplo, para la amplificación por FISH o PCR. Las sondas/cebadores KIF5B pueden ser de los nucleótidos 2139-3360 de la SEQ ID NO:3 (es decir, pueden hibridarse con los nucleótidos que codifican los exones 16-26 de la proteína KIF5B). Estas sondas/cebadores son adecuados, por ejemplo, para la amplificación por FISH o PCR. Por PCR, por ejemplo, para amplificar la región que incluye la unión de fusión RET/KIF5B, los cebadores directos pueden diseñarse para hibridarse con la secuencia Ret de los nucleótidos 1-2138 de la SEQ ID NO:3, y los cebadores inversos pueden diseñarse para hibridarse con los nucleótidos 2139-3360 de la SEQ ID NO:3.

[0265] En una realización, el análisis POR FISH se utiliza para identificar el reordenamiento cromosómico que resulta en la fusión KIF5B-RET como se describe anteriormente. Por ejemplo, para realizar FISH, al menos una primera sonda etiquetada con una primera etiqueta detectable puede diseñarse para dirigirse a KIF5B, como en uno o más de los exones 1-15 de KIF5B (por ejemplo, los exones que contienen la parte de la proteína que incluye el dominio motor de quinesina y el dominio oligomérico), y al menos una segunda sonda etiquetada con una segunda etiqueta detectable puede diseñarse para dirigirse a RET, como en uno o más de los exones 12-25 de RET (por ejemplo, los exones que contienen la parte de la proteína que incluye el dominio tirosina quinasa). La al menos una primera sonda y la al menos una segunda sonda estarán más juntas en un sujeto que porta la fusión KIF5B-RET en comparación con un sujeto que no porta la fusión KIF5B-RET.

[0266] En una estrategia, se utiliza una variación de un ensayo de FISH, por ejemplo, «FISH de desacoplamiento», para evaluar un paciente. Mediante este procedimiento, se utilizan al menos una sonda dirigida a la unión del intrón 11 de RET/exón 12 de RET y al menos una sonda dirigida a KIF5B, por ejemplo, en uno o más de los exones 1-15 y/o intrones 1-14. En células normales, se observan ambas sondas (o se observará un color secundario debido a la proximidad de los genes KIF5B y RET), y solo se observará la sonda KIF5B cuando se produzca la translocación. Otras variaciones del procedimiento de FISH conocido en la técnica son adecuadas para evaluar un paciente.

[0267] Se utilizan sondas que contienen segmentos de ADN que son esencialmente complementarios a las secuencias de bases de ADN que existen en diferentes porciones de los cromosomas. Los ejemplos de sondas útiles según la invención, y el marcaje e hibridación de sondas a muestras se describen en dos patentes de EE. UU. de Vysis, Inc. patentes de EE. UU. n.º. 5.491.224 y 6.277.569 de Bittner, y col.

[0268] Los protocolos adicionales para la detección de FISH se describen a continuación.

[0269] Las sondas cromosómicas suelen tener normalmente una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 10^5 nucleótidos. Las sondas más largas comprenden normalmente fragmentos más pequeños de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Las sondas que se hibridan con el ADN centromérico y el ADN específico de *locus* están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Vysis, Inc. (Downers Grove, I11.), Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregón) o de Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Alternativamente, las sondas se pueden hacer no comercialmente a partir de ADN cromosómico o genómico a través de técnicas estándar. Por ejemplo, las fuentes de ADN que se pueden utilizar incluyen ADN genómico, secuencias de ADN clonado, híbridos de células somáticas que contienen uno o una parte de un cromosoma (por ejemplo, cromosoma humano) junto con el complemento cromosómico normal del huésped, y cromosomas purificados por citometría de flujo o microdisección. La región de interés se puede aislar mediante clonación o mediante amplificación específica del sitio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Nath and Johnson, Biotechnic Histochem., 1998, 73(1):6-22, Wheeless y col., Cytometry 1994, 17:319-326, y la patente de EE. UU. n.º 5.491.224.

[0270] Las sondas que se utilizarán se hibridan con una región específica de un cromosoma para determinar si una anomalía citogenética está presente en esta región. Un tipo de anomalía citogenética es una deleción. Aunque las deleciones pueden ser de uno o más cromosomas completos, las deleciones implican normalmente la pérdida de parte de uno o más cromosomas. Si la región completa de un cromosoma que está contenida en una sonda se deleciona de una célula, la hibridación de esa sonda con el ADN de la célula normalmente no ocurrirá y no habrá ninguna señal presente en ese cromosoma. Si la región de un cromosoma que está parcialmente contenida dentro de una sonda se deleciona de una célula, aún puede ocurrir la hibridación de esa sonda con el ADN de la célula, pero puede haber menos señal. Por ejemplo, la pérdida de una señal se compara con la hibridación de la sonda con el ADN de las células de control que no contienen las anomalías genéticas que las sondas intentan detectar. En algunas realizaciones, al menos 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, o más células se enumeran para la presencia de la anomalía citogenética.

[0271] Las anomalías citogenéticas que deben detectarse pueden incluir, pero no se limitan, translocaciones no recíprocas, inversiones intracromosómicas, mutaciones puntuales, deleciones, cambios en el número de copias de genes, cambios en el nivel de expresión génica y mutaciones de la línea germinal. En particular, un tipo de anomalía citogenética es una duplicación. Las duplicaciones pueden ser de cromosomas completos o de regiones más pequeñas que un cromosoma completo. Si la región de un cromosoma que está contenida en una sonda se duplica en una célula, la hibridación de esa sonda con el ADN de la célula normalmente producirá al menos una señal adicional en comparación con el número de señales presentes en las células de control sin anomalías de la región cromosómica contenidas en la sonda.

[0272] Las sondas cromosómicas se marcan de modo que se pueda detectar la región cromosómica con la que se hibridan. Las sondas normalmente se marcan directamente con un fluoróforo, una molécula orgánica que emite fluorescencia después de absorber la luz de menor longitud de onda/mayor energía. El fluoróforo permite visualizar la sonda sin una molécula de detección secundaria. Después de unir covalentemente un fluoróforo a un nucleótido, el nucleótido puede incorporarse directamente a la sonda con técnicas estándar tales como la traducción de mellas, el cebado aleatorio y el etiquetado por PCR. Alternativamente, los nucleótidos de desoxicitidina dentro de la sonda pueden ser transaminados con un enlazador. Luego, el fluoróforo se une covalentemente a los nucleótidos deoxicitidina transaminados. Véase, la patente de EE. UU. n.º 5.491.224.

[0273] La patente de EE. UU. n.º 5.491.224 describe el marcaje de la sonda como un número de residuos de citosina que tienen un marcador fluorescente unido covalentemente al mismo. El número de bases de citosina marcadas con fluorescencia es suficiente para generar una señal fluorescente detectable, mientras que los segmentos de ADN individualmente etiquetados conservan esencialmente sus propiedades de unión complementarias específicas (hibridación) con respecto a la región del cromosoma o cromosoma a detectar. Dichas sondas se realizan tomando el segmento de la sonda de ADN no marcado, transaminándose con un grupo de enlace una serie de nucleótidos de desoxicitidina en el segmento, uniendo covalentemente una etiqueta fluorescente a al menos una porción de las bases de desoxicitidina transaminadas.

[0274] Las sondas también se pueden etiquetar mediante traslación de mellas, etiquetado de cebadores aleatorios o etiquetado de PCR. El etiquetado se realiza utilizando nucleótidos marcados con fluorescencia (directa) o hapteno (indirecta). Ejemplos representativos, no limitativos de etiquetas incluyen: AMCA-6-dUTP, azulcascada-4-dUTP, fluoresceína-12-dUTP, rodamina-6-dUTP, rojoTexas-6-dUTP, Cy3-6-dUTP, Cy5-dUTP, Biotina (BIO)-11-dUTP, digoxigenina (DIG)-11-dUTP o dinitrofenilo (DNP)-11-dUTP.

[0275] Las sondas también se pueden marcar indirectamente con biotina o digoxigenina, o se pueden marcar con isótopos radiactivos tales como ^{32}p y .^{3}H, aunque se requieren moléculas de detección secundarias o un procesamiento adicional para visualizar las sondas. Por ejemplo, una sonda marcada con biotina se puede detectar mediante avidina conjugada con un marcador detectable. Por ejemplo, la avidina puede conjugarse con un marcador enzimático como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante. Los marcadores enzimáticos se pueden detectar en reacciones colorimétricas estándar utilizando un sustrato y/o un catalizador para la enzima. Los

catalizadores para la fosfatasa alcalina incluyen 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio. El diaminobenzoato se puede utilizar como un catalizador para la peroxidasa de rábano picante.

[0276] Las sondas también pueden prepararse de manera tal que un marcador fluorescente u otro no forme parte del ADN antes o durante la hibridación, y se añade después de la hibridación para detectar la sonda hibridada a un cromosoma. Por ejemplo, se pueden utilizar sondas que tienen moléculas antigénicas incorporadas en el ADN. Después de la hibridación, estas moléculas antigénicas se detectan utilizando anticuerpos específicos reactivos con las moléculas antigénicas. Dichos anticuerpos pueden incorporar un fluorocromo, o pueden detectarse utilizando un segundo anticuerpo con un fluorocromo unido.

[0277] Sin embargo, tratado o modificado, el ADN de la sonda se purifica comúnmente para eliminar productos residuales sin reaccionar (por ejemplo, moléculas de fluorocromo no incorporadas en el ADN) antes de su uso en la hibridación.

[0278] Antes de la hibridación, las sondas cromosómicas se desnaturalizan según procedimientos bien conocidos en la técnica. Las sondas se pueden hibridar o aparear al ADN cromosómico en condiciones de hibridación. Las «condiciones de hibridación» son condiciones que facilitan el apareamiento entre una sonda y el ADN cromosómico diana. Dado que el apareamiento de diferentes sondas variará dependiendo de la longitud de la sonda, la concentración de la base y similares, el apareamiento se facilita variando la concentración de la sonda, la temperatura de hibridación, la concentración de sal y otros factores bien conocidos en la técnica.

[0279] Las condiciones de hibridación se facilitan variando las concentraciones, composiciones de bases, complejidades y longitudes de las sondas, así como las concentraciones de sal, las temperaturas y la duración de la incubación. Por ejemplo, las hibridaciones *in situ* se realizan normalmente en un tampón de hibridación que contiene 1-2X SSC, 50-65 % de formamida y ADN de bloqueo para suprimir la hibridación no específica. En general, las condiciones de hibridación, como se describió anteriormente, incluyen temperaturas de aproximadamente 25 ºC a aproximadamente 55 ºC y longitudes de incubación de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 96 horas.

[0280] La unión no específica de las sondas cromosómicas al ADN fuera de la región diana puede eliminarse mediante una serie de lavados. La temperatura y la concentración de sal en cada lavado se varían para controlar la rigurosidad de los lavados. Por ejemplo, para condiciones de alta rigurosidad, los lavados pueden llevarse a cabo a aproximadamente 65 ºC a aproximadamente 80 ºC, utilizando 0,2X a aproximadamente 2X SSC, y aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de un detergente no iónico tal como Nonidet P-40 (NP40). La rigurosidad se puede reducir al disminuir la temperatura de los lavados o al aumentar la concentración de sal en los lavados. En algunas aplicaciones es necesario bloquear la capacidad de hibridación de secuencias repetitivas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el ARNt, el ADN genómico humano o el ADN de Cot-I se utilizan para bloquear la hibridación no específica. Después del lavado, se permite que el portaobjetos drene y se seque al aire, a continuación se aplican el medio de montaje, una contratinción como DAPI y un cubreobjetos al portaobjetos. Los portaobjetos pueden verse inmediatamente o almacenarse a -20 ºC antes del examen.

[0281] Para las sondas fluorescentes utilizadas en las técnicas de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), la fluorescencia se puede visualizar con un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro apropiado para cada fluoróforo, o utilizando conjuntos de filtros de paso de banda doble o triple para observar múltiples fluoróforos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.776.688. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas como la citometría de flujo para examinar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas.

[0282] En los procedimientos por CGH, una primera colección de ácidos nucleicos (por ejemplo, de una muestra, por ejemplo, un posible tumor) se marca con una primera etiqueta, mientras que una segunda colección de ácidos nucleicos (por ejemplo, un control, por ejemplo, de una célula/tejido sana) está etiquetada con una segunda etiqueta. La relación de hibridación de los ácidos nucleicos se determina por la relación de los dos marcadores (primero y segundo) que se unen a cada fibra en la matriz. Cuando hay deleciones o multiplicaciones cromosómicas, se detectarán las diferencias en la relación de las señales de las dos etiquetas y la relación proporcionará una medida del número de copias. El CGH basado en matrices también se puede realizar con un etiquetado de un solo color (a diferencia de marcar el control y la posible muestra de tumor con dos tintes diferentes y mezclarlos antes de la hibridación, lo que producirá una relación debida a la hibridación competitiva de sondas en las matrices). En CGH de un solo color, el control se marca e hibrida con una matriz y se leen las señales absolutas, y la posible muestra de tumor se marca e hibrida con una segunda matriz (con contenido idéntico) y se leen las señales absolutas. La diferencia en el número de copias se calcula con base en las señales absolutas de las dos matrices.

[0283] Los protocolos de hibridación adecuados para su uso con los procedimientos de la invención se describen, por ejemplo, en Albertson (1984) EMBO J. 3: 1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9138-9142; EPO Pub. n.º 430.402; Methods in Molecular Biology, vol. 33: In situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (1994), etc. En una realización, se utiliza el protocolo de hibridación de Pinkel, y col. (1998) Nature Genetics 20: 207-211, o de Kallioniemi (1992) Proc. Natl Acad Sci USA 89:5321-5325 (1992). La CGH basada en matrices se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.455.258.

[0284] En otra realización, se pueden utilizar ensayos basados en la amplificación para medir la presencia/ausencia y el número de copias. En dichos ensayos basados en la amplificación, las secuencias de ácido nucleico actúan como una plantilla en una reacción de amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación será proporcional a la cantidad de plantilla en la muestra original. La comparación con los controles apropiados, por ejemplo, tejido sano, proporciona una medida del número de copias.

[0285] Los expertos en la materia conocen bien los procedimientos de amplificación «cuantitativa». Por ejemplo, la PCR cuantitativa implica la coamplificación simultánea de una cantidad conocida de una secuencia de control utilizando los mismos cebadores. Esto proporciona un estándar interno que puede utilizarse para calibrar la reacción de PCR. Se proporcionan protocolos detallados para la PCR cuantitativa en Innis, y col. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.). La medición del número de copias de ADN en *loci* de microsatélites utilizando análisis cuantitativo por PCR se describe en Ginzonger, y col. (2000) Cancer Research 60:5405-5409. La secuencia de ácido nucleico conocida para los genes es suficiente para permitir que un experto en la materia seleccione de manera rutinaria cebadores para amplificar cualquier parte del gen. La PCR cuantitativa fluorogénica también se puede utilizar en los procedimientos de la invención. En la PCR cuantitativa fluorogénica, la cuantificación se basa en la cantidad de señales de fluorescencia, por ejemplo, TaqMan y sybr green.

[0286] Otros procedimientos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés) (véase Wu y Wallace (1989) Genomics 4:560, Landegren, y col. (1988) Science 241:1077, y Barringer y col. (1990) Gene 89: 117), amplificación de la transcripción (Kwoh, y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli, y col. (1990) Proc. Nat. Acad Sci. USA 87: 1874), punto de PCR, y PCR con adaptador del enlazador, etc.

Muestras de ácido nucleico

[0287] Una variedad de muestras de tejido puede ser la fuente de las muestras de ácido nucleico utilizada en los presentes procedimientos. Los fragmentos de ADN genómico o subgenómico se pueden aislar de la muestra de un sujeto (por ejemplo, una muestra de tumor, un tejido adyacente normal (NAT, por sus siglas en inglés), una muestra de sangre o cualquier control normal)). En ciertas realizaciones, la muestra de tejido se conserva como una muestra congelada o como preparación de tejido incrustado en parafina fijado con formaldehído o paraformaldehído (FFPE). Por ejemplo, la muestra se puede incrustar en una matriz, por ejemplo, un bloque FFPE o una muestra congelada. La etapa de aislamiento puede incluir la clasificación por flujo de cromosomas individuales; y/o micro-disección de la muestra de un sujeto (por ejemplo, una muestra de tumor, un NAT, una muestra de sangre).

[0288] Los protocolos para el aislamiento de ADN a partir de una muestra de tejido son conocidos en la técnica. Se describen procedimientos adicionales para aislar ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) de tejidos fijados en parafina fijados con formaldehído o paraformaldehído (FFPE), por ejemplo, en Cronin M. y col., (2004) Am J. Pathol. 164(1):35-42; Masuda N. y col., (1999) Nucleic Acids Res. 27(22):4436-4443; Specht K. y col, (2001) Am J Pathol. 158(2):419-429, Ambion RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Protocol (Ambion, cat. Nº AM1975, September 2008) y QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook (Qiagen, Cat. No. 37625, October 2007). El kit de aislamiento de ácido nucleico total RecoverAll™ utiliza xileno a temperaturas elevadas para solubilizar muestras embebidas en parafina y un filtro de fibra de vidrio para capturar ácidos nucleicos. El kit QIAamp® DNA FFPE Tissue utiliza la tecnología QIAamp® DNA Micro para la purificación de ADN genómico y mitocondrial.

[0289] Las muestras de ácido nucleico aisladas (por ejemplo, muestras de ADN genómico) pueden fragmentarse o cortarse mediante la práctica de técnicas rutinarias. Por ejemplo, el ADN genómico se puede fragmentar por procedimientos físicos de cizallamiento, procedimientos de escisión enzimática, procedimientos de escisión química y otros procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. La biblioteca de ácidos nucleicos puede contener la totalidad o sustancialmente la totalidad de la complejidad del genoma. El término «sustancialmente todo» en este contexto se refiere a la posibilidad de que en la práctica pueda haber alguna pérdida no deseada de la complejidad del genoma durante las etapas iniciales del procedimiento. Los procedimientos descritos en esta invención también son útiles en los casos en que la biblioteca de ácidos nucleicos es una porción del genoma, es decir, en la que la complejidad del genoma se reduce por diseño. En algunas realizaciones, cualquier porción seleccionada del genoma se puede utilizar con los procedimientos descritos en esta invención. En ciertas realizaciones, todo el exoma o un subconjunto del mismo está aislado.

[0290] Los procedimientos pueden incluir además aislar una muestra de ácido nucleico para proporcionar una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de ácido nucleico). En ciertas realizaciones, la muestra de ácido nucleico incluye fragmentos genómicos, subgenómicos completos, o ambos. Las muestras de ácido nucleico aisladas se pueden utilizar para preparar bibliotecas de ácido nucleico. Por lo tanto, en una realización, los procedimientos presentados en la invención incluyen además aislar una muestra de ácido nucleico para proporcionar una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de ácido nucleico como se describe en esta invención). Los protocolos para aislar y

preparar bibliotecas a partir de fragmentos genómicos o subgenómicos completos son conocidos en la técnica (por ejemplo, el kit de preparación de muestras de ADN genómico de Illumina). En ciertas realizaciones, el fragmento de ADN genómico o subgenómico se aísla de la muestra de un sujeto (por ejemplo, una muestra de tumor, un tejido adyacente normal (NAT), una muestra de sangre o cualquier control normal)). En una realización, se conserva la muestra (por ejemplo, el tumor o la muestra NAT). Por ejemplo, la muestra está embebida en una matriz, por ejemplo, un bloque FFPE o una muestra congelada. En ciertas realizaciones, la etapa de aislamiento incluye la clasificación por flujo de cromosomas individuales; y/o microdisección de la muestra de un sujeto (por ejemplo, una muestra de tumor, un NAT, una muestra de sangre). En ciertas realizaciones, la muestra de ácido nucleico utilizada para generar la biblioteca de ácido nucleico es inferior a 5, inferior a 1 microgramo, inferior a 500 ng, inferior a 200 ng, inferior a 100 ng, inferior a 50 ng o inferior a 20 ng (por ejemplo, 10 ng o menos).

[0291] En otras realizaciones, la muestra de ácido nucleico utilizada para generar la biblioteca incluye ARN o ADNc derivado de ARN. En algunas realizaciones, el ARN incluye ARN celular total. En otras realizaciones, ciertas secuencias abundantes de ARN (por ejemplo, ARN ribosómico) se han delecionado. En algunas realizaciones, la fracción de ARNm con cola de poli (A) en la preparación de ARN total se ha enriquecido. En algunas realizaciones, el ADNc se produce mediante procedimientos de síntesis de ADNc cebados al azar. En otras realizaciones, la síntesis de ADNc se inicia en la cola de poli (A) de los ARNm maduros mediante cebado con oligonucleótidos que contienen oligo (dT). Los procedimientos de deleción, enriquecimiento de poli (A) y síntesis de ADNc son bien conocidos por los expertos en la materia.

[0292] El procedimiento puede incluir además amplificar la muestra de ácido nucleico (por ejemplo, muestra de ADN o ARN) mediante procedimientos de amplificación de ácido nucleico específicos o no específicos que son bien conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, ciertas realizaciones, la muestra de ácido nucleico se amplifica, por ejemplo, mediante procedimientos de amplificación del genoma completo, tales como la amplificación por desplazamiento de cadena cebada al azar.

[0293] En otras realizaciones, la muestra de ácido nucleico se fragmenta o se corta mediante procedimientos físicos o enzimáticos y se liga a adaptadores sintéticos, se selecciona el tamaño (por ejemplo, mediante electroforesis preparativa en gel) y se amplifica (por ejemplo, mediante PCR). En otras realizaciones, el grupo de ácidos nucleicos fragmentado y ligado al adaptador se utiliza sin una selección o amplificación de tamaño explícita antes de la selección híbrida.

[0294] En otras realizaciones, el ADN aislado (por ejemplo, el ADN genómico) está fragmentado o cortado. En algunas realizaciones, la biblioteca incluye menos del 50 % del ADN genómico, como una subfracción del ADN genómico que es una representación reducida o una porción definida de un genoma, por ejemplo, que se ha subfraccionado por otros medios. En otras realizaciones, la biblioteca incluye todo o sustancialmente todo el ADN genómico.

[0295] En algunas realizaciones, la biblioteca incluye menos del 50 % del ADN genómico, como una subfracción del ADN genómico que es una representación reducida o una porción definida de un genoma, por ejemplo, que se ha subfraccionado por otros medios. En otras realizaciones, la biblioteca incluye todo o sustancialmente todo el ADN genómico. Los protocolos para aislar y preparar bibliotecas a partir de fragmentos genómicos o subgenómicos completos son conocidos en la técnica (por ejemplo, el kit de preparación de muestras de ADN genómico de Illumina). Los procedimientos alternativos de cizallamiento del ADN pueden ser más automatizables y/o más eficientes (por ejemplo, con muestras de FFPE degradadas). También se pueden utilizar alternativas a los procedimientos de cizallamiento del ADN para evitar una etapa de ligamiento durante la preparación de la biblioteca.

[0296] Los procedimientos descritos en esta invención pueden realizarse utilizando una pequeña cantidad de ácidos nucleicos, por ejemplo, cuando la cantidad de ADN fuente es limitante (por ejemplo, incluso después de la amplificación del genoma completo). En una realización, el ácido nucleico comprende menos de aproximadamente 5 µg, 4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,8 µg, 0,7 µg, 0,6 µg, 0,5 µg o 400 ng, 300 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, o 20 ng o menos de muestra de ácido nucleico. Por ejemplo, para preparar 500 ng de ácidos nucleicos listos para la hibridación, uno comienza normalmente con 3 µg de ADN genómico. Sin embargo, se puede comenzar con menos si se amplifica el ADN genómico (por ejemplo, mediante PCR) antes de la etapa de hibridación de la solución. Por lo tanto, es posible, pero no esencial, amplificar el ADN genómico antes de la hibridación de la solución.

[0297] En algunas realizaciones, se genera una biblioteca utilizando ADN (por ejemplo, ADN genómico) de un tejido de muestra, y se genera una biblioteca correspondiente con ARN (o ADNc) aislado del mismo tejido de muestra.

Diseño de cebos

[0298] Un cebo puede ser una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN, que puede hibridarse con (por ejemplo, ser complementaria a) y, por lo tanto, permitir la captura de un ácido nucleico

diana. En una realización, un cebo es una molécula de ARN. En otras realizaciones, un cebo incluye una entidad de unión, por ejemplo, una etiqueta de afinidad, que permite la captura y separación, por ejemplo, mediante la unión a una entidad de unión, de un híbrido formado por un cebo y un ácido nucleico hibridado con el cebo. En una realización, un cebo es adecuado para la hibridación en fase de solución.

[0299] Los cebos pueden producirse y utilizarse por procedimientos y condiciones de hibridación como se describe en los documentos US 2010/0029498 y Gnirke, A. y col. (2009) Nat Biotecnol. 27(2):182-189, y en USSN 61/428.568, presentada el 30 de diciembre de 2010. Por ejemplo, los cebos de ARN biotinilado pueden producirse obteniendo un grupo de oligonucleótidos sintéticos largos, originalmente sintetizados en una micromatriz, y amplificando los oligonucleótidos para producir las secuencias de cebos. En algunas realizaciones, los cebos se producen añadiendo una secuencia promotora de ARN polimerasa en un extremo de las secuencias de cebos, y sintetizando secuencias de ARN utilizando ARN polimerasa. En una realización, pueden obtenerse bibliotecas de oligodesoxinucleótidos sintéticos de proveedores comerciales, tales como Agilent Technologies, Inc., y amplificarse utilizando procedimientos conocidos de amplificación de ácidos nucleicos.

[0300] Cada secuencia de cebo puede incluir una secuencia de cebo específica de la diana (por ejemplo, una específica de miembro) y colas universales en cada extremo. Como se utiliza en esta invención, el término «secuencia de cebo» puede referirse a la secuencia de cebo específica de la diana o al oligonucleótido completo, incluida la «secuencia de cebo» específica de la diana y otros nucleótidos del oligonucleótido. En una realización, un cebo específico de la diana se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico en el intrón 15 de KIF5B, en el intrón 11 de RET, o una unión de fusión que une el exón 15 de KIF5B y el exón 12 de RET.

[0301] En una realización, el cebo es un oligonucleótido de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, de los cuales 170 nucleótidos son «secuencias de cebo» específicas de la diana. Los otros 30 nucleótidos (por ejemplo, 15 nucleótidos en cada extremo) son colas arbitrarias universales utilizadas para la amplificación por PCR. Las colas pueden ser cualquier secuencia seleccionada por el usuario. Por ejemplo, el grupo de oligonucleótidos sintéticos puede incluir oligonucleótidos de la secuencia de 5'-ATCGCACCAGCGTGTN$_{170}$CACTGCGGCTCCTCA-3' con N$_{170}$ que indica las secuencias de cebo específicas de la diana.

[0302] Las secuencias de cebo descritas en esta invención pueden utilizarse para la selección de exones y secuencias diana cortas. En una realización, el cebo tiene una longitud de entre aproximadamente 100 nucleótidos y 300 nucleótidos. En otra realización, el cebo tiene una longitud de aproximadamente 130 nucleótidos y 230 nucleótidos. En otra realización, el cebo está entre aproximadamente 150 nucleótidos y 200 nucleótidos de longitud. Las secuencias específicas de la diana en los cebos, por ejemplo, para la selección de exones y secuencias diana cortas, tienen una longitud de entre aproximadamente 40 nucleótidos y 1.000 nucleótidos. En una realización, la secuencia específica de la diana está entre aproximadamente 70 nucleótidos y 300 nucleótidos de longitud. En otra realización, la secuencia específica de la diana tiene una longitud de entre aproximadamente 100 nucleótidos y 200 nucleótidos. En otra realización, la secuencia específica de la diana está entre aproximadamente 120 nucleótidos y 170 nucleótidos de longitud.

Secuenciación

[0303] La invención también incluye procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos. En una realización, cualquier variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica se puede utilizar para secuenciar directamente al menos una porción de una fusión KIF5B-RET. En una realización, la secuencia de fusión KIF5B-RET se compara con una secuencia de referencia (control) correspondiente.

[0304] En una realización, la secuencia de la molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET se determina mediante un procedimiento que incluye uno o más de: hibridar un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido específico de alelo para una alteración descrita en esta invención con dicho ácido nucleico; hibridar un cebador, o un conjunto de cebadores (por ejemplo, un par de cebadores), que amplifica una región que comprende la mutación o una unión de fusión del alelo; amplificar, por ejemplo, amplificar específicamente, una región que comprende la mutación o una unión de fusión del alelo; unir un oligonucleótido adaptador a un extremo de un ácido nucleico que comprende la mutación o una unión de fusión del alelo; generar una señal óptica, por ejemplo, una señal colorimétrica, específica de la presencia de la mutación o unión de fusión; hibridar un ácido nucleico que comprende la mutación o unión de fusión a un segundo ácido nucleico, por ejemplo, un segundo ácido nucleico unido a un sustrato; generar una señal, por ejemplo, una señal eléctrica o fluorescente, específica de la presencia de la mutación o unión de fusión; e incorporar un nucleótido en un oligonucleótido que se hibrida a un ácido nucleico que contiene la mutación o unión de fusión.

[0305] En otra realización, la secuencia se determina mediante un procedimiento que comprende uno o más de: determinar la secuencia de nucleótidos a partir de una molécula de ácido nucleico individual, por ejemplo, cuando una señal correspondiente a la secuencia se deriva de una molécula única como opuesta, por ejemplo, de una suma de señales de una pluralidad de moléculas clonalmente expandidas; determinar la secuencia de

nucleótidos de proxies expandidos clonalmente para moléculas de ácido nucleico individuales; secuenciación masiva paralela de lectura corta; secuenciación basada en plantillas; pirosecuenciación; secuenciación en tiempo real que comprende formación de imágenes de la incorporación continua de nucleótidos marcados con tinte durante la síntesis de ADN; secuenciación de nanoporos; secuenciación por hibridación; secuenciación basada en matrices de nanotransistores; secuenciación polónica; secuenciación basada en microscopía de barrido de efecto túnel (STM, por sus siglas en inglés); o secuenciación basada en sensores de nanocables y moléculas.

[0306] Se puede utilizar cualquier procedimiento de secuenciación conocido en la técnica. Las reacciones de secuenciación ejemplares incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxam y Gilbert (Proc. Natl Acad Sci USA (1977) 74:560) o Sanger (Sanger y col. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. 74:5463). Se puede utilizar cualquier variedad de procedimientos automatizados de secuenciación cuando se realizan los ensayos, (Biotechniques (1995) 19:448), incluyendo la secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.547.835 y el número de publicación de la solicitud de patente internacional WO 94/16101, titulado DNA Sequencing by Mass Spectrometry de H. Koster; patente de EE. UU. n.º 5.547.835 y número de publicación de solicitud de patente internacional WO 94/21822 titulado DNA Sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradation de H. Koster), y patente de EE. UU. n.º. 5.605.798 y la solicitud de patente internacional n.º PCT/US96/03651 titulada DNA Diagnostics Based on Spectrometry de H. Koster; Cohen y col. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; y Griffin y col. (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159).

[0307] La secuenciación de las moléculas de ácido nucleico también se puede llevar a cabo utilizando la secuenciación de próxima generación (NGS). La secuenciación de próxima generación incluye cualquier procedimiento de secuenciación que determine la secuencia de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico individuales o proxies clonalmente expandidos para moléculas de ácido nucleico individuales de manera altamente paralela (por ejemplo, más de 10^5 moléculas se secuencian simultáneamente). En una realización, la abundancia relativa de las especies de ácido nucleico en la biblioteca puede estimarse contando el número relativo de ocurrencias de sus secuencias relacionadas en los datos generados por el experimento de secuenciación. Los procedimientos de secuenciación de próxima generación son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Metzker, M. (2010) Nature Biotechnology Reviews 11:31-46.

[0308] En una realización, la secuenciación de próxima generación permite la determinación de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico individual (por ejemplo, el sistema de secuenciación de genes HeliScope de Helicos BioSciences y el sistema PacBio RS de Pacific Biosciences). En otras realizaciones, el procedimiento de secuenciación determina la secuencia de nucleótidos de los proxies expandidos clonalmente para moléculas de ácido nucleico individuales (por ejemplo, el secuenciador Solexa, Illumina Inc., San Diego, California); 454 Life Sciences (Branford, Connecticut) e Ion Torrent), por ejemplo, secuenciación masivamente paralela de lectura corta (por ejemplo, el secuenciador Solexa, Illumina Inc., San Diego, California), que genera más bases de secuencia por unidad de secuenciación que otros procedimientos de secuenciación que generan menos lecturas pero más largas. Otros procedimientos o máquinas para la secuenciación de próxima generación incluyen, pero no se limitan a, los secuenciadores proporcionados por 454 Life Sciences (Branford, Connecticut), Applied Biosystems (Foster City, California); secuenciador SOLiD) y Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, Mass.).

[0309] Las plataformas para la secuenciación de próxima generación incluyen, pero no se limitan a, sistema FLX del secuenciador del genoma (GS) de Roche/454, analizador de genoma (GA) de Illumina/Solexa, sistema de detección de ligamiento de oligonucleótidos de soporte (APD) de Life/APG (SOLiD), sistema G.007 de Polonator, sistema de secuenciación de genes HeliScope de Helicos BioSciences y el sistema PacBio RS de Pacific Biosciences.

[0310] Las tecnologías de NGS pueden incluir una o más etapas, por ejemplo, preparación de plantillas, secuenciación y formación de imágenes y análisis de datos.

Preparación de plantillas

[0311] Los procedimientos de preparación de plantillas pueden incluir etapas tales como romper ácidos nucleicos al azar (por ejemplo, ADN genómico o ADNc) en tamaños más pequeños y generar plantillas de secuenciación (por ejemplo, plantillas de fragmentos o plantillas de pares de parejas). Las plantillas separadas espacialmente pueden unirse o inmovilizarse a una superficie o soporte sólido, lo que permite realizar simultáneamente grandes cantidades de reacciones de secuenciación. Los tipos de plantillas que se pueden utilizar para las reacciones NGS incluyen, por ejemplo, plantillas amplificadas clonalmente que se originan a partir de moléculas de ADN individuales y plantillas de moléculas de ADN individuales.

[0312] Los procedimientos de preparación de plantillas amplificadas clonalmente incluyen, por ejemplo, PCR en emulsión (emPCR, por sus siglas en inglés) y amplificación en fase sólida.

[0313] EmPCR se puede utilizar para preparar plantillas para NGS. Normalmente, se genera una biblioteca de fragmentos de ácido nucleico, y los adaptadores que contienen sitios de cebado universales se ligan a los

extremos del fragmento. Los fragmentos se desnaturalizan en hebras individuales y se capturan con perlas. Cada perla captura una sola molécula de ácido nucleico. Después de la amplificación y el enriquecimiento de las perlas de emPCR, se puede unir o inmovilizar una gran cantidad de plantillas en un gel de poliacrilamida en un portaobjetos de microscopio estándar (por ejemplo, Polonator), químicamente reticulada a una superficie de vidrio recubierta de amino (por ejemplo, Life/APG; Polonator), o depositarse en pocillos individuales de PicoTiterPlate (PTP) (p. ej., Roche/454), en los que se puede realizar la reacción NGS.

[0314] La amplificación en fase sólida también se puede utilizar para producir plantillas para NGS. Normalmente, los cebadores directo e inverso se unen covalentemente a un soporte sólido. La densidad de la superficie de los fragmentos amplificados se define por la relación de los cebadores a las plantillas en el soporte. La amplificación en fase sólida puede producir cientos de millones de agrupaciones de plantillas separadas espacialmente (por ejemplo, Illumina/Solexa). Los extremos de las agrupaciones de plantillas se pueden hibridar con cebadores de secuenciación universales para reacciones NGS.

[0315] Otros procedimientos de preparación de plantillas amplificadas clonalmente también incluyen, por ejemplo, amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés) (Lasken R. S. Curr Opin Microbiol. 2007; 10(5):510-6). MDA es una técnica de amplificación de ADN no basada en PCR. La reacción implica aparear cebadores hexaméricos aleatorios en la plantilla y la síntesis de ADN mediante enzimas de alta fidelidad, normalmente Φ29 a una temperatura constante. MDA puede generar productos de gran tamaño con menor frecuencia de error.

[0316] Los procedimientos de amplificación de plantillas, tales como la PCR, pueden acoplarse con plataformas NGS para dirigir o enriquecer regiones específicas del genoma (por ejemplo, exones). Los procedimientos ejemplares de enriquecimiento de la plantilla incluyen, por ejemplo, tecnología de PCR de microgotas (Tewhey R. y col., Nature Biotech. 2009, 27:1025-1031), micromatrices de oligonucleótidos diseñados a medida (por ejemplo, micromatrices de oligonucleótidos Roche/NimbleGen) y procedimientos de hibridación basados en soluciones (por ejemplo, sondas de inversión molecular (MIPs, por sus siglas en inglés) (Porreca G. J. y col., Nature Methods, 2007, 4:931-936; Krishnakumar S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105:9296-9310; Turner E. H. y col., Nature Methods, 2009, 6:315-316), y secuencias de captura de ARN biotinilado (Gnirke A. y col., Nat. Biotecnol. 2009; 27(2):182-9).

[0317] Las plantillas de una sola molécula son otro tipo de plantillas que se pueden utilizar para la reacción NGS. Las plantillas de moléculas individuales separadas espacialmente pueden inmovilizarse sobre soportes sólidos mediante diversos procedimientos. En una estrategia, las moléculas de cebador individuales se unen covalentemente al soporte sólido. Los adaptadores se añaden a las plantillas y las plantillas se hibridan con los cebadores inmovilizados. En otra estrategia, las plantillas de una sola molécula se unen covalentemente al soporte sólido al cebar y extender las plantillas de una sola molécula monocatenaria a partir de cebadores inmovilizados. Los cebadores universales se hibridan a continuación con las plantillas. En otra estrategia, las moléculas de polimerasa individuales se unen al soporte sólido, al que se unen las plantillas cebadas.

Secuenciación y formación de imágenes

[0318] Los procedimientos de secuenciación y formación de imágenes ejemplares para NGS incluyen, pero no se limitan a, terminación reversible cíclica (CRT, por sus siglas en inglés), secuenciación por ligamiento (SBL, por sus siglas en inglés), adición de una sola molécula (pirosecuenciación) y secuenciación en tiempo real.

[0319] CRT utiliza terminadores reversibles en un procedimiento cíclico que incluye mínimamente las etapas de incorporación de nucleótidos, imágenes de fluorescencia y escisión. Normalmente, una ADN polimerasa incorpora un único nucleótido modificado de forma fluorescente correspondiente al nucleótido complementario de la base de la plantilla al cebador. La síntesis de ADN se termina después de la adición de un solo nucleótido y los nucleótidos no incorporados se eliminan por lavado. La formación de imágenes se realiza para determinar la identidad del nucleótido marcado incorporado. Luego, en la etapa de escisión, se eliminan el grupo de terminación/inhibición y el tinte fluorescente. Las plataformas NGS ejemplares que utilizan el procedimiento CRT incluyen, pero no se limitan a, analizador del genoma (GA) Illumina/Solexa, que utiliza el procedimiento de plantilla amplificada clonalmente junto con el procedimiento de CRT de cuatro colores detectado por la fluorescencia de reflexión interna total (TIRF, por sus siglas en inglés); y Helicos BioSciences/HeliScope, que utiliza el procedimiento de plantilla de molécula única junto con el procedimiento de CRT de un color detectado por TIRF.

[0320] SBL utiliza ADN ligasa y sondas codificadas de una base o sondas codificadas de dos bases para la secuenciación. Normalmente, una sonda marcada con fluorescencia se hibrida con su secuencia complementaria adyacente a la plantilla cebada. La ADN ligasa se utiliza para ligar la sonda marcada con tinte al cebador. La imagen de fluorescencia se realiza para determinar la identidad de la sonda ligada después de que las sondas no ligadas se eliminen por lavado. El tinte fluorescente se puede eliminar mediante el uso de sondas escindibles para regenerar un grupo 5'-PO_4 para los ciclos de ligamiento posteriores. Alternativamente, se puede hibridar un nuevo cebador con la plantilla después de que se elimine el cebador viejo. Las plataformas SBL ejemplares incluyen, pero no se limitan a,

Life/APG/SOLiD (detección de ligamiento de oligonucleótidos de soporte), que utiliza sondas codificadas con dos bases.

[0321] El procedimiento de pirosecuenciación se basa en detectar la actividad de la ADN polimerasa con otra enzima quimioluminiscente. Normalmente, el procedimiento permite la secuenciación de una sola hebra de ADN sintetizando la hebra complementaria a lo largo de ella, un par de bases a la vez, y detectando qué base se añadió realmente en cada etapa. La plantilla de ADN está inmóvil, y las soluciones de los nucleótidos A, C, G y T se añade y eliminan secuencialmente de la reacción. La luz se produce solo cuando la solución de nucleótidos complementa la primera base no pareada de la plantilla. La secuencia de soluciones que producen señales quimioluminiscentes permite la determinación de la secuencia de la plantilla. Las plataformas de pirosecuenciación ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Roche/454, que utiliza plantillas de ADN preparadas por emPCR con 1-2 millones de perlas depositadas en pocillos de PTP.

[0322] La secuenciación en tiempo real implica obtener imágenes de la incorporación continua de nucleótidos marcados con tinte durante la síntesis de ADN. Las plataformas de secuenciación en tiempo real ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la plataforma de Pacific Biosciences, que utiliza moléculas de ADN polimerasa unidas a la superficie de detectores individuales de guía de onda de modo cero (ZMW, por sus siglas en inglés) para obtener información de la secuencia cuando se incorporan nucleótidos fosfoenlazados al crecimiento de la hebra cebadora; la plataforma Life/VisiGen, que utiliza una ADN polimerasa modificada por ingeniería genética con un tinte fluorescente unido para generar una señal mejorada después de la incorporación de nucleótidos por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés); y la plataforma LI-COR Biosciences, que utiliza nucleótidos que extinguen los tintes en la reacción de secuenciación.

[0323] Otros procedimientos de secuenciación para NGS incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de nanoporos, secuenciación por hibridación, secuenciación basada en nanotransistores, secuenciación polónica, secuenciación basada en microscopía de barrido de efecto túnel (STM) y secuenciación basada en sensores de nanocable y molécula.

[0324] La secuenciación de nanoporos implica la electroforesis de moléculas de ácido nucleico en solución a través de un poro a escala nanométrica que proporciona un espacio altamente confinado dentro del cual se pueden analizar polímeros de ácido nucleico único. Se describen procedimientos ejemplares de secuenciación de nanoporos, por ejemplo, en Branton D. y col., Nat. Biotecnol. 2008; 26(10):1146-53.

[0325] La secuenciación por hibridación es un procedimiento no enzimático que utiliza una micromatriz de ADN. Normalmente, un solo grupo de ADN se marca de forma fluorescente y se hibrida con una matriz que contiene secuencias conocidas. Las señales de hibridación de un punto dado en la matriz pueden identificar la secuencia de ADN. La unión de una hebra de ADN a su hebra complementaria en la doble hélice del ADN es sensible incluso a los emparejamientos erróneos de una sola base cuando la región híbrida es corta o están presentes las proteínas especializadas de detección de emparejamiento erróneo. Los procedimientos ejemplares de secuenciación por hibridación se describen, por ejemplo, en Hanna G. J. y col., J. Clin. Microbiol. 2000; 38 (7): 2715-21; y Edwards J. R. y col, Mut. Res. 2005; 573 (1-2): 3-12.

[0326] La secuenciación polónica se basa en la amplificación de polonías y la secuenciación por síntesis a través de múltiples extensiones de base única (FISSEQ). La amplificación por polonías es un procedimiento para amplificar el ADN *in situ* sobre una película de poliacrilamida. Los procedimientos ejemplares de secuenciación polónica se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0087362.

[0327] Los dispositivos basados en matrices de nanotransistores, tales como el transistor de efecto de campo en nanotubos de carbono (CNTFET, por sus siglas en inglés), también se pueden utilizar para NGS. Por ejemplo, las moléculas de ADN son estiradas y conducidas sobre nanotubos por electrodos microfabricados. Las moléculas de ADN entran en contacto secuencialmente con la superficie del nanotubo de carbono, y la diferencia en el flujo de corriente desde cada base se produce debido a la transferencia de carga entre la molécula de ADN y los nanotubos. El ADN se secuencia mediante el registro de estas diferencias. Los procedimientos ejemplares de secuenciación basados en una matriz de nanotransistores se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2006/0246497.

[0328] La microscopia de barrido de efecto túnel (STM) también se puede utilizar para NGS. STM utiliza una sonda controlada por piezoeléctricos que realiza un barrido ráster de un espécimen para formar imágenes de su superficie. El STM se puede utilizar para obtener imágenes de las propiedades físicas de moléculas de ADN individuales, por ejemplo, generando imágenes coherentes de tunelización de electrones y espectroscopia mediante la integración del microscopio de barrido de efecto túnel con un espacio flexible impulsado por un accionador. Los procedimientos de secuenciación ejemplares que utilizan STM se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0194225.

[0329] Un dispositivo de análisis molecular que está comprendido por un sensor de nanocables y molécula

también se puede utilizar para NGS. Dicho dispositivo puede detectar las interacciones del material nitrogenado dispuesto en los nanocables y las moléculas de ácido nucleico, como el ADN. Una guía de moléculas está configurada para guiar una molécula cerca del sensor de moléculas, lo que permite una interacción y una detección posterior. Los procedimientos de secuenciación ejemplares que utilizan sensores de nanocables y moléculas se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2006/0275779.

[0330] Se pueden utilizar procedimientos de secuenciación de doble extremo para NGS. La secuenciación de doble extremo utiliza cebadores bloqueados y no bloqueados para secuenciar tanto las hebras sentido como antisentido del ADN. Normalmente, estos procedimientos incluyen las etapas de apareamiento de un cebador no bloqueado a una primera hebra de ácido nucleico; apareamiento de un segundo cebador bloqueado en una segunda hebra de ácido nucleico; alargamiento del ácido nucleico a lo largo de la primera hebra con una polimerasa; terminación del primer cebador de secuenciación; desbloqueo del segundo cebador; y alargamiento del ácido nucleico a lo largo de la segunda hebra. Se describen procedimientos ejemplares de secuenciación de doble extremo, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.244.567.

Análisis de los datos

[0331] Una vez que se han generado las lecturas de NGS, pueden alinearse con una secuencia de referencia conocida o ensamblarse *de novo*.

[0332] Por ejemplo, la identificación de variaciones genéticas como el polimorfismo de un solo nucleótido y las variantes estructurales en una muestra (por ejemplo, una muestra de tumor) se puede lograr alineando las lecturas de NGS con una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de tipo natural). Los procedimientos de alineación de secuencias para NGS se describen, por ejemplo, en Trapnell C. y Salzberg S. L. Nature Biotech., 2009, 27:455-457.

[0333] Se describen ejemplos de ensamblajes *de novo*, por ejemplo, en Warren R. y col., Bioinformatics, 2007, 23:500-501; Butler J. y col., Genome Res., 2008, 18:810-820; y Zerbino D.R. y Birney E., Genome Res., 2008, 18:821-829.

[0334] La alineación o el ensamblaje de secuencias se puede realizar utilizando datos de lectura de una o más plataformas NGS, por ejemplo, mezclando datos de lectura de Roche/454 e Illumina/Solexa.

[0335] Los algoritmos y los procedimientos para el análisis de datos se describen en el documento USSN 61/428.568, presentado el 30 de diciembre de 2010.

Nivel de expresión de fusión KIF5B-RET

[0336] En ciertas realizaciones, el nivel de expresión de fusión de KIF5B-RET también puede ensayarse. La expresión de fusión de KIF5B-RET se puede evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de procedimientos para detectar la expresión de una molécula o proteína transcrita. Ejemplos no limitativos de tales procedimientos incluyen procedimientos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de la superficie celular, citoplásmicas o nucleares, procedimientos de purificación de proteínas, ensayos de actividad o función de proteínas, procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos, procedimientos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos.

[0337] En ciertas realizaciones, la actividad de un gen particular se caracteriza por una medida del transcrito del gen (por ejemplo, un ARNm), por una medida de la cantidad de proteína traducida, o por una medida de la actividad del producto génico. La expresión de fusión de KIF5B-RET se puede controlar de varias maneras, incluso mediante la detección de los niveles de ARNm, los niveles de proteína o la actividad de la proteína, cualquiera de los cuales se puede medir utilizando técnicas estándar. La detección puede involucrar la cuantificación del nivel de expresión génica (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, proteína o actividad enzimática) o, alternativamente, puede ser una evaluación cualitativa del nivel de expresión génica, en particular en comparación con un control nivel. El tipo de nivel que se está detectando será evidente en el contexto.

[0338] Los procedimientos de detección y/o cuantificación del transcrito del gen KIF5B-RET (ARNm o ADNc elaborado a partir de ellos) utilizando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en la materia (véase Sambrook y col. *supra*). Por ejemplo, un procedimiento para evaluar la presencia, ausencia o cantidad de ADNc implica una transferencia de Southern como se describe anteriormente. Brevemente, el ARNm se aísla (por ejemplo, utilizando un procedimiento de extracción de guanidinio-fenol-cloroformo ácido, Sambrook y col. *supra*) y se transcribe de forma inversa para producir ADNc. El ADNc se digiere acto seguido opcionalmente y se ejecuta en un gel en tampón y se transfiere a las membranas. La hibridación se lleva a cabo utilizando las sondas de ácido nucleico específicas para el ADNc de fusión KIF5B-RET, por ejemplo, utilizando las sondas y los cebadores descritos en esta invención.

[0339] En otras realizaciones, la expresión de KIF5B-RET se evalúa preparando ADN genómico o ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) a partir de células en una muestra del sujeto, e hibridando el ADN genómico o ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un polinucleótido que comprende la fusión KIF5B-RET, y sus fragmentos. El ADNc puede, opcionalmente, amplificarse utilizando cualquiera de una variedad de procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia. La expresión de la fusión de KIF5B-RET también se puede detectar mediante PCR cuantitativa (QPCR, por sus siglas en inglés) para evaluar el nivel de expresión de KIF5B-RET.

Detección del polipéptido de fusión KIF5B-RET

[0340] La actividad o nivel de un polipéptido de fusión KIF5B-RET también puede detectarse y/o cuantificarse detectando o cuantificando el polipéptido expresado. El polipéptido de fusión KIF5B-RET puede detectarse y cuantificarse por cualquiera de los diversos medios conocidos por los expertos en la materia. Estos pueden incluir procedimientos bioquímicos analíticos como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), cromatografía de hiperdifusión y similares, o varios procedimientos inmunológicos como reacciones de precipitina en fluidos o en gel, inmunodifusión (única o doble), inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, inmunoelectrotransferencia, inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) y similares. Un experto en la materia puede adaptar procedimientos conocidos de detección de proteínas/anticuerpos.

[0341] Otro agente para detectar un polipéptido de fusión KIF5B-RET es una molécula de anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido correspondiente a un marcador de la descripción, por ejemplo, un anticuerpo con un marcador detectable. Las técnicas para generar anticuerpos se describen en esta invención. El término «marcado», con respecto a la sonda o el anticuerpo, tiene por objeto abarcar el marcado directo de la sonda o el anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, el enlace físico) de una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado en el extremo de una sonda de ADN con biotina, de manera que se puede detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia.

[0342] En otra realización, el anticuerpo está marcado, por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforos, marcado con fluoróforo o marcado con enzimas. En otra realización, se utiliza un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par de proteína-ligando {por ejemplo, biotina-estreptavidina}), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína de fusión KIF5B-RET.

[0343] Los polipéptidos de fusión KIF5B-RET de las células se pueden aislar utilizando técnicas que conocen los expertos en la materia. Los procedimientos de aislamiento de proteínas empleados pueden ser, por ejemplo, los descritos en Harlow y Lane (Harlow y Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

[0344] Los medios para detectar proteínas utilizando técnicas electroforéticas son bien conocidos por los expertos en la materia (véase en general, R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990) Methods in Enzymology vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N.Y.).

[0345] En otra realización, el análisis de membrana Western (inmunoelectrotransferencia) se utiliza para detectar y cuantificar la presencia de un polipéptido en la muestra.

[0346] En otra realización, el polipéptido se detecta utilizando un inmunoensayo. Como se utiliza en esta invención, un inmunoensayo es un ensayo que utiliza un anticuerpo para unirse específicamente al analito. El inmunoensayo se caracteriza así por la detección de la unión específica de un polipéptido a un anti-anticuerpo en oposición al uso de otras propiedades físicas o químicas para aislar, dirigir y cuantificar el analito.

[0347] El polipéptido de fusión KIF5B-RET se detecta y/o cuantifica utilizando cualquiera de una serie de ensayos de unión inmunológica (véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, véase también Asai (1993) Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc. Nueva York; Stites & Terr (1991) Basic and Clinical Immunology 7th Edition.

Kits

[0348] En un ejemplo, la descripción presenta, un kit, por ejemplo, que contiene un oligonucleótido que tiene una mutación descrita en esta invención, por ejemplo, una fusión KIT5B-RET. Opcionalmente, el kit también puede

contener un oligonucleótido que es la contraparte de tipo natural del oligonucleótido mutante.

[0349] Un kit presentado en la descripción puede incluir un portador, por ejemplo, un medio que se está compartimentando para recibir en confinamiento cercano uno o más medios del recipiente. En un ejemplo, el recipiente contiene un oligonucleótido, por ejemplo, un cebador o sonda como se describe anteriormente. Los componentes del kit son útiles, por ejemplo, para diagnosticar, identificar una mutación en una muestra de tumor en un paciente y, en consecuencia, identificar un agente terapéutico apropiado para tratar el cáncer. La sonda o cebador del kit se puede utilizar en cualquier ensayo de secuenciación o detección de nucleótidos conocido en la técnica, por ejemplo, un ensayo de secuenciación, por ejemplo, un procedimiento NGS, RT-PCR o hibridación *in situ*.

[0350] Un kit presentado en la descripción puede incluir, por ejemplo, un ensayo de controles positivos y negativos, nucleótidos, enzimas (por ejemplo, ARN o ADN polimerasa o ligasa), disolventes o tampones, un estabilizador, un conservante, un anticuerpo secundario, por ejemplo, un anticuerpo anti-HRP (IgG) y un reactivo de detección.

[0351] Se puede proporcionar un oligonucleótido en cualquier forma, por ejemplo, líquida, seca, semiseca o liofilizada, o en una forma para almacenamiento en estado congelado.

[0352] Normalmente, un oligonucleótido y otros componentes en un kit se proporcionan en una forma que es estéril. Cuando un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene una mutación RET, por ejemplo, una fusión KIF5B-RET, descrito en esta invención, o un oligonucleótido complementario de una mutación RET descrito en esta invención, se proporciona en una solución líquida, la solución líquida generalmente es una solución acuosa, por ejemplo, una solución acuosa estéril. Cuando el oligonucleótido se proporciona como una forma seca, la reconstitución se realiza generalmente mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, un tampón estéril, puede proporcionarse opcionalmente en el kit.

[0353] El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene un oligonucleótido en una concentración adecuada para su uso en el ensayo o con instrucciones de dilución para su uso en el ensayo. En algunos ejemplos, el kit contiene recipientes, divisores o compartimentos separados para los componentes de ensayo y oligonucleótidos, y el material informativo. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden estar contenidos en una botella o vial, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otros ejemplos, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un contenedor único, no dividido. Por ejemplo, una composición de oligonucleótido está contenida en una botella o vial que se ha adherido al material informativo en forma de una etiqueta. En algunos ejemplos, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, cada uno de los cuales contiene una o más formas unitarias (por ejemplo, para su uso con un ensayo) de un oligonucleótido. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de ampollas, paquetes de papel de aluminio o paquetes de ampollas, cada uno de los cuales contiene una única unidad de oligonucleótido para su uso en una secuenciación o detección de una mutación en una muestra de tumor. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos y/o estancos. El envase puede ser etiquetado para su uso.

[0354] Para kits basados en anticuerpos, el kit puede incluir: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, unido a un soporte sólido) que se une a un polipéptido de fusión KIF5B-RET; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une al polipéptido o al primer anticuerpo y se conjuga con un agente detectable.

[0355] En un ejemplo, el kit puede incluir material informativo para realizar e interpretar la secuenciación o el diagnóstico. En otro ejemplo, el kit puede proporcionar una guía sobre dónde informar acerca de los resultados del ensayo, por ejemplo, en un centro de tratamiento o proveedor de atención médica. El kit puede incluir formularios para notificar los resultados de una secuenciación o un ensayo de diagnóstico descrito en esta invención, y dirección e información de contacto con respecto a dónde enviar dichos formularios u otra información relacionada; o una dirección URL (localizador de recursos uniforme) para notificar los resultados en una base de datos en línea o una aplicación en línea (por ejemplo, una app). En otro ejemplo, el material informativo puede incluir una guía con respecto a si un paciente debe recibir tratamiento con un fármaco quimioterapéutico particular, dependiendo de los resultados del ensayo.

[0356] El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, las instrucciones, se proporciona en material impreso, por ejemplo, un texto impreso, dibujos y/o fotografías, por ejemplo, una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, tales como material legible por ordenador, grabación de video o grabación de audio. En otro ejemplo, el material informativo del kit es una información de contacto, por ejemplo, una dirección física, una dirección de correo electrónico, un sitio web o un número de teléfono, en el que un usuario del kit puede obtener información importante sobre la secuenciación o el ensayo de diagnóstico y/o su uso en los procedimientos descritos en esta invención. El material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

[0357] En algunos ejemplos, se proporciona una muestra biológica a un proveedor del ensayo, por ejemplo, un proveedor de servicios (como un establecimiento de un tercero) o un proveedor de atención médica, que evalúa la muestra en un ensayo y proporciona una lectura. Por ejemplo, en un ejemplo, un proveedor de ensayo recibe una muestra biológica de un sujeto, tal como una muestra de sangre o tejido, por ejemplo, una muestra de biopsia, y evalúa la muestra utilizando un ensayo descrito en esta invención, por ejemplo, un ensayo de secuenciación o ensayo de hibridación *in situ*, y determina que la muestra contiene un ácido nucleico que contiene una mutación descrito en el Ejemplo. El proveedor del ensayo, por ejemplo, un proveedor de servicios o un proveedor de atención médica, puede concluir que el sujeto es, o no, un candidato para un fármaco particular o un régimen de tratamiento contra el cáncer particular.

[0358] El proveedor del ensayo puede proporcionar los resultados de la evaluación y, opcionalmente, las conclusiones con respecto a uno o más diagnósticos, pronósticos u opciones de terapia apropiadas para, por ejemplo, un proveedor de atención médica, un paciente o una compañía de seguros, en cualquier formato adecuado. Tal como por correo o electrónicamente, o a través de una base de datos en línea. La información recopilada y proporcionada por el proveedor del ensayo se puede almacenar en una base de datos.

[0359] La invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, que no debe interpretarse como una limitación adicional.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: ensayos de secuenciación masiva en paralelo para identificar nuevas alteraciones

[0360] Lo siguiente ejemplifica el uso de ensayos de secuenciación masivamente paralelos para identificar nuevas alteraciones, tales como las fusiones KIF5B-RET. Basándose en los resultados mostrados en esta invención, se pueden cribar alteraciones adicionales, por ejemplo, translocaciones de RET, utilizando, por ejemplo, el análisis de qRT-PCR de ADNc preparado a partir de una muestra de tumor preseleccionada.

Introducción

[0361] Se desarrolló un ensayo diagnóstico de Pan-Cáncer basado en una tecnología de secuenciación masivamente paralela para interrogar a 2574 codificadores de exones que representan 145 genes relevantes para el cáncer (asociados con vías relacionadas con el cáncer, terapia dirigida o pronóstico), además de 37 intrones de 14 genes que con frecuencia se reordenan en el cáncer utilizando un mínimo de ADN a partir de especímenes de tumores embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE). Este ensayo puede identificar todas las clases de alteraciones del ADN (por ejemplo, sustituciones, inserciones y deleciones de bases, alteraciones del número de copias y reorganizaciones) en una sola prueba de diagnóstico. En una cohorte de 40 especímenes de cáncer colorrectal (CCR) y 24 de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM), se identificaron 175 alteraciones en 33 genes de cáncer. 38 muestras (59 %) albergaban al menos una alteración que podría vincularse a una opción de tratamiento clínico o ensayo clínico de nuevas terapias dirigidas, incluida una fusión del gen KIF5B-RET en NSCLC (las fusiones del gen KIF5B-RET se describen en el Ejemplo 2 en esta invención).

Resultados

[0362] Se realizó una evaluación de los ensayos con ADN genómico derivado de 40 muestras de tejido de CRC y 24 NSCLC de FFPE (Tabla complementaria 1). En total, se seleccionaron 2.574 exones codificantes que representan 145 genes de cáncer, más 37 intrones de 15 genes de cáncer con reorganización frecuente (Tabla complementaria 2) utilizando la captura híbrida en fase de solución y se secuenciaron en la plataforma HiSeq2000 de Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA) a una cobertura media de 253X. Se identificaron 175 alteraciones en 33 genes de cáncer, de las cuales 116 fueron sustituciones de una sola base (75 no sinónimos, 41 sin sentido), 46 fueron pequeñas inserciones o deleciones (indelos) (44 cambio de marco, 2 en marco), 10 fueron alteraciones en el número de copias (9 amplificaciones, 1 deleción homocigótica) y 3 fueron reordenamientos (Figura 5, Tabla complementaria 2).

[0363] La distribución porcentual de las alteraciones del ADN en 40 CRC es aproximadamente la siguiente: aproximadamente el 58 % son sustituciones de bases, el 28 % son inserciones y deleciones, el 12 % son alteraciones en el número de copias, aproximadamente el 1 % son fusiones de genes.

[0364] La distribución porcentual de las alteraciones del ADN en 24 NSCLCs es aproximadamente la siguiente: aproximadamente el 72 % son sustituciones de bases, el 14 % son inserciones y deleciones, el 12 % son alteraciones en el número de copias, aproximadamente el 2 % son fusiones genéticas.

Mutaciones identificadas en casos de CCR

[0365] Entre 40 CRCs, se identificaron 125 alteraciones en 21 genes. 39 tumores portaban al menos una

mutación (intervalo 1-9) y 25 tumores (62,5 %) contenían al menos dos clases diferentes de alteración del ADN (Figura 5). *TP53* y *APC* fueron los genes alterados con mayor frecuencia (32/40 (80 %) y 27/40 (67,5 %), respectivamente), con ambos mutados a frecuencias más altas que las que se notificaron en COSMIC (en la web mundial en sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/). 41/42 (98 %) de las mutaciones de *APC* en la cohorte estaban truncándose (21 sin sentido, 17 indelos de cambio de marco), una observación exclusiva de los tumores de CRC que indica la especificidad del ensayo. 15 muestras tenían inactivación bialélica y 12 una sola mutación de *APC* truncante y LOH.

[0366] Además, 11 genes de cáncer conocidos fueron mutados, amplificados o reorganizados en múltiples casos de CRC: *KRAS* (10), *BRAF* (6), *FBXW7* (5), *ATM* (2), *BCL2L1* (2), *BRCA2* (2), *CDH1* (2), *ERBB3* (2), *GNAS* (2), *PIK3CA* (2) y *SMAD4* (2), *ALK*, *CDK8*, *LRP1B*, *MYC*, *MSH6*, *RICTOR*, *SMAD2* y *STK11* fueron alterados en un solo caso (Figura 5, Tabla complementaria 1). En particular, 21 CRCs (52,5 %) albergaban al menos una alteración que podría estar relacionada con una opción de tratamiento clínico o un ensayo clínico de terapias dirigidas novedosas. Los ejemplos incluyen mutaciones en *KRAS* y *BRAF* (resistencia al cetuximab (Lievre y col., Cancer Res 66:3992-3995, 2006; Di Nicolantonio y col., J Clin Oncol. 26:5705-5712, 2008) o panitumumab (Di Nicolantonio y col., *supra*; Lievre y col., Bull Cancer 95:133-140, 2008), FBXW7 (resistencia a las anti-tubulinas (Wertz, y col., Nature 471:110-114, 2011)), *BRCA2* (ensayos clínicos de inhibidores de PARP (Turner y col., Curr Opin Pharmacol 5:388-393, 2005), GNAS (ensayos clínicos de inhibidores de MEK o ERK), *PIK3CA* (ensayos clínicos de inhibidores de la quinasa PI3/mTOR) y *CDK8* (ensayos clínicos) de los inhibidores de CDK ref) (Tabla complementaria 3).

Mutaciones identificadas en casos de NSCLC

[0367] Entre 24 NSCLCs, se identificaron 50 mutaciones en 21 genes. 20 de 24 tumores albergaban al menos una mutación (intervalo 1-7) (Figuras complementarias 4 y 5, Tabla complementaria 2). Doce genes fueron alterados en tumores múltiples: KRAS (10), TP53 (7), STK11 (4), LRP1B (3), JAK2 (3), EGFR (2), BRAF (2), CDKN2A (2), CTNNB1 (2), MDM2 (2), PIK3CA (2) y ATM (2). APC, CCNE1, CDK4, MLH1, MSH6, NF1, RB1, RET y TSC1 se mutaron en un solo caso. Además, 3 pacientes tuvieron una mutación truncadora en el supuesto gen supresor de tumores LRP1B (Liu y col., Genomics 69:271-274, 2000), lo que apoya aún más el papel de la inactivación de este gen en la oncogénesis. En el 72 % (36/50) de NSCLCs, al menos una alteración se asoció con un tratamiento clínico actual o un ensayo de terapia dirigida, incluidas las mutaciones en *KRAS* (resistencia a los inhibidores de la quinasa EGFR (Pao y col., PLoS Med 2:e17, 2005); ensayos clínicos de inhibidores de PI3K y MEK) y BRAF (ensayos clínicos de inhibidores de BRAF que incluyen vemurafenibref y GSK 2118436 ref), EGFR (sensibilidad a gefitinib o erlotinib ref), *MDM2* (ensayos clínicos de nutlinas (Vassilev y col., Science 303:844-848, 2004), *CDKN2A*, *CCNE1* y *CDK4* (ensayos clínicos de inhibidores de CDK4 (Finn y col., Breast Cancer Res. 11:R77, 2009; Toogood y col., J Med Chem 48:2388-2406, 2005; Konecny y col., Clin Cancer Res 17:1591-1602, 2011), y *PIK3CA* (ensayos clínicos de inhibidores de PI3 quinasa/mTOR ref) (Tabla complementaria 4). Aunque la prueba detecta las inversiones de *EML4-ALK* en estirpes celulares, no se identificó *EML4-ALK* en esta cohorte de pacientes (Soda y col., Nature 448:561-566, 2007).

[0368] Sorprendentemente, se descubrió que tres pacientes tenían una mutación c.1849G>Tp.V617F en *JAK*, que se observa comúnmente en síndromes mielodisplásicos (MDS) pero no se ha identificado en tumores sólidos (James y col., Nature 434:1144-1148, 2005) (véase en línea en sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/), aunque un paciente tenía un historial de policitemia vera con una médula ósea positiva para la mutación de *JAK2*. La secuenciación de una serie más grande de especímenes de NSCLC se puede realizar para caracterizar mejor las mutaciones de *JAK2* en NSCLC, y se pueden realizar estudios adicionales para evaluar si estos predicen la sensibilidad clínica a los inhibidores de JAK2.

Ejemplo 2A: fusiones KIF5B-RET novedosas

[0369] Se identificó un nuevo evento de inversión en un adenocarcinoma de pulmón utilizando la secuenciación NGS (de próxima generación). El adenocarcinoma era de un hombre de 44 años de edad, varón caucásico no fumador. Se observó una secuencia genómica sugerente de una nueva reorganización del cromosoma 10, específicamente una inversión pericéntrica de 11 MB con puntos de ruptura en el intrón 15 de KIF5B y el intrón 11 de RET. Se determinó que los puntos de ruptura estaban en Cr10:32,316,376-32,316,416 dentro del intrón 15 de KIF5B y Cr 10:43,611,042-43,611,118 dentro del intrón 11 de RET (véase la FIG. 1). Más específicamente, una inversión pericéntrica de 11,294,741 pb genera la fusión del gen *RET* uniendo los exones 1-15 de *KIF5B* al exón 12-20 de *RET*. La Figura 6A proporciona una representación esquemática de la inversión de 11,294,741 pb en NSCLC que genera una fusión de genes *KIF5B-RET* en marco (no a escala). La región invertida del cromosoma 10 comienza en 32,316,377 bps (dentro del intrón 15 de *KIF5B*) y termina en 43,611,118 bps (dentro del intrón 11 de *RET*). La Figura 6D es un resumen de los exones presentes o ausentes en la fusión KIF5B-RET.

[0370] La inversión da como resultado una fusión en marco del extremo 5' de KIF5B y el extremo 3' de RET, cuya fusión se expresa para generar una proteína de fusión que incluye un dominio de tirosina quinasa en la proteína RET. Más específicamente, la fusión de proteínas da como resultado una fusión en marco del exón 15 de KIF5B con el exón 12 de RET. Véase las FIGs. 2B y 3A-3D. En las FIGs. 3A-3D, la SEQ ID NO:1 es la secuencia de

ADNc de la fusión KIF5B-RET (es decir, la fusión 5'-KIF5B-3′-RET) y la SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión KIF5B-RET. La secuencia subrayada en las FIGs. 3A-3D representa la secuencia de ADNc de KIF5B (nucleótidos 471-2195 de RefSeq n.º NM_004521.2 (registro de GenBank 14 de agosto de 2011)) y la secuencia de la proteína KIF5B (aminoácidos 1-575 de RefSeq n.º NP_004512 (registro de GenBank 14 de agosto de 2011)). La secuencia no subrayada en las FIGs. 3A-3D representa la secuencia de ADNc RET (nucleótidos 2327-3535 de RefSeq n.º NM_020975 (registro de GenBank 14 de agosto de 2011) y la secuencia de la proteína RET (aminoácidos 713-1114 de RefSeq n.º NP_066124.1 (registro de GenBank 14 de agosto de 2011)). La secuencia de la proteína RET en la fusión KIF5B-RET mantiene el dominio de tirosina quinasa intacto de RET, y este dominio se indica mediante un recuadro gris en la FIG. 3C. La secuencia de la proteína KIF5B en la fusión mantiene el dominio motor de quinesina intacto, y este dominio está indicado por un doble subrayado en las FIGs. 3A-3B. Los exones 1 a 15 de KIF5B también contienen el dominio de hélice superenrollada que media la homodimerización. Al menos debido a que la fusión KIF5B-RET es una fusión en marco que mantiene el dominio de tirosina quinasa intacto de RET, y el dominio motor de quinesina y el dominio de hélice superenrollada de KIF5B, esta proteína de fusión contribuye probablemente al fenotipo oncogénico de muestra de tumor de pulmón.

[0371] La Figura 7A proporciona otra representación esquemática de la fusión KIF5B-RET. Esta variante se identificó en 10 casos de CRC, en los que el exón 15 de KIF5B se fusiona en marco al exón 12 de RET. La proteína de fusión de longitud completa predicha tiene una longitud de 977 aminoácidos, con los aminoácidos 1-575 derivados de KIF5B y los aminoácidos 576-977 derivados de RET (mostrado anteriormente). La confirmación de la secuencia capilar de los límites de la unión del exón derivados del ADNc se muestra a continuación. La Figura 7B es otra representación de la secuencia de aminoácidos variante de KIF5B-RET predicha. Los aminoácidos derivados de KIF5B (texto normal). Los aminoácidos derivados de RET (cursiva, subrayado).

[0372] Los exones *KIF5B* 1-15 comprenden un dominio motor de quinesina y un dominio de hélice superenrollada que media directamente la homodimerización. El exón 15 de KIF5B es un punto de fusión conocido en pacientes con NSCLC con fusiones *KIF5B-ALK* (Wong y col., Cancer, 2011; Takeuchi y col., Clin Cancer Res 15:3143-3149, 2009).

[0373] La Figura 6B es un esquema de la estructura del dominio de la proteína de las fusiones de los genes *RET-KIF5B* y *KIF5B-RET*. El dominio de cadherina de *RET* se incluye en la proteína *RET-KIF5B* predicha. La quinesina y los dominios de la hélice superenrollada de *KIF5B* y el dominio tirosina quinasa de *RET* se incluyen en la proteína de fusión *KIF5B-RET*. La RT-PCR del cebador diseñado para el exón 11 de *RET* y el exón 16 de *KIF5B* no produjo ningún producto. La RT-PCR del cebador diseñado para el exón 15 de KIF5B y el exón 12 de RET produjo un producto fuerte. Utilizando la secuenciación de ADNc, un aumento de expresión de RET de 7,3 veces comienza en el exón 12 en relación con los exones 1 a 11, lo que sugiere que el transcrito de la fusión *KIF5B-RET* da como resultado la sobreexpresión del dominio quinasa RET. Además, la secuenciación de ADNc reveló que 490 pares de lecturas únicas comprendieron la unión de fusión.

[0374] IHC demostró inmunoreactividad citoplásmica focal moderada para la expresión de la proteína RET (Figura 6C). La Figura 6C es una fotografía que representa la distribución de la expresión de RET en el caso de NSCLC con fusión de RET confirmada en la secuenciación de ADN por NGS. Tenga en cuenta la inmunorreactividad citoplásmica focal moderada para la expresión de la proteína RET (avidina-biotina peroxidasa X 200). El detalle de gran aumento de la inmunotinción citoplásmica para RET se muestra en el inserto en la parte inferior derecha.

[0375] Las proteínas de fusión RET anteriores se han identificado en cánceres distintos del cáncer de pulmón. Por ejemplo, se ha demostrado que el oncogén RET se activa a través de reordenamientos somáticos en carcinomas papilares de tiroides. Los exones *RET* 12-20 comprenden el dominio tirosina quinasa RET que comúnmente forma la porción 3' de las fusiones PTC/RET observadas en ~35 % de los carcinomas papilares de tiroides. Las fusiones KIF5B-ALK se han identificado previamente en el cáncer de pulmón ALK positivo. Según nuestro conocimiento, esta es la primera demostración de un ADNc de fusión RET en un cáncer de pulmón, y también la primera demostración de una fusión KIF5B-RET.

[0376] El cáncer de tiroides y las estirpes celulares que albergan translocaciones oncogénicas de *PTC/RET*, que sobreexpresan el dominio quinasa RET, son sensibles al inhibidor de RET sorafenib, lo que sugiere que esta fusión del gen *KIF5B-RET* puede identificar un nuevo subconjunto farmacológico de tumores de NSCLC (Henderson y col., Clin Cancer Res. 14:4908-4914, 2008; Carlomagno y col., J Natl Cancer Inst 98:326-334, 2006). Se ha demostrado que otras mutaciones activadoras de RET son sensibles al tratamiento con el inhibidor de múltiples quinasas sorafenib (por ejemplo, Plaza-Menacho y col., Jour. Biol. Chem. 282:29230-29240, 2007). Por lo tanto, es de esperar que los cánceres que portan una fusión KIF5B-RET como se describe en esta invención sean susceptibles de ser tratados con inhibidores de múltiples quinasas, tales como sorafenib y sunitinib.

[0377] En conjunto, estos resultados sugieren que las fusiones de genes que se pueden administrar en forma farmacológica pueden ocurrir ampliamente en el cáncer a baja frecuencia y se identifican de manera más efectiva con un diagnóstico basado en la secuenciación, tal como el que se describe en esta invención.

Recurrencia de la fusión RET

[0378] Para determinar si la fusión *RET* se expresa de forma recurrente en NSCLC, una serie de 117 NSCLCs (92 caucásicos, 5 afroamericanos, 20 de etnias desconocidas) se cribaron para RET por IHC; 22/117 casos mostraron tinción moderada a intensa. La RT-PCR y la secuenciación de ADNc de ARN de 15 tumores positivos para IHC identificaron una fusión KIF5B-RET adicional en un paciente masculino caucásico que fumaba (Tabla 2).

Ejemplo 2B: fusiones KIF5B-RET adicionales

[0379] La inversión del cromosoma 10 que crea la fusión KIF5B-RET también puede crear una fusión recíproca RET-KIF5B (es decir, fusión 5′-RET-3′-KIF5B). Véase las FIGs. 2A y 4A-4D. La fusión de la proteína RET-KIF5B predicha da como resultado una fusión del exón 11 de RET con el exón 16 de KIF5B. Véase las FIGs. 2A y 4A-4D. En las FIGs. 4A-4D, la SEQ ID NO:3 es la secuencia de ADNc de la fusión RET-KIF5B y la SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión RET-KIF5B predicha. La secuencia subrayada en las FIGs. 4A-4D representa la secuencia de ADNc de KIF5B (nucleótidos 2196-3362 de RefSeq n.º NM_004521.2 (registro GenBank, 14 de agosto de 2011)) y la secuencia de la proteína KIF5B (aminoácidos 576-963 de RefSeq n.º NP_004512 (registro de GenBank 14 de agosto de 2011)). La secuencia no subrayada en las FIGs. 4A-4D representa la secuencia de ADNc de RET (nucleótidos 190-2326 de RefSeq n.º NM_020975 (registro de GenBank 14 de agosto de 2011) y la secuencia de proteínas RET (aminoácidos 1-712 de RefSeq n.º NP_066124.1 (registro de GenBank 14 de agosto de 2011)). La secuencia de la proteína RET predicha en la fusión RET-KIF5B no incluye el dominio de tirosina quinasa. Los estudios de RT-PCR diseñados para el exón 11 de RET y el exón 16 de KIF5B no produjeron ningún producto. Por lo tanto, esta orientación de la fusión no se expresa.

[0380] El cribado adicional de muestras de tumores ha identificado fusiones adicionales del gen *KIF5B-RET* que contienen un dominio catalítico RET.

[0381] Los cánceres de tiroides y las estirpes celulares que albergan translocaciones de PTC-RET son sensibles al sorafenib que inhibe RET, lo que sugiere que la fusión del gen KIF5B-RET en NSCLC puede ser farmacológica. La expresión de KIF5B-RET en células Ba/F3 condujo a la transformación oncogénica determinada por el crecimiento independiente de IL-3. Estas células fueron sensibles a sunitinib, sorafenib y vandetinib, inhibidores de quinasas con múltiples dianas que inhiben RET, pero no a gefitinib, un inhibidor de quinasas EGFR (FIG. 8). Sunitinib, pero no gefitinib, inhibió la fosforilación de RET en células Ba/F3 de KIF5B-RET (FIG. 9). Estos hallazgos sugieren que los inhibidores de la quinasa RET deben probarse en ensayos clínicos prospectivos para obtener un beneficio terapéutico en pacientes con NSCLC con reordenamientos de KIF5B-RET.

Discusión

[0382] En el estudio actual, se describe un ensayo integral de perfiles genómicos que identifica de manera robusta las sustituciones, las inserciones, las deleciones de bases, las alteraciones del número de copias y los reordenamientos genómicos del tejido tumoral de FFPE. Los resultados muestran que las alteraciones genómicas con relevancia terapéutica clínica directa se detectan en una gran fracción de CRCs y NSCLCs que demuestran el valor de las pruebas sistemáticas para tales alteraciones en pacientes con cáncer. Debido al amplio intervalo de terapias dirigidas ya aprobadas o en desarrollo clínico, realizar consultas exhaustivas y simultáneas para una amplia gama de alteraciones genómicas acelerará la identificación de subconjuntos de pacientes apropiados para estas estrategias terapéuticas.

[0383] El procedimiento identificó adicionalmente dos reordenamientos genómicos previamente desconocidos, cada uno de los cuales podría potencialmente conducir a una intervención terapéutica. El primero es un reordenamiento de *ALK* similar a los previamente detectados en el linfoma anaplásico (Morris y col., Science 263:1281-1284, 1994), NSCLC (Soda y col., Nature 448:561-566, 2007, *supra*) y tumor miofibroblástico inflamatorio (Lawrence y col., Am J Pathol 157:377-384, 2000) que se asocia con sensibilidad clínica al inhibidor de la quinasa ALK crizotinib (Kwak y col., N Engl J Med 363:1693-1703, 2010; Butrynski y col., N Engl J Med 363:1727-1733, 2010). Los hallazgos actuales sugieren que otros tipos de cáncer, incluido el CCR, pueden contener reordenamientos *ALK* adicionales no detectados previamente que podrían ser sensibles a los fármacos.

[0384] Más importante aún, la aplicación de perfiles genómicos integrales a los especímenes tumorales identificó nuevas inversiones *KIF5B-RET* recurrentes en pacientes con NSCLC. Este gen de fusión contiene el dominio completo de quinasa RET y da como resultado un aumento en la expresión del dominio de quinasa RET. Las translocaciones de PTC/RET oncogénicas detectadas en el cáncer de tiroides y en las estirpes celulares son sensibles *in vitro* e *in vivo* a los inhibidores de RET (Henderson y col., Clin Cancer Res 14:4908-4914, 2008; Carlomagno y col., J Natl Cancer Inst 98:326-334, 2006; Kim y col., J Clin Endocrinol Metab 91:4070-4076, 2006; Dawson y col., Anticancer Drugs 19:547-552, 2008). Es posible que sunitinib u otros inhibidores de la tirosina quinasa RET, incluyendo vandetinib o sorafenib (Henderson y col., *supra*), puedan ser clínicamente efectivos en el NSCLC de *KIF5B-RET*. La identificación de incluso una pequeña subpoblación de pacientes con NSCLC que responden a una terapia dirigida molecular pueda tener un gran impacto clínico, como lo destaca la reciente

aprobación de la FDA de crizotinib para el NSCLC reorganizado con *ALK*. Está claro que el aprovechamiento del poder de la secuenciación masiva en paralelo para generar perfiles genómicos integrales para los tumores de pacientes será cada vez más informativo clínicamente y, en última instancia, crítico para el manejo terapéutico eficaz en la clínica oncológica.

Ejemplo 3: procedimientos

[0385] Lo siguiente ejemplifica ciertas realizaciones de los procedimientos y condiciones experimentales utilizados para identificar la fusión KIF5B-RET según los Ejemplos 1-2. Se puede realizar un cribado adicional de la translocación de RET utilizando, por ejemplo, el análisis por qRT-PCR del ADNc preparado a partir de una muestra de tumor preseleccionada.

[0386] Se realizó una secuenciación masiva de ADN en hibridación capturada, bibliotecas basadas en el ligamiento de adaptador utilizando ADN aislado de un tejido embebido en parafina fija archivado. Se utilizó una combinación de herramientas de análisis para analizar los datos y asignar retiradas de alteración de ADN. Se realizó un cribado adicional de la translocación de RET utilizando el análisis de qRT-PCR del ADNc preparado a partir de tumores congelados o la evaluación de RET por IHC de especímenes de FFPE archivados. Se realizó una secuenciación masiva de ADNc paralela para confirmar la expresión de ambas translocaciones nuevas utilizando ARN aislado de tejido de FFPE. Se secuenció el ADN genómico de referencia normal coincidente de la sangre del paciente con NSCLC con el índice KIF5B-RET para confirmar el origen somático del reordenamiento.

Secuenciación del ADN genómico

[0387] La secuenciación de 2.574 exones de 145 genes de cáncer se realizó utilizando el ADN de especímenes de tumores embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE); 24 de pacientes con NSCLC y 40 de pacientes con cáncer colorrectal (CCR). Las bibliotecas de secuenciación del contenido de 606.675 pb se construyeron mediante el procedimiento de ligamiento del adaptador utilizando ADN genómico seguido de una selección de hibridación en fase de solución con sondas de captura de hibridación de ARN optimizadas (kit personalizado Agilent SureSelect). La secuenciación en el instrumento HiSeq2000 (Illumina) se realizó utilizando 36 X 36 lecturas pareadas a una cobertura promedia de 229X con 84 % de exones a ≥ 100X (Tablas complementarias 2A y 2B). El procesamiento de datos y las asignaciones de mutaciones para sustituciones de bases, indelos, alteraciones del número de copias y reordenamientos genómicos se realizaron utilizando una combinación de herramientas optimizadas para la retirada de mutación del tejido tumoral. Para maximizar la sensibilidad de detección de mutaciones en biopsias de cáncer heterogéneas, la prueba se validó para detectar sustituciones de bases a ≥ 10 % de frecuencia de alelos mutantes con ≥ 99 % de sensibilidad e indelos a ≥ 20 % de frecuencia de alelos mutantes con ≥ 95 % de sensibilidad, con una falsa tasa de descubrimiento de <1 %.

Secuenciación de ADNc

[0388] El ADNc se generó a partir del ARN total extraído de una sola sección de tejido FFPE de 5-10 um utilizando el kit Roche High Pure y se transcribió de manera inversa a ADNc con cebadores de hexámeros aleatorios mediante el sistema de síntesis de la primera hebra SuperScript® III (Invitrogen). El ADNc bicatenario se elaboró con el módulo de síntesis de segunda hebra de ARNm NEBNext® (New England Biolabs) y se utilizó como entrada para la construcción de la biblioteca, captura híbrida y secuenciación según las muestras de ADN de FFPE. El análisis de los niveles de expresión se realizó con una combinación de herramientas de análisis.

Inmunohistoquímica de proteínas RET

[0389] NSCLC se inmunotiñeron después de la recuperación del epítopo basado en microondas mediante procedimientos automatizados (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona) para la expresión de RET utilizando el clon de oncoproteína RET monoclonal de ratón 3F8 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los portaobjetos se puntuaron de forma semicuantitativa para la intensidad y distribución de la tinción de células tumorales utilizando el sistema de puntuación H.

Tabla 1 Distribución de 125 mutaciones de CRC entre 21 genes de cáncer mutados

Gen	Muestras mutadas	Mutaciones totales	No sinónimo	Sin sentido	Cambio en el marco INDELO	Amplificación	Reordenamiento
TP53	32	34	23	3	8	-	-
APC	27	42	1	24	17	-	-
KRAS	10	10	10	-	-	-	-
BRAF	6	6	6	-	-	-	-
FBXW7	5	5	-	2	3	-	-
ATM	2	2	-	1	1	-	-
BCL2L1	2	2	-	-	-	2	-
BRCA2	2	2	-	-	2	-	-
CDH1	2	4	-	1	3	-	-
ERBB3	2	2	2	-	-	-	-
GNAS	2	2	2	-	-	-	-
PIK3CA	2	2	2	-	-	-	-
SMAD4	2	2	1	-	1	-	-
ALK	1	1	-	-	-	-	1
CDK8	1	1	-	-	-	1	-
LRP1B	1	3	-	-	3	-	-
MYC	1	1	-	-	-	1	-
MSH6	1	1	-	-	1	-	1
RICTOR	1	1	-	-	-	-	-
SMAD2	1	1	-	1	-	-	-
STK11	1	1	-	1	-	-	-

Tabla 2: resumen de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas analizados por inmunohistoquímica de RET

Característica	N.º de pacientes (n=17)
Género	
Hombres	62
Mujeres	55
Histología	
Adenocarcinoma	83
Carcinoma de células escamosas	26
Carcinoide	8
Otros	
Fumador	
Nunca	5
Antiguo limitado	53
Actual	34
Desconocido	25
Estadio	
I	77
II	16
III	13
IV	8
N/A	3
IHC RET	
0	78
1+/2+	17
3+/4+	22
N.º de fusiones KIF5B-RET: 1 Frecuencia en todos los pacientes: 1/117: 0,85 % Frecuencia de adenocarcinoma: 1/89: 1,1 %	

Tabla complementaria 1a: 145 genes secuenciados entre la secuencia de codificación completa

Gen	RefSeq	Gen	RefSeq	Gen	RefSeq	Gen	RefSeq	Gen	RefSeq
ABL1	NM_007313	NF1	NM_000267	CDK6	NM_001259	MDM2	NM_002392	SMARCB1	NM_003073
AKT1	NM_005163	NOTCH1	NM_017617	CDK8	NM_001260	MDM4	NM_002393	SOX10	NM_006941
AKT2	NM_001626	NPM1	NM_002520	CHEK1	NM_001274	MEN1	NM_000244	SOX2	NM_003106
AKT3	NM_81690	NRAS	NM_002524	CHEK2	NM_007194	MITF	NM_198159	SRC	NM-005417
ALK	NM_004304	NTRK3	NM_002530	CRKL	NM_005207	MLH1	NM_000249	TET2	NM_017628
APC	NM_000038	PDGFRA	NM_006206	EPHA6	NM_173655	MPL	NM_005373	TGFBR2	NM_003242
AR	NM_000044	PIK3CA	NM_006218	EPHB4	NM_004444	MRE11A	NM_005590	TOP1	NM_003286
BRAF	NM_004333	PIK3R1	NM_0181523	EPHB6	NM_004445	MSH2	NM_000251	TSC1	NM_000368
CCND1	NM_053056	PTCH1	NM_000264	ERBB3	NM_001982	MSH6	NM_000179	TSC2	NM_000548
CDK4	NM_000075	PTEN	NM_000314	ERBB4	NM_005235	MTOR	NM_004958	VHL	NM_000551
CDKN2A	NM_000077	RB1	NM_000321	FBXW7	NM_018315	MYCL1	NM_005376	WT1	NM_000378
CEBPA	NM_004364	RET	NM_020630	FGFR4	NM_002011	MYCN	NM_005378	ARFRP1	NM_003224
CTNNB1	NM_001904	SMO	NM_005631	FLT1	NM_002019	NF2	NM_000268	BCL2A1	NM_004049
EGFR	NM_005228	STK11	NM_000455	FLT4	NM_182925	NKX2-1	NM_003317	CDH20	NM_031891
ERBB2	NM_004448	TP53	NM_000546	GATA1	NM_002049	NTRK1	NM_002529	CDH5	NM_001795
ESR1	NM_000125	ABL2	NM_005158	GNAS	NM_016592	PAX5	NM_016734	EPHA3	NM_005233
FGFR1	NM_015850	ATM	NM_000051	HOXA3	NM_030661	PDGFRB	NM_002609	EPHA5	NM_004439
FGFR2	NM_000141	AURKA	NM_003600	HSP90AA1	NM_005348	PKHD1	NM_138694	EPHA7	NM_004440
FGFR3	NM_000142	AURKB	NM_004217	IDH1	NM_005896	PRKDC	NM_006904	EPHB1	NM_004441
FLT3	NM_004119	BCL2	NM_000633	IDH2	NM_002168	PTPN11	NM_002834	FOXP4	NM_138457
HRAS	NM_005343	BCL2L1	NM_001191	IGF1R	NM_000875	RAF1	NM_002880	GPR124	NM_032777
JAK2	NM_004972	BCL2L2	NM_004050	IGF2R	NM_000876	RARA	NM_000964	GUCY1A2	NM_000855
KIT	NM_000222	BCL6	NM_001706	IKBKE	NM_014002	RICTOR	NM_152756	LRP1B	NM_018557
KRAS	NM_004985	BRCA1	NM_007294	INHBA	NM_002192	RPTOR	NM_020761	LTK	NM_002344
MAP2K1	NM_002755	BRCA2	NM_000059	IRS2	NM_003749	RUNX1	NM_001754	PAK3	NM_002578
MAP2K2	NM_030662	CBL	NM_005188	JAK3	NM_000215	SMAD2	NM_005901	PLCG1	NM_002660
MET	NM_000245	CCNE1	NM_001238	KDR	NM_002253	SMAD3	NM_005902	PTPRD	NM_002839
MLL	NM_005933	CDH1	NM_004360	MAP2K4	NM_003010	SMAD4	NM_005359	TBX22	NM_016954
MYC	NM_002467	CDH2	NM_001792	MCL1	NM_021960	SMARCA4	NM_003072	USP9X	NM_001039590

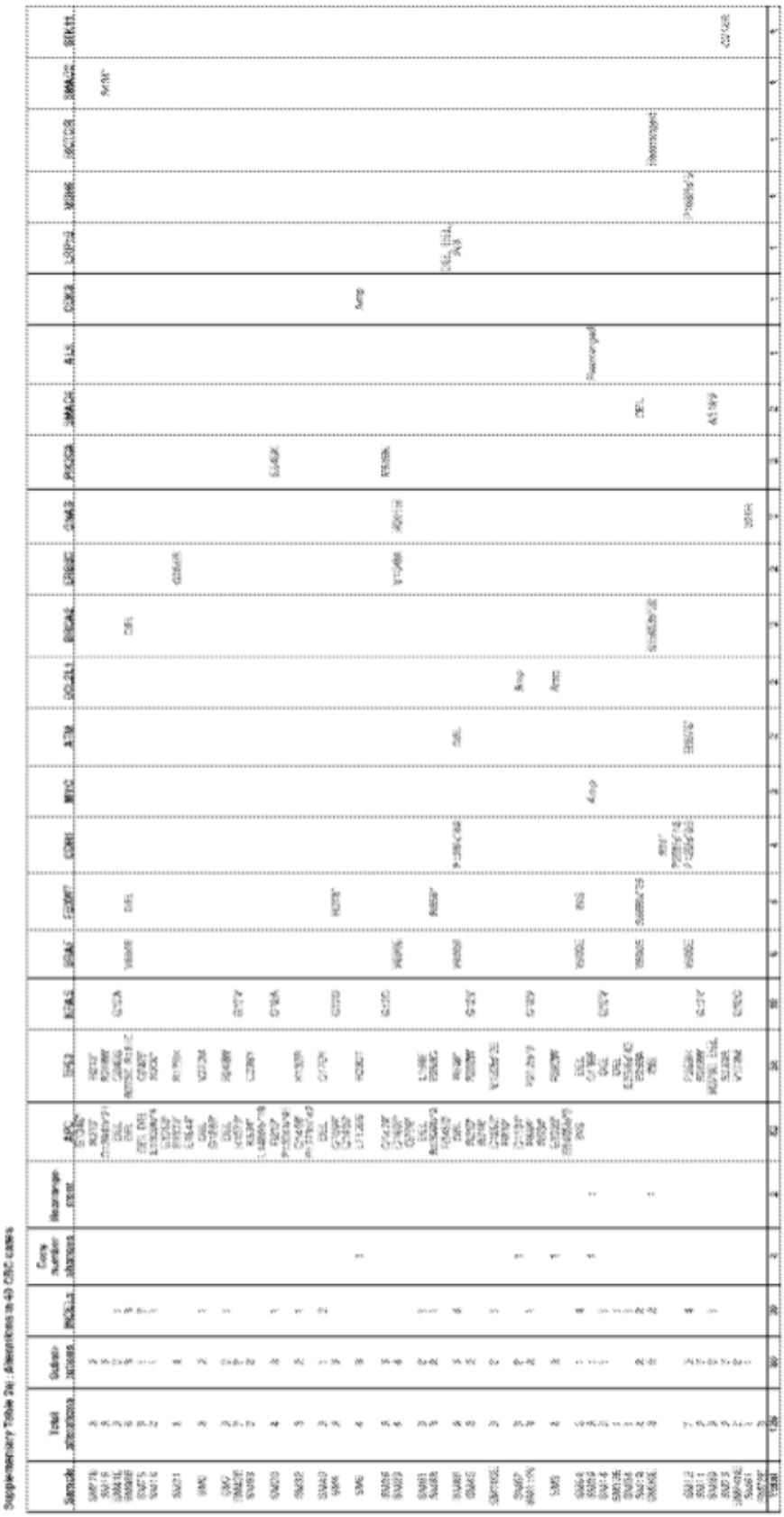
Gen	Grupo	n.º marcadores	RefSeq	Exones	45
CDKN2A	Del.A	52	NM_000077	Intrones	-2
MAP2K4	Del.B	118	NM_003010	PGx	-2
PTEN	Del.A	97	NM_000314	Amp/Del	4

(continuación)

Gen	Grupo	n.º marcadores	RefSeq	Exones	45
RB1	Del.A	105	NM_000321	Exones+Intrones	152
WT1	Del.B	94	NM_000378	Ex+Int+PGx	184

Tabla complementaria 1b: genes secuenciados entre intrones seleccionados (n=14)

Gen	RefSeq	Intrones secuenciados
ALK	NM_004304	19
BCR	NM_004327	8, 13, 14
BRAF	NM_004333	7, 8, 9, 10
EGFR	NM_005228	7
ETV1	NM_004956	3, 4
ETV4	NM_001986	8
ETV5	NM_004454	6, 7
ETV6	NM_001987	5, 6
EWSR1	NM_005243	8, 9, 10, 11, 12, 13
MLL	NM_005933	6, 7, 8, 9
RAF1	NM_002880	5, 6, 7, 8, 9
RARA	NM_000964	2
RET	NM_020630	9, 10, 11
TMPRSS2	NM_005656	1, 2



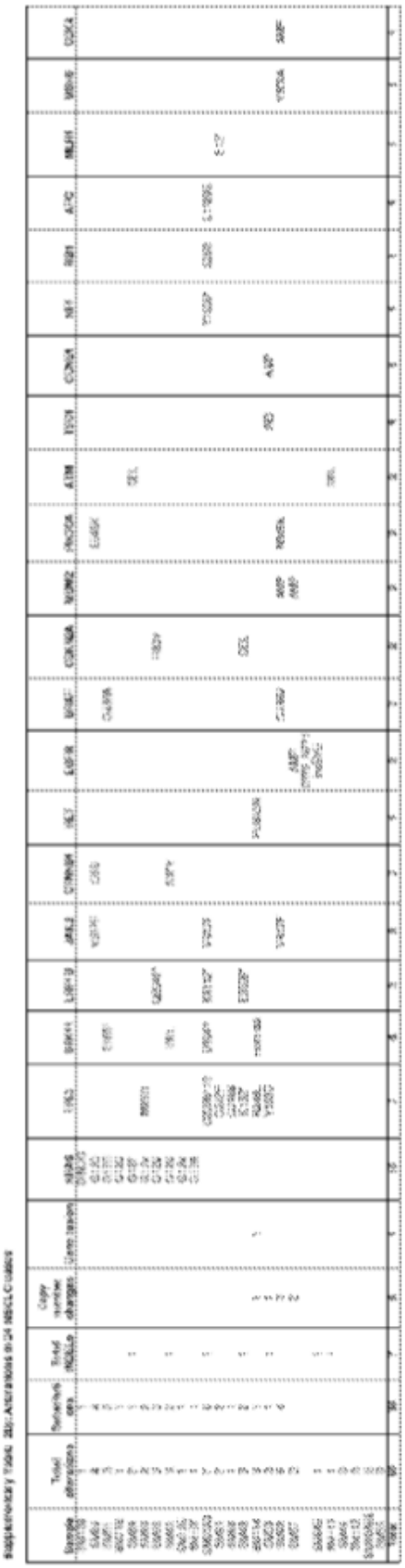


Tabla complementaria 3: alteraciones que podrían vincularse a una opción de tratamiento clínico o ensayo clínico de terapias dirigidas novedosas

Gen	Muestras mutadas	Tratamiento terapéutico potencial o ensayo clínico
TP53	**32**	**Actualmente desconocido**
APC	**27**	**Actualmente desconocido**
KRAS	**10**	**Resistencia a cetuximab y panitumumab**
BRAF	**6**	**Resistencia a cetuximab y panitumumab**
FBXW7	**5**	**Resistencia potencial a tubulinas**
ATM	**2**	**Inhibidores PARP**
HCL2L1	**2**	**Actualmente desconocido**
BRCA2	**2**	**Inhibidores PARP**
CDH1	**2**	**Actualmente desconocido**
ERBB3	**2**	**Actualmente desconocido**
GNAS	**2**	**Inhibidores MEK o ERK**
PIK3CA	**2**	**Inhibidores PI3 quinasa/mTOR**
SMAD4	**2**	**Diagnóstico deficiente**
ALK	**1**	**Inhibidores ALK, por ejemplo, Crizotinib**
CDK8	**1**	**Inhibidores CDK, por ejemplo, PD0332991**
LRP1B	**1**	**Actualmente desconocido**
MYC	**1**	**Actualmente desconocido**
MSH6	**1**	**Diagnóstico deficiente**
RICTOR	**1**	**Actualmente desconocido**
SMAD2	**1**	**Actualmente desconocido**
STK11	**1**	**Actualmente desconocido**

Tabla complementaria 4: distribución de 51 mutaciones entre 21 genes de NSCLC mutados

Gen	Muestras mutadas	Mutaciones totales	No sinónimo	Sin sentido	Cambio en el marco INDELO	Amplificación	Deleción homocigótica	Fusión génica
KRAS	10	10	10	-	-	-	-	-
TP53	7	7	5	1	1	-	-	-
STK11	4	4	1	1	1	-	1	-
LRP1B	3	3	-	3	-	-	-	-
JAK2	3	3	3	-	-	-	-	-
EGFR	2	2	-	-	-	1	-	-
BRAF	2	2	2	-	-	-	-	-
CDKN2A	2	2	1	-	-	-	-	-
RET	1	1	-	-	-	-	-	1
CTNNB1	2	2	2	-	-	-	-	
MDM2	2	2	-	-	-	2	-	
PIK3CA	2	2	2	-	-	-	-	
ATM	2	2	-	-	2	-	-	
TSC1	1	1	-	-	1	-	-	
CCNE1	1	1	-	-	-	1	-	
NF1	1	1	-	1	-	-	-	
RB1	1	1	-	1	-	-	-	
APC	1	1	1	-	-	-	-	
JLH1	1	1	-	1	-	-	-	
MSH6	1	1	1	-	-	-	-	
CDK4	1	1	-	-	-	1	-	

Tabla complementaria 5: alteración de NSCLC que podría vincularse a una opción de tratamiento clínico o ensayo clínico de terapias dirigidas novedosas

Gen	Mutaciones totales	Tratamiento terapéutico potencial o ensayo clínico
KRAS	**10**	**Resistencia a inhibidores de la quinasa EGFR, ensayos clínicos de inhibidores PI3K o MEK**
STK11	**4**	**Actualmente desconocido**
JAK2	**3**	**Inhibidores JAK2**
EFFR	**2**	**Erlotinibor gefitinib**
BRAF	**2**	**Vemurafenib y GSK 2118436**
CDKN2A	**2**	**Inhibidores CDK, por ejemplo, PD0332991**
RET	**2**	**Inhibidores RET, por ejemplo, Sorafanib o sunitinib**
CTNNB1	**2**	**Actualmente desconocido**
MDM2	**2**	**Nutlinas**
PIK3CA	**2**	**Inhibidores de quinasa PI3/mTOR**
ATM	**2**	**Inhibidores PARP**
TSC1	**1**	**Inhibidores mTOR**
CCNE1	**1**	**Inhibidores CDK4, por ejemplo, PD0332991**
NF1	**1**	**Actualmente desconocido**
RB1	**1**	**Actualmente desconocido**
MLH1	**1**	**Actualmente desconocido**
MSH6	**1**	**Actualmente desconocido**
CDK4	**1**	**Inhibidores CDK4, por ejemplo, PD0332991**

Referencias adicionales:

[0390]

James y col., Nucl. Acids Res. 16:1999-2014, 1988.
Levin y col., Genome Biol. 10:R115, 2009.
Li y Durbin, Bioinformatics 26:589-95, 2010.
Li y col., Bioinformatics 25:2078-9, 2009.
En línea en picard.sourceforge.net
McKenna y col., Genome Res. 20:1297-303, 2010.
Forbes y col., Nucl. Acids Res. 39 (suppl 1): D945-D950, 2011.
Smigielski y col., Nucl. Acids Res. 28:352-355, 2000.

[0391] También se incorporan por referencia en su totalidad cualquier secuencia de polinucleótidos y polipéptidos que hacen referencia a un número de acceso que se correlaciona con una entrada en una base de datos pública, tal como la mantenida por la base de datos COSMIC, disponible en la red mundial en sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/; y el Instituto de Investigación Genómica (TIGR) en la red mundial en tigr.org y/o el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) en la web en ncbi.nlm.nih.gov.

REIVINDICACIONES

1. Un agente anticáncer para su uso en un procedimiento de tratamiento a un sujeto que tiene un cáncer colorrectal con una fusión del miembro de la familia de la quinesina-5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET), en el que el procedimiento comprende:
administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente anticáncer, tratando de ese modo el cáncer colorrectal en el sujeto,
en el que el agente anticáncer se selecciona de:
(i) un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET; o
(ii) una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en moléculas antisentido, ribozimas, ARNip y moléculas de triple hélice, en el que la molécula de ácido nucleico se hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, bloqueando o reduciendo así la expresión del ARNm de la molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET.

2. Un agente anticáncer para su uso en un procedimiento de tratamiento a un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:
adquirir un conocimiento de la presencia de una fusión del miembro de la familia quinesina 5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET) en dicho sujeto por secuenciación, por ejemplo, secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) o secuenciación por espectrometría de masas; y administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente anticáncer, tratando de ese modo el cáncer en el sujeto,
en el que el agente anticáncer se selecciona de:
(i) un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET; o
(ii) una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en moléculas antisentido, ribozimas, ARNip y moléculas de triple hélice, en el que la molécula de ácido nucleico se hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, bloqueando o reduciendo así la expresión del ARNm de la molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET,
y en el que el cáncer es un cáncer colorrectal o un cáncer de pulmón.

3. El agente anticáncer para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente anticáncer se administra después de una de las siguientes etapas:
(i) determinar la presencia de la fusión KIF5B-RET en una muestra de tumor de dicho sujeto;
(ii) adquirir conocimiento de la presencia de la fusión KIF5B-RET en dicho sujeto;
(iii) adquirir conocimiento de la presencia de la fusión KIF5B-RET en dicho sujeto de otra parte; o
(iv) identificar la presencia de la fusión KIF5B-RET en dicho sujeto, en el que dicha identificación surge de la colaboración con otra parte.

4. El agente anticáncer para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho cáncer de pulmón se elige de entre un cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés), un adenocarcinoma de pulmón, un carcinoma broncogénico, un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), un carcinoma de células escamosas (SCC, por sus siglas en inglés), o una combinación de los mismos.

5. El agente anticáncer para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente anticáncer se selecciona de lenvatinib, sorafenib, sunitinib, vandetanib, NVP-AST487, regorafenib, motesanib, cabozantinib, apatinib o DCC-2157.

6. El agente anticáncer para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente anticáncer se administra en combinación con un segundo agente terapéutico o una modalidad terapéutica diferente, por ejemplo, un procedimiento quirúrgico o de radiación.

7. Un procedimiento de determinación de la presencia de una fusión del miembro de la familia quinesina 5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET), que comprende la adquisición de conocimiento mediante secuenciación, por ejemplo, secuenciación de la próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) o secuenciación por espectrometría de masas, cuya molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET o un polipéptido de fusión KIF5B-RET está presente en una muestra de un sujeto que tiene cáncer, en el que el cáncer se elige de entre un cáncer colorrectal o un cáncer de pulmón, opcionalmente en el que el cáncer de pulmón es un NSCLC, un SCLC, un SCC, o una combinación de los mismos, y en el que en respuesta a la adquisición de conocimiento de la presencia de la fusión KIF5B-RET:
(i) el sujeto está clasificado como candidato para recibir tratamiento con un agente anticáncer; y/o
(ii) el sujeto se identifica como probable para responder a un tratamiento que comprende un agente anticáncer, en el que el agente anticáncer se selecciona de:
(a) un inhibidor de múltiples quinasas o un inhibidor específico de RET; o
(b) una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en moléculas antisentido, ribozimas, ARNip y moléculas de triple hélice, en el que la molécula de ácido nucleico se hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET, bloqueando o reduciendo así la expresión del ARNm de la molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET,

comprendiendo dicho procedimiento opcionalmente proporcionar además un informe a otra parte, en el que dicho informe comprende:
información sobre el papel de una fusión KIF5B-RET, o secuencia de tipo natural, en la enfermedad; información sobre el pronóstico, la resistencia o las opciones terapéuticas potenciales o sugeridas para el sujeto;
información sobre la eficacia probable de una opción terapéutica, la aceptabilidad de una opción terapéutica o la conveniencia de aplicar una opción terapéutica al sujeto; o
información, o una recomendación sobre, la administración de un fármaco al sujeto.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la muestra:
(i) comprende fluido, células y/o un tejido, por ejemplo, un tejido tumoral;
(ii) es una muestra de ácido nucleico o una muestra de proteína;
(iii) se adquiere del sujeto;
(iv) comprende una biopsia de tumor o una célula tumoral circulante o ácido nucleico; y/o
se elige de entre uno o más de: tejido, por ejemplo, tejido canceroso, tal como una biopsia de tejido, sangre entera, suero, plasma, raspado bucal, esputo, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, células tumorales circulantes, ácidos nucleicos circulantes o médula ósea.

9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que se determina que una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión KIF5B-RET está presente en una muestra del sujeto que tiene cáncer, y en el que el procedimiento comprende además un procedimiento elegido de uno o más de: un ensayo de hibridación de ácido nucleico, un ensayo basado en la amplificación, un ensayo PCR-RFLP, una PCR en tiempo real, un análisis de cribado, FISH, cariotipo espectral o MFISH, hibridación genómica comparativa, hibridación *in situ*, SSP, HPLC o genotipado espectrométrico de masas.

10. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el procedimiento comprende además: poner en contacto la muestra con un reactivo que se une específicamente a un polipéptido de fusión KIF5B-RET, en el que la muestra es una muestra de proteína; y detectar la formación de un complejo del polipéptido de fusión KIF5B-RET y el reactivo, opcionalmente en el que: el reactivo se marca con un grupo detectable para facilitar la detección del reactivo unido y no unido; y/o el reactivo es una molécula de anticuerpo.

11. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que:
(i) se evalúa el nivel o la actividad de la fusión KIF5B-RET;
(ii) la fusión KIF5B-RET se detecta antes de iniciar un tratamiento con el agente anticáncer en el sujeto;
(iii) la fusión KIF5B-RET se detecta en el momento del diagnóstico del sujeto con un cáncer; y/o
(iv) la fusión KIF5B-RET se detecta en un intervalo predeterminado, por ejemplo, un primer punto en el tiempo y al menos en un punto posterior en el tiempo.

12. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además, en respuesta a una determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET, uno o más de:
(i) estratificar una población de pacientes;
(ii) identificar o seleccionar al sujeto como probable o no probable para responder a un tratamiento;
(iii) seleccionar una opción de tratamiento para el sujeto, opcionalmente en el que la opción de tratamiento comprende administrar un agente anticáncer elegido de entre lenvatinib, sorafenib, sunitinib, vandetanib, NVP-AST487, regorafenib, motesanib, cabozantinib, apatinib o DCC-2157; o
(iv) pronosticar la evolución temporal del cáncer en el sujeto.

13. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además:
identificar, seleccionar, u obtener información o conocimiento de que el sujeto ha participado en un ensayo clínico o ha sido tratado por cáncer,
en el que la presencia de la fusión KIF5B-RET identifica al sujeto como si tuviera un riesgo aumentado de, o tiene, un cáncer asociado con la fusión KIF5B-RET.

14. Un agente anticáncer para su uso en un procedimiento de tratamiento a un sujeto que tiene cáncer colorrectal o de pulmón con una fusión del miembro de la familia de la quinesina-5B-proto-oncogén RET (KIF5B-RET), en el que el procedimiento comprende:
administrar al sujeto una cantidad efectiva del agente anticáncer, tratando así el cáncer en el sujeto,
en el que el agente anticáncer se elige de entre lenvatinib, NVP-AST487, regorafenib, motesanib, cabozantinib, apatinib o DCC-2157.

15. El agente anticáncer para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 14, o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en el que la fusión KIF5B-RET:
(i) es una molécula de ácido nucleico de fusión en marco que comprende al menos el exón 15 de KIF5B y al menos el exón 12 de RET de la SEQ ID NO:1, o un polipéptido de fusión en marco codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende al menos el exón 15 de KIF5B y al menos el exón 12 de RET de la SEQ ID NO:1;
(ii) comprende los nucleótidos 1720-1731, 1717-1734 o 1714-1737 de la SEQ ID NO:1;

(iii) comprende un dominio de tirosina quinasa de RET y un dominio motor y un dominio de hélice superenrollada de quinesina KIF5B, de la SEQ ID NO:2; y/o
(iv) comprende la secuencia de aminoácidos de 1-575 de la SEQ ID NO:2 correspondiente a KIF5B y la secuencia de aminoácidos de 576-977 de la SEQ ID NO:2 correspondiente a RET.

16. El agente anticáncer para su uso según la reivindicación 1 o 14, en el que el procedimiento comprende adquirir conocimiento de la presencia de la fusión KIF5B-RET en el sujeto.

17. El agente anticáncer para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 14, o el procedimiento según la reivindicación 7, en el que la fusión KIF5B-RET es un gen o producto génico, por ejemplo, ADNc, ARNm o polipéptido.

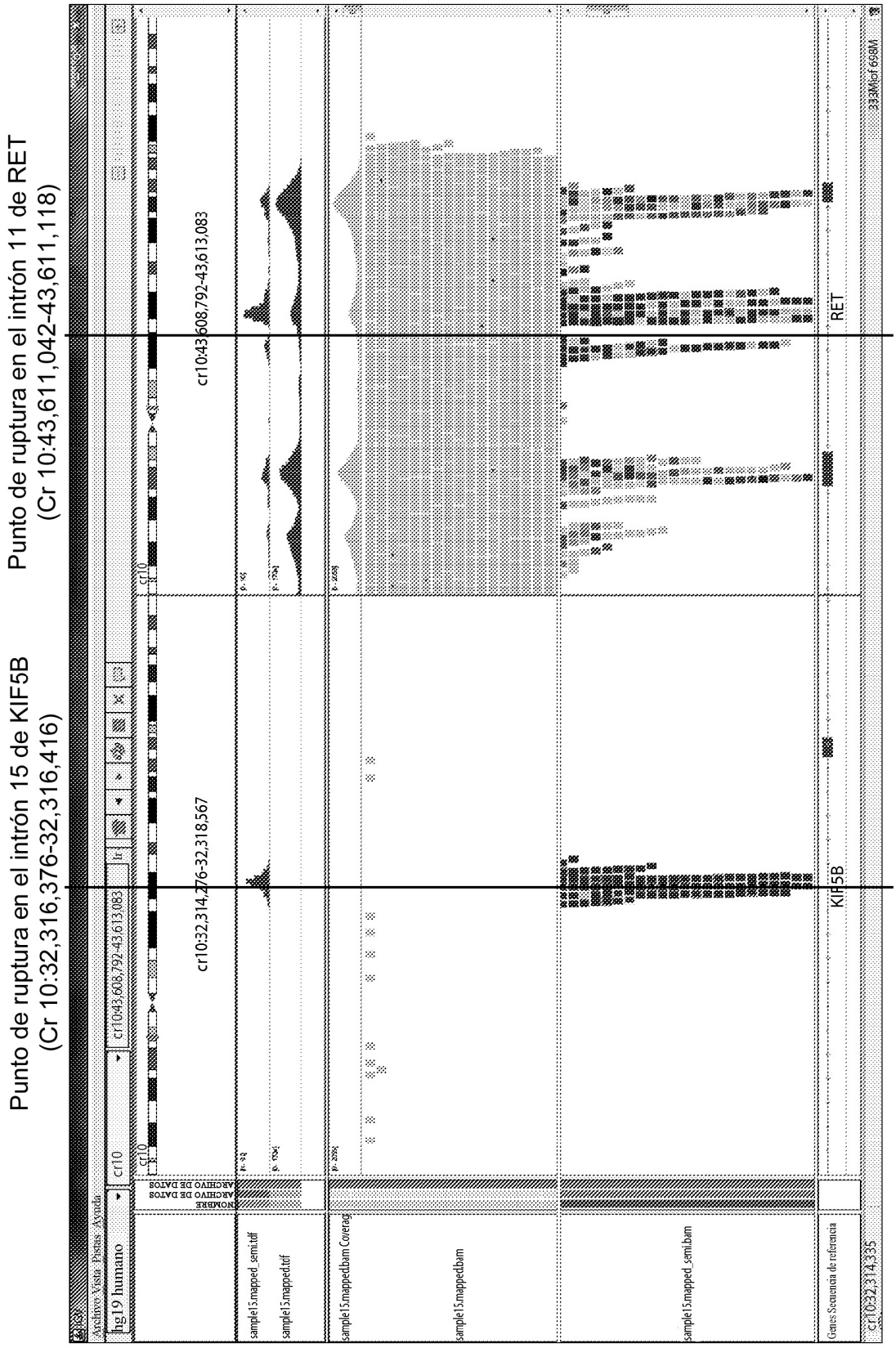

Punto de ruptura en el intrón 15 de KIF5B
(Cr 10:32,316,376-32,316,416)
Punto de ruptura en el intrón 11 de RET
(Cr 10:43,611,042-43,611,118)
KIF5B
RET
cr10:32,314,276-32,318,567
cr10:43,608,792-43,613,083

Fig. 1

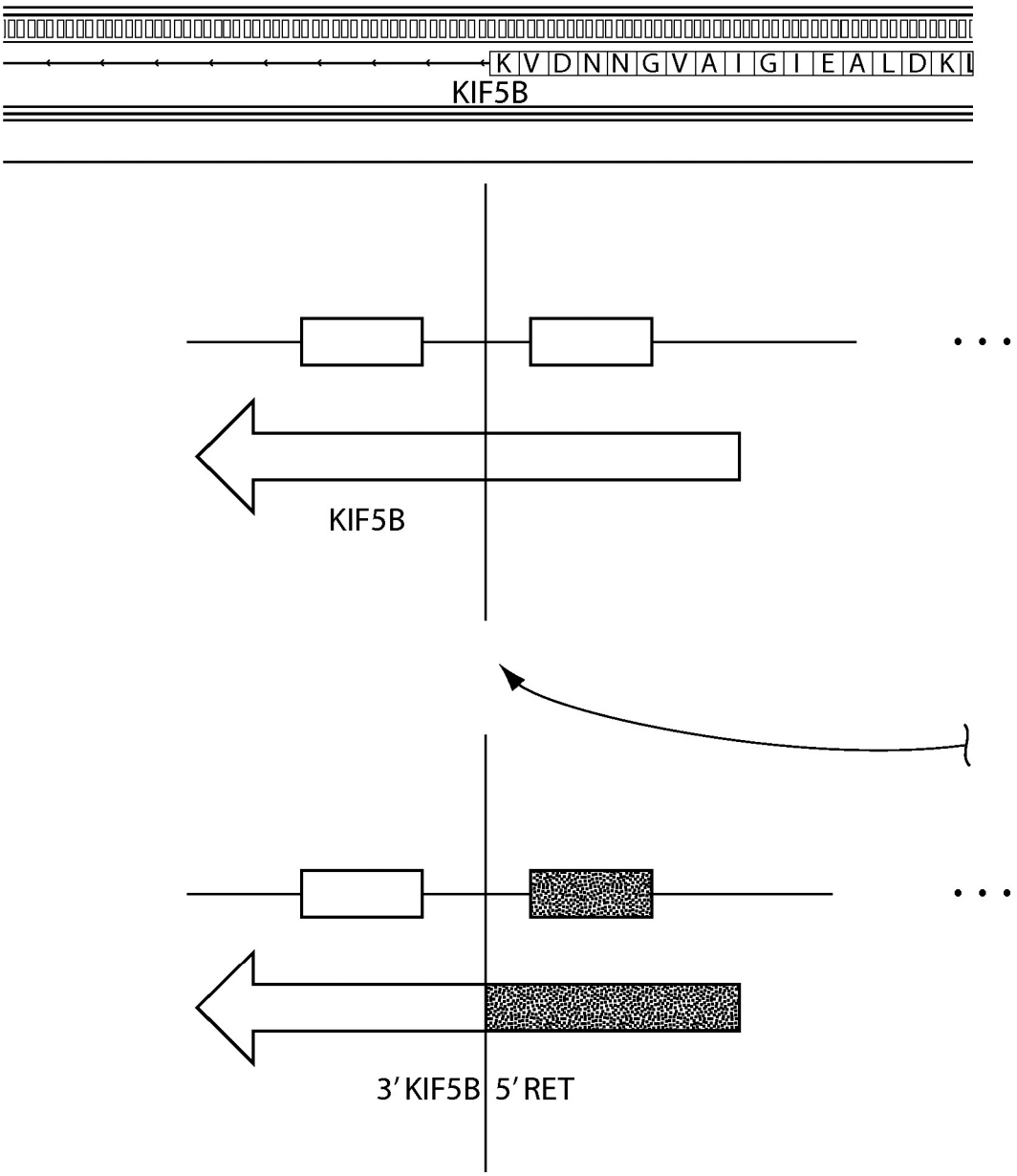


Fig. 2A

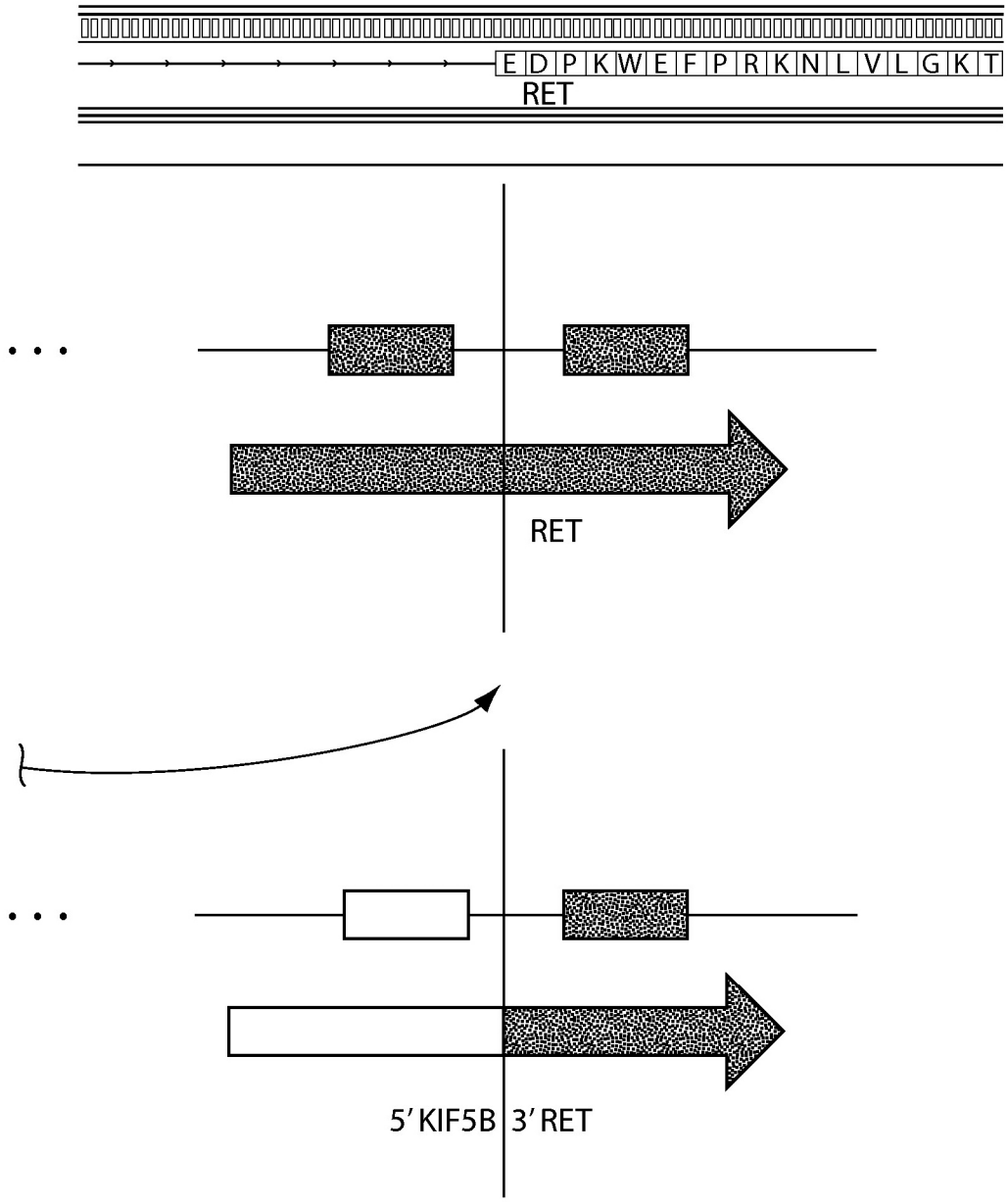


Fig. 2B

```
atg gcg gac ctg gcc gag tgc aac atc aaa gtg atg tgt cgc ttc aga cct ctc aac gag  60
  M   A   D   L   A   E   C   N   I   K   V   M   C   R   F   R   P   L   N   E  20

tct gaa gtg aac cgc ggc gac aag tac atc gcc aag ttt cag gga gaa gac acg gtc gtg 120
  S   E   V   N   R   G   D   K   Y   I   A   K   F   Q   G   E   D   T   V   V  40

atc gcg tcc aag cct tat gca ttt gat cgg gtg ttc cag tca agc aca tct caa gag caa 180
  I   A   S   K   P   Y   A   F   D   R   V   F   Q   S   S   T   S   Q   E   Q  60

gtg tat aat gac tgt gca aag aag att gtt aaa gat gta ctt gaa gga tat aat gga aca 240
  V   Y   N   D   C   A   K   K   I   V   K   D   V   L   E   G   Y   N   G   T  80

ata ttt gca tat gga caa aca tcc tct ggg aag aca cac aca atg gag ggt aaa ctt cat 300
  I   F   A   Y   G   Q   T   S   S   G   K   T   H   T   M   E   G   K   L   H 100

gat cca gaa ggc atg gga att att cca aga ata gtg caa gat att ttt aat tat att tac 360
  D   P   E   G   M   G   I   I   P   R   I   V   Q   D   I   F   N   Y   I   Y 120

tcc atg gat gaa aat ttg gaa ttt cat att aag gtt tca tat ttt gaa ata tat ttg gat 420
  S   M   D   E   N   L   E   F   H   I   K   V   S   Y   F   E   I   Y   L   D 140

aag ata agg gac ctg tta gat gtt tca aag acc aac ctt tca gtt cat gaa gac aaa aac 480
  K   I   R   D   L   L   D   V   S   K   T   N   L   S   V   H   E   D   K   N 160

cga gtt ccc tat gta aag ggg tgc aca gag cgt ttt gta tgt agt cca gat gaa gtt atg 540
  R   V   P   Y   V   K   G   C   T   E   R   F   V   C   S   P   D   E   V   M 180

gat acc ata gat gaa gga aaa tcc aac aga cat gta gca gtt aca aat atg aat gaa cat 600
  D   T   I   D   E   G   K   S   N   R   H   V   A   V   T   N   M   N   E   H 200

agc tct agg agt cac agt ata ttt ctt att aat gtc aaa caa gag aac aca caa acg gaa 660
  S   S   R   S   H   S   I   F   L   I   N   V   K   Q   E   N   T   Q   T   E 220

caa aag ctg agt gga aaa ctt tat ctg gtt gat tta gct ggt agt gaa aag gtt agt aaa 720
  Q   K   L   S   G   K   L   Y   L   V   D   L   A   G   S   E   K   V   S   K 240

act gga gct gaa ggt gct gtg ctg gat gaa gct aaa aac atc aac aag tca ctt tct gct 780
  T   G   A   E   G   A   V   L   D   E   A   K   N   I   N   K   S   L   S   A 260

ctt gga aat gtt att tct gct ttg gct gag ggt agt aca tat gtt cca tat cga gat agt 840
  L   G   N   V   I   S   A   L   A   E   G   S   T   Y   V   P   Y   R   D   S 280
```

Fig. 3A

```
aaa atg aca aga atc ctt caa gat tca tta ggt ggc aac tgt aga acc act att gta att 900
  K   M   T   R   I   L   Q   D   S   L   G   G   N   C   R   T   T   I   V   I 300

tgc tgc tct cca tca tca tac aat gag tct gaa aca aaa tct aca ctc tta ttt ggc caa  960
  C   C   S   P   S   S   Y   N   E   S   E   T   K   S   T   L   L   F   G   Q 320

agg gcc aaa aca att aag aac aca gtt tgt gtc aat gtg gag tta act gca gaa cag tgg 1020
  R   A   K   T   I   K   N   T   V   C   V   N   V   E   L   T   A   E   Q   W 340

aaa aag aag tat gaa aaa gaa aaa gaa aaa aat aag atc ctg cgg aac act att cag tgg 1080
  K   K   K   Y   E   K   E   K   E   K   N   K   I   L   R   N   T   I   Q   W 360

ctt gaa aat gag ctc aac aga tgg cgt aat ggg gag acg gtg cct att gat gaa cag ttt 1140
  L   E   N   E   L   N   R   W   R   N   G   E   T   V   P   I   D   E   Q   F 380

gac aaa gag aaa gcc aac ttg gaa gct ttc aca gtg gat aaa gat att act ctt acc aat 1200
  D   K   E   K   A   N   L   E   A   F   T   V   D   K   D   I   T   L   T   N 400

gat aaa cca gca acc gca att gga gtt ata gga aat ttt act gat gct gaa aga aga aag 1260
  D   K   P   A   T   A   I   G   V   I   G   N   F   T   D   A   E   R   R   K 420

tgt gaa gaa gaa att gct aaa tta tac aaa cag ctt gat gac aag gat gaa gaa att aac 1320
  C   E   E   E   I   A   K   L   Y   K   Q   L   D   D   K   D   E   E   I   N 440

cag caa agt caa ctg gta gag aaa ctg aag acg caa atg ttg gat cag gag gag ctt ttg 1380
  Q   Q   S   Q   L   V   E   K   L   K   T   Q   M   L   D   Q   E   E   L   L 460

gca tct acc aga agg gat caa gac aat atg caa gct gag ctg aat cgc ctt caa gca gaa 1440
  A   S   T   R   R   D   Q   D   N   M   Q   A   E   L   N   R   L   Q   A   E 480

aat gat gcc tct aaa gaa gaa gtg aaa gaa gtt tta cag gcc cta gaa gaa ctt gct gtc 1500
  N   D   A   S   K   E   E   V   K   E   V   L   Q   A   L   E   E   L   A   V 500

aat tat gat cag aag tct cag gaa gtt gaa gac aaa act aag gaa tat gaa ttg ctt agt 1560
  N   Y   D   Q   K   S   Q   E   V   E   D   K   T   K   E   Y   E   L   L   S 520

gat gaa ttg aat cag aaa tcg gca act tta gcg agt ata gat gct gag ctt cag aaa ctt 1620
  D   E   L   N   Q   K   S   A   T   L   A   S   I   D   A   E   L   Q   K   L 540

aag gaa atg acc aac cac cag aaa aaa cga gca gct gag atg atg gca tct tta cta aaa 1680
  K   E   M   T   N   H   Q   K   K   R   A   A   E   M   M   A   S   L   L   K 560

gac ctt gca gaa ata gga att gct gtg gga aat aat gat gta aag gag gat cca aag tgg 1740
  D   L   A   E   I   G   I   A   V   G   N   N   D   V   K   E   D   P   K   W 580
```

Fig. 3B

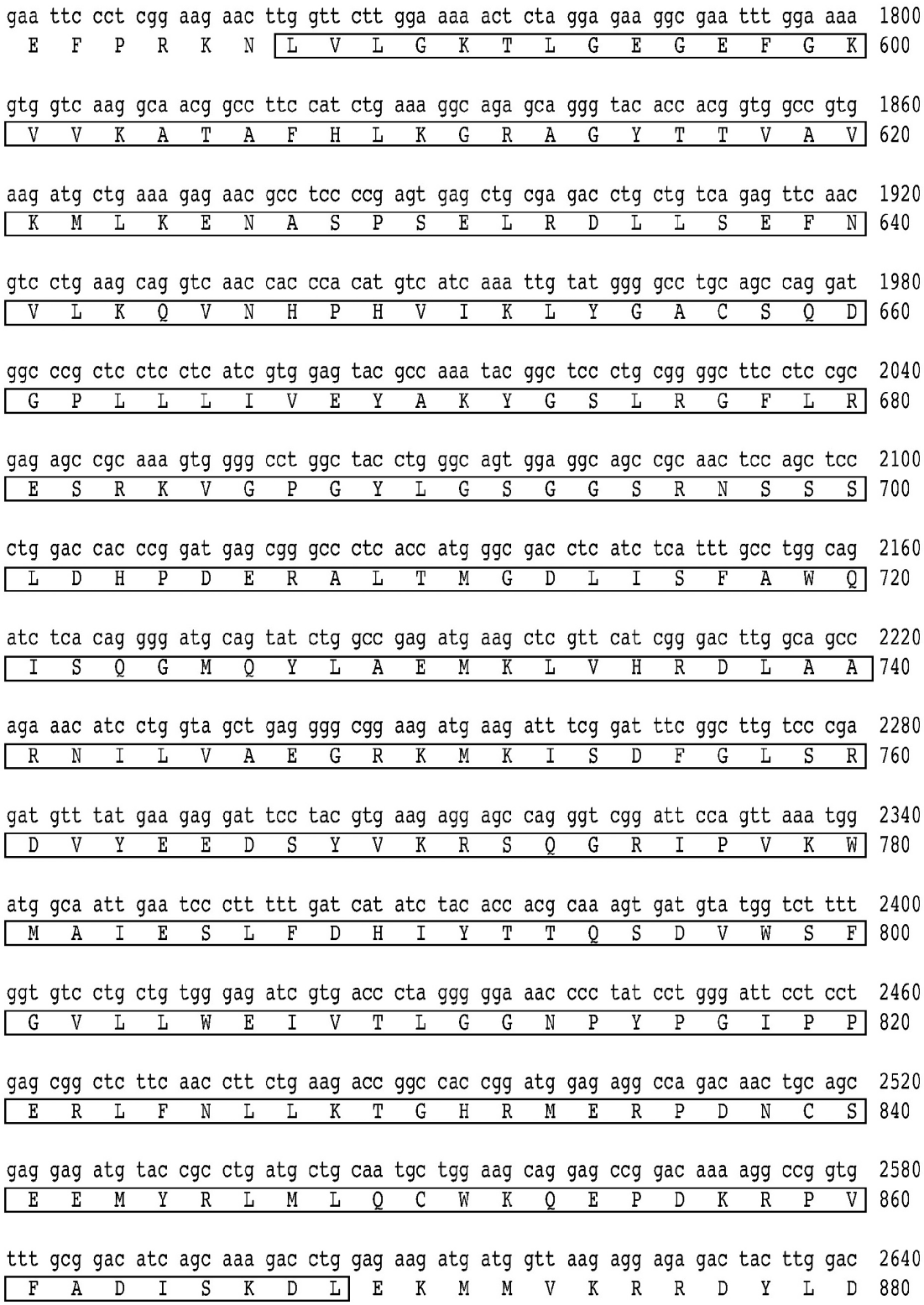

gaa ttc cct cgg aag aac ttg gtt ctt gga aaa act cta gga gaa ggc gaa ttt gga aaa 1800
E F P R K N L V L G K T L G E G E F G K 600
gtg gtc aag gca acg gcc ttc cat ctg aaa ggc aga gca ggg tac acc acg gtg gcc gtg 1860
V V K A T A F H L K G R A G Y T T V A V 620
aag atg ctg aaa gag aac gcc tcc ccg agt gag ctg cga gac ctg ctg tca gag ttc aac 1920
K M L K E N A S P S E L R D L L S E F N 640
gtc ctg aag cag gtc aac cac cca cat gtc atc aaa ttg tat ggg gcc tgc agc cag gat 1980
V L K Q V N H P H V I K L Y G A C S Q D 660
ggc ccg ctc ctc ctc atc gtg gag tac gcc aaa tac ggc tcc ctg cgg ggc ttc ctc cgc 2040
G P L L L I V E Y A K Y G S L R G F L R 680
gag agc cgc aaa gtg ggg cct ggc tac ctg ggc agt gga ggc agc cgc aac tcc agc tcc 2100
E S R K V G P G Y L G S G G S R N S S S 700
ctg gac cac ccg gat gag cgg gcc ctc acc atg ggc gac ctc atc tca ttt gcc tgg cag 2160
L D H P D E R A L T M G D L I S F A W Q 720
atc tca cag ggg atg cag tat ctg gcc gag atg aag ctc gtt cat cgg gac ttg gca gcc 2220
I S Q G M Q Y L A E M K L V H R D L A A 740
aga aac atc ctg gta gct gag ggg cgg aag atg aag att tcg gat ttc ggc ttg tcc cga 2280
R N I L V A E G R K M K I S D F G L S R 760
gat gtt tat gaa gag gat tcc tac gtg aag agg agc cag ggt cgg att cca gtt aaa tgg 2340
D V Y E E D S Y V K R S Q G R I P V K W 780
atg gca att gaa tcc ctt ttt gat cat atc tac acc acg caa agt gat gta tgg tct ttt 2400
M A I E S L F D H I Y T T Q S D V W S F 800
ggt gtc ctg ctg tgg gag atc gtg acc cta ggg gga aac ccc tat cct ggg att cct cct 2460
G V L L W E I V T L G G N P Y P G I P P 820
gag cgg ctc ttc aac ctt ctg aag acc ggc cac cgg atg gag agg cca gac aac tgc agc 2520
E R L F N L L K T G H R M E R P D N C S 840
gag gag atg tac cgc ctg atg ctg caa tgc tgg aag cag gag ccg gac aaa agg ccg gtg 2580
E E M Y R L M L Q C W K Q E P D K R P V 860
ttt gcg gac atc agc aaa gac ctg gag aag atg atg gtt aag agg aga gac tac ttg gac 2640
F A D I S K D L E K M M V K R R D Y L D 880

Fig. 3C

```
ctt gcg gcg tcc act cca tct gac tcc ctg att tat gac gac ggc ctc tca gag gag gag  2700
  L   A   A   S   T   P   S   D   S   L   I   Y   D   D   G   L   S   E   E   E  900

aca ccg ctg gtg gac tgt aat aat gcc ccc ctc cct cga gcc ctc cct tcc aca tgg att  2760
  T   P   L   V   D   C   N   N   A   P   L   P   R   A   L   P   S   T   W   I  920

gaa aac aaa ctc tat ggc atg tca gac ccg aac tgg cct gga gag agt cct gta cca ctc  2820
  E   N   K   L   Y   G   M   S   D   P   N   W   P   G   E   S   P   V   P   L  940

acg aga gct gat ggc act aac act ggg ttt cca aga tat cca aat gat agt gta tat gct  2880
  T   R   A   D   G   T   N   T   G   F   P   R   Y   P   N   D   S   V   Y   A  960

aac tgg atg ctt tca ccc tca gcg gca aaa tta atg gac acg ttt gat agt taa  2934
  N   W   M   L   S   P   S   A   A   K   L   M   D   T   F   D   S   *  977
```

ADNc = SEQ ID NO:1
proteína = SEQ ID NO:2

Fig. 3D

```
atg gcg aag gcg acg tcc ggt gcc gcg ggg ctg cgt ctg ctg ttg ctg ctg ctg ctg ccg  60
  M   A   K   A   T   S   G   A   A   G   L   R   L   L   L   L   L   L   L   P  20

ctg cta ggc aaa gtg gca ttg ggc ctc tac ttc tcg agg gat gct tac tgg gag aag ctg  120
  L   L   G   K   V   A   L   G   L   Y   F   S   R   D   A   Y   W   E   K   L  40

tat gtg gac cag gca gcc ggc acg ccc ttg ctg tac gtc cat gcc ctg cgg gac gcc cct  180
  Y   V   D   Q   A   A   G   T   P   L   L   Y   V   H   A   L   R   D   A   P  60

gag gag gtg ccc agc ttc cgc ctg ggc cag cat ctc tac ggc acg tac cgc aca cgg ctg  240
  E   E   V   P   S   F   R   L   G   Q   H   L   Y   G   T   Y   R   T   R   L  80

cat gag aac aac tgg atc tgc atc cag gag gac acc ggc ctc ctc tac ctt aac cgg agc  300
  H   E   N   N   W   I   C   I   Q   E   D   T   G   L   L   Y   L   N   R   S 100

ctg gac cat agc tcc tgg gag aag ctc agt gtc cgc aac cgc ggc ttt ccc ctg ctc acc  360
  L   D   H   S   S   W   E   K   L   S   V   R   N   R   G   F   P   L   L   T 120

gtc tac ctc aag gtc ttc ctg tca ccc aca tcc ctt cgt gag ggc gag tgc cag tgg cca  420
  V   Y   L   K   V   F   L   S   P   T   S   L   R   E   G   E   C   Q   W   P 140

ggc tgt gcc cgc gta tac ttc tcc ttc ttc aac acc tcc ttt cca gcc tgc agc tcc ctc  480
  G   C   A   R   V   Y   F   S   F   F   N   T   S   F   P   A   C   S   S   L 160

aag ccc cgg gag ctc tgc ttc cca gag aca agg ccc tcc ttc cgc att cgg gag aac cga  540
  K   P   R   E   L   C   F   P   E   T   R   P   S   F   R   I   R   E   N   R 180

ccc cca ggc acc ttc cac cag ttc cgc ctg ctg cct gtg cag ttc ttg tgc ccc aac atc  600
  P   P   G   T   F   H   Q   F   R   L   L   P   V   Q   F   L   C   P   N   I 200

agc gtg gcc tac agg ctc ctg gag ggt gag ggt ctg ccc ttc cgc tgc gcc ccg gac agc  660
  S   V   A   Y   R   L   L   E   G   E   G   L   P   F   R   C   A   P   D   S 220

ctg gag gtg agc acg cgc tgg gcc ctg gac cgc gag cag cgg gag aag tac gag ctg gtg  720
  L   E   V   S   T   R   W   A   L   D   R   E   Q   R   E   K   Y   E   L   V 240

gcc gtg tgc acc gtg cac gcc ggc gcg cgc gag gag gtg gtg atg gtg ccc ttc ccg gtg  780
  A   V   C   T   V   H   A   G   A   R   E   E   V   V   M   V   P   F   P   V 260

acc gtg tac gac gag gac gac tcg gcg ccc acc ttc ccc gcg ggc gtc gac acc gcc agc  840
  T   V   Y   D   E   D   D   S   A   P   T   F   P   A   G   V   D   T   A   S 280

gcc gtg gtg gag ttc aag cgg aag gag gac acc gtg gtg gcc acg ctg cgt gtc ttc gat  900
  A   V   V   E   F   K   R   K   E   D   T   V   V   A   T   L   R   V   F   D 300
```

Fig. 4A

```
gca gac gtg gta cct gca tca ggg gag ctg gtg agg cgg tac aca agc acg ctg ctc ccc 960
  A   D   V   V   P   A   S   G   E   L   V   R   R   Y   T   S   T   L   L   P 320

ggg gac acc tgg gcc cag cag acc ttc cgg gtg gaa cac tgg ccc aac gag acc tcg gtc 1020
  G   D   T   W   A   Q   Q   T   F   R   V   E   H   W   P   N   E   T   S   V 340

cag gcc aac ggc agc ttc gtg cgg gcg acc gta cat gac tat agg ctg gtt ctc aac cgg 1080
  Q   A   N   G   S   F   V   R   A   T   V   H   D   Y   R   L   V   L   N   R 360

aac ctc tcc atc tcg gag aac cgc acc atg cag ctg gcg gtg ctg gtc aat gac tca gac 1140
  N   L   S   I   S   E   N   R   T   M   Q   L   A   V   L   V   N   D   S   D 380

ttc cag ggc cca gga gcg ggc gtc ctc ttg ctc cac ttc aac gtg tcg gtg ctg ccg gtc 1200
  F   Q   G   P   G   A   G   V   L   L   L   H   F   N   V   S   V   L   P   V 400

agc ctg cac ctg ccc agt acc tac tcc ctc tcc gtg agc agg agg gct cgc cga ttt gcc 1260
  S   L   H   L   P   S   T   Y   S   L   S   V   S   R   R   A   R   R   F   A 420

cag atc ggg aaa gtc tgt gtg gaa aac tgc cag gca ttc agt ggc atc aac gtc cag tac 1320
  Q   I   G   K   V   C   V   E   N   C   Q   A   F   S   G   I   N   V   Q   Y 440

aag ctg cat tcc tct ggt gcc aac tgc agc acg cta ggg gtg gtc acc tca gcc gag gac 1380
  K   L   H   S   S   G   A   N   C   S   T   L   G   V   V   T   S   A   E   D 460

acc tcg ggg atc ctg ttt gtg aat gac acc aag gcc ctg cgg cgg ccc aag tgt gcc gaa 1440
  T   S   G   I   L   F   V   N   D   T   K   A   L   R   R   P   K   C   A   E 480

ctt cac tac atg gtg gtg gcc acc gac cag cag acc tct agg cag gcc cag gcc cag ctg 1500
  L   H   Y   M   V   V   A   T   D   Q   Q   T   S   R   Q   A   Q   A   Q   L 500

ctt gta aca gtg gag ggg tca tat gtg gcc gag gag gcg ggc tgc ccc ctg tcc tgt gca 1560
  L   V   T   V   E   G   S   Y   V   A   E   E   A   G   C   P   L   S   C   A 520

gtc agc aag aga cgg ctg gag tgt gag gag tgt ggc ggc ctg ggc tcc cca aca ggc agg 1620
  V   S   K   R   R   L   E   C   E   E   C   G   G   L   G   S   P   T   G   R 540

tgt gag tgg agg caa gga gat ggc aaa ggg atc acc agg aac ttc tcc acc tgc tct ccc 1680
  C   E   W   R   Q   G   D   G   K   G   I   T   R   N   F   S   T   C   S   P 560

agc acc aag acc tgc ccc gac ggc cac tgc gat gtt gtg gag acc caa gac atc aac att 1740
  S   T   K   T   C   P   D   G   H   C   D   V   V   E   T   Q   D   I   N   I 580

tgc cct cag gac tgc ctc cgg ggc agc att gtt ggg gga cac gag cct ggg gag ccc cgg 1800
  C   P   Q   D   C   L   R   G   S   I   V   G   G   H   E   P   G   E   P   R 600
```

Fig. 4B

```
ggg att aaa gct ggc tat ggc acc tgc aac tgc ttc cct gag gag gag aag tgc ttc tgc 1860
  G   I   K   A   G   Y   G   T   C   N   C   F   P   E   E   E   K   C   F   C 620

gag ccc gaa gac atc cag gat cca ctg tgc gac gag ctg tgc cgc acg gtg atc gca gcc 1920
  E   P   E   D   I   Q   D   P   L   C   D   E   L   C   R   T   V   I   A   A 640

gct gtc ctc ttc tcc ttc atc gtc tcg gtg ctg ctg tct gcc ttc tgc atc cac tgc tac 1980
  A   V   L   F   S   F   I   V   S   V   L   L   S   A   F   C   I   H   C   Y 660

cac aag ttt gcc cac aag cca ccc atc tcc tca gct gag atg acc ttc cgg agg ccc gcc 2040
  H   K   F   A   H   K   P   P   I   S   S   A   E   M   T   F   R   R   P   A 680

cag gcc ttc ccg gtc agc tac tcc tct tcc ggt gcc cgc cgg ccc tcg ctg gac tcc atg 2100
  Q   A   F   P   V   S   Y   S   S   S   G   A   R   R   P   S   L   D   S   M 700

gag aac cag gtc tcc gtg gat gcc ttc aag atc ctg cag cct gag gga act ggc atg ata 2160
  E   N   Q   V   S   V   D   A   F   K   I   L   Q   P   E   G   T   G   M   I 720

gat gaa gag ttc act gtt gca aga ctc tac att agc aaa atg aag tca gaa gta aaa acc 2220
  D   E   E   F   T   V   A   R   L   Y   I   S   K   M   K   S   E   V   K   T 740

atg gtg aaa cgt tgc aag cag tta gaa agc aca caa act gag agc aac aaa aaa atg gaa 2280
  M   V   K   R   C   K   Q   L   E   S   T   Q   T   E   S   N   K   K   M   E 760

gaa aat gaa aag gag tta gca gca tgt cag ctt cgt atc tct caa cat gaa gcc aaa atc 2340
  E   N   E   K   E   L   A   A   C   Q   L   R   I   S   Q   H   E   A   K   I 780

aag tca ttg act gaa tac ctt caa aat gtg gaa caa aag aaa aga cag ttg gag gaa tct 2400
  K   S   L   T   E   Y   L   Q   N   V   E   Q   K   K   R   Q   L   E   E   S 800

gtc gat gcc ctc agt gaa gaa cta gtc cag ctt cga gca caa gag aaa gtc cat gaa atg 2460
  V   D   A   L   S   E   E   L   V   Q   L   R   A   Q   E   K   V   H   E   M 820

gaa aag gag cac tta aat aag gtt cag act gca aat gaa gtt aag caa gct gtt gaa cag 2520
  E   K   E   H   L   N   K   V   Q   T   A   N   E   V   K   Q   A   V   E   Q 840

cag atc cag agc cat aga gaa act cat caa aaa cag atc agt agt ttg aga gat gaa gta 2580
  Q   I   Q   S   H   R   E   T   H   Q   K   Q   I   S   S   L   R   D   E   V 860

gaa gca aaa gca aaa ctt att act gat ctt caa gac caa aac cag aaa atg atg tta gag 2640
  E   A   K   A   K   L   I   T   D   L   Q   D   Q   N   Q   K   M   M   L   E 880
```

Fig. 4C

```
cag gaa cgt cta aga gta gaa cat gag aag ttg aaa gcc aca gat cag gaa aag agc aga 2700
  Q   E   R   L   R   V   E   H   E   K   L   K   A   T   D   Q   E   K   S   R 900

aaa cta cat gaa ctt acg gtt atg caa gat aga cga gaa caa gca aga caa gac ttg aag 2760
  K   L   H   E   L   T   V   M   Q   D   R   R   E   Q   A   R   Q   D   L   K 920

ggt ttg gaa gag aca gtg gca aaa gaa ctt cag act tta cac aac ctg cgc aaa ctc ttt 2820
  G   L   E   E   T   V   A   K   E   L   Q   T   L   H   N   L   R   K   L   F 940

gtt cag gac ctg gct aca aga gtt aaa aag agt gct gag att gat tct gat gac acc gga 2880
  V   Q   D   L   A   T   R   V   K   K   S   A   E   I   D   S   D   D   T   G 960

ggc agc gct gct cag aag caa aaa atc tcc ttt ctt gaa aat aat ctt gaa cag ctc act 2940
  G   S   A   A   Q   K   Q   K   I   S   F   L   E   N   N   L   E   Q   L   T 980

aaa gtg cac aaa cag ttg gta cgt gat aat gca gat ctc cgc tgt gaa ctt cct aag ttg 3000
  K   V   H   K   Q   L   V   R   D   N   A   D   L   R   C   E   L   P   K   L 1000

gaa aag cga ctt cga gct aca gct gag aga gtg aaa gct ttg gaa tca gca ctg aaa gaa 3060
  E   K   R   L   R   A   T   A   E   R   V   K   A   L   E   S   A   L   K   E 1020

gct aaa gaa aat gca tct cgt gat cgc aaa cgc tat cag caa gaa gta gat cgc ata aag 3120
  A   K   E   N   A   S   R   D   R   K   R   Y   Q   Q   E   V   D   R   I   K 1040

gaa gca gtc agg tca aag aat atg gcc aga aga ggg cat tct gca cag att gct aaa cct 3180
  E   A   V   R   S   K   N   M   A   R   R   G   H   S   A   Q   I   A   K   P 1060

att cgt ccc ggg caa cat cca gca gct tct cca act cac cca agt gca att cgt gga gga 3240
  I   R   P   G   Q   H   P   A   A   S   P   T   H   P   S   A   I   R   G   G 1080

ggt gca ttt gtt cag aac agc cag cca gtg gca gtg cga ggt gga gga ggc aaa caa gtg 3300
  G   A   F   V   Q   N   S   Q   P   V   A   V   R   G   G   G   G   K   Q   V 1100

taa     3360  SEQ ID NO:3
*             SEQ ID NO:4
```

Fig. 4D

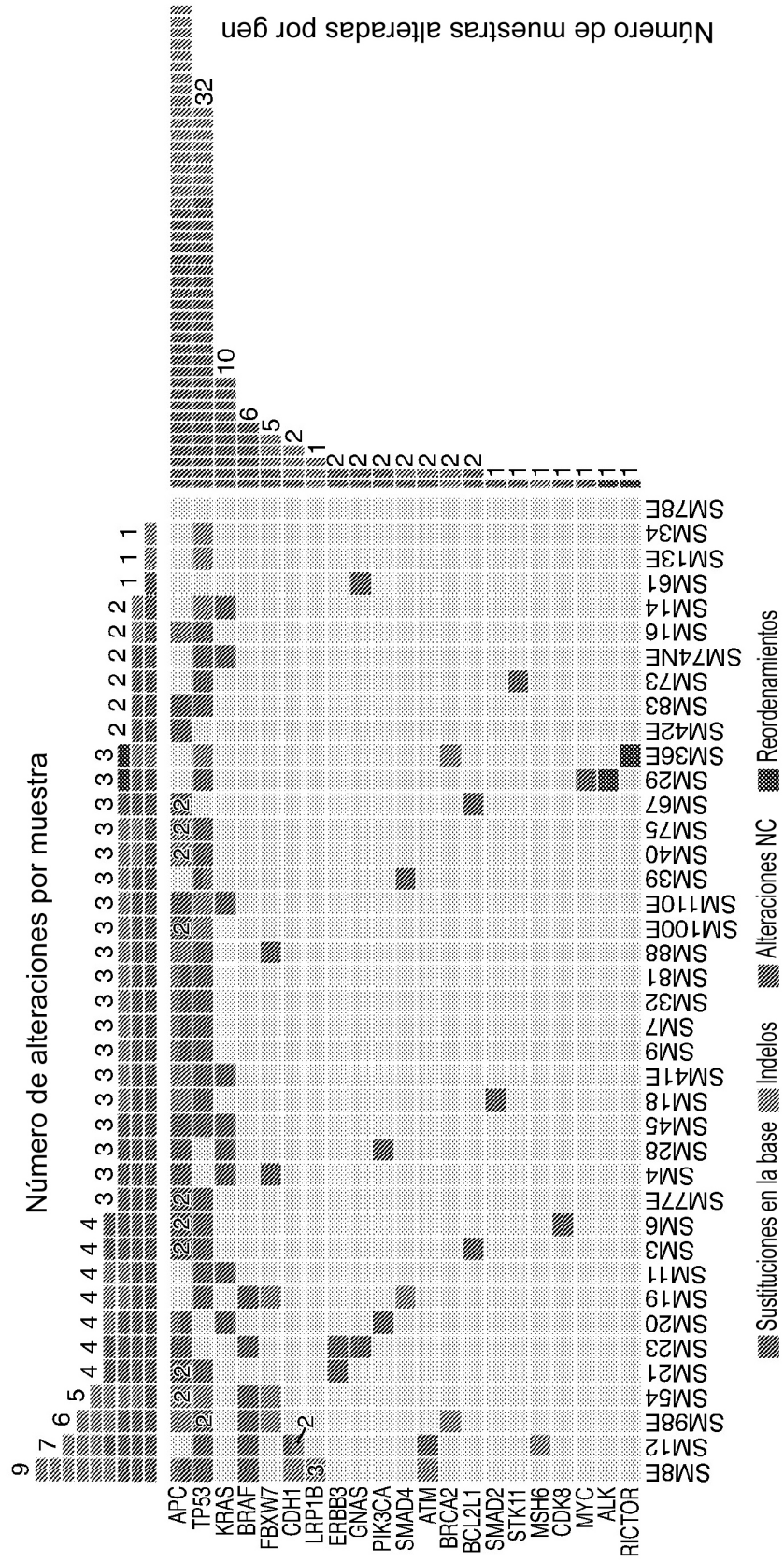

Número de alteraciones por muestra
Número de muestras alteradas por gen
Sustituciones en la base
Indelos
Alteraciones NC
Reordenamientos
APC
TP53
KRAS
BRAF
FBXW7
CDH1
LRP1B
ERBB3
GNAS
PIK3CA
SMAD4
ATM
BRCA2
BCL2L1
SMAD2
STK11
MSH6
CDK8
MYC
ALK
RICTOR

Fig. 5

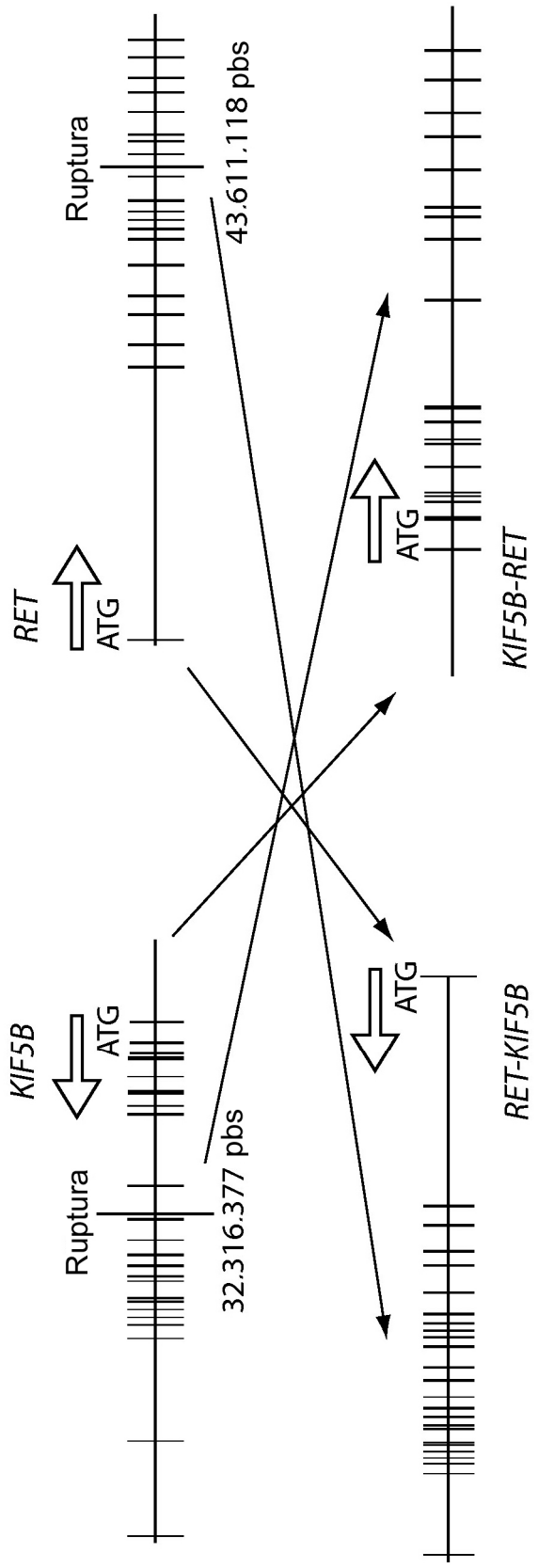

Ruptura
43.611.118 pbs
RET
ATG
ATG
KIF5B-RET
KIF5B
ATG
ATG
Ruptura
32.316.377 pbs
RET-KIF5B

Fig. 6A

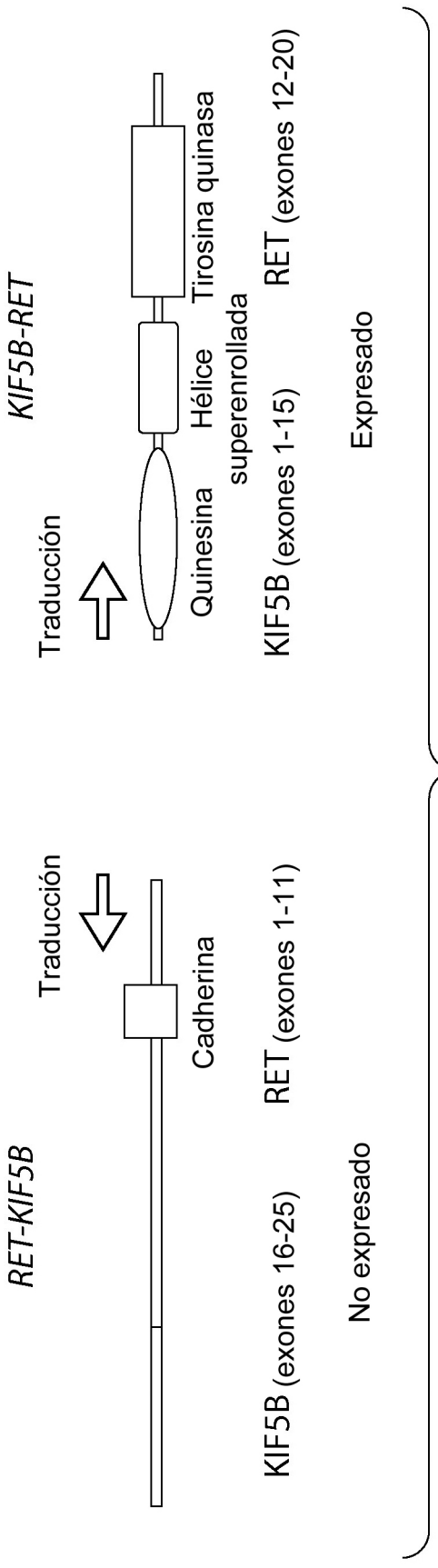

KIF5B-RET
Traducción
Quinesina
Hélice superenrollada
Tirosina quinasa
KIF5B (exones 1-15)
RET (exones 12-20)
Expresado
RET-KIF5B
Traducción
Cadherina
KIF5B (exones 16-25)
RET (exones 1-11)
No expresado

Fig. 6B

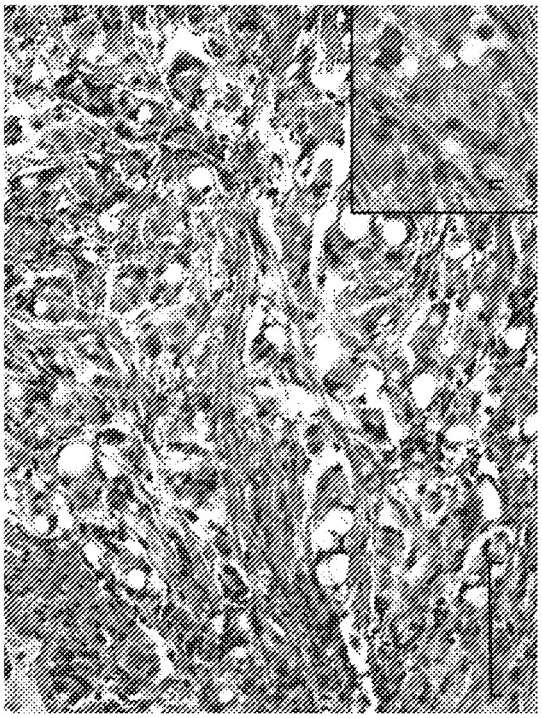


Fig. 6C

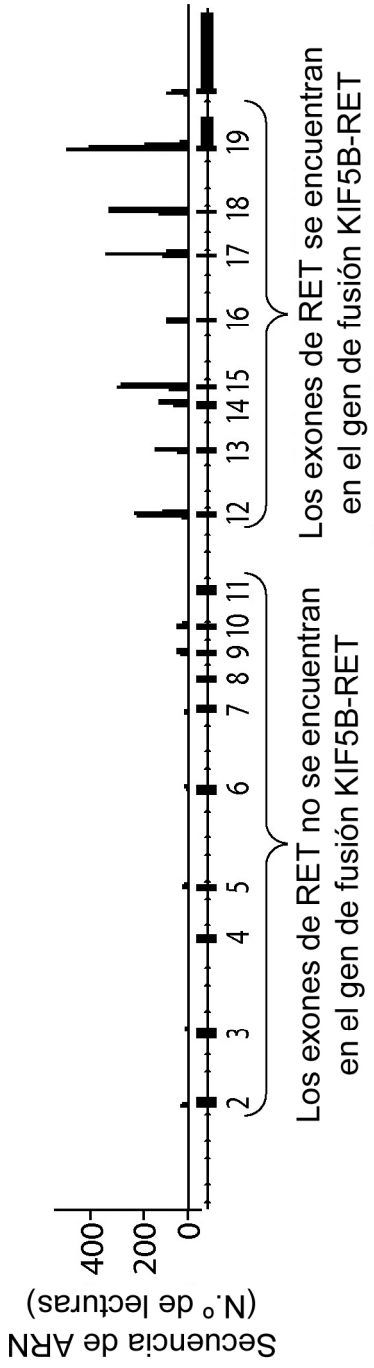

Secuencia de ARN
(N.º de lecturas)
400
200
0
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Los exones de RET no se encuentran en el gen de fusión KIF5B-RET
Los exones de RET se encuentran en el gen de fusión KIF5B-RET

Fig. 6D

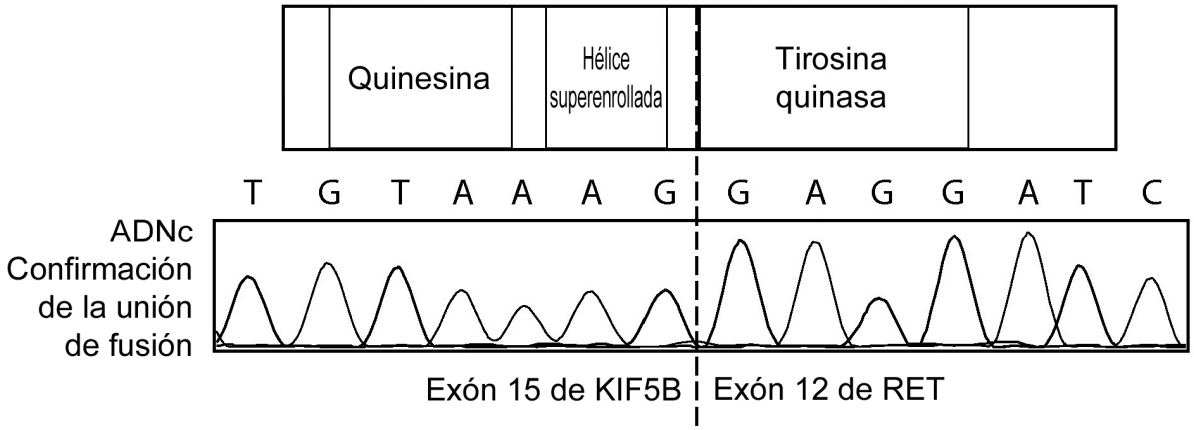

Quinesina
Hélice superenrollada
Tirosina quinasa
T G T A A A G G A G G A T C
ADNc
Confirmación de la unión de fusión
Exón 15 de KIF5B
Exón 12 de RET

Fig. 7A

1 MADLAECNIKVMCRFRPLNESEVNRGDKYIAKFQGEDTVVIASKPYAFDRVFQSSTSQEQ

61 VYNDCAKKIVKDVLEGYNGTIFAYGQTSSGKTHTMEGKLHDPEGMGIIPRIVQDIFNYIY

121 SMDENLEFHIKVSYFEIYLDKIRDLLDVSKTNLSVHEDKNRVPYVKGCTERFVCSPDEVM

181 DTIDEGKSNRHVAVTNMNEHSSRSHSIFLINVKQENTQTEQKLSGKLYLVDLAGSEKVSK

241 TGAEGAVLDEAKNINKSLSALGNVISALAEGSTYVPYRDSKMTRILQDSLGGNCRTTII

301 CCSPSSYNESETKSTLLFGQRAKTIKNTVCVNVELTAEQWKKKYEKEKEKNKILRNTIQW

361 LENELNRWRNGETVPIDEQFDKEKANLEAFTVDKDITLTNDKPATAIGVIGNFTDAERRK

421 CEEEIAKLYKQLDDKDEEINQQSQLVEKLKTQMLDQEELLASTRRDQDNMQAELNRLQAE

481 NDASKEEVKEVLQALEELAVNYDQKSQEVEDKTKEYELLSDELNQKSATLASIDAELQKL

541 KEMTNHQKKRAAEMMASLLKDLAEIGIAVGNNDVK*EDPKWEFPRKNLVLGKTLGEGEFGK*

601 VVKATAFHLKGRAGYTTVAVKMLKENASPSELRDLLSEFNVLKQVNHPHVIKLYGACSQD

661 GPLLLIVEYAKYGSLRGFLRESRKVGPGYLGSGGSRNSSSLDHPDERALTMGDLISFAWQ

721 ISQGMQYLAEMKLVHRDLAARNILVAEGRKMKISDFGLSRDVYEEDSYVKRSQGRIPVKW

781 MAIESLFDHIYTTQSDVWSFGVLLWEIVTLGGNPYPGIPPERLFNLLKTGHRMERPDNCS

841 EEMYRLMLQCWKQEPDKRPVFADISKDLEKMMVKRRDYLDLAASTPSDSLIYDDGLSEEE

901 TPLVDCNNAPLPRALPSTWIENKLYGMSDPNWPGESPVPLTRADGTNTGFPRYPNDSVYA

961 NWMLSPSAAKLMDTFDS

Fig. 7B

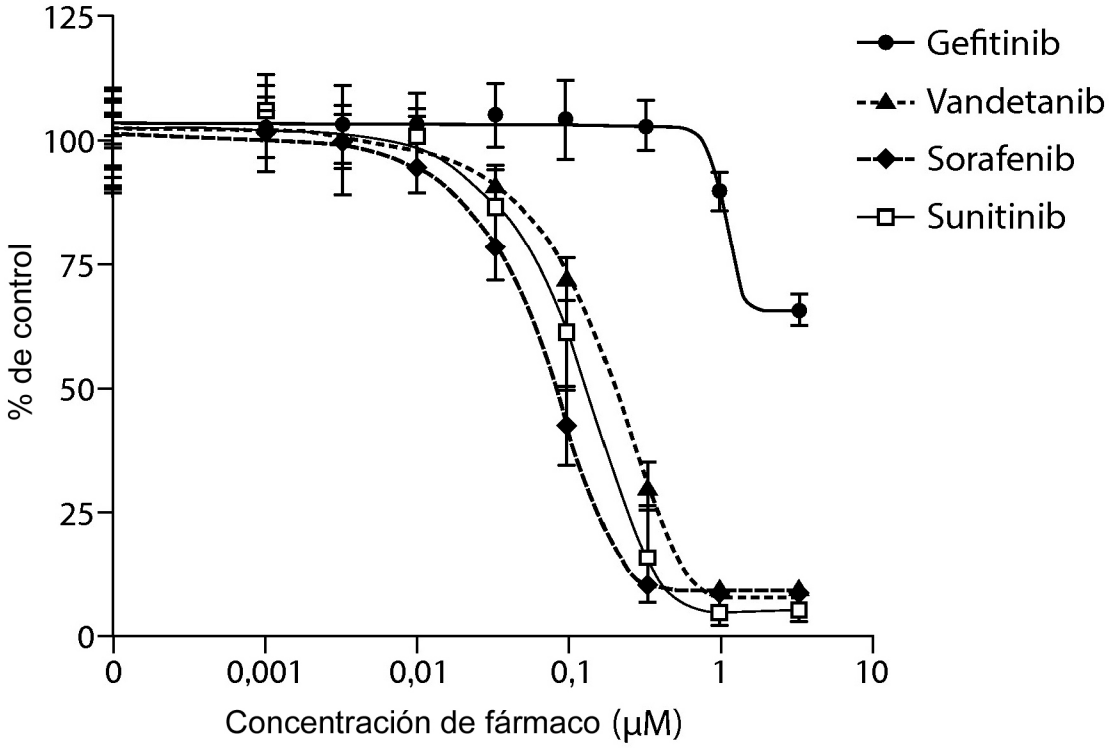

125
100
75
50
25
0
% de control
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración de fármaco (µM)
Gefitinib
Vandetanib
Sorafenib
Sunitinib

Fig. 8

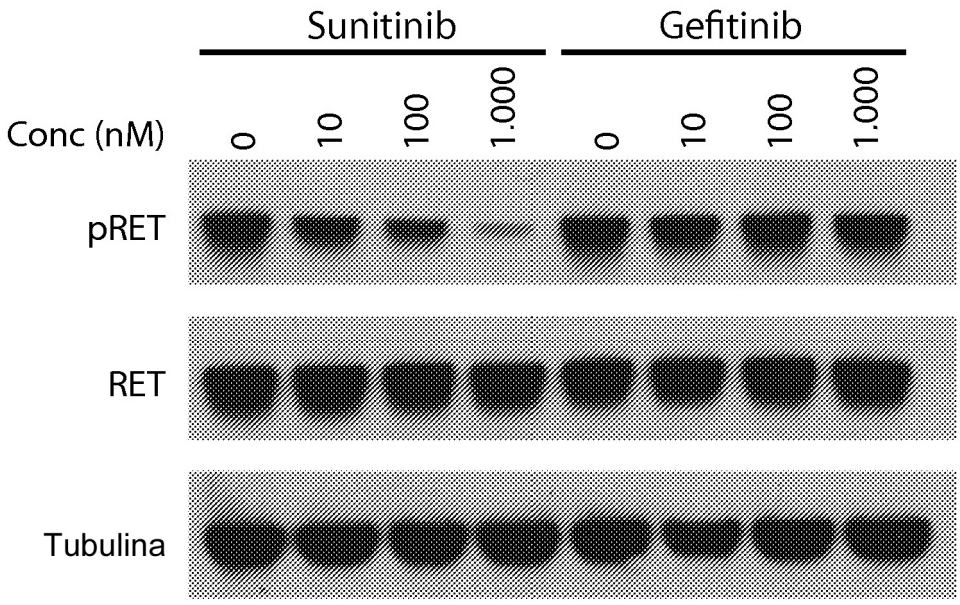

Sunitinib
Gefitinib
Conc (nM)
0
10
100
1.000
0
10
100
1.000
pRET
RET
Tubulina

Fig. 9