

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 370**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2011 E 11868918 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2726628**

54 Título: **MÉTODOS PARA DETECTAR FUSIONES GÉNICAS**

30 Prioridad:

**01.07.2011 US 201161504040 P**

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

**26.07.2016**

73 Titular/es:

**HTG MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC (100.0%)  
3430 E. Global Loop  
Tuscon, AZ 85706, US**

72 Inventor/es:

**SELIGMANN, BRUCE;  
KERNS, BJ;  
LUECKE, JOHN;  
ROUNSEVILLE, MATT;  
BOTROS, IHAB y  
SCHWARTZ, MARK**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 578 370 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para detectar fusiones génicas.

### 5 CAMPO

Esta divulgación se refiere a métodos para detectar fusiones génicas, particularmente fusiones génicas oncogénicas.

### ANTECEDENTES

10

Muchos cánceres se caracterizan por alteraciones en las rutas de señalización celular que conducen a un control aberrante de los procesos celulares, o a un crecimiento no controlado y la proliferación de células. Estas alteraciones a menudo están causadas por cambios genéticos (también denominados mutaciones) que afectan a la actividad de proteínas de señalización particulares. Un gen de fusión es un tipo de mutación que es un gen híbrido formado a partir de dos genes separados previamente o de regiones no contiguas previamente del mismo gen. Por ejemplo, esto puede ocurrir como resultado de una translocación, deleción intersticial o inversión cromosómica.

15

Entre otros ejemplos conocidos, se ha indicado que los genes de tirosina cinasa, que codifican enzimas importantes que regulan directamente el crecimiento celular, contienen mutaciones oncogénicas. La actividad de la cinasa puede activarse, por ejemplo, por la sustitución o deleción en las secuencias aminoacídicas y, por lo tanto, provocan carcinogénesis o contribuyen a cánceres agresivos frente a cánceres menos agresivos, o conducen a una propensión a la metástasis, o causan sensibilidad a fármacos o resistencia a fármacos. Aunque hay muchos ejemplos, la fusión génica de BCR-ABL es una que se ha asociado durante mucho tiempo con el cáncer; en particular, leucemia mielógena crónica (CML) y en algunos casos leucemia mielógena aguda (AML) o leucemia linfobástica aguda (ALL). Otros ejemplos incluyen transposiciones de genes que implican EML4/ALK (por ejemplo, cáncer de pulmón), TMPRSS2/ERG (por ejemplo, cáncer de próstata), IgH/MYC (por ejemplo, linfoma de Burkitt), MYB/NFIB (por ejemplo, carcinomas del pecho y de cabeza y cuello), TMPRSS2/ETV4 (por ejemplo, cáncer de próstata), EWSR1/FLI1 (por ejemplo, sarcoma de Ewing), y muchos otros conocidos por los expertos en la técnica o aún por descubrir.

30

En el contexto de la transformación neoplásica, es sabido que algunos genes son altamente prolíficos ya que pueden recombinarse con muchas parejas diferentes, por ejemplo, en las mismas entidades tumorales, por ejemplo, MLL en leucemias agudas (Collins y Rabbitts, Trends in Molecular Medicine, 8(9): 436-442 2002), EWSR1 en tumores óseos y de tejido blando (Helman y Meltzer, Nature Reviews Cancer, 3(9): 685-694, 2003), y RET en carcinomas de tiroides (Pierotti, Nature Reviews Cancer, 1(3): 245-250, 2001). Sin embargo, el mismo gen de fusión también puede dar lugar a tumores de derivaciones totalmente diferentes, y se ha descrito un gen de fusión particular, ETV6-NTRK3, en cánceres tan diversos como leucemia mieloide aguda, fibrosarcoma infantil, nefroma mesoblástico y carcinoma de mama (Tognon y col., Cancer Cell, 2(5): 367-376, 2002). También hay varios ejemplos en los que las aberraciones cromosómicas aparentemente idénticas producen diferentes genes de fusión. Una de las translocaciones más comunes en leucemia linfobástica aguda pre-B, t(1;19)(q23;p13) que conducen a una fusión de TCF3/PBX1, puede dar como resultado una transcripción quimérica que consiste en dos genes completamente diferentes, MEF2D en 1q23 y DAZAP1 en 19q13 (Yuki y col., Cancer Science, 95 (6): 503-507, 2004). Se desvelan ensayos para la detección de productos de fusión en Scheidel Petrovic y col. (1998) y Clark (1988). Scheidel Petrovic y col. (1998) desvelan ensayos de protección de nucleasa para estudiar fusiones génicas en linfoma, y Clark y col., 1988 utilizan ensayos de protección de nucleasa para estudiar fusiones génicas indicativas de leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica aguda usando una sonda específica para abarcar una unión de fusión.

45

Las fusiones génicas pueden ser marcadores de diagnóstico o dianas terapéuticas, así como útiles para predecir el pronóstico de los pacientes y/o la respuesta a los fármacos. Además, es evidente que pueden surgir múltiples fusiones en el mismo tumor o sujeto y/o que cada sujeto puede tener fusiones génicas médicamente relevantes que difieren de otros sujetos afectados. Por consiguiente, las nuevas tecnologías para detectar fusiones génicas son sumamente importantes para hacer avances en la ciencia y la medicina.

50

### RESUMEN

55

Se desvelan en el presente documento métodos para detectar la presencia de una fusión génica (tal como una fusión génica oncogénica) en una muestra de un sujeto. Los métodos desvelados pueden usarse para detectar fusiones génicas conocidas (tales como una translocación génica conocida, una deleción intersticial o inversión) y en algunos ejemplos, también pueden usarse para detectar fusiones génicas previamente desconocidas, por ejemplo

una fusión entre dos genes en un punto de fusión previamente no identificado, o una fusión entre dos genes previamente desconocidos para participar en una fusión génica. Los métodos son altamente sensibles y específicos, opcionalmente pueden usarse para cuantificar fusiones génicas detectadas, y pueden usarse para detectar una fusión génica en cualquier molécula de ácido nucleico, tal como ADN o ARN. Los métodos desvelados también son responsables de la multiplexación, para detectar múltiples fusiones génicas en una muestra procedente de un sujeto, o para detectar el mismo conjunto de fusiones génicas (o conjunto de genes, incluyendo algunas fusiones génicas) en muestras procedentes de múltiples sujetos.

Las anteriores y otras características de la divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra genes de tipo silvestre ejemplares (Genes 1 y 2) y un gen de fusión y una sonda de fusión ejemplar. Cuando la fusión génica está presente en una muestra, la sonda de fusión hibrida y se detecta tras un tratamiento de nucleasa (línea continua). Cuando la fusión génica no está presente en una muestra, la sonda de fusión únicamente hibrida parcialmente en los Genes 1 y 2 y al menos la porción no hibridada se hidroliza por el tratamiento de nucleasa (líneas discontinuas).

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra genes de tipo silvestre ejemplares (Genes 1 y 2) y un gen de fusión y una sonda de fusión marcada directa ejemplar que tiene un solapamiento de cuatro nucleótidos con la porción 5' del gen de fusión. La etiqueta (biotina en este ejemplo) se localiza en el extremo 5' de la sonda. Cuando la fusión génica está presente en una muestra, la sonda de fusión hibrida y la etiqueta se detecta tras un tratamiento de nucleasa (panel superior). La sonda de fusión no hibrida en el Gen 1 y se hidroliza por el tratamiento de nucleasa (panel central). La sonda de fusión hibrida en el Gen 2; sin embargo, el extremo 5' que incluye la etiqueta no hibrida y se escinde por el tratamiento de nucleasa (panel inferior). Por lo tanto, la sonda etiquetada se detecta únicamente en muestras en las que está presente la fusión génica.

La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra genes de tipo silvestre de longitud completa ejemplares (Genes 1 y 2) y un gen de fusión y sondas flanqueantes ejemplares y una sonda de fusión ejemplar. El gen de fusión incluye una porción 5' del Gen 1 y una porción 3' del Gen 2. La sonda 5' 1 y la sonda 3' 1 flanqueantes hibridan en el Gen 1 de longitud completa y se detectan tras un tratamiento de nucleasa. La sonda 5' 1 flanqueante también hibrida en el gen de fusión y se detecta tras un tratamiento de nucleasa; sin embargo la sonda 3' 1 flanqueante no hibrida en el gen de fusión y se hidroliza por tratamiento de nucleasa. La sonda 5' 2 y la sonda 3' 2 flanqueantes pueden incluirse opcionalmente en el ensayo; estas hibridan en el gen 2 de longitud completa y se detectan tras un tratamiento de nucleasa. La sonda 3' 2 también hibrida en el gen de fusión y se detecta tras un tratamiento de nucleasa; sin embargo la sonda 5' 2 flanqueante no hibrida en el gen de fusión y se hidroliza por el tratamiento de nucleasa (línea discontinua). Una sonda de fusión que abarca el punto de fusión también puede incluirse opcionalmente en el ensayo. Cuando la fusión génica está presente en una muestra, la sonda de fusión hibrida y se detecta tras un tratamiento de nucleasa (línea continua). Cuando la fusión génica no está presente en una muestra, la sonda de fusión únicamente hibrida parcialmente en los Genes 1 y 2 y al menos la porción no hibridada se hidroliza por el tratamiento de nucleasa (líneas discontinuas).

La figura 4 es un diagrama que muestra un ensayo en damero que detecta dianas de fusión transcritas de Bcr-Abl *in vitro* con sondas de fusión de Bcr-Abl (Tabla 4, a continuación). "Sí" indica señal detectable, "No" indica falta de señal detectable.

Las figuras 5A y B son diagramas esquemáticos de métodos ejemplares de captura de una o más sondas de fusión y/o sondas flanqueantes en una matriz para detectar la presencia de uno o más genes de fusión en una única muestra. La figura 5A muestra la hibridación de una sonda de fusión o flanqueante marcada de forma detectable (biotinilada en este caso) con un ácido nucleico diana (etapa 1), tratamiento de nucleasa (etapa 2), disociación de la sonda del ácido nucleico diana (etapa 3), hibridación de la sonda marcada de forma detectable en una micromatriz que incluye un ácido nucleico complementario a la sonda (etapa 4), y detección de la sonda marcada (etapas 5 y 6). La figura 5B muestra la hibridación de una sonda de fusión o flanqueante con un ácido nucleico diana (etapa 1), tratamiento de nucleasa (etapa 2), disociación de la sonda del ácido nucleico diana (etapa 3), hibridación de la sonda en una micromatriz que incluye un enlazador de programación que es complementario a una porción de la sonda (etapa 4), hibridación con un enlazador de detección, cuya porción es complementaria a una porción diferente de la sonda (etapa 5), hibridación con un ácido nucleico marcado de forma detectable (biotinilado en este caso) que es complementario a una porción diferente del enlazador de detección (etapa 6), y detección del ácido nucleico

5 marcado (etapa 7). Las figuras 6A-H son una serie de paneles que muestran la titulación de sondas de fusión para EML4-ALK-v1 (figura 6A), EML4-ALK-v2 (figura 6B), EML4-ALK-v3a (figura 6C), EML4-ALK-v3b-3 (figura 6D), EML4-ALK-v4 (figura 6E), EML4-ALK-v5a (figura 6F), EML4-ALK-v5b-3 (figura 6G) y EML4-ALK-v6 (figura 6H) con cantidades en aumento de los ARN transcritos (IVT) de EML4-ALK *in vitro* correspondientes.

Las figuras 7A y B son gráficos que muestran una señal obtenida usando las sondas flanqueantes de ALK identificadas con ALK IVT de longitud completa (figura 7A) o un ALK IVT truncado (figura 7B).

## LISTA DE SECUENCIAS

10 Cualquier secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos enumeradas en el presente documento o en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de letras estándares para bases nucleotídicas, y un código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. En al menos algunos casos, únicamente se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está  
15 incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada.

Las SEQ ID NO: 1-32 son secuencias de ácidos nucleicos de sondas de fusión ejemplares.

Las SEQ ID NO: 33-132 son secuencias de ácidos nucleicos de sondas flanqueantes ejemplares.

20 Las SEQ ID NO: 133-146 son secuencias de ácidos nucleicos de la sonda de fusión de Bcr-Abl.

Las SEQ ID NO: 147-160 son secuencias de ácidos nucleicos del enlazador de programación de Bcr-Abl.

25 Las SEQ ID NO: 161-174 son secuencias de ácidos nucleicos del enlazador de detección de Bcr-Abl.

La SEQ ID NO: 175 es una secuencia de ácidos nucleicos de la región de fusión de Bcr-Abl E1A2 ejemplar.

30 La SEQ ID NO: 176 es una secuencia de ácidos nucleicos de la sonda de fusión de Bcr-Abl de "solapamiento corto" ejemplar.

Las SEQ ID NO: 177-184 son secuencias de ácidos nucleicos diana de la sonda de fusión EML4-ALK ejemplar.

Las SEQ ID NO: 185-192 son secuencias de ácidos nucleicos diana de la sonda flanqueante de 5'-ALK ejemplar.

35 Las SEQ ID NO: 193-200 son secuencias de ácidos nucleicos diana de la sonda flanqueante de 3'-ALK ejemplar.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 40 I. Introducción

Se desvelan en el presente documento métodos para detectar una o más fusiones génicas en una muestra biológica. En algunas realizaciones, los métodos para detectar la presencia de un gen de fusión en una muestra procedente de un sujeto utilizan una sonda de fusión que abarca el punto de fusión entre dos ácidos nucleicos o  
45 genes. En realizaciones particulares, los métodos incluyen detectar la presencia de un ARNm del gen de fusión en una muestra procedente de un sujeto. Los métodos pueden incluir poner en contacto una muestra procedente de un sujeto (tal como una muestra que incluye ácidos nucleicos) con una sonda de fusión. La sonda de fusión incluye una porción 5' complementaria a un primer ácido nucleico y una porción 3' complementaria a un segundo ácido nucleico, donde la sonda de fusión abarca un punto de fusión del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico. La sonda  
50 de fusión se incuba con la muestra en condiciones suficientes para que la sonda de fusión hibride específicamente en una fusión génica. La muestra se pone en contacto con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, S1 nucleasa), y se detecta la presencia de la sonda de fusión. El gen de fusión se identifica como presente en la muestra cuando se detecta la sonda de fusión.

55 En algunos ejemplos, la sonda de fusión incluye una etiqueta detectable (tal como biotina o peroxidasa de rábano picante) y la detección de la presencia de la sonda de fusión incluye detectar la etiqueta detectable. En otros ejemplos, la sonda de fusión se detecta indirectamente, por ejemplo por hibridación con un ácido nucleico marcado complementario a toda o una porción de la sonda de fusión (por ejemplo, un "enlazador de programación"). En algunos ejemplos, la sonda de fusión se detecta usando una micromatriz, por ejemplo, una micromatriz que incluye

un ácido nucleico que es complementario a la sonda de fusión (véase, por ejemplo, la figura 5A). En otros ejemplos, la sonda de fusión se detecta usando una micromatriz que incluye un enlazador de programación complementario a una porción de la sonda de fusión y que se incuba posteriormente con un enlazador de detección, cuya porción es complementaria a una porción separada de la sonda de fusión. El enlazador de detección puede marcarse de forma detectable, o una porción separada del enlazador de detección puede ser complementaria a un ácido nucleico adicional que incluye una etiqueta detectable (tal como biotina o peroxidasa de rábano picante). Véase, por ejemplo, la figura 5B.

En algunos ejemplos, los métodos incluyen detectar la presencia de más de un gen de fusión en una muestra procedente del sujeto. Los métodos pueden incluir poner en contacto una muestra procedente de un sujeto (tal como una muestra que incluye ácidos nucleicos) con al menos dos sondas de fusión. Cada sonda de fusión incluye una porción 5' complementaria a un primer ácido nucleico y una porción 3' complementaria a un segundo ácido nucleico, donde la sonda de fusión abarca un punto de fusión del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico de una fusión génica particular (diferente). Las al menos dos sondas de fusión se incuban con la muestra en condiciones suficientes para que las sondas de fusión hibriden específicamente en la fusión génica. La muestra se pone en contacto con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, S1 nucleasa) y después la muestra se pone en contacto con una superficie que incluye al menos dos regiones espacialmente discretas que incluyen al menos un anclaje, donde cada anclaje está en asociación con un enlazador bifuncional que tiene una primera porción específica para (por ejemplo, complementaria a) el anclaje y una segunda porción específica para (por ejemplo, complementaria a) una de las al menos dos sondas de fusión, en condiciones suficientes para que las sondas de fusión se unan (por ejemplo, hibriden en) el enlazador bifuncional, detectando las sondas de fusión hibridadas, e identificando la presencia de la fusión génica por la región espacialmente distinta a la que está unida la sonda de fusión.

En algunas realizaciones, las sondas de fusión de uso en los métodos desvelados tienen aproximadamente 10-200 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, la sonda de fusión incluye aproximadamente números equivalentes de nucleótidos de cada uno de los primeros y segundos ácidos nucleicos. En otros ejemplos, la sonda de fusión incluye un pequeño número de nucleótidos de uno de los dos ácidos nucleicos y un mayor número de nucleótidos del otro ácido nucleico. Por ejemplo, la porción 5' de la sonda puede tener aproximadamente 1-10 nucleótidos de longitud y la porción 3' de la sonda puede tener aproximadamente 10 nucleótidos o más de longitud, o la porción 5' de la sonda puede tener aproximadamente 10 nucleótidos o más de longitud y la porción 3' de la sonda puede tener aproximadamente 1-10 nucleótidos de longitud.

En otras realizaciones, los métodos para detectar la presencia de un gen de fusión en una muestra procedente de un sujeto utilizan dos o más sondas que flanquean el punto de fusión entre dos ácidos nucleicos o genes. Los métodos pueden incluir poner en contacto una muestra procedente de un sujeto con una primera sonda complementaria con un primer ácido nucleico 5' con respecto a un punto de fusión entre el primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico en condiciones suficientes para que la primera sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico y poner en contacto la muestra con una segunda sonda complementaria con el primer ácido nucleico 3' con respecto al punto de fusión entre el primer y segundo ácidos nucleicos en condiciones suficientes para que la segunda sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico. La muestra se pone en contacto con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, S1 nucleasa), la presencia de la primera sonda y la segunda sonda se detecta, y se determina una relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda. El gen de fusión se identifica como presente en la muestra cuando la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es diferente de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente diferente de uno). En algunos ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 3' del primer ácido nucleico si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es mayor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente mayor de uno). En otros ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 5' del primer ácido nucleico si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es menor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente menor de uno). En algunos ejemplos, la primera sonda y la segunda sonda tienen cada una aproximadamente 10-200 ácidos nucleicos de longitud.

En algunos ejemplos, las primeras y/o segundas sondas (por ejemplo, las sondas flanqueantes) incluyen una etiqueta detectable (tal como biotina o peroxidasa de rábano picante) y la detección de la presencia de la sonda o las sondas incluye detectar la etiqueta detectable. En algunos ejemplos, las sondas flanqueantes se marcan con la misma etiqueta detectable. En otros ejemplos, las sondas flanqueantes se marcan con diferentes etiquetas detectables. En otros ejemplos, las sondas flanqueantes se detectan indirectamente, por ejemplo por hibridación con un ácido nucleico marcado complementario a toda o una porción de la sonda de fusión (por ejemplo, un "enlazador de programación"). En algunos ejemplos, las sondas flanqueantes se detectan usando una micromatriz, por ejemplo,

una micromatriz que incluye ácidos nucleicos que son complementarios a las sondas flanqueantes (véase, por ejemplo, la figura 5A). En otros ejemplos, las sondas flanqueantes se detectan usando una micromatriz que incluye enlazadores de programación complementarios a una porción de cada una de las sondas flanqueantes y que se incuban posteriormente con enlazadores de detección, cuya porción es complementaria a una porción separada de las sondas flanqueantes. Los enlazadores de detección pueden marcarse de forma detectable, o una porción separada de los enlazadores de detección es complementaria a ácidos nucleicos adicionales que incluyen una etiqueta detectable (tal como biotina o peroxidasa de rábano picante). Véase, por ejemplo, la figura 5B.

En realizaciones adicionales, los métodos incluyen determinar el porcentaje de fusión génica en la muestra relativa al primer ácido nucleico o el segundo ácido nucleico. Estos métodos incluyen adicionalmente poner en contacto la muestra con una sonda de fusión que incluye una porción 5' complementaria a un primer ácido nucleico y una porción 3' complementaria a un segundo ácido nucleico, en los que la sonda de fusión abarca un punto de fusión del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico, en condiciones suficientes para que la sonda de fusión hibride específicamente en una fusión génica, además de poner en contacto la muestra con la primera sonda y la segunda sonda como anteriormente. Los métodos pueden incluir adicionalmente detectar la presencia de la sonda de fusión y determinar una relación de la sonda de fusión con respecto a la primera sonda y/o una relación de la sonda de fusión con respecto a la segunda sonda.

En otras realizaciones, los métodos incluyen poner en contacto una muestra de un sujeto (tal como una muestra que incluye ácidos nucleicos) con dos o más sondas que flanquean el punto de fusión entre dos ácidos nucleicos o genes. Los métodos pueden incluir poner en contacto una muestra procedente de un sujeto con una primera sonda complementaria con un primer ácido nucleico 5' con respecto a un punto de fusión entre el primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico en condiciones suficientes para que la primera sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico y poner en contacto la muestra con una segunda sonda complementaria con el primer ácido nucleico 3' con respecto al punto de fusión entre el primer y segundo ácidos nucleicos en condiciones suficientes para que la segunda sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico. La muestra se pone en contacto con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, S1 nucleasa) y después la muestra se pone en contacto con una superficie que incluye al menos dos regiones espacialmente discretas que incluyen al menos un anclaje, donde cada anclaje está en asociación con un enlazador bifuncional que tiene una primera porción específica para (por ejemplo, complementaria a) el anclaje y una segunda porción específica para (por ejemplo, complementaria a) una de las al menos sondas flanqueantes, en condiciones suficientes para que las sondas flanqueantes se unan a (por ejemplo, hibriden en) el enlazador bifuncional, detectando las sondas flanqueantes hibridadas, y determinando una relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda. La fusión génica se identifica como presente en la muestra cuando la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es diferente de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente diferente de uno).

En algunos ejemplos, una etapa de protección con nucleasa puede reducir la necesidad de una amplia manipulación de los ácidos nucleicos, particularmente ARN, que pueden ser sensibles a la degradación contaminando las nucleasas y, por lo tanto, con los que es difícil trabajar. Además, las realizaciones en las que no se requiere purificación de los ácidos nucleicos (antes o después de la hibridación de las sondas) disminuyen la variabilidad inter-ensayo introducida por las etapas de extracción de ácidos nucleicos. Además, las realizaciones únicamente de lisis permiten la capacidad de medir tanto ácidos nucleicos solubles, así como ácidos nucleicos entrecruzados (por ejemplo, en secciones FFPE).

La protección de la nucleasa de una muestra puede permitir mayor sensibilidad y reproducibilidad en un ensayo. En algunas realizaciones, los métodos dan como resultado un fondo disminuido, por ejemplo, ya que el tratamiento de nucleasa destruye la mayor parte de los ácidos nucleicos no específicamente hibridados. Por lo tanto, los ensayos desvelados pueden ser lo suficientemente sensibles de tal forma que la amplificación de la fusión génica no es necesaria para detectar una señal. Las realizaciones del método particular no incluyen específicamente una etapa de amplificación (por ejemplo, amplificación por PCR). Esto reduce los inconvenientes de una etapa de amplificación, tal como artefactos específicos de secuencia o un intervalo dinámico limitado parcial, y la necesidad de usar ácidos nucleicos purificados e intactos. El aumento de la sensibilidad de los métodos desvelados permite realizar múltiples ensayos en una única muestra (por ejemplo, una única sección FFPE puede dividirse en múltiples ensayos). Además, el aumento de la sensibilidad del ensayo permite una detección génica de una única copia en tan sólo 1000 células.

Finalmente, los métodos desvelados son susceptibles de multiplexación, por ejemplo, usando una micromatriz. Las realizaciones de micromatrices particulares se analizan en la Sección V, a continuación. Esto permite la exploración o detección de múltiples fusiones génicas simultáneamente (tal como la detección de la misma fusión en muchas

muestras, o la detección de múltiples fusiones génicas diferentes en una única muestra), por ejemplo al menos 10, al menos 25, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, o más fusiones génicas en un único ensayo. La realización de micromatriz de multiplexación da como resultado la captura de sondas de fusión en ubicaciones espacialmente distintas, por lo tanto, las sondas de fusión pueden detectarse usando la misma etiqueta detectable y pueden distinguirse en base a su posición en la micromatriz.

## II. Términos

10 A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew y col. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y George P. Rédei, *Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, and Proteomics*, 2ª Edición, 2003 (ISBN: 0-471-26821-6).

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la técnica para poner en práctica la presente divulgación. Las formas singulares "un", "una", y "el/la" se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "que comprende una célula" incluye células individuales o múltiples y se considera equivalente a la frase "que comprende al menos una célula". El término "o" se refiere a un único elemento de elementos alternativos indicados o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Como se usa en el presente documento, "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, "que comprende A o B", significa "que incluye A, B o A y B", sin excluir elementos adicionales.

Los métodos y materiales adecuados para poner en práctica y ensayar la tecnología desvelada se describen a continuación; no obstante, pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

30 Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

**Complementariedad:** Capacidad para formar pares de bases entre ácidos nucleicos. Los oligonucleótidos y sus análogos hibridan por enlace de hidrógeno, que incluye unión de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases complementarias. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico consisten en bases nitrogenadas que son pirimidinas (citosina (C), uracilo (U) y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenadas forman enlaces hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y el enlace de la pirimidina con la purina se denomina como "emparejamiento de bases". Más específicamente, A será un enlace hidrógeno a T o U, y G se unirá a C. "Complementariedad" se refiere al emparejamiento de bases que se produce entre dos ácidos nucleicos distintos o dos regiones distintas del mismo ácido nucleico.

"Específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son expresiones que indican un grado suficiente de complementariedad de tal forma que se produce una unión estable y específica entre la sonda (o su análogo) y la diana de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN). La sonda o el análogo puede, pero no necesariamente, tener una complementariedad del 100 % con respecto a su secuencia diana para ser hibridable específicamente. Una sonda o análogo es hibridable específicamente cuando hay suficiente grado de complementariedad para evitar la unión no específica de la sonda o el análogo a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, por ejemplo en los métodos desvelados en el presente documento. Dicha unión se denomina hibridación específica.

**Contacto:** Colocación en asociación física directa; incluye tanto forma sólida como líquida. Por ejemplo, el contacto puede producirse *in vitro* con una sonda de ácido nucleico y una sonda biológica en solución o sobre una superficie.

55 **Detectar:** Determinar si un agente (tal como una señal, nucleótido particular, aminoácido, molécula de ácido nucleico y/u organismo) está presente o ausente, por ejemplo, un ácido nucleico de fusión génica. En algunos ejemplos, esto puede incluir adicionalmente cuantificación. Por ejemplo, el uso de los métodos desvelados y las sondas en ejemplos particulares permite la detección de una fusión génica en una muestra.

**Etiqueta detectable:** Un compuesto o composición que se conjuga directa o indirectamente en otra molécula (tal como una molécula de ácido nucleico, por ejemplo una sonda de fusión, una sonda flanqueante, o una sonda de detección) para facilitar la detección de esta molécula. Los ejemplos no limitantes específicos de etiquetas incluyen restos fluorescentes o fluorogénicos, restos cromogénicos, haptenos, etiquetas de afinidad e isótopos radioactivos.

- 5 La etiqueta puede detectarse directamente (por ejemplo, ópticamente detectable) o indirectamente (por ejemplo, a través de interacción con una o más moléculas adicionales que, a su vez, son detectables). Las etiquetas ejemplares en el contexto de las sondas desveladas en el presente documento se describen a continuación. Los métodos para etiquetar ácidos nucleicos, y orientación en la elección de etiquetas útiles para diversos fines, se analizan, por ejemplo, en Sambrook y Russell, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) y Ausubel y col., en *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987, incluyendo actualizaciones).

- Fusión génica:** Un gen híbrido formado a partir de dos o más genes separados previamente. Las fusiones génicas pueden producirse como resultado de una transposición cromosómica, tal como una translocación, deleción intersticial o inversión cromosómica. El "punto de fusión" o "interrupción" de una fusión génica es el punto de transición entre la secuencia del primer gen en la fusión a la secuencia del segundo gen en la fusión.

- Las expresiones "fusión génica" y "gen de fusión" se usan de forma intercambiable e indican los productos de una transposición cromosómica, incluyendo, pero sin limitación, ADN (tal como ADN o ADNc genómico), ARN, (incluyendo ARNm), o una proteína.

- Hibridación:** La capacidad de ADN monocatenario complementario, ARN o híbridos de ADN/ARN para formar una molécula dúplex (también denominada un complejo de hibridación). Pueden usarse técnicas de hibridación de ácidos nucleicos para formar complejos de hibridación entre una sonda de ácido nucleico, y el gen está diseñado con respecto a una diana. En ejemplos no limitantes particulares, las sondas de ácidos nucleicos se optimizan para dirigir los genes individuales o fusiones génicas que se enumeran en la Tabla 1.

- Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de astringencia variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación y la composición y la longitud de las secuencias de ácido nucleico de hibridación. Generalmente, la temperatura de la hibridación y la resistencia iónica (tal como la concentración de Na<sup>+</sup>) del tampón de hibridación determinarán la astringencia de la hibridación. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación para conseguir grados particulares de astringencia se analizan en Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11).

- Nucleasa:** Una enzima que escinde un enlace fosfodiéster. Una endonucleasa es una enzima que escinde un enlace fosfodiéster interno en una cadena nucleotídica (a diferencia de las exonucleasas, que escinden un enlace fosfodiéster en el extremo de una cadena nucleotídica). Algunas nucleasas tienen tanto actividad endonucleasa como exonucleasa. Las endonucleasas incluyen endonucleasas de restricción u otras endonucleasas específicas de sitio (que escinden ADN en sitios específicos de secuencia), DNasa I, Bal 31 nucleasa, S1 nucleasa, nucleasa de soja verde, Ribonucleasa A, Ribonucleasa T1, RNasa I, RNasa PhyM, RNasa U2, RNasa CLB, nucleasa microcócica, y endonucleasas apurínicas/apirimidínicas. Las exonucleasas incluyen exonucleasa III y exonucleasa VII. En ejemplos particulares, una nucleasa es específica para los ácidos nucleicos monocatenarios, tal como S1 nucleasa, nucleasa de soja verde, Ribonucleasa A o Ribonucleasa T1.

- Ácido nucleico:** Un polímero desoxirribonucleótido o de ribonucleótido en forma monocatenaria o bicatenaria, y a menos que se limite de otro modo, que incluye análogos de nucleótidos naturales que hibridan en ácidos nucleicos de manera similar a los nucleótidos de origen natural. El término "nucleótido" incluye, pero sin limitación, un monómero que incluye una base (tal como una pirimidina, purina o análogos sintéticos de las mismas) unida a un azúcar (tal como ribosa, desoxirribosa o análogos sintéticos de las mismas), o una base unida a un aminoácido, como un ácido nucleico peptídico (PNA). Un "nucleótido" también incluye un ácido nucleico bloqueado (LNA). Un nucleótido es un monómero en un polinucleótido. Una secuencia nucleotídica se refiere a la secuencia de bases en un polinucleótido.

- Sonda:** Una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, molécula de ácido nucleico diana de ADN genómico, ADNc, ARN o ARNm) y, después de la hibridación en la diana, es capaz de detectarse directa o indirectamente. Por lo tanto, las sondas permiten la detección, y en algunos ejemplos cuantificación, de una molécula de ácido nucleico diana, tal como una molécula de ácido nucleico de fusión génica o una molécula de ácido nucleico que está implicado en un evento de fusión génica. En algunos ejemplos, una sonda incluye una etiqueta detectable. En algunos ejemplos, las sondas pueden incluir uno o más

ácidos nucleicos peptídicos y/o uno o más ácidos nucleicos bloqueados.

Una sonda es capaz de hibridar con secuencias que incluyen una o más variantes de una secuencia "de tipo silvestre" o una porción de una secuencia (por ejemplo en una fusión génica). Por ejemplo, una sonda puede incluir una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad (tal como un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de identidad) con una secuencia génica de "tipo silvestre".

En algunos ejemplos, una "**sonda de fusión**" es una sonda que incluye secuencias de ácidos nucleicos capaces de hibridar con secuencias de dos genes separados cuando dos genes son parte de una fusión génica. Una sonda de fusión incluye una porción 5' capaz de hibridar con un primer ácido nucleico (por ejemplo, de un primer gen) y una porción 3' capaz de hibridar con un segundo ácido nucleico (por ejemplo, de un segundo gen), donde la sonda de fusión abarca el punto donde el primer gen y el segundo gen se condensan (el "punto de fusión").

En otros ejemplos, una "**sonda flanqueante**" es una sonda que incluye secuencias de ácidos nucleicos capaces de hibridar con un único ácido nucleico y se sitúa 5' o 3' con respecto a un punto de fusión. Una sonda 5' flanqueante incluye una sonda capaz de hibridar con una porción de un ácido nucleico 5' en un punto de fusión y una sonda 3' flanqueante incluye una sonda capaz de hibridar con una porción de un ácido nucleico 3' con respecto a un punto de fusión.

**20 Muestra:** Un espécimen biológico que contiene ADN (por ejemplo, ADN genómico o ADNc), ARN (incluyendo ARNm), proteína, o combinaciones de los mismos, obtenido de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, células, lisados celulares, preparaciones cromosómicas, sangre periférica, orina, saliva, biopsia tisular (tal como una biopsia tumoral o biopsia de nódulos linfáticos), espécimen quirúrgico, médula ósea, muestras de amniocentesis y material de autopsia. En un ejemplo, una muestra incluye ARN, tal como ARNm. En ejemplos particulares, las muestras se usan directamente (por ejemplo, frescas o congeladas), o pueden manipularse antes del uso, por ejemplo, por fijación (por ejemplo, usando formalina) y/o embebidas en cera (tal como muestras tisulares embebidas en parafina fijadas en formalina (FFPE)).

**Identidad/similitud de secuencia:** La identidad/similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico, o dos o más secuencias aminoacídicas, se expresa en cuanto a la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia puede medirse en cuanto al porcentaje de identidad; cuanto mayor es el porcentaje, más idénticas son las secuencias. Los homólogos u ortólogos de secuencias de ácido nucleico o aminoacídicas poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia al alinearse usando métodos convencionales.

Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para fines de comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73: 237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151-3, 1989; Corpet y col., Nuc. Acids Res. 16: 10881-90, 1988; Huang y col. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; y Pearson y col., Meth. Mol. Bio. 24: 307-31, 1994. Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990, presentan una consideración detallada de métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineación local básica del NCBI (BLAST) (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894) y en Internet, para su uso junto con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Se usa blastn para comparar secuencias de ácido nucleico, mientras que se usa blastp para comparar secuencias aminoacídicas. Puede encontrarse información adicional en el sitio web del NCBI.

Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones donde se presenta un nucleótido o residuo aminoacídico idéntico en ambas secuencias. Se determina el porcentaje de identidad de secuencia dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia expuesta en la secuencia identificada, o entre una longitud articulada (tal como 100 nucleótidos o residuos aminoacídicos consecutivos de una secuencia expuesta en una secuencia identificada), seguido de la multiplicación del valor resultante por 100.

Una indicación de que dos moléculas de ácido nucleico están estrechamente relacionadas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones de astringencia. Las condiciones de astringencia dependen de la secuencia y son diferentes en condiciones ambientales diferentes.

Las sondas de ácido nucleico desveladas en el presente documento no se limitan a las secuencias exactas mostradas, ya que los expertos en la técnica apreciarán que pueden hacerse cambios a una secuencia, y no afectan sustancialmente a la capacidad de una sonda para funcionar como se desee. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 %, tal como el 100 % de identidad de secuencia con respecto a las sondas desveladas. Un experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan únicamente como orientativos; es posible que puedan usarse sondas que estén fuera de estos intervalos.

10 **Sujeto:** Cualquier organismo que tiene un genoma, incluyendo virus, organismos unicelulares (tales como bacterias o levadura), u organismos invertebrados o vertebrados multicelulares (tales como mamíferos humanos y no humanos). En un ejemplo, se sabe o se sospecha que un sujeto tiene un tumor asociado a una fusión génica.

### 15 III. Métodos para detectar fusiones génicas usando una sonda de fusión

En algunas realizaciones, los métodos utilizan una sonda de fusión que abarca el punto de fusión entre dos ácidos nucleicos o genes. En algunos ejemplos, una muestra se pone en contacto con la sonda de fusión y se trata con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios. Únicamente la sonda que se hibrida y forma de esta manera un dúplex con el gen diana (por ejemplo, un ácido nucleico que tiene la fusión génica diana) sobrevivirá al tratamiento con nucleasa y se detectará posteriormente. La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra genes de tipo de silvestre y de fusión ejemplares y una sonda de fusión ejemplar. Cuando la fusión génica está presente en una muestra, la sonda de fusión hibrida y se detecta tras un tratamiento de nucleasa (línea continua). Cuando la fusión génica no está presente en una muestra, la sonda de fusión únicamente hibrida parcialmente en los Genes 1 y 2 y cualquier porción de la sonda de fusión que no está sometida a duplexación con una diana se hidroliza por el tratamiento con nucleasa. En algunos ejemplos, la porción de la sonda de fusión que se somete a duplexación en el Gen 1 o el Gen 2 sobrevive al tratamiento con nucleasa, pero no se detecta (por ejemplo, ya que la porción detectable de la sonda está hidrolizada).

Los métodos pueden incluir poner en contacto una muestra (tal como una muestra que incluye ácidos nucleicos, por ejemplo una muestra de un sujeto) con una sonda de fusión que tiene una porción 5' complementaria a un primer ácido nucleico y una porción 3' complementaria a un segundo ácido nucleico donde la sonda de fusión abarca un punto de fusión del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico. La sonda se incuba con la muestra en condiciones suficientes para que la sonda de fusión hibride específicamente en una fusión génica. La muestra se pone en contacto con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, S1 nucleasa), y se detecta la presencia de la sonda de fusión. El gen de fusión se identifica como presente en la muestra cuando se detecta la sonda de fusión. En ejemplos particulares, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico son ARNm (por ejemplo, el ácido nucleico de fusión génica detectado es ARNm).

Los métodos desvelados son susceptibles a multiplexación. Esto permite la exploración o detección de múltiples fusiones génicas simultáneamente (tal como la detección de la misma fusión en muchas muestras, o la detección de múltiples fusiones génicas diferentes en una única muestra), por ejemplo al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, o más fusiones génicas en un único ensayo. En algunos ejemplos, pueden incluirse sondas de fusión específicas para dos o más fusiones génicas distintas (por ejemplo, fusiones génicas que implican una combinación diferente de genes o fusiones génicas que implican los mismos genes, pero diferentes puntos de fusión) en el ensayo. En otros ejemplos, se usa la misma sonda para múltiples muestras y la identidad de la muestra se basa en la misma ubicación (por ejemplo, la posición en una micromatriz). Las sondas de fusión pueden marcarse (directa o indirectamente) con diferentes etiquetas detectables con el fin de identificar las fusiones génicas. Como alternativa, las sondas de fusión pueden marcarse (directa o indirectamente) con la misma etiqueta y su identidad puede determinarse basándose en su posición espacial (por ejemplo en una micromatriz).

Un experto en la técnica puede identificar condiciones suficientes para que una sonda de fusión hibride específicamente en una fusión génica, tal como una fusión génica presente en una muestra procedente de un sujeto. Por ejemplo, un experto en la técnica puede determinar experimentalmente las características (tal como la longitud, composición de la base y grado de complementariedad) que permitirán que un ácido nucleico (por ejemplo, una sonda de fusión) hibride en otro ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico de fusión génica) en condiciones de astringencia seleccionada, minimizando al mismo tiempo la hibridación no específica en otras sustancias o moléculas. Típicamente, la secuencia de ácido nucleico de una sonda de fusión tendrá una complementariedad suficiente con respecto a la fusión génica correspondiente para permitirle hibridar en condiciones de hibridación

5 astringente seleccionadas, por ejemplo, hibridación a aproximadamente 37 °C o más (tal como aproximadamente 37 °C, 42 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, o más). Entre los parámetros de reacción de hibridación que pueden variarse se encuentran la concentración de sal, tampón, pH, temperatura, tiempo de incubación, cantidad y tipo de desnaturalizante, tal como formamida. Por ejemplo, puede añadirse ácido nucleico (por ejemplo, una sonda de fusión) a una muestra a una concentración que varía de aproximadamente 10 pM a aproximadamente 10 nM (tal como de aproximadamente 30 pM a 5 nM, aproximadamente de 100 pM a aproximadamente 1 nM), en un tampón tal como, por ejemplo, 6X SSPE-T (NaCl 0,9 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mM, EDTA 6 mM, y Triton X-100 al 0,05 %) o tampón de lisis (descrito a continuación). En un ejemplo, la sonda se añade a la muestra a una concentración final de aproximadamente 30 pM. En otro ejemplo, la sonda se añade a la muestra a una concentración final de aproximadamente 167 pM. En un ejemplo adicional, la sonda se añade a la muestra a una concentración final de aproximadamente 1 nM.

15 Los ácidos nucleicos en la muestra se desnaturalizan (por ejemplo de aproximadamente 95 °C a aproximadamente 105 °C durante aproximadamente 5-15 minutos) y se hibridan en una fusión génica entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 24 horas (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 hora a 20 horas, o de aproximadamente 6 horas a 16 horas) a una temperatura que varía de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 70 °C (por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 65 °C, de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C). En algunos ejemplos, la sonda de fusión se incuba con la muestra a una temperatura de al menos aproximadamente 40 °C, al menos aproximadamente 45 °C, al menos aproximadamente 50 °C, al menos aproximadamente 55 °C, al menos aproximadamente 60 °C, al menos aproximadamente 65 °C, o al menos aproximadamente 70 °C. En un ejemplo, la sonda de fusión se incuba con la muestra a aproximadamente 60 °C. En otro ejemplo, la sonda de fusión se incuba con la muestra a aproximadamente 50 °C. Estas temperaturas de hibridación son ejemplares, y un experto en la técnica puede seleccionar una temperatura de hibridación apropiada dependiendo de factores tales como la longitud y la composición nucleotídica de la sonda de fusión.

30 En algunas realizaciones, los métodos no incluyen la purificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, la purificación de ácido nucleico no se realiza antes de poner en contacto la muestra con la sonda de fusión y/o la purificación de ácido nucleico no se realiza tras poner en contacto la muestra con la sonda de fusión). En algunos ejemplos, no se requiere ningún procesamiento previo de la muestra excepto para la lisis celular. En algunos ejemplos, la lisis celular y la puesta en contacto de la muestra con la sonda de fusión se producen secuencialmente. En otros ejemplos, la lisis celular y la puesta en contacto de la muestra con la sonda de fusión se producen simultáneamente, en algunos ejemplos no limitantes sin ninguna etapa intermedia.

35 Tras la hibridación de la sonda de fusión y los ácidos nucleicos en la muestra, la muestra se somete a un procedimiento de protección de nucleasa. Las sondas de fusión que han hibridado en una fusión génica no se hidrolizan por la nucleasa y pueden detectarse posteriormente.

40 El tratamiento con una o más nucleasas destruirá las moléculas de ácido nucleico distintas de las sondas de fusión que han hibridado en un ácido nucleico de fusión génica presente en la muestra. Por ejemplo, si la muestra incluye un extracto o lisado celular, los ácidos nucleicos no deseados, tales como ADN genómico, ADNc, ARNt, ARNr y ARNm distintos de la fusión génica de interés y porciones de la fusión génica de interés que no se hibridan en secuencias de sonda complementarias, pueden destruirse sustancialmente en esta etapa. Puede usarse cualquiera de una diversidad de nucleasas, incluyendo, RNAsa pancreática, nucleasa de soja verde, S1 nucleasa, RNAsa A, 45 Ribonucleasa T1, Exonucleasa III, Exonucleasa VII, RNAsa CLB, RNAsa PhyM, RNAsa U2, o similares, dependiendo de la naturaleza de los complejos hibridados y de los ácidos nucleicos no deseados presentes en la muestra. Un experto en la técnica puede seleccionar una nucleasa apropiada, por ejemplo en base a si se detecta ADN o ARN. En un ejemplo particular, la nucleasa es específica para ácidos nucleicos monocatenarios, por ejemplo S1 nucleasa. Una ventaja de usar una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios en algunas 50 realizaciones del método desveladas en el presente documento es eliminar dichas moléculas monocatenarias ("cohesivas") de las etapas de reacción posteriores donde pueden conducir a antecedentes innecesarios o reactividad cruzada. La S1 nucleasa está disponible en el mercado, por ejemplo, en Promega, Madison, WI (cat. N° M5761); Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA (cat. N° 18001-016); Fermentas, Glen Burnie, MD (cat. N° EN0321), y otros. Las condiciones de reacción para estas enzimas se conocen bien en la técnica y pueden 55 optimizarse empíricamente.

En algunos ejemplos, se añade S1 nucleasa diluida en un tampón apropiado (tal como acetato sódico 0,25 M, pH 4,5, NaCl 1,4 M, ZnSO<sub>4</sub> 0,0225 M, KATHON al 0,05 %) a la mezcla de sonda hibridada y se incuba a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 30-120 minutos (por ejemplo, aproximadamente 60-90 minutos)

para digerir el ácido nucleico sin hibridar y la sonda de fusión.

Las muestras se tratan opcionalmente para eliminar de otro modo el material sin hibridar y/o para inactivar o eliminar las enzimas residuales (por ejemplo, por extracción de fenol, precipitación, filtración de columna, etc.). En algunos ejemplos, las muestras se tratan opcionalmente para disociar el ácido nucleico diana (tal como una fusión génica diana o un gen diana de longitud completa o de tipo silvestre) de la sonda (por ejemplo, usando hidrólisis de base y calor). Después de la hibridación, la diana hibridada puede degradarse, por ejemplo, por nucleasas o por tratamientos químicos, dando la sonda de fusión en proporción directa a la cantidad de sonda que se ha hibridado en diana. Como alternativa, la muestra puede tratarse para dar la porción hibridada (monocatenaria) de la diana, o el dúplex formado por la diana hibridada y la sonda, que se analizará adicionalmente.

Después, se detecta la presencia de la sonda de fusión. Puede usarse cualquier método adecuado para detectar la sonda de fusión tras la hibridación y el tratamiento con nucleasa. En algunos ejemplos, la sonda de fusión incluye una etiqueta detectable y la detección de la presencia de la sonda de fusión incluye detectar indirectamente la etiqueta detectable. En otros ejemplos, la sonda de fusión se detecta indirectamente, por ejemplo por hibridación con un ácido nucleico marcado. En algunos ejemplos, la sonda de fusión se detecta usando una micromatriz, por ejemplo, una micromatriz que incluye un ácido nucleico marcado de forma detectable (por ejemplo marcado con biotina o peroxidasa de rábano picante) que es complementario a la sonda de fusión (véase, por ejemplo, la figura 5A). En otros ejemplos, la sonda de fusión se detecta usando una micromatriz que incluye un enlazador de programación complementario a una porción de la sonda de fusión y que se incuba posteriormente con un enlazador de detección, cuya porción es complementaria a una porción separada de la sonda de fusión. El enlazador de detección puede marcarse de forma detectable, o una porción separada del enlazador de detección es complementaria a un ácido nucleico adicional que incluye una etiqueta detectable (tal como biotina o peroxidasa de rábano picante). Véase, por ejemplo, la figura 5B. Los métodos de detección de las sondas se proporcionan en más detalle en la Sección V a continuación.

En algunas realizaciones, las sondas de fusión de uso en los métodos desvelados tienen aproximadamente 10-200 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las sondas de fusión de uso en los métodos desvelados son de no más de 500, no más de 400, no más de 300, o no más de 200 nucleótidos de longitud, tal como de 20 a 100 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, la sonda de fusión incluye aproximadamente números iguales de nucleótidos de cada uno de los primeros y segundos ácidos nucleicos. Las sondas de fusión se analizan en más detalle en la Sección VIB, a continuación.

En otros ejemplos, la sonda de fusión incluye un pequeño número de nucleótidos complementarios a uno de los dos ácidos nucleicos (un "solapamiento corto") y un número mayor de nucleótidos del otro ácido nucleico. En ejemplos particulares, la porción de "solapamiento corto" de la sonda de fusión también incluye una etiqueta detectable (tal como biotina, fluoresceína u otras moléculas fluorescentes, digoxigenina o dinitrofenol). La sonda de fusión puede marcarse terminalmente (por ejemplo, la etiqueta detectable se incluye en el extremo 5' o 3' de la sonda) o la etiqueta detectable puede incluirse en una o más posiciones internas de la sonda de fusión. La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra genes de tipo de silvestre y de fusión ejemplares y una sonda de fusión marcada directa ejemplar que tiene un solapamiento de cuatro nucleótidos con la porción 5' del gen de fusión. La etiqueta (biotina en este ejemplo) se sitúa en o cerca del extremo 5' de la sonda (por ejemplo en el extremo 5' o en la porción de "solapamiento corto" de la sonda). Cuando la fusión génica está presente en una muestra, la sonda de fusión hibrida y la etiqueta se detecta tras un tratamiento de nucleasa (panel superior). La sonda de fusión no hibrida en el Gen 1 y se hidroliza por el tratamiento de nucleasa (panel central). La sonda de fusión hibrida en el Gen 2, sin embargo, el extremo 5' que incluye la etiqueta no hibrida y se escinde por el tratamiento de nucleasa (panel inferior). Por lo tanto, la sonda etiquetada se detecta únicamente en muestras en las que está presente la fusión génica.

En algunos ejemplos, la porción 5' de la sonda puede tener aproximadamente 1-10 nucleótidos de longitud y la porción 3' de la sonda puede tener aproximadamente 10-200 nucleótidos o más de longitud, o la porción 5' de la sonda puede tener aproximadamente 10-200 nucleótidos o más de longitud y la porción 3' de la sonda puede tener aproximadamente 1-10 nucleótidos de longitud. Las sondas de fusión de solapamiento corto se analizan en más detalle en la Sección VIB, a continuación.

#### 55 IV. Métodos para detectar fusiones génicas usando la relación de las sondas flanqueantes

En otras realizaciones, los métodos para detectar la presencia de un gen de fusión en una muestra procedente de un sujeto utilizan dos o más sondas que flanquean el punto de fusión entre dos ácidos nucleicos o genes. La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra genes de tipo silvestre y de fusión ejemplares y sondas flanqueantes

ejemplares y (una sonda de fusión ejemplar opcional). El gen de fusión incluye una porción 5' del Gen 1 y una porción 3' del Gen 2 (panel central). La sonda 5' 1 y la sonda 3' 1 flanqueantes hibridan en el Gen 1 de longitud completa (por ejemplo, de tipo silvestre) y se detectan tras un tratamiento de nucleasa (panel superior). La sonda 5' 1 flanqueante también hibrida en el gen de fusión y se detecta tras un tratamiento de nucleasa (panel central); sin embargo, la sonda 3' 1 flanqueante no hibrida en el gen de fusión y se hidroliza por tratamiento de nucleasa (panel central). La sonda 5' 2 y la sonda 3' 2 flanqueantes pueden incluirse opcionalmente en el ensayo; estas hibridan en el Gen 2 de longitud completa (por ejemplo, de tipo silvestre) y se detectan tras un tratamiento de nucleasa (panel inferior). La sonda 3' 2 también hibrida en el gen de fusión y se detecta tras un tratamiento de nucleasa; sin embargo, la sonda 5' 2 flanqueante no hibrida en el gen de fusión y se hidroliza por el tratamiento de nucleasa (panel central). Una sonda de fusión que abarca el punto de fusión puede incluirse también opcionalmente en el ensayo. Cuando la fusión génica está presente en una muestra, la sonda de fusión hibrida y se detecta tras un tratamiento de nucleasa (línea continua). Cuando la fusión génica no está presente en una muestra, la sonda de fusión únicamente hibrida parcialmente en los Genes 1 y 2 y se hidroliza por el tratamiento de nucleasa (líneas discontinuas). En algunos ejemplos, la porción de la sonda de fusión que se somete a duplexación en el Gen 1 o el Gen 2 se mantiene, pero no se detecta (por ejemplo, porque la porción detectable de la sonda está hidrolizada).

Los métodos pueden incluir poner en contacto una muestra procedente de un sujeto con una primera sonda complementaria con un primer ácido nucleico 5' con respecto a un punto de fusión entre el primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico en condiciones suficientes para que la primera sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico, poner en contacto la muestra con una segunda sonda complementaria con el primer ácido nucleico 3' con respecto al punto de fusión entre el primer y segundo ácidos nucleicos en condiciones suficientes para que la segunda sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico, poner en contacto la muestra con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, S1 nucleasa), detectar la presencia de la primera sonda y la segunda sonda, y determinar una relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda. El gen de fusión se identifica como presente en la muestra cuando la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es diferente de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente diferente de uno). En algunos ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 3' del primer ácido nucleico si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es mayor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente mayor de uno). En otros ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 5' del primer ácido nucleico si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es menor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente menos de uno). En ejemplos particulares, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico son ARNm (por ejemplo, el ácido nucleico de fusión génica detectado es ARNm). En otros ejemplos, los métodos incluyen determinar una relación de la segunda sonda con respecto a la primera sonda. En algunos ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 5' del primer ácido nucleico si la relación de la segunda sonda con respecto a la primera sonda es mayor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente mayor de uno). En otros ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 3' del primer ácido nucleico si la relación de la segunda sonda con respecto a la primera sonda es menor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente menos de uno). En algunos ejemplos, la primera sonda y la segunda sonda tienen cada una aproximadamente 10-200 ácidos nucleicos de longitud. En algunos ejemplos, la muestra se pone en contacto con dos o más sondas que son complementarias al primer ácido nucleico 5' con respecto al punto de fusión y/o se pone en contacto con dos o más sondas que son complementarias al primer ácido nucleico 3' con respecto al punto de fusión. En otros ejemplos, la muestra se pone en contacto con una o más sondas que son complementarias al primer ácido nucleico en la fusión génica (por ejemplo al menos una sonda 5' flanqueante y al menos una sonda 3' flanqueante) y una o más sondas que son complementarias al segundo ácido nucleico en la fusión génica (por ejemplo, al menos una sonda 5' flanqueante y al menos una sonda 3' flanqueante). Aún en ejemplos adicionales, la muestra se pone en contacto con una o más sondas 5' y 3' flanqueantes complementarias a un primer o segundo ácido nucleico en una fusión génica y una o más sondas 5' y 3' flanqueantes complementarias a un primer o segundo ácido nucleico en una fusión génica diferente. Las sondas pueden marcarse con diferentes etiquetas detectables o pueden marcarse con la misma etiqueta detectable y distinguirse en base a información espacial (por ejemplo, usando una micromatriz).

Los métodos desvelados son susceptibles a multiplexación. Esto permite la exploración o detección de múltiples fusiones génicas simultáneamente (tal como la detección de la misma fusión en muchas muestras, o la detección de múltiples fusiones génicas diferentes en una única muestra), por ejemplo al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, o más fusiones génicas en un único ensayo. En algunos ejemplos, pueden incluirse las sondas 5' y 3' flanqueantes específicas para dos o más fusiones génicas distintas (por ejemplo, fusiones génicas que implican una combinación diferente de genes o fusiones génicas que implican los mismos genes, pero diferentes puntos de fusión) en el ensayo. En otros ejemplos, se usa el mismo conjunto de sondas flanqueantes para múltiples muestras y la identidad de la muestra se basa en la misma ubicación (por ejemplo, la posición en una micromatriz).

Las sondas flanqueantes pueden marcarse (directa o indirectamente) con diferentes etiquetas detectables con el fin de identificar las fusiones génicas. Como alternativa, las sondas flanqueantes pueden marcarse (directa o indirectamente) con la misma etiqueta y su identidad puede determinarse basándose en su posición espacial (por ejemplo en una micromatriz).

5

Un experto en la técnica puede identificar condiciones suficientes para una sonda (tal como una sonda 5' flanqueante y una sonda 3' flanqueante) para hibridar específicamente en un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico de longitud completa y/o de fusión génica presente en una muestra de un sujeto. Por ejemplo, un experto en la técnica puede determinar experimentalmente las características (tal como la longitud, composición de la base y grado de complementariedad) que permitirán que un ácido nucleico (por ejemplo, una sonda flanqueante) hibride en otro ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico de longitud completa o de fusión génica) en condiciones de astringencia seleccionada, minimizando al mismo tiempo la hibridación no específica en otras sustancias o moléculas. Típicamente, la secuencia de ácido nucleico de una sonda flanqueante tendrá suficiente complementariedad con el gen de longitud completa correspondiente y la fusión génica para permitirle hibridar en condiciones de hibridación astringente seleccionadas, por ejemplo, hibridación a aproximadamente 37 °C o más (tal como aproximadamente 37 °C, 42 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, o más). Entre los parámetros de reacción de hibridación que pueden variarse se encuentran la concentración de sal, tampón, pH, temperatura, tiempo de incubación, cantidad y tipo de desnaturizante, tal como formamida. Por ejemplo, puede añadirse ácido nucleico (por ejemplo, una sonda flanqueante) a una muestra a una concentración que varía de aproximadamente 10 pM a aproximadamente 10 nM (tal como de aproximadamente 30 pM a 5 nM, de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 1 nM), en un tampón tal como, por ejemplo, 6X SSPE-T (NaCl 0,9 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mM, EDTA 6 mM, y Triton X-100 al 0,05 %) o tampón de lisis (descrito a continuación). En un ejemplo, la sonda se añade a la muestra a una concentración final de aproximadamente 30 pM. En otro ejemplo, la sonda se añade a la muestra a una concentración final de aproximadamente 167 pM. En un ejemplo adicional, la sonda se añade a la muestra a una concentración final de aproximadamente 1 nM.

Los ácidos nucleicos en la muestra se desnaturalizan (por ejemplo de aproximadamente 95 °C a aproximadamente 105 °C durante aproximadamente 5-15 minutos) y se hibridan en una fusión génica entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 24 horas (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 hora a 20 horas, o de aproximadamente 6 horas a 16 horas) a una temperatura que varía de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 70 °C (por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 65 °C, de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C). En algunos ejemplos, las sondas flanqueantes se incuban con la muestra a una temperatura de al menos aproximadamente 40 °C, al menos aproximadamente 45 °C, al menos aproximadamente 50 °C, al menos aproximadamente 55 °C, al menos aproximadamente 60 °C, al menos aproximadamente 65 °C, o al menos aproximadamente 70 °C. En un ejemplo, las sondas flanqueantes se incuban con la muestra a aproximadamente 60 °C. En otro ejemplo, las sondas flanqueantes se incuban con la muestra a aproximadamente 50 °C. Estas temperaturas de hibridación son ejemplares, y un experto en la técnica puede seleccionar una temperatura de hibridación apropiada dependiendo de factores tales como la longitud y la composición nucleotídica de las sondas flanqueantes.

40

En algunas realizaciones, los métodos no incluyen la purificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, la purificación de ácido nucleico no se realiza antes de poner en contacto la muestra con las sondas flanqueantes y/o la purificación del ácido nucleico no se realiza tras poner en contacto la muestra con las sondas flanqueantes). En algunos ejemplos, no se requiere ningún procesamiento previo de la muestra excepto para la lisis celular. En algunos ejemplos, la lisis celular y la puesta en contacto de la muestra con las sondas flanqueantes se producen secuencialmente. En otros ejemplos, la lisis celular y la puesta en contacto de la muestra con las sondas flanqueantes se producen simultáneamente, en algunos ejemplos no limitantes sin ninguna etapa intermedia.

Tras la hibridación de la una o más sondas flanqueantes y ácidos nucleicos en la muestra, la muestra se somete a un procedimiento de protección de nucleasa. Las sondas flanqueantes que han hibridado en un ácido nucleico de longitud completa o una fusión génica no se hidrolizan por la nucleasa y pueden detectarse posteriormente.

50

El tratamiento con una o más nucleasas destruirá las moléculas de ácido nucleico distintas de las sondas flanqueantes que han hibridado en un ácido nucleico de longitud completa o de fusión génica presente en la muestra. Por ejemplo, si la muestra incluye un extracto o lisado celular, los ácidos nucleicos no deseados, tales como ADN genómico, ADNc, ARNt, ARNr y ARNm distintos del gen o la fusión génica de interés y porciones de la fusión génica de interés que no se hibridan en secuencias de sonda complementarias, pueden destruirse sustancialmente en esta etapa. Puede usarse cualquiera de una diversidad de nucleasas, incluyendo, RNAsa pancreática, nucleasa de soja verde, S1 nucleasa, RNAsa A, Ribonucleasa T1, Exonucleasa III, Exonucleasa VII,

55

RNAse CLB, RNAse PhyM, RNAse U2, o similares, dependiendo de la naturaleza de los complejos hibridados y de los ácidos nucleicos no deseados presentes en la muestra. En un ejemplo particular, la nucleasa es específica para ácidos nucleicos monocatenarios, por ejemplo S1 nucleasa. Una ventaja de usar una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios en algunas realizaciones del método desveladas aquí es eliminar dichas moléculas monocatenarias ("cohesivas") de las etapas de reacción posteriores donde pueden conducir a antecedenentes innecesarios o reactividad cruzada. La S1 nucleasa está disponible en el mercado, por ejemplo, en Promega, Madison, WI (cat. N° M5761); Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA (cat. N° 18001-016); Fermentas, Glen Burnie, MD (cat. N° EN0321), y otros. Las condiciones de reacción para estas enzimas se conocen bien en la técnica y pueden optimizarse empíricamente.

10

En algunos ejemplos, se añade S1 nucleasa diluida en un tampón apropiado (tal como un tampón que incluye acetato sódico, cloruro sódico, sulfato de cinc, y detergente, por ejemplo, acetato sódico 0,25 M, pH 4,5, NaCl 1,4 M, ZnSO<sub>4</sub> 0,0225 M, KATHON al 0,05 %) a la mezcla de sonda hibridada y se incuba a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 30-120 minutos (por ejemplo, aproximadamente 60-90 minutos) para digerir sondas de ácido nucleico sin hibridar y no unidas.

15

Las muestras se tratan opcionalmente para eliminar de otro modo material sin hibridar y/o para inactivar o eliminar enzimas residuales (por ejemplo, por extracción de fenol, precipitación, filtración de columna, etc.). En algunos ejemplos, las muestras se tratan opcionalmente para disociar el ácido nucleico diana (tal como una fusión génica diana o un gen diana de longitud completa o de tipo silvestre) de la sonda (por ejemplo, usando hidrólisis de base y calor). Después de la hibridación, la diana hibridada puede degradarse, por ejemplo, por nucleasas o por tratamientos químicos, dando las sondas flanqueantes en proporción directa a la cantidad de sonda que se ha hibridado en diana. Como alternativa, la muestra puede tratarse para dar la porción hibridada (monocatenaria) de la diana, o el dúplex formado por la diana hibridada y la sonda, que se analizará adicionalmente.

20

Después, la presencia de las sondas flanqueantes en la muestra se detecta y se determina una relación de la primera sonda (sonda 5' flanqueante) con respecto a la segunda sonda (sonda 3' flanqueante). La presencia de una fusión génica en la muestra se detecta si la relación de la sonda 5' flanqueante con respecto a la sonda 3' flanqueante es diferente de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente diferente de uno). Como se muestra en la figura 3, el efecto de una fusión génica en la relación de las sondas 5' y 3' flanqueantes depende de si las sondas flanqueantes son complementarias al gen 5' en la fusión (Gen 1 en la figura 3) o el gen 3' en la fusión (Gen 2 en la figura 3).

25

En un ejemplo, la primera y segunda sondas (las sondas 5' y 3' flanqueantes, respectivamente) son complementarias al gen 5' en la fusión. En este ejemplo, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 3' del ácido nucleico (Gen 1) si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es mayor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente mayor de uno). En algunos ejemplos, la fusión génica está presente y no incluye una porción 3' del ácido nucleico si la relación es de aproximadamente al menos 1,1, tal como al menos 1,5, al menos 1,8, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10 o al menos 20, por ejemplo de 1,1 a 20 o de 1,1 a 60, tal como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, o más. En ejemplos particulares, una fusión génica está presente y no incluye una porción 3' del ácido nucleico si la relación es de aproximadamente al menos 1,5. En otros ejemplos, una fusión génica está presente y no incluye una porción 3' del ácido nucleico si la relación es de aproximadamente al menos 1,8. En otros ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 5' del ácido nucleico (gen 1) si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es menor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente menor de uno). En algunos ejemplos, la fusión génica está presente y no incluye una porción 5' del ácido nucleico si la relación es no más de 0,95, tal como no más de 0,9, no más de 0,8, no más de 0,7, no más de 0,6, no más de 0,5, o no más de 0,1, por ejemplo 0,05 a 0,95, tal como aproximadamente 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,65, 0,6, 0,55, 0,5, 0,45, 0,4, 0,35, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1, 0,05, o menor.

30

En otro ejemplo, la primera y segunda sondas (las sondas 5' y 3' flanqueantes, respectivamente) son complementarias al gen 3' en la fusión. En este ejemplo, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 3' del ácido nucleico si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es mayor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente mayor de uno). En algunos ejemplos, la fusión génica está presente y no incluye una porción 3' del ácido nucleico (gen 2) si la relación es al menos 1,1, tal como al menos 1,5, al menos 1,8, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10 o al menos 20, por ejemplo de 1,1 a 20 o de 1,1 a 60, tal como aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, o más. En ejemplos

35

55

particulares, una fusión génica está presente y no incluye una porción 5' del ácido nucleico si la relación es de aproximadamente al menos 1,5. En otros ejemplos, una fusión génica está presente y no incluye una porción 3' del ácido nucleico si la relación es de aproximadamente al menos 1,8. En otros ejemplos, la fusión génica se detecta y no incluye una porción 5' del ácido nucleico (gen 2) si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es menor de uno (por ejemplo, estadísticamente significativamente menos de uno). En algunos ejemplos, la fusión génica está presente y no incluye una porción 3' del ácido nucleico si la relación es no más de 0,95, tal como no más de 0,9, no más de 0,8, no más de 0,7, no más de 0,6, no más de 0,5, o no más de 0,1, por ejemplo 0,05 a 0,95, tal como aproximadamente 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,65, 0,6, 0,55, 0,5, 0,45, 0,4, 0,35, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1, 0,05, o menor.

10

En algunas realizaciones, la fusión génica está presente si la relación de las sondas flanqueantes (por ejemplo, la relación de una sonda 5' flanqueante con respecto a una sonda 3' flanqueante o la relación de una sonda 3' flanqueante con respecto a una sonda 5' flanqueante) difiere de un control (tal como una relación promedio en una muestra de tipo silvestre) por al menos dos desviaciones estándares (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, o más desviaciones estándares). En algunos ejemplos, el control es la relación (por ejemplo la relación promedio) de las sondas flanqueantes en una muestra que no incluye una fusión génica.

En algunos ejemplos, por ejemplo en el caso de un ARN o ARNm que se expresa normalmente a altos niveles, la relación de sonda flanqueante cuando está presente una fusión génica puede ser menor que cuando el ARN o el ARNm se expresa normalmente a niveles inferiores. Un experto en la técnica puede determinar el nivel al que se expresa normalmente el ARN o el ARNm en una célula y determinar el intervalo de relaciones que se expresan para reflejar la presencia de una fusión génica en la muestra.

En realizaciones adicionales, los métodos incluyen determinar el porcentaje de fusión génica en la muestra relativa al primer ácido nucleico o el segundo ácido nucleico. Los métodos incluyen poner en contacto la muestra con una sonda de fusión que incluye una porción 5' complementaria a un primer ácido nucleico y una porción 3' complementaria a un segundo ácido nucleico (tal como se ha analizado en la Sección III, anteriormente) en condiciones suficientes para que la sonda de fusión hibride específicamente en una fusión génica, donde la sonda de fusión abarca un punto de fusión del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico además de poner en contacto la muestra con la primera sonda y la segunda sonda anterior. Los métodos incluyen adicionalmente detectar la presencia de la sonda de fusión y determinar una relación de la sonda de fusión con respecto a la primera sonda y/o una relación de la sonda de fusión con respecto a la segunda sonda.

En algunos ejemplos, el porcentaje de la fusión génica con respecto al gen de longitud completa (por ejemplo, el gen de tipo silvestre o de no fusión) puede determinarse determinando la relación de la sonda de fusión con respecto a la primera sonda (por ejemplo, la sonda 5' flanqueante) o la relación de la sonda de fusión con respecto a la segunda sonda (por ejemplo, la sonda 3' flanqueante). Por ejemplo, si la porción 5' del gen está presente en la fusión génica, la relación de la sonda de fusión con respecto a la sonda 5' flanqueante será el porcentaje del ácido nucleico de fusión génica presente en la muestra con respecto al ácido nucleico de longitud completa. Asimismo, si la porción 3' del gen está presente en la fusión génica, la relación de la sonda de fusión con respecto a la sonda 3' flanqueante será el porcentaje del ácido nucleico de fusión génica presente en la muestra con respecto al ácido nucleico de longitud completa.

Puede usarse cualquier método adecuado para detectar las sondas. En algunos ejemplos, la primera y/o la segunda sonda (las sondas flanqueantes) incluye una etiqueta detectable y la detección de la presencia de la sonda o las sondas incluye detectar la etiqueta detectable. En algunos ejemplos, las sondas flanqueantes se marcan con la misma etiqueta detectable. En otros ejemplos, las sondas flanqueantes se marcan con diferentes etiquetas detectables. En otros ejemplos, las sondas flanqueantes se detectan indirectamente, por ejemplo por hibridación con un ácido nucleico marcado. En algunos ejemplos, las sondas flanqueantes se detectan usando una micromatriz, por ejemplo, una micromatriz que incluye ácidos nucleicos que son complementarios a las sondas flanqueantes (véase, por ejemplo, la figura 5A). En otros ejemplos, las sondas flanqueantes se detectan usando una micromatriz que incluye enlazadores de programación complementarios a una porción de cada una de las sondas flanqueantes y que se incuban posteriormente con enlazadores de detección, cuya porción es complementaria a una porción separada de las sondas flanqueantes. Los enlazadores de detección pueden marcarse de forma detectable, o una porción separada de los enlazadores de detección es complementaria a ácidos nucleicos adicionales que incluyen una etiqueta detectable (tal como biotina o peroxidasa de rábano picante). Véase, por ejemplo, la figura 5B. Se proporcionan en más detalle métodos para detectar las sondas en la Sección V a continuación.

## V. Métodos para detectar la hibridación de las sondas

Puede utilizarse en los métodos desvelados cualquier método adecuado para detectar la presencia de un ácido nucleico (tal como una sonda) en una muestra. Un experto en la técnica puede seleccionar métodos de detección apropiados. En algunos ejemplos, las sondas desveladas (tales como una o más sondas de fusión o flanqueantes) se marcan directamente. En otros ejemplos, las sondas desveladas se detectan por hibridación con una sonda de detección, que tiene una secuencia complementaria al menos a una porción de la sonda de fusión o flanqueante y una etiqueta detectable. Se conocen en la técnica etiquetas detectables y métodos para incorporar dichas etiquetas en una molécula de ácido nucleico, tal como una sonda. En ejemplos no limitantes, se marcan las sondas de ácido nucleico con dNTP unidos covalentemente a moléculas de hapteno (tal como un compuesto nitro-aromático (por ejemplo, dinitrofenilo (DNP)), biotina, fluoróforos (tal como fluoresceína), digoxigenina, etc.). Se conocen en la técnica métodos para conjugar haptenos y otras etiquetas con nucleótidos (por ejemplo, para facilitar la incorporación en sondas marcadas). Para ejemplos de procedimientos, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.258.507, 4.772.691, 5.328.824 y 4.711.955. Una etiqueta puede unirse directa o indirectamente a un dNTP en cualquier ubicación en el dNTP, tal como un fosfato (por ejemplo,  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  fosfato) o un azúcar.

En un ejemplo, cuando la etiqueta es un hapteno, la detección de las moléculas de ácido nucleico marcadas puede realizarse poniendo en contacto las moléculas de ácido nucleico marcadas con hapteno unidas a la secuencia diana genómica con un anticuerpo anti-hapteno primario. En un ejemplo, el anticuerpo anti-hapteno primario (tal como un anticuerpo anti-hapteno de ratón) se marca directamente con una enzima. En otro ejemplo, se usa un anticuerpo secundario (tal como un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra) conjugado con una enzima para la amplificación de señal. En un ejemplo, la etiqueta es biotina y la detección se realiza poniendo en contacto la muestra con peroxidasa de avidina-rábano picante.

En ejemplos adicionales, una etiqueta detectable incluye diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radioactivos. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Las etiquetas detectables adicionales incluyen sondas de Raman (dispersión de luz).

En ejemplos adicionales, las sondas se marcan con moléculas fluorescentes (o fluorocromos). Se conocen numerosos fluorocromos por los expertos en la técnica, y pueden seleccionarse, por ejemplo de Life Technologies (anteriormente Invitrogen), por ejemplo, véase, *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Se proporcionan ejemplos de fluoróforos particulares que pueden unirse (por ejemplo, conjugados químicamente) a una molécula de ácido nucleico (tal como una región de unión únicamente específica) en la Patente de Estados Unidos N° 5.866.366. Otros fluoróforos adecuados incluyen quelatos de europio reactivos con tiol que emiten en aproximadamente 617 nm (Heyduk y Heyduk, *Anal. Biochem.* 248: 216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274: 3315-22, 1999), así como GFP, Lissamine™, dietilaminocoumarina, fluoresceína clorotriazinilo, naftofluoresceína, 4,7-diclororodamina y xanteno (como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.800.996 de Lee y col.) y derivados de los mismos. También pueden usarse otros fluoróforos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo los disponibles en Life Technologies (Invitrogen; *Molecular Probes* (Eugene, OR)) y que incluyen la serie de colorantes ALEXA FLUOR® (por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.696.157, 6.130.101 y 6.716.979), la serie de colorantes BODIPY (colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro, por ejemplo como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.774.339, 5.187.288, 5.248.782, 5.274.113, 5.338.854, 5.451.663 y 5.433.896), Cascade Blue (un derivado amina reactivo del pireno sulfonado descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.132.432) y Marina Blue (patente de Estados Unidos N° 5.830.912). Una etiqueta fluorescente puede ser una nanopartícula fluorescente, tal como un nanocristal semiconductor, por ejemplo, QUANTUM DOT™ (obtenido, por ejemplo, en Life Technologies (QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, OR); véanse también las patentes de Estados Unidos N° 6.815.064; 6.682.596; y 6.649.138).

En algunos ejemplos, las sondas están diseñadas de tal forma que la hibridación de cada sonda y el tratamiento con nucleasa posterior producen un fragmento de un tamaño específico. Después, las sondas pueden detectarse (directa o indirectamente) utilizando técnicas de separación por tamaño, tal como electroforesis en gel (por ejemplo, electroforesis en gel en plancha o capilar) o cromatografía líquida (por ejemplo, HPLC). En algunos ejemplos, las sondas pueden marcarse con diferentes etiquetas detectables (por ejemplo diferentes flúors) con el fin de discriminar fragmentos que son similares en tamaño. Las sondas pueden detectarse utilizando métodos de espectrometría de masas.

En algunos ejemplos, las sondas de fusión o flanqueantes desveladas pueden marcarse con diferentes etiquetas detectables o pueden ponerse en contacto con diferentes sondas de detección, con el fin de detectar por separado

cada sonda si está presente más de una sonda en una mezcla de reacción. En otros ejemplos, la presencia de una o más sondas se detecta usando una micromatriz. En dichos ejemplos, las sondas de fusión y/o flanqueantes pueden marcarse con la misma etiqueta detectable, y las sondas se distinguen en base a la ubicación espacial de la señal en la micromatriz.

5

En algunos ejemplos, las sondas se detectan en una micromatriz usando una técnica de ensayo de protección con nucleasa cuantitativa, por ejemplo, como se describe en las publicaciones de patente internacionales WO 99/032663; WO 00/037683; WO 00/037684; WO 00/079008; WO 03/002750; y WO 08/121927; y la pat. de Estados Unidos N° 6.238.869; 6.458.533; y 7.659.063. Véase también, Martel y col., *Assay and Drug Development Technologies*. 2002, 1 (1-1): 61-71; Martel y col., *Progress in Biomedical Optics and Imaging*, 2002, 3: 35-43; Martel y col., *Gene Closing and Expression Technologies*, Q. Lu y M. Weiner, Eds., Eaton Publishing, Natick (2002); Seligmann, B. *Pharmacogenomics*, 2003, 3: 36-43; Martel y col., "Array Formats" en "Microarray Technologies and Applications", U.R. Muller y D. Nicolau, Eds, Springer-Verlag, Heidelberg; Sawada y col., *Toxicology in Vitro*, 20: 1506-1513; Bakir, y col., *Biorg. & Med. Chem Lett*, 17: 3473-3479; Kris, y col., *Plant Physiol*. 144: 1256-1266; Roberts, y col., *Laboratory Investigation*, 87: 979-997; Rimsza, y col., *Blood*, 15 de octubre de 2008, 112 (8): 3425-3433; Pechhold, y col., *Nature Biotechnology*, 27, 1038-1042.

En resumen, en un ejemplo no limitante, tras la hibridación y el tratamiento con nucleasa, la solución se neutraliza y se transfiere en una micromatriz, tal como una ARRAYPLATE programada (HTG Molecular, Tucson, AZ; cada elemento de la ARRAYPLATE está programada para capturar una sonda específica, por ejemplo, utilizando un anclaje unido a la placa y un enlazador de programación asociado al anclaje), y las sondas se capturan durante una incubación (por ejemplo, durante una noche a aproximadamente 50 °C). En su lugar, la plataforma puede ser una micromatriz NIMBLEGEN (Roche Nimblegen, Madison, WI) o las sondas pueden capturarse en perlas X-MAP (Luminex, Austin, TX), un ensayo denominado como el ensayo QBEAD, o procesarse adicionalmente, incluyendo reacciones de amplificación por PCR o ligación según se desee, y, por ejemplo, medirse después por secuenciación, o por métodos tales como NANOSTRING). El medio se elimina y se añade un cóctel de enlazadores de detección específicos de sonda, en el caso de los ensayos ARRAYPLATE y QBEAD, que hibridan en su sondas respectivas (capturadas) durante una incubación (por ejemplo, 1 hora a aproximadamente 50 °C). Véase, por ejemplo, la figura 5B. Esta etapa se omite en el caso de los ensayos NIMBLEGEN de micromatriz porque las sondas están biotiniladas directamente, y no se usa ningún enlazador de detección (por ejemplo, figura 5A). Específicos para los ensayos ARRAYPLATE y QBEAD, la matriz o las perlas se lavan y después se añade un enlazador de biotina (un oligonucleótido que hibrida en una secuencia común en cada enlazador de detección, con biotina incorporada en éste) y se incuba (por ejemplo, 1 hora a aproximadamente 50 °C). Para la ARRAYPLATE (ensayo de ARNm), se añade avidina marcada con HRP (avidina-HRP) y se incuba (por ejemplo, a aproximadamente 37 °C durante 1 hora), después se lava para eliminar la avidina-HRP no unida. Se añade un sustrato y la placa se forma por imagen para medir la intensidad de cada elemento en la placa. En el caso de QBEAD se añade Avidina-PE, las perlas se lavan, y después se miden por citometría de flujo usando Luminex 200, FLEXMAP 3D, u otro instrumento apropiado. En el caso de las matrices NIMBLEGEN, después de la adición de avidina-HRP se realiza opcionalmente una etapa de amplificación de señal de tiramida en presencia de un sustrato, dando como resultado la deposición de la sonda marcada con Cy3, los portamuestras se lavan, se secan y se exploran en un escáner de micromatriz estándar. Se proporcionan enlazadores de programación y enlazadores de detección ejemplares en la Tabla 6 (Ejemplo 1). Un experto en la técnica puede diseñar enlazadores de programación, enlazadores de detección y otros reactivos adecuados para su uso en un ensayo de protección de nucleasa cuantitativo en base a las sondas de fusión y/o las sondas flanqueantes utilizadas en los métodos desvelados en el presente documento.

45

Un experto en la técnica puede identificar otros métodos adecuados para detectar las sondas utilizadas en los métodos desvelados en el presente documento.

## VI. Fusiones génicas y sondas ejemplares

50

Un experto en la técnica puede identificar fusiones génicas y sondas apropiadas para su uso en los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, las bases de datos que proporcionan fusiones génicas o que identifican los genes implicados en las fusiones génicas están disponibles públicamente. Véase, por ejemplo, HYBRIDdb ([primate.or.kr/hybriddb](http://primate.or.kr/hybriddb)); ChimerDB ([ercsb.ewha.ac.kr:8080/FusionGene/index.jsp](http://ercsb.ewha.ac.kr:8080/FusionGene/index.jsp)); Cancer Genome Anatomy Project Recurrent Chromosome Aberrations in Cancer ([cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/RecurrentAberrations](http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/RecurrentAberrations)); Cancer Genome Project, Sanger Institute ([sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/](http://sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/)); COSMIC ([sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)); Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology ([atlasgeneticsoncology.org](http://atlasgeneticsoncology.org)). Véase también, Hahn y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13257-13261, 2004; Futreal y col., *Nature Rev. Cancer* 4: 177-183, 2004.

55

En algunos ejemplos, los métodos desvelados incluyen la etapa de seleccionar una fusión génica particular, denominada en el presente documento como una fusión génica diana. En base a la fusión génica diana, las sondas de fusión y/o las sondas flanqueantes pueden diseñarse para usarse en los métodos desvelados usando los criterios expuestos en el presente documento en combinación con el conocimiento de un experto en la técnica. En algunos ejemplos no limitantes, las fusiones génicas son fusiones génicas oncogénicas. Por ejemplo, si se conoce un sujeto o se sospecha que tiene un tipo particular de tumor, tal como leucemia mielógena crónica o leucemia mielógena aguda, la fusión génica seleccionada puede ser una que está asociada a ese tumor (tal como una fusión génica de Bcr-Abl). Las fusiones génicas ejemplares y tumores asociados se muestran en la Tabla 1. Las fusiones génicas adicionales incluyen cambios no oncogénicos (por ejemplo, fusiones génicas no transformantes) y genómicos que proporcionan una ventaja selectiva (por ejemplo, en patógenos tales como virus y bacterias).

Se conocen bien por un experto en la técnica los criterios para el diseño de sondas. Los factores que afectan a la especificidad de hibridación de sonda-diana incluyen la longitud de sonda, la temperatura de fusión, la auto-complementariedad, y la presencia de una secuencia repetitiva o no única. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y Suplementos de 2000); Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., Wiley & Sons, 1999.

La especificidad de una sonda aumenta con la longitud. Por lo tanto, por ejemplo, una sonda que incluye 30 nucleótidos consecutivos hibridan en una secuencia diana con una especificidad mayor que una sonda correspondiente de únicamente 15 nucleótidos. Por lo tanto, las sondas de fusión y flanqueantes desveladas en el presente documento pueden seleccionarse para incluir al menos 10, 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 o nucleótidos más consecutivos complementarios a una fusión génica o complementarios a una molécula de ácido nucleico particular. En algunos ejemplos, las sondas de fusión o flanqueantes desveladas en el presente documento tienen no más de 500 nucleótidos, tal como no más de 400, no más de 300, no más de 250, no más de 200, no más de 100, o incluso no más de 50 nucleótidos consecutivo complementarios a una fusión génica o complementarios a una molécula de ácido nucleico particular tal como de 10 a 500 nucleótidos, de 10 a 400 nucleótidos, de 10 a 250 nucleótidos, de 10 a 200 nucleótidos, de 10 a 100 nucleótidos, de 10 a 75 nucleótidos, de 10 a 60 nucleótidos, de 40 a 80 nucleótidos, de 100 a 200 nucleótidos, o de 10 a 50 nucleótidos consecutivos complementarios a una fusión génica o complementarios a una molécula de ácido nucleico particular (por ejemplo, un primer o segundo ácido nucleico que es parte de una fusión génica). En ejemplos particulares, una sonda tiene al menos 10 nucleótidos de longitud, tal como al menos 10 nucleótidos contiguos complementarios a una secuencia de ácido nucleico, tal como una secuencia que flanquea un punto de fusión génica o secuencias de ácido nucleico de fusión génica desveladas en el presente documento. Las longitudes particulares de sondas que pueden usarse para poner en práctica los métodos de la presente divulgación incluyen sondas que tienen al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, o más nucleótidos contiguos complementarios a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo un primer o segundo ácido nucleico que es parte de una fusión génica. En un ejemplo particular, cada sonda de ácido nucleico tiene al menos 30 nucleótidos de longitud. En un ejemplo no limitante, cada sonda de ácido nucleico tiene aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. En un ejemplo particular, cada sonda de ácido nucleico tiene aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.

Las condiciones que dan como resultado grados particulares de hibridación (astringencia) variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico de hibridación. Generalmente, la temperatura de hibridación y la resistencia iónica (tal como la concentración de Na<sup>+</sup>) del tampón de hibridación determinarán la astringencia de la hibridación. En algunos ejemplos, las sondas utilizadas en los métodos desvelados tienen una temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de al menos aproximadamente 37 °C, al menos aproximadamente 42 °C, al menos aproximadamente 45 °C, 50 °C, al menos aproximadamente 55 °C, al menos aproximadamente 60 °C, al menos aproximadamente 65 °C, al menos aproximadamente 70 °C, al menos aproximadamente 75 °C, al menos aproximadamente 80 °C, tal como aproximadamente 37 °C-80 °C (por ejemplo, aproximadamente 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o 80 °C). Los métodos para calcular la T<sub>m</sub> de una sonda se conocen por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, 2001, Capítulo 10).

También se proporcionan sondas que se degeneran en una o más posiciones (tales como 1, 2, 3, 4, 5, o más

posiciones), por ejemplo, una sonda que incluye una mezcla de nucleótidos (tal como 2, 3 o 4 nucleótidos) en una posición especificada en la sonda. En algunos ejemplos, las sondas desveladas en el presente documento incluyen una o más bases sintéticas o bases alternativas (tal como inosina). En otros ejemplos, las sondas desveladas en el presente documento incluyen uno o más nucleótidos modificados o análogos de ácidos nucleicos, tal como uno o más ácidos nucleicos bloqueados (véase, por ejemplo, pat. de Estados Unidos N° 6.794.499) o uno o más ácidos nucleicos peptídicos. En algunos ejemplos, el uso de uno o más ácidos nucleicos bloqueados o ácidos nucleicos peptídicos en la sonda puede aumentar la  $T_m$  de la sonda relativa de la  $T_m$  de una sonda de la misma longitud y composición que no incluye el ácido nucleico modificado.

**10 A. Fusiones génicas ejemplares**

Los métodos desvelados pueden usarse para detectar la presencia de una fusión génica en una muestra de un sujeto. Se conocen bien por un experto en la técnica fusiones génicas. Las fusiones génicas pueden producir un producto génico con una función nueva o diferente a la de cualquiera de las dos parejas de fusión. En otros ejemplos, una fusión génica incluye una secuencia génica intacta o intacta en su mayor parte condensada a un promotor de otro gen, por ejemplo, un promotor fuerte que regula en ascenso la expresión de la secuencia génica. En algunos ejemplos, una fusión génica es un oncogen. La Tabla 1 proporciona genes ejemplares implicados en fusiones génicas y fusiones génicas ejemplares. Pueden detectarse otras fusiones génicas, incluyendo las aún no identificadas, por un experto en la técnica utilizando los métodos desvelados en el presente documento.

20

Tabla 1. Genes y fusiones génicas ejemplares

Gen de fusión	Gen 1	Nº de acceso	Gen 2	Nº de acceso	Fusión Nº de acceso	Tumor asociado
ABL1/BCR	ABL1		BCR			CML, ALL,
BCR/ABL1	BCR	Hs.446394	ABL1	Hs.446504	AF113911, AJ131466, AJ131467, AY043457, M13096, M25946	ALL, CML,
DDX5/ PRKCB	DDX5	Hs.279806	PRKCB	Hs.349845	CD683976	Nasofaringe
CCDC134 /ZNF75A	CCDC134	Hs.474991	ZNF75A	Hs.513292	CD691174	
COL3A1/GRSF1	COL3A1	Hs.443625	GRSF1	Hs.309763	AW081998	Esófago, carcinoma de células escamosas
IREB2/OXR 1	IREB2	Hs.370324	OXR1	Hs.432398	AK127563	Lengua
MYB/NFIB	MYB		NFIB		FJ969915, FJ969916, FJ969917	Cabeza y cuello, mama
TMPRSS2/ ERG	TMPRSS2		ERG		DQ831521, DQ204772, DQ204773	Próstata TMPRSS2
TMPRSS2/ETV4	TMPRSS2		ETV4		DQ396625	Próstata
EWSR1/FLI1	EWSR1	Hs.374477	FLI1	Hs.257049	AF327066	Sarcoma de Ewing
EML4/ALK	EML4	NM_019063	ALK	NM_004304		Carcinoma de pulmón

**B. Sondas de fusión**

25

En algunas realizaciones, la sonda es una sonda de fusión, que hibrida en una porción de cada gen incluido en la fusión génica y abarca el punto de fusión. La sonda de fusión incluye al menos dos partes, de tal forma que la porción 5' de la sonda es capaz de hibridar en el primer gen y la porción 3' de la sonda es capaz de hibridar en el segundo gen. En algunos ejemplos, una sonda de fusión tiene aproximadamente 10-200 nucleótidos de longitud (incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 20-100, 25-50 o 30-45 nucleótidos de longitud y otros como se ha descrito anteriormente). En otros ejemplos, una sonda de fusión tiene al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30,

30

35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 14, 150, 160, 170, 180, 190, 200, o más nucleótidos de longitud.

En algunos ejemplos, la porción 5' y la porción 3' de la sonda de fusión tienen la misma o una longitud similar (por ejemplo, la porción 5' tiene al menos 9 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente 9-25 nucleótidos de longitud y la porción 3' tiene al menos 9 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente 9-25 nucleótidos de longitud). En ejemplos particulares, la porción 5' de la sonda tiene 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos de longitud, y la porción 3' de la sonda tiene el mismo número de nucleótidos. En otros ejemplos, la porción 5' y la porción 3' no tienen la misma o una longitud similar. En algunos ejemplos, la porción 5' de la sonda tiene 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos de longitud, y la porción 3' de la sonda es aproximadamente 1-20 (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) nucleótidos más corta o más larga que la porción 5' de la sonda.

En ejemplos adicionales, la porción 5' de la sonda o la porción 3' de la sonda es muy corta, por ejemplo aproximadamente 1-10 nucleótidos de longitud, mientras que la otra porción de la sonda tiene una longitud similar a la que se ha descrito anteriormente (por ejemplo al menos 9 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente 9-50 nucleótidos de longitud). En ejemplos particulares, la porción 5' de la sonda tiene al menos aproximadamente 1-10 nucleótidos de longitud (tal como 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, o al menos 10 nucleótidos de longitud) y la porción 3' de la sonda tiene aproximadamente al menos 9 nucleótidos de longitud, tal como al menos aproximadamente 9-50 nucleótidos de longitud (tal como al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos). En otros ejemplos, la porción 3' de la sonda tiene al menos aproximadamente 1-10 nucleótidos de longitud (tal como 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, o al menos 10 nucleótidos de longitud) y la porción 5' de la sonda tiene aproximadamente al menos 9 nucleótidos de longitud, tal como al menos aproximadamente 9-50 nucleótidos de longitud (tal como al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos). En un ejemplo, la porción 5' de la sonda tiene aproximadamente 1-3 bases de largo y la porción 3' de la sonda tiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud (tal como al menos aproximadamente 10-200, al menos aproximadamente 10-100, o al menos aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud) o viceversa. En otros ejemplos, la porción 5' de la sonda tiene aproximadamente 3-10 bases de largo y la porción 3' de la sonda tiene al menos aproximadamente 25 nucleótidos de longitud (tal como aproximadamente 25-200, al menos aproximadamente 25-100, o al menos aproximadamente 25-50 nucleótidos de longitud).

En algunos ejemplos, las fusiones génicas diferentes pueden contener una porción común (por ejemplo, las fusiones génicas distintas pueden incluir la misma o una porción 5' similar, pero diferentes porciones 3', o viceversa), y la diferencia en el punto de fusiones que varía puede variar únicamente en unas pocas bases (por ejemplo, 20 o menor, tal como 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 base). En algunos ejemplos, la sonda de fusión está diseñada para discriminar las fusiones, por ejemplo desplazando ligeramente la sonda de tal forma que las bases que son diferentes entre las fusiones son internas con respecto a la secuencia que se captura o hibrida en el enlazador de programación, de tal forma que las bases de sonda no correspondiente o las bases de diana no correspondiente se hidrolizarán por la nucleasa, y después la región emparejada corta restante se fundirá y se hidrolizará, impidiendo así que la sonda no correspondiente se capture. De esta manera, los enlazadores de programación pueden utilizarse para distinguir las fusiones génicas (por ejemplo, en base a la ubicación espacial en una matriz). Como alternativa, la sonda puede diseñarse de manera que tenga únicamente unas pocas bases que cubran la secuencia que difiere entre fusiones, con la etiqueta situada en ese extremo de tal forma que está protegida cuando la secuencia se hibrida, y se hidroliza de otro modo y, por lo tanto, no se detecta, y se captura por la secuencia génica común, de tal forma que todas las sondas se capturan, pero únicamente las sondas emparejadas correctamente producen una señal detectable.

Las sondas de fusión ejemplares incluyen las mostradas en la Tabla 2. Se muestran otras sondas de fusión ejemplares en las Tablas 4, 7 y 8 (a continuación). Un experto en la técnica puede diseñar sondas de fusión para cualquier fusión génica donde se conoce el punto de fusión de los dos genes, por ejemplo las proporcionadas en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 2. Sondas de fusión ejemplares

Gen 1 (5')	Gen 2 (3')	Gen de fusión Nº de acceso	Secuencia de la sonda de fusión (5'-> 3')*	Tm	SEQ ID NO:
DDX5	PRKCB	CD683976	gggaccgagggCATGCTTTCAGAACG	61,3	1
CCDC134	ZNF75A	CD691174	gcctggagatctCATTGTTTGTGC	53,8	2
COL3A1	GRSF1	AW081998	gaaatgcttctgcTTCACCCTTAGC	54,8	3
IREB2	OXR1	AK127563	ctaaactggcaccaAGTATGAGATATAG	52,7	4
CRTC1	MAML2	AY040324	gccgcgaggCTCCAGGGTTCC	62,6	5
MYB	NFIB var. 1	FJ969915	gagagccccttgagCTGAGGATT	60	6
			cgagccccUgcagCTGAGGA TIT	58,2	7
			gagccccttgagCTGAGGATTTG	57	8
			agccccttgagCTGAGGATTTGT	57,6	9
			gccccttgagCTGAGGATTTGTG	57,5	10
			ccccttgagCTGAGGATTTGTGA	56,3	11
			cccttgagCTGAGGATTTGTGAC	55,5	12
MYB	NFIB var. 2	FJ969916	cgagccccttgagTCCTGGTACC	60	13
			gagccccttgagTCCTGGTACCT	58	14
			agccccttgagTCCTGGTACCTG	59,1	15
			gccccttgagTCCTGGTACCTGG	59,9	16
			ccccttgagTCCTGGTACCTGGG	59,6	17
MYB	NFIB var. 3	FJ969917	gagagccccttgagCCTAACGGC	62,7	18
			cgagccccttgagCCTAACGGCA	61,9	19
			gagccccttgagCCTAACGGCAG	60,5	20
			agccccttgagCCTAACGGCAGT	61,1	21
			gccccttgagCCTAACGGCAGTG	61	22
			ccccttgagCCTAACGGCAGTGG	60,7	23
TMPRSS2	ERG	EU090248	tggagcggcagGTTATTCCAGG	60	24
			ggagcggcagGTTATTCCAGGA	59,8	25
			gagcggcagGTTATTCCAGGAT	58,1	26
TMPRSS2	ETV4	EU693079	tgaactcagctCGGCCCCCGCT	60,8	27
			tgaactcagctCGGCCCCCGCTT	60,8	28
			gaactcagctCGGCCCCCGCTTG	60,5	29
EWSR1	FLI1	JF290489	tacgggcagcagaACCCTTCTTAT	54,8	30
			acgggcagcagaACCCTTCTTATG	56,2	31
			cgggcagcagaACCCTTCTTATGA	56	32

\*Minúscula, gen 1; mayúscula, gen 2

### 5 C. Sondas flanqueantes

- En algunas realizaciones, la sonda es una sonda "flanqueante", que hibrida en una porción del gen de longitud completa, cuya porción se incluye en la fusión génica. Las sondas flanqueantes son complementarias a la secuencia presente en el gen de tipo silvestre y también pueden ser complementarias a la secuencia presente en el gen de fusión. Esto se presenta esquemáticamente en la figura 3. Una "sonda 5' flanqueante" es una sonda que es complementaria a una secuencia que está 5' de un punto de fusión o de ruptura en el gen de tipo silvestre (de no fusión) (por ejemplo, sonda 5' 1 o sonda 5' 2 en la figura 3). Una "sonda 3' flanqueante" es una sonda que es complementaria a una secuencia que está 3' de un punto de fusión o una ruptura en el gen de tipo silvestre (de no fusión) (por ejemplo, sonda 3' 1 o sonda 3' 2 en la figura 3). En algunos ejemplos, una sonda de fusión tiene aproximadamente 10-200 nucleótidos de longitud (incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 20-100, 25-50 o 30-45 nucleótidos de longitud y otros como se ha descrito anteriormente). En otros ejemplos, una sonda de fusión tiene al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 14, 150, 160, 170, 180, 190, 200, o más nucleótidos de longitud.
- En algunas realizaciones, se sabe que se produce una fusión entre dos genes y también se conoce el punto de fusión. Las sondas flanqueantes pueden diseñarse para ser complementarias al gen 5' en la fusión (Gen 1 en la figura 3) en los puntos 5' y 3' con respecto al punto de fusión conocido. Asimismo, las sondas flanqueantes pueden

diseñarse para ser complementarias al gen 3' en la fusión (Gen 2 en la figura 3) en los puntos 5' y 3' con respecto al punto de fusión. Las sondas flanqueantes ejemplares se proporcionan en las Tablas 3 y 8.

En otras realizaciones, se sabe que se produce una fusión entre dos genes, o se sabe que se produce una fusión, pero no se conoce el punto de fusión. En dichos casos, es deseable diseñar las sondas flanqueantes tan cerca como al extremo 5' y el extremo 3' del gen de interés, para aumentar la probabilidad de que el punto de fusión esté entre las sondas flanqueantes.

Tabla 3. Sondas flanqueantes ejemplares

10

Gen	Nº de Acceso	Secuencia de sonda flanqueante (5' -> 3')	T <sub>m</sub>	SEQ ID NO:
DDX5	NM_004396			
DDXS 5' flanqueante		ATAGAGCGGCTCCCAGCGTTCCTGCGGC GTAGGAGGCGGTCCAGACTAT	77,9	33
		GCGGCCGGCACCTCATTCATTTCTACCGG TCTCTAGTAGTGCAGCTTCGG	74,4	34
		CAAGGCTTCGCCGTCATCGAGGCCATTT CAGCGACTTGTCGCACGCTT	76,2	35
DDX5 3' flanqueante		GTGCTGGCACCAACTCGGGAACGGCCCA ACAGGTGCAGCAAGTAGCTGC	77	36
		CAATCTGAGAAGAACAACCTACCTTGTC TTGATGAAGCAGATAGAATGC	67,6	37
		GCAATTAATCCCAAGTTGCTTCAGTTGGT CGAAGACAGAGGTCAGGTCG	70,8	38
PRKCB	NM_002738			
PRKCB 5' flanqueante		GTCACATTCTCCTGCCCTGGCGCTGACAA GGGTCCAGCCTCCGATGACCC	77,4	39
		GTGACACCTGCATGATGAATGTGCACAAG CGCTGCGTGATGAATGTTCCC	73,2	40
		CCGCATCTACATCCAGGCCACATCGACA GGGACGTCTCATTGTCCTCG	75,5	41
PRKCB 3' flanqueante		GAAAGACAAGAGGCTTGCAAGGACCCTG AAGAGGTCGGAGCATCATAAG	71,9	42
		CTCATGAGATGGTATCAGCCACCCAATGA CTGGCGTATCTTGGTCCTGTG	71,9	43
		GAGAGACACCTCCAACCTCGACAAAGAGT TCACCAGACAGCCTGTGGAAC	72,1	44
CCDC134	NM_024821			
CCDC134 5' flanqueante		CTTTCAGTTGCTTTGCTGTTAGCCTGTTGG ACCTTCGAGCCTAGCTGCTC	72,2	45
		CACAGGACTCGGCCACCTGCCCTTCCTGC ACCGACTGGCCAGCTCAAGA	78,2	46
		GTCTGGGATGGGAGCCACAGGCACCTTGA GGACCTCCCTGGACCAAGCC	78,1	47
CCDC134 3' flanqueante		GGAGGCAGGTCGGGAGGAAGAAGAGGTG GAGGTGTGGTTGTGGTGGAGAG	76,2	48
		CCTGCCCTGGACCCTGTTGGTGGCTGAAGA CCTCTGGCCAGCTGGCTTCCG	78,3	49
		CAGCAGAACTAGGTTCTGAGCCACGGGTC AGGGTGCCACCCTGCTGCTGG	77,3	50

ZNF75A	NM_153028			
ZNF75A 5' flanqueante		CAAGCTGGCCGAGGTTGCAGTCCATGAGC TGGGAAAGGAGGCAGTGCTCT	76,3	51
		TTGGGAGAAACAGCAGAGGCCCTCAAGTTT CGGGCTGAAGCCAACAGAGTC	73,9	52
		GTTTCGGGCTGAAGCCAACAGAGTCCCAA CCAGTGGGCGTATCCCAAGAT	74,8	53
ZNF75A 3' flanqueante		CTGCAGCCACTCAGTAGTCTTCTGTGGTC ACAGAAGTAAACATTGTTGGC	70,5	54
		GCAGGCTTACCAATTTCCATAGTCTCATG AGGCCGAAATGAATTACAATG	68,1	55
		CCACTAGGGAATCTCCAGATGAACTATTA ATGCACTGTCTTATGCCTCTC	67,7	56
COL3A1	NM_000090			
COL3A1 5' flanqueante		TTTATGACGGGCCCCGGTGCTGAAGGGCAG GGAACAACCTTGATGGTGCTAC	74,9	57
		GAAGGAGGATGTTCCCATCTTGGTCAGTC CTATGCGGATAGAGATGTCTG	70,4	58
		GCCAGAACCATGCCAAATATGTGTCTGTG ACTCAGGATCCGTTCTCTGCG	72,3	59
COL3A1 3' flanqueante		CAAGGGTGAAAGTGGGAAACCAGGAGCT AACGGTCTCAGTGGAGAACGTG	73,2	60
		GTCCTTGATGTGCAGCTGGCATTCCCTCG ACTTCTCTCCAGCCGAGCTTC	73,8	61
		CACCCTATGACATTGGTGGTCTGATCAA GAATTTGGTGTGGACGTTGGC	71,9	62
GRSF1	NM_002092			
GRSF1 5' flanqueante		CCCAACCGGCCCTGGATTCCACTTCCGTT CCACCATCGCTGCTGGAGCAG	77,8	63
		CTTCTCATTTCGAGCTCAAGGACTGCCCT GGTCATGCACTATGGAAGATG	71,1	64
		TGCAGAAAGCCTTAGAGAAGCACCCGAT GTACATGGGCCAGCGGTATGTG	73,8	65
GRSF1 3' flanqueante		TTTAGCCTAGCTGCTGCTTACGGAGTGCA AGGGAGAACTCTGAGAAGCAG	72,1	66
		GAGCCATGACTGTTGCTGCACTCCAGCCT GAGTGACAGAGTGAGACCCTG	74,5	67
		GAGATGGAGTCTTGATCGCCCAGGCTAG AGTGCAGTGGCCTGGTCTTGG	74,1	68
IREB2	NM_004136			
IREB2 5' flanqueante		GCTGGCTCTGCTGCTCTCGCGATATTTGCG CGAGCCTGCTTCCTTCTTTC	74,8	69
		CTGCTCTCGCGATATTTGCGCGAGCCTGC TTCCTTCTTTCCTCCCTTGCC	74,8	70
		TATTTGCGCGAGCCTGCTTCCTTCTTTCCT CCCTTGCCAGTCCGCTGTC	75,5	71
IREB2 3'flanqueante		GACTACCTGCCGAGGATCTTGTGATTCTG GAGAACTAGGCCGAAACTCAG	71,5	72

ES 2 578 370 T3

		ATCTTGCCCTCTCCACCCTTAGTGGTAGCTT ATGCCATAGCAGGCACAGTG	72,1	73
		GGTTCCTCCACATATGAAGATGGACCAT GGCAGGATACAACCTGATTGTG	70,4	74
OXR1	NM 018002			
OXR1 5' flanqueante		GTGTTGTCGACTTGACCTGCTAATTTCTG TTCTGGAATCGAGAGAAGAC	69,5	75
		CTCCAGGGTTCAACCCTTTGGCTGGTGCA GGAAAGCAAACACCACAAGCC	74,9	76
		GGTATTCGACCTGCACGAGTTGTATCTTC AACTTCTGAGGAGGAGGAAGC	70,8	77
OXR1 3' flanqueante		CTGTTATACATGTGACAGTGACTTTGTGCT GAAATTCAGCTATTCCAGA	66,7	78
		TTTGTCTTACAGAAAGTGTGATTGCCA GGTTGCTTATAGCACTTAAAG	66,2	79
		CTTCGGTCTTCCACAGCAGTATTATTGTCT TTGTGGAGTTGACTAATGAT	67,4	80
CRTC1	NM_015321			
CRTC1 5' flanqueante		GAGGTGGCGGCGAGAAGATGGCGACTTC GAACAATCCGCGGAAATTCAGC	75,3	81
		GGCGAGAAGATGGCGACTTCGAACAATC CGCGGAAATTCAGCGAGAAGAT	73,2	82
		TGGCGACTTCGAACAATCCGCGGAAATTC AGCGAGAAGATCGCGCTGCAC	75,2	83
CRTC1 3' flanqueante		GCTCCCATCACCTTCACTGGGTCCCGATG GAGCCGTCTCAGAGGCCGAGG	77,8	84
		CCAAGTGTCTGTTCCTGCGGCCCTTGG CCTTCCAGGGTCTGGCCAGG	79,4	85
		GGTGCTGGCTCTGATGATTCCAGAGCCTG TATCCACCTTCTGGGCTCCTG	74,2	86
MAML2	NM 032427			
MAML2 5' flanqueante		CTCCCTCTCCTATCGGAGCACAATGAAAG CCTGTGTATCGCCGTGACTCC	73,4	87
		CAGACTTGCCTGCAATAGCCAGCAGTAGC CTCTTCCACCTCACCATCCC	73,6	88
		CACCACCTGAGCTGTGAAGGACGATATGA ACGAGGTAGGGCCGAGAGCTC	74,1	89
MAML2 3' flanqueante		CAACAACTCCTTAATTTGCTCTAATAGA TAGGTATGGTTAATCTTTCC	62,9	90
		CTTGCAGGATAGATTGAAATGTTATAGGT TTGTTTGGAGTAACCAAACAG	65,4	91
		TTTCCACAATCCTCTACTTCAGTGGGATG CTGTGTCTAGTGATTAAACA	68,7	92
MYB	NM 005375			
MYB 5' flanqueante		CTCCTCCGTGACCTCCTCCTCCTTTTCTC CTGAGAACTTCGCCCCAGC	74,9	93
		CCCGCACAGCATATATAGCAGTGACGAG GATGATGAGGACTTTGAGATG	70,7	94

		TGTGTGACCATGACTATGATGGGCTGCTT CCCAAGTCTGGAAAGCGTCAC	73	95
MYB 3' flanqueante		GGGAGACAGAACTGTGGTTGATAGCCA GTCACTGCCTTAAGAACATTTG	69,7	96
		GATAGCCAGTCACTGCCTTAAGAACATTT GATGCAAGATGGCCAGCACTG	70,6	97
		AGCCAGTCACTGCCTTAAGAACATTTGAT GCAAGATGGCCAGCACTGAAC	71,6	98
NFIB	NM_001190737			
NFIB 5' flanqueante		GCACGCCGAGTGAACCTGAATCTTTGGCT ATTTAAGGAGGACTGGGTTTG	70,8	99
		CATTCATCGAGGCACTTCTTCCACATGTCC GTGCAATTGCCTATACTTGG	70,8	100
		CCTTGCCAAACTGCGCAAAGATATTCGCC AGGAGTATCGAGAGGACTTTG	71,5	101
NFIB 3' flanqueante		GCATCAGCCAACTCATTGCCATGACAAC TCTTTGTACTGTGTCCGTGCC	72,1	102
		GTACAACCTGTAGGTGACGAGTAGTCAGTT ATTGCTTGCTAGCTACACACC	68,8	103
		CAGCCTATACTGCTAGCAGCTGCTCATA TGCAGTCAATTACTGGAAGCG	70,5	104
EWSR1	NM_013986			
EWSR1 5' flanqueante		CAGCGGACGGAACCATTCCAACAGCCTA GTCTCGTGCTGAGAGCCTCTC	74,4	105
		GTGTCACGTGCGGCGCTCTTTAGAGAGGA CTGGGACAAGAGTTGCGGACG	75,5	106
EWSR1 3' flanqueante		GGCGAGCACCGTCAGGAGCGCAGAGATC GGCCCTACTAGATGCAGAGACC	76,5	107
		TGTGAGCATGCTCAGTATCATTGTGGAGA ACCAAGAGGGCCTCTTAACTG	70,7	108
		GTATCATTGTGGAGAACCAAGAGGGCCTC TTAACTGTAACAATGTTTCATG	67,8	109
FLI1	NM_002017			
FLI1 5' flanqueante		GTTTCATCCGGTTAACTGTCTCTTTTCGCTC CGCTACAACAACAAACGTGC	71,2	110
		GGGACTATTAAGGAGGCTCTGTCCGGTGGT GAGCGACGACCAGTCCCTCTT	74,7	111
		GCAGGAGTGGATCAATCAGCCAGTGAGG GTCAACGTCAAGCGGGAGTATG	73,8	112
FLI1 3' flanqueante		CTTCTTAGGGTAACACTAAGTACCTTCTA GACAACATGTCTACCTAAATG	64,8	113
		GGGTAACACTAAGTACCTTCTAGACAACA TGCTACCTAAATGAAATGGG	66,1	114
		CAACATGTCTACCTAAATGAAATGGGATG TGTTTCGGAACATTTGTCTCC	67,5	115
TMPRSS2	NM_005656			
TMPRSS2 5' flanqueante		GAGTAGGCGCGAGCTAAGCAGGAGGCGG AGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGG	80,8	116

		GCGCGGCAGGTCATATTGAACATTCCAGATACCTATCATTACTCGATGCT	69,9	117
TMPRSS2 3' flanqueante		CACTACTCTACCATGGTTCTGCCTCCTGGC CAAGCAGGCTGGTTTGCAAG	73,9	118
		GAATGATTCTACAGCTAGGACTTAACCTT GAAATGGAAAGTCATGCAATC	66	119
		CTGTAGAGAGCAGCATTCCCAGGGACCTT GGAAACAGTTGGCACTGTAAG	72	120
ETV4	NM 001079675			
ETV4 5' flanqueante		CCGGCCGTGCGGCCGAGGGAGCGGCCG GATGGAGCGGAGGATGAAAGCC	82,7	121
		GGATGAAAGCCGGATACTTGGACCAGCA AGTGCCCTACACCTTCAGCAGC	73,9	122
		CCTTCAGCAGCAAATCGCCCGGAAATGGG AGCTTGCGCGAAGCGCTGATC	76,3	123
ETV4 3' flanqueante		CTTTCTTCTGCCCTTTCCTAGGCCAGGCC TGGGTTTGTACTTCCACCTC	73,7	124
		CTAGGCCAGGCCTGGGTTTGTACTTCCA CCTCCACCACATCTGCCAGAC	75,4	125
		GGGTTTGTACTTCCACCTCCACCACATCTG CCAGACCTTAATAAAGGCC	72,1	126
ERG	NM_004449			
ERG 5' flanqueante		GGGAGAGTGTGCAAGAGATCGCTGCGGG ACAGGTTCTAGAGATCGCTCC	74,9	127
		CCCGAGGGACATGAGAGAAGAGGAGCGG CGCTCAGGTTATTCCAGGATCT	74,6	128
		GAGCGGCGCTCAGGTTATTCCAGGATCTT TGGAGACCCGAGGAAAGCCGT	75,3	129
ERG 3' flanqueante		GCACTGTGGCTTGGGATTCAGCCCTG AGCCTGATGTTGCTGGCTATC	73,7	130
		CCTTCTGCACAGATGTGGCACCTGCAACC CAGGAGCAGGAGCCGGAGGAG	77,3	131
		CAGCAGGTGCAGCAGAGATGGCTACAGC TCAGGAGCTGGGAAGGTGATGG	75,2	132

## VII. Muestras

Las muestras de uso en los métodos desvelados incluyen cualquier espécimen que incluye ácido nucleico (tal como ADN genómico, ADNc, ADN vírico o ARN, ARNr, ARNt, ARNm, oligonucleótidos, fragmentos de ácido nucleico, ácidos nucleicos modificados, ácidos nucleicos sintéticos, o similares). En ejemplos particulares, la muestra incluye ácidos nucleicos modificados, ácidos nucleicos sintéticos, o similares). En algunos ejemplos, la muestra incluye ARNm. En algunos ejemplos, los métodos desvelados incluyen obtener la muestra antes del análisis de la muestra. En algunos ejemplos, los métodos desvelados incluyen seleccionar un sujeto que tiene un tumor, y después en algunos ejemplos seleccionar adicionalmente la fusión génica diana para la detección en base al tumor del sujeto (por ejemplo, véase la Tabla 1).

Las muestras apropiadas incluyen cualquier muestra del entorno o biológica convencional, incluyendo muestras clínicas obtenidas a partir de un sujeto humano o veterinario. Las muestras ejemplares incluyen, sin limitación, células, lisados celulares, frotis de sangre, preparaciones de citocentrífuga, frotis de citología, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, plasma, suero, saliva, esputo, orina, lavado broncoalveolar, semen, etc.), biopsias tisulares (por ejemplo, biopsias tumorales), aspirados con aguja fina, y/o secciones tisulares (por ejemplo, secciones tisulares de criostato y/o secciones tisulares embebidas en parafina). En otros ejemplos, la muestra incluye células tumorales circulantes o células fetales circulantes en sangre materna. En ejemplos particulares, las muestras se usan

directamente (por ejemplo, frescas o congeladas), o pueden manipularse antes del uso, por ejemplo, por fijación (por ejemplo, usando formalina) y/o incrustación en cera (tal como muestras tisulares embebidas en parafina y fijadas en formalina (FFPE)).

- 5 En ejemplos adicionales, una muestra incluye un espécimen que incluye ácidos nucleicos bacterianos o víricos, por ejemplo, una muestra de un sujeto infectado con un virus o bacteria. Una muestra también puede incluir especímenes ambientales, por ejemplo, agua, aire, suelo, polvo, madera o alimentos u otros materiales que pueden contener o contaminarse con un patógeno.
- 10 Se conocen en la técnica métodos para obtener una muestra de un sujeto. Por ejemplo, los métodos para obtener muestras tisulares o celulares son rutinarios. Pueden obtenerse muestras ejemplares de células o tejidos normales, o de células o tejidos neoplásicos. La neoplasia es una condición biológica en la que una o más células han experimentado una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, un aumento de la tasa de crecimiento, invasión del tejido circundante, y cuyas células pueden ser capaces de metastatizar. En ejemplos particulares, una
- 15 muestra biológica incluye una muestra tumoral, tal como una muestra que contiene células neoplásicas.

- Las células o tejidos neoplásicos ejemplares pueden incluirse en o aislarse a partir de tumores sólidos, incluyendo cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tal como carcinoma de células escamosas de pulmón), carcinomas de mama (por ejemplo, carcinomas lobular y conductual), cáncer adrenocortical, ameloblastoma, cáncer ampular, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer cervical, colangioma, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer gástrico, glioma, tumor de células granulares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, mola hidatiforme, linfoma, melanoma, mesotelioma, mieloma, neuroblastoma, cáncer oral, osteocondroma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, pilomatricoma, cáncer de próstata, cáncer de células renales, tumor de glándulas salivales, tumores de tejido blando, nevus de Spitz, cáncer de células
- 20 escamosas, cáncer teratoideo y cáncer de tiroides. Las células neoplásicas ejemplares también pueden incluirse en o aislarse a partir de cánceres hematológicos que incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tal como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de
- 25 Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico y mielodisplasia.

- Por ejemplo, una muestra de un tumor que contiene material celular puede obtenerse por escisión quirúrgica de todo o parte del tumor, recogiendo un aspirado de agua fina del, así como otros métodos conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, se aplica una muestra tisular o celular a un sustrato y se analiza para determinar la presencia de
- 30 una fusión génica. Un soporte sólido útil en un método desvelado necesita únicamente llevar la muestra biológica y, opcionalmente, pero ventajosamente, permite la detección conveniente de componentes (por ejemplo, proteínas y/o secuencias de ácidos nucleicos) en la muestra. Los soportes ejemplares incluyen portamuestras de microscopio (por ejemplo, portamuestras de microscopio de vidrio o portamuestras de microscopio de plástico), cubreobjetos (por
- 35 ejemplo, cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), placas de cultivo tisular, placas multi-pocilo, membranas (por ejemplo, nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF)) o chips BIACORE.

- Las muestras descritas en el presente documento pueden prepararse usando cualquier método conocido actualmente o desarrollado de ahora en adelante en la técnica. En algunos ejemplos, las células en la muestra se
- 40 lisan o se permeabilizan en una solución acuosa (por ejemplo usando un tampón de lisis). La solución acuosa o el tampón de lisis incluye detergente (tal como dodecil sulfato sódico) y uno o más agentes caotrópicos (tal como formamida, HCl guanidinio, isotiocianato de guanidinio, o urea). La solución también puede contener un tampón (por ejemplo SSC). En algunos ejemplos, el tampón de lisis incluye de aproximadamente el 15 % al 25 % de formamida (v/v), SDS de aproximadamente 0,01 % al 0,1 %, y SSC aproximadamente 0,5-6X (por ejemplo, aproximadamente
- 45 3X SSC). El tampón puede incluir opcionalmente ARNt (por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 2,0 mg/ml) o una ribonucleasa. El tampón de lisis también puede incluir un indicador de pH, tal como Rojo de Fenol. En un ejemplo particular, el tampón de lisis incluye formamida al 20 %, SSC 3X (79,5 %), SDS al 0,05 %, 1 µg/ml de ARNt, y 1 mg/ml de Rojo de Fenol.

- 50 Las células (u otros tipos de muestra) se incuban en la solución acuosa durante un periodo de tiempo suficiente (tal como de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, por ejemplo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 10 minutos) y a una temperatura suficiente (tal como de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 115 °C, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 105 °C, o de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 100 °C) para lisar o permeabilizar la célula. En algunos

- ejemplos, la lisis se realiza a aproximadamente 95 °C, si el ácido nucleico de la fusión génica a detectar es ARN. En otros ejemplos, la lisis se realiza a aproximadamente 105 °C, si el ácido nucleico de fusión génica a detectar es ADN. En algunos ejemplos, las condiciones de lisis pueden ser de tal forma que el ADN genómico no es accesible a las sondas mientras que el ARN (por ejemplo, ARNm) es, o de tal forma que el ARN se destruye y únicamente el ADN es accesible para la hibridación de la sonda. En algunos ejemplos, la etapa de lisis incluye incubar la muestra a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 5-15 minutos para desnaturalizar el ARN en la muestra, pero no el ADN genómico. En otros ejemplos, la etapa de lisis incluye incubar la muestra a aproximadamente 105 °C durante aproximadamente 5-15 minutos para desnaturalizar el ARN y el ADN genómico en la muestra.
- 10 En algunos ejemplos, el lisado celular en bruto se usa directamente sin purificación adicional. Las células pueden lisarse en presencia o ausencia de una o más de las sondas desveladas. Si las células se lisan en ausencia de la sonda, la una o más sondas pueden añadirse posteriormente al lisado en bruto. En otros ejemplos, los ácidos nucleicos (tal como ADN y/o ARN) se aíslan a partir del lisado celular antes de entrar en contacto con una o más de las sondas desveladas.
- 15 En algunos ejemplos, las muestras tisulares se preparan fijando y embebiendo el tejido en un medio e incluyen una suspensión celular que se prepara como una monocapa sobre un soporte sólido (tal como un portaobjetos de vidrio), por ejemplo por frotis o centrifugación de las células sobre el soporte sólido. En ejemplos adicionales, puede usarse tejido congelado fresco (por ejemplo, sin fijar) o secciones de tejido en los métodos desvelados en el presente documento. Las secciones tisulares se usan en los métodos desvelados en el presente documento, por ejemplo colocando toda o una porción de la sección en el tampón de lisis y avanzando como se describe para otros tipos de muestras.
- 20 En algunos ejemplos se usa un medio de embebido. Un medio de embebido es un material inerte en el que se embeben tejidos y/o células para ayudar a conservarlas para un análisis futuro. La incrustación también permite muestras tisulares que se cortarán en secciones finas. Los medios de embebido incluyen parafina, celoidina, compuesto OCT™, agar, plástico o acrílico. Muchos medios de embebido son hidrófobos; por lo tanto, el material inerte puede necesitar recuperarse antes del análisis histológico o citológico, que utiliza reactivos hidrófilos primarios. Los términos de desparafinización o cera perdida se usan ampliamente en el presente documento para referirse a la eliminación parcial o completa de cualquier tipo de medio de embebido de una muestra biológica. Por ejemplo, las secciones tisulares embebidas en parafina se desparafinan por paso a través de disolventes orgánicos, tales como tolueno, xileno, limoneno, u otros disolventes adecuados. En algunos ejemplos, una muestra embebida en parafina fijada en formalina no se desparafina antes de la lisis celular.
- 30 Los tejidos pueden fijarse mediante cualquier proceso adecuado, incluyendo perfusión o inmersión en un fijador. Los fijadores pueden clasificarse como agentes de entrecruzamiento (tales como aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de entrecruzamiento sin aldehído), agentes de oxidación (por ejemplo, iones metálicos y complejos, tales como tetraóxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturalizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro mercuríco, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, metacarn, fluido de Bouin, fijador B5, fluido de Rossman, y fluido de Gendre), microondas y fijadores diversos (por ejemplo, fijación en volumen excluido y fijación al vapor). También pueden incluirse aditivos en el fijador, tales como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales de metales (tales como cloruro de cinc, sulfato de cinc y sales de litio), y lántano.
- 40 El fijador más usado comúnmente en la preparación de muestras para IHC es formaldehído, generalmente en forma de una solución de formalina (formaldehído al 4 % en una solución de tampón, denominada como formalina tamponada al 10 %). En un ejemplo, el fijador es formalina tamponada neutra al 10 %.
- 45 La divulgación se ilustra adicionalmente por los siguientes Ejemplos no limitantes.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### 55 Detección de fusiones de Bcr-Abl

Este ejemplo describe sondas de fusión para la detección de fusiones de Bcr-Abl y su uso en la detección de ácidos nucleicos de fusión de Bcr-Abl.

Se diseñaron sondas de fusión que abarcaban fusiones de Bcr-Abl y se proporcionan en la Tabla 4. Se prepara ARNm transcrito *in vitro* (IVT) para dianas de fusión de Bcr-Abl (Tabla 5). La diana IVT específica se añadió y la señal de una matriz que contenía todas las sondas de fusión diana se midió en un ensayo en damero (figura 4). La diana IVT diluida con tampón de lisis se incubó con sondas de fusión a 95 °C durante 10-15 minutos, y se incubó a 60 °C durante 6-16 horas para permitir la hibridación de la sonda de ARN. La mezcla se trató con S1 nucleasa (dilución 1:40 en tampón S1 nucleasa) a 50 °C durante 60-90 minutos para digerir el ARN no hibridado y las sondas. La reacción de nucleasa se detuvo (NaOH 1,6 N, EDTA 0,135 M, pH 8,0) durante 15-20 minutos a 95 °C y después la mezcla se añadió a una placa que incluía enlazadores de programación específicos para las sondas de fusión (Tabla 6) y se incubó a 50 °C durante 16-24 horas. Después, los enlazadores de detección (Tabla 6) se añadieron y se incubaron a 60 °C durante 60-90 minutos. Se añadió la sonda de detección y se incubó a 50 °C durante 60-90 minutos, después se añadió la solución de detección y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Se añadió una solución luminiscente y la placa se sometió a formación de imagen para detectar la sonda de fusión que se une a la placa.

Las sondas son específicas generalmente para la diana de interés (figura 4). La sonda para E12A2 se entrecruzó con la diana E13A2, y la sonda para E12A3 se entrecruzó con la diana E13A3. Las sondas pueden diseñarse de nuevo para eliminar esta reactividad cruzada, que se cree que surge porque las fusiones específicas están muy cercanas entre sí, con bases de solapamiento incorporadas en las secuencias de sonda.

Tabla 4. Dianas y sondas de fusión de Bcr-Abl

Sonda/diana de fusión	Secuencia de sonda de fusión (5'-> 3')*	SEQ ID NO:
E1A2	gatgctactggccgctgaagggtctCTGCGTCTCCATGGAAGGCGCCCTC	133
E1A3	tagcctaagaccggagctttcacCTGCGTCTCCATGGAAGGCGCCCTC	134
E6A2	gatgctactggccgctgaagggtctTTTTCCAGAGAGTTCTTGGTCGTTGG	135
E6A3	tagcctaagaccggagctttcacTTTCCAGAGAGTTCTTGGTCGTTGG	136
E12A2	gatcctactggccgctgaagggtctACTTCTTCTGCTGCTCCCGGATGTT	137
E12A3	tagcctaagaccggagctttcacACTTCTTCTGCTGCTCCCGGATGTT	138
E13A2	gatgctactggccgctgaagggtctCTTCTTA/GTTGATGGTCAGCGGAAT	139
E13A3	tagcctaagaccggagctttcacCTTCTTA/GTTGATGGTCAGCGGAAT	140
E14A2	gatgctactggccgctgaagggtctTTGAActCTGCTTAAATCCAGTGGC	141
E14A3	tagcctaagaccggagctttcacTTGAActCTGCTTAAATCCAGTGGC	142
E19A2	gatgctactggccgctgaagggtctTGACGTGCGAAGGCTGCCTTCAGTGC	143
E19A3	tagcctaagaccggagctttcacTGACGTGCGAAGGCTGCCTTCAGTGC	144
E20A2	gatgctactggccgctgaagggtctCGATGCCCTCTGCGAAGTTGGGGTA	145
E20A3	tagcctaagaccggagctttcacCGATGCCCTCTGCGAAGTTGGGGTA	146

\*Minúscula, secuencia Abl; Mayúscula, secuencia Bcr; Subrayado, posición polimórfica

Tabla 5. Secuencias nucleotídicas incluidas en las dianas IVT Bcr-Abl

Fusión diana	Secuencia Bcr (posiciones de nucleótidos en NM_021574.2)	Secuencia Abl (posiciones de nucleótidos en NM_007313.2)
E1A2	1736-1875	576-715
E1A3	1736-1875	750-900
E6A2	2378-2517	576-715
E6A3	2378-2517	750-900
E12A2	3059-3198	576-715
E12A3	3059-3198	750-900
E13A2	3164-3303	576-715
E13A3	3164-3303	750-900
E14A2	3239-3378	576-715
E14A3	3239-3378	750-900
E19A2	3647-3786	576-715
E19A3	3647-3786	750-900
E20A2	3782-3921	576-715
E20A3	3782-3921	750-900

Tabla 6. Enlazadores de programación y enlazadores de detección para el ensayo de Bcr-Abl

Fusión	Secuencia (5'-> 3')*	SEQ ID NO:
Enlazadores de programación		
E1A2	GCGTCCCACAACGCTCGACCGGCGGAGGGGCGCCTTCCATGGAGACGCAG	147
E1A3	GCGTCCCACAACGCTCGACCGGCGGAGGGGCGCCTTCCATGGAGACGCAG	148
E6A2	GGACGCCGTCCGGTCTCACGTGGACCAACGACCAAGAAGTCTCTGGAAA	149
E6A3	GGACGCCGTCCGGTCTCACGTGGACCAACGACCAAGAAGTCTCTGGAAA	150
E12A2	GCAGCGCACGTGCTCAGCCGTAGTGAACATCCGGGAGCAGCAGAAGAAGT	151
E12A3	GCAGCGCACGTGCTCAGCCGTAGTGAACATCCGGGAGCAGCAGAAGAAGT	152
E13A2	CCACGTCCCTTCCCTAGAGACGCTTAATTCCGCTGACCATCAATAAGGAAG	153
E13A3	CCACGTCCCTTCCCTAGAGACGCTTAATTCCGCTGACCATCAACAAGGAAG	154
E14A2	TGGCTGTAGAACACGCGAGCGGTTCCGCACTGGATTTAAGCAGAGTTCAA	155
E14A3	TGGCTGTAGAACACGCGAGCGGTTCCGCACTGGATTTAAGCAGAGTTCAA	156
E19A2	CTGGCAGCCACGACGCGGAACGAGGCACTGAAGGCAGCCTTCGACGTCA	157
E19A3	CTGGCAGCCACGACGCGGAACGAGGCACTGAAGGCAGCCTTCGACGTCA	158
E20A2	GCGGACTGTGGTACCATGCCGACCGTACCCCAACTTCGCAGAGGGCATCG	159
E20A3	GCGGACTGTGGTACCATGCCGACCGTACCCCAACTTCGCAGAGGGCATCG	160
Enlazador de detección		
E1A2	AAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	161
E1A3	GTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	162
E6A2	AAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	163
E6A3	GTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	164
E12A2	AAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	165
E12A3	GTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	166
E13A2	AAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	167
E13A3	GTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	168
E14A2	AAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	169
E14A3	GTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	170.
E19A2	AAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	171
E19A3	GTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	172
E20A2	AAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	173
E20A3	GTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTG	174 .

5 Ejemplo 2

**Sondas de fusión de Bcr-Abl marcadas directamente**

Este ejemplo describe métodos ejemplares para detectar un gen de fusión de Bcr-Abl en una muestra que utiliza una sonda de fusión marcada directamente. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que también pueden usarse métodos que se desvían de estos métodos específicos para detectar con éxito la presencia de una fusión génica de Bcr-Abl en una muestra.

Se sintetiza una sonda de fusión se sintetiza que abarca el sitio de fusión de Bcr-Abl E1/A2, incluyendo cuatro nucleótidos de la secuencia Bcr y 40 nucleótidos de la secuencia Ab1 (Tabla 7). La sonda se marca con biotina en el extremo 5' o de aproximadamente uno a dos nucleótidos del extremo 5'.

Tabla 7. Fusiones de Bcr-Abl E1A2 y secuencias de la sonda de fusión de "solapamiento corto"

	Secuencia (5'-> 3')*	SEQ ID NO:
Punto de fusión E1A2	acgatggcgagggcgccctccatggagacgcagAAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGC ATCTGACTTTGAGCCTCA	175
Sonda de fusión	gcapAAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCA	176

\*Minúscula, secuencia Bcr; Mayúscula, secuencia Abl

5 Una muestra celular se lisa con tampón de lisis (por ejemplo como se ha descrito anteriormente) y la sonda (167 pM) se hibrida en la muestra lisada. La muestra se trata con S1 nucleasa para eliminar ácidos nucleicos no hibridados como se ha descrito anteriormente. El tratamiento de S1 nucleasa también elimina la porción no hibridada de la sonda de fusión hibridada en el ácido nucleico Abl de tipo silvestre, incluyendo la etiqueta de biotina (por ejemplo, véase la figura 2). La sonda de fusión restante, que se hibrida en el ácido nucleico de fusión de Bcr-Abl se detecta  
10 utilizando peroxidasa de avidina-rábano picante o avidina-ficoeritrina. La detección de la señal indica la presencia de una fusión génica de Bcr-Abl en la muestra.

### Ejemplo 3

#### 15 Detección de fusiones génicas de EML4-ALK utilizando sondas de fusión

Este ejemplo describe la detección de variantes de fusión de EML4-ALK con sondas de fusión.

Se añadieron variantes de fusión génica de EML4-ALK transcritas *in vitro* (IVT) a concentraciones finales de 167 pM  
20 de una o más sondas de fusión complementarias a las secuencias diana en la Tabla 8. La muestra se calienta a 95 °C durante 10-15 minutos y después se incuba a 60 °C durante 6-16 horas para la hibridación de la sonda de ARN. A la muestra se le añadió S1 nucleasa diluida 1:40 en tampón de S1 nucleasa (acetato sódico 0,25 M, pH 4,5, NaCl 1,4 M, ZnSO<sub>4</sub> 0,225 M, KATHON al 0,05 %). La muestra se incubó a 50 °C durante 60-90 minutos para digerir los ácidos nucleicos no unidos.

25

Tabla 8. Secuencias diana de la sonda de fusión de EML-ALK

Variante	Secuencia diana (5'-> 3')	SEQ ID NO:
EML4-ALK-v1	TAGAGCCCACACCTGGGAAAGGACCTAAAGTGTACCGCCGGAAGCACCA G	177
EML4-ALK-v2	CTAACTCGGGAGACTATGAAATATTGTACTIONGTACCGCCGGAAGCACCCAG	178
EML4-ALK-v3a	CAAGCATAAAGATGTCATCATCAACCAAGTGTACCGCCGGAAGCACCCAGG	179
EML4-ALK-v3b-3	TCAACTCGCGAAAAAACAGCCAAGTGTACCGCCGGAAGCACCCAGGAGC T	180
EML4-ALK-v4	CATGATCTGAATCCTGAAAGAGAAATAGATATGCTGGATGAGCCCTGA	181
EML4-ALK-v5a	AAAATCAGTCTCAAGTAAAGTGTACCGCCGGAAGCACCCAGGAGCTGCAA G	182
EML4-ALK-v5b-3	CTCAAGTAAAGTTTCAGAGCTCAGGGGAGGATATGGAGATCCAGGGAGG C	183
EML4-ALK-v6	AACAGCTCTCTGTGATGCGCTACTCAATAGTGTACCGCCGGAAGCACCCAG	184

Se preparó una ARRAYPLATE (HTG Molecular) que incluía enlazadores de programación que incluían una porción  
30 complementaria a una porción de la sonda de fusión en ubicaciones espacialmente distintas diluyendo una solución de lavado 20X (SSC 20 X, TWEEN-20 al 0,95 %, KATHON al 0,05 %) calentada a 50 °C en 1:20, añadiendo 250 µl por pocillo a la ARRAYPLATE, incubando durante 10-50 segundos y vaciando los pocillos. Esto se repitió seis ciclos. Después del último lavado, se añadieron 40 µl por pocillo de una solución de programación que incluía 5 nM de cada enlazador de programación y la placa se incubó a 60 °C durante 60-90 minutos y después se lavó.

35

Se preparó una placa de parada con 10 µl de solución de parada S1 (NaOH 1,6 N, EDTA 0,135 M, pH 8,0) y toda la

muestra se transfirió a la placa de parada tras la incubación de nucleasa. La placa de parada se incubó a 95 °C durante 15-20 minutos para inactivar la S1 nucleasa e hidrolizar el ARN unido. La placa se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se añadieron 10 µl de una solución de neutralización (HEPES 1 M, pH 7,5, SSC 6X, HCl 1,6 N) a la fase acuosa inferior de la placa de parada y se mezcló.

5

La solución de lavado se eliminó de la ARRAYPLATE y se transfirieron 60 µl de la fase acuosa inferior de la placa de parada a la ARRAYPLATE. Los 70 µl restantes de la fase oleosa superior de la placa de parada se transfirieron a la ARRAYPLATE y la placa se incubó a 50 °C durante 16-24 horas para permitir la hibridación de la sonda a la placa. Después, la ARRAYPLATE se lavó con una solución de lavado, se añadieron 40 µl de solución de enlazador de

10

detección (5 nM) y se incubó durante 60-90 minutos a 60 °C para permitir la hibridación del enlazador de detección. Tras el lavado, a la placa se le añadieron 40 µl de sonda de detección (5 nM) y se incubó durante 60-90 minutos a 50 °C. Tras el lavado, a la placa se le añaden 40 µl de una solución enzimática de detección y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. La placa se lavó y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 15-30 minutos. Después del lavado, se añadieron 50 µl de una solución luminiscente y se cubrieron con 100 µl de aceite de

15

formación de imágenes (Norpar 15 al 99,9 %, colorante Oil Red O al 0,1 %) y se formó por imágenes usando un dispositivo de formación de imagen OMX, OMX HD, CAPELLA o SUPERCAPPELLA.

Se realizaron curvas de valoración con una cantidad en aumento de ARNm de fusión IVT con cada sonda EML4-ALK. Los resultados para cada sonda se muestran en la figura 6A-H. Todas las sondas proporcionaron una detección sensible de ARNm IVT. Las sondas EML4-ALK-v2 (figura 6B), EML4-ALK-v3a (figura 6C), EML4-ALK-v4 (figura 6E) y EML4-ALK-v5a (figura 6F) mostraron todas una respuesta lineal sobre la curva de valoración. Las diferencias observadas en las intensidades de señal pueden deberse a diferencias en la eficiencia de la hibridación de las sondas en su secuencia de fusión diana, la calidad de las IVT, u otros factores.

20

## 25 Ejemplo 4

### Sondas flanqueantes ALK

Este ejemplo describe el diseño y el ensayo de las sondas ALK flanqueantes 5' y 3'.

30

Se utilizaron dos ARNm IVT en estos experimentos. Uno fue una IVT ALK de longitud completa generada a partir de un clon disponible en el mercado. La segunda IVT se diseñó para incluir únicamente las 16 secuencias diana (Tabla 9). Los experimentos se realizaron como se describió en el Ejemplo 3.

35

Tabla 9. Secuencias diana de las sondas ALK flanqueantes 5' y 3'

ID diana	Posición diana	Secuencia diana (5'-> 3')	SEQ ID NO:
Diana ALK 5' 1	56	GCGGTGGTAGCAGCTGGTACCTCCCGCCGCTCTGTTCGGAG GGTCGCGG	185
Diana ALK 5' 2	262	GAGCCGAGGCGCCGGTGAGAGCAAGGACGCTGCAAACCTTGCG CAGCGCGG	186
Diana ALK 5' 3	337	CAGCAGGCAGACAGTCCGAAGCCTTCCCGCAGCGGAGAGATA GCTTGAGG	187
Diana ALK 5' 4	595	CCAAGTCCACCTCCCTTCAACCATAGTAGTTCCTCTGTACC GAGCGCAG	188
Diana ALK 5' 5	1086	GCTACTCGCGCCTGCAGAGGAAGAGTCTGGCAGTTGACTTCG TGGTGCCC	189
Diana ALK 5' 6	1349	CGCAAGCTCCGGCGTGCCAAGCAGTTGGTGTGGAGCTGGGC GAGGAGGC	190
Diana ALK 5' 7	1445	CTGCTCCAGTTCAATCTCAGCGAGCTGTTGAGTTGGTGGATT CGCCAAGG	191
Diana ALK 5' 8	1528	GAAGAAGGCGTCGGAAGTGGGCAGAGAGGGAAGGCTGTCCGC GGCAATTC	192
Diana ALK 3' 1	4233	CCAAGTACTGCTTTGCTGGCAAGACCTCCTCCATCAGTGACC TGAAGGAG	193

Diana ALK 3' 2	4578	GAGAGACCCGCCCTCGCCCGAGCCAGCCCTCCTCCCTGGCCA TGCTGGAC	194
Diana ALK 3' 3	4723	GACCTGTCCAGGCCCTGGAAGAGTGGCCAAGATTGGAGACTT CGGGATGG	195
Diana ALK 3' 4	5125	TGTAATCAACACCGCTTTGCCGATAGAATATGGTCCACTTGT GGAAGAGG	196
Diana ALK 3' 5	5394	CTCAGTCCAACCCTCCTTCGGAGTTGCACAAGGTCCACGGAT CCAGAAAC	197
Diana ALK 3' 6	5557	GGAGGGAAGCTGTACTGTCCCACCTAACGTTGCAACTGGGAG ACTTCCGG	198
Diana ALK 3' 7	5611	CTCACTGCTCCTAGAGCCCTCTTCGCTGACTGCCAATATGAA GGAGGTAC	199
Diana ALK 3' 8	5665	GTTCAGGCTACGTCACTTCCCTTGTGGGAATGTCAATTACGG CTACCAGC	200

Se seleccionaron ocho secuencias diana diferentes en la porción 5' del gen ALK que no está implicado en la construcción de fusión de EML y las sondas se diseñaron. También se seleccionaron ocho secuencias diana diferentes en la porción 3' del gen ALK que son parte de la construcción de fusión de EML y las sondas se diseñaron.

5 Cada sonda se ensayó frente a la IVT ALK de longitud completa (figura 7A) y la ALK IVT truncada (figura 7B). En base a estos resultados, se seleccionaron las siguientes secuencias diana para la detección de fusiones génicas de ALK: Diana ALK 5' 3, diana ALK 5' 5, diana ALK 5' 7, diana ALK 5' 8, diana ALK 3' 5, diana ALK 3' 6, diana ALK 3' 7 y diana ALK 3' 8.

## 10 Ejemplo 5

### Métodos para detectar una fusión génica utilizando relaciones de sonda flanqueante

Este ejemplo describe métodos ejemplares de detección de la presencia de una fusión génica en una muestra utilizando sondas que flanquean la región de fusión. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos también pueden usarse para detectar con éxito la presencia de una fusión génica en una muestra.

Una muestra, tal como una muestra tumoral o una muestra sanguínea se recoge de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una fusión génica diana. Las células en la muestra se lisan con tampón de lisis (descrito anteriormente) a 60 °C durante 6-16 horas en presencia de una sonda 5' flanqueante y una sonda 3' flanqueante para uno de los genes en la fusión génica diana (por ejemplo, las sondas flanqueantes mostradas en la Tabla 3 o la Tabla 8). La mezcla se trata con S1 nucleasa (dilución 1:40 en tampón de S1 nucleasa) a 50 °C durante 60-90 minutos para digerir el ARN no hibridado y las sondas. La reacción de nucleasa se detiene (NaOH 1,6 N, EDTA 0,135 M pH 8,0) durante 15-20 minutos a 95 °C y después la mezcla se añade a una placa que incluye enlazadores de programación específicos para las sondas flanqueantes y se incuba a 50 °C durante 16-24 horas. Después, se añaden enlazadores de detección y se incuban a 60 °C durante 60-90 minutos. La sonda de detección se añade y se incuban a 50 °C durante 60-90 minutos, después la solución de detección se añade y se incuban a 37 °C durante 60 minutos. La solución luminiscente se añade y la placa se somete a formación de imágenes para detectar la sonda que se une a la placa.

Se calcula una relación de la intensidad de señal de la sonda 5' flanqueante con respecto a la sonda 3' flanqueante. Si la relación no es estadísticamente diferente de uno, entonces la fusión génica diana no está presente en la muestra. Si las sondas flanqueantes son complementarias al gen 5' en la fusión génica diana, entonces la fusión génica está presente en la muestra si la relación es estadísticamente significativamente mayor de uno. Si las sondas flanqueantes son complementarias al gen 3' en la fusión génica diana, entonces la fusión génica está presente en la muestra si la relación es estadísticamente significativamente menos de uno.

**Ejemplo 6****Método de micromatriz para detectar fusiones génicas**

5 Este ejemplo describe métodos ejemplares para detectar una fusión génica en una muestra que incluyen utilizar una micromatriz. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que también pueden usarse métodos que se desvían de estos métodos específicos para detectar con éxito la presencia una fusión génica en una muestra.

10 El tampón de lisis, aceite mineral (para impedir la evaporación) y una concentración final de 167 pM de una o más sondas de fusión y/o sondas flanqueantes se añaden a una muestra que incluye células. La muestra se calienta a 95 °C durante 10-15 minutos y después se incuba a 60 °C durante 6-16 horas para la hibridación de la sonda de ARN. Si la muestra es un tejido FFPE o células, la muestra se trata con 1 mg/ml de proteinasa K a 50 °C antes de la incubación a 60 °C. La S1 nucleasa se diluye 1:40 en tampón S1 nucleasa (acetato sódico 0,25 M, pH 4,5, NaCl 1,4 M, ZnSO<sub>4</sub> 0,225 M, KATHON al 0,05 %) y se añade a la muestra. La muestra se incuba a 50 °C durante 60-15 90 minutos para digerir ácidos nucleicos no unidos.

20 Se prepara una ARRAYPLATE (HTG Molecular) que incluye enlazadores de programación que incluyen una porción complementaria a una porción de la sonda de fusión en ubicaciones especialmente distintas diluyendo una solución de lavado 20 X (SSC 20X, TWEEN-20 al 0,95 %, KATHON al 0,05 %) calentada a 50 °C en 1:20, añadiendo 250 µl por pocillo a la ARRAYPLATE, incubando durante 10-50 segundos y vaciando los pocillos. Esto se repite seis ciclos. Después del último lavado, se añaden 40 µl por pocillo de solución de programación que incluye 5 nM de cada enlazador de programación y la placa se incuba a 60 °C durante 60-90 minutos y después se lavó.

25 Se prepara una placa de parada con 10 µl de solución de parada S1 (NaOH 1,6 N, EDTA 0,135 M, pH 8,0) y toda la muestra (120 µl) se transfiere a la placa de parada tras la incubación de nucleasa. La placa de parada se incuba a 95 °C durante 15-20 minutos para inactivar la S1 nucleasa e hidrolizar ARN unido. La placa se deja enfriar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se añaden 10 µl de solución de neutralización (HEPES 1 M, pH 7,5, SSC 6 x, HCl 1,6 N) a la fase acuosa inferior de la placa de parada y se mezclan.

30 La solución de lavado se elimina del ARRAYPLATE y se transfieren 60 µl de la fase acuosa inferior de la placa de parada a la ARRAYPLATE. Los 70 µl restantes de la fase oleosa superior de la placa de parada se transfieren a la ARRAYPLATE y la placa se incuba a 50 °C durante 16-24 horas para permitir la hibridación de la sonda en la placa. Después, la ARRAYPLATE se lava con una solución de lavado, se añaden 40 µl de una solución de enlazador de detección (5 nM) y se incuban durante 60-90 minutos a 60 °C para permitir la hibridación del enlazador de detección.

35 Tras el lavado, a la placa se le añaden 40 µl de sonda de detección (5 nM) y se incuban durante 60-90 minutos a 50 °C. Tras el lavado, a la placa se le añaden 40 µl de una solución enzimática de detección y se incuban a 37 °C durante 60 minutos. La placa se lava y se incuba a temperatura ambiente con agitación durante 15-30 minutos. Después del lavado, se añaden 50 µl de una solución luminiscente y se cubren con 100 µl de aceite para formación de imágenes (Norpar 15 al 99,9 %, colorante Oil Red O al 0,1 %) y se sometieron a formación de imágenes usando un dispositivo de formación de imágenes OMIX, OMIX HD, CAPELLA o SUPERCAPELLA. La intensidad de señal indica la presencia y cantidad de hibridación de sonda de fusión, indicando la presencia de la fusión génica diana (si se usa una sonda de fusión), o la presencia de longitud completa y/o un gen (si se usan sondas flanqueantes).

## Listado de secuencias

45 <110> HTG Molecular Diagnostics, Inc.  
Seligmann, Bruce  
Kerns, BJ  
Luecke, John

50 Rounseville, Matt  
Botros, Ihab  
Schwartz, Mark

<120> Métodos para detectar fusiones génicas

55 <130> 8736-87469-02

<150> US 61/504.040

<151> 01-07-2011.

<160> 200

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

15 gggaccgagg gtcatgcttt cagaacg 27

<210> 2  
 <211> 24  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 2

gcttgagat ctcatgttt gtgc 24

30 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 3

40 gaaatgcttc ttgcttcacc ctagc 26

<210> 4  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 4

ctaaactgg caccaagat gagatag 29

<210> 5  
 55 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 5  
 5 gccgcgcggc tccagggtc c 21  
 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 6  
 gcgagcccct tgcagctgag gatt 24  
 <210> 7  
 20 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 7  
 cgagcccctt gcagctgagg attt 24  
 30 <210> 8  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 8  
 40 gagccccttg cagctgagga ttg 24  
 <210> 9  
 <211> 24  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 50 <400> 9  
 agccccttgc agctgaggat ttgt 24  
 55 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 10  
 5 gcccccttgca gctgaggatt tgtg 24  
  
 <210> 11  
 <211> 24  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 11  
  
 ccccttgca gctgaggatt gtga 24  
 20 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 12  
 30 ccctgcagc tgaggattg tgac 24  
  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 40 <400> 13  
  
 cgagcccctt gcagtcctgg tacc 24  
  
 <210> 14  
 45 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 14  
  
 gagccccttg cagtcctgg acct 24  
 55 <210> 15  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 5 <400> 15  
 agccccttgc agtcttgga cctg 24  
 <210> 16  
 10 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 16  
 gcccttgca gtcctgtac ctgg 24  
 20 <210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 17  
 30 ccccttgca gtcctgtacc tggg 24  
 <210> 18  
 <211> 24  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 40 <400> 18  
 gcgagcccct tgcagcctaa cggc 24  
 45 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 19  
 55 cgagcccctt gcagcctaac ggca 24  
 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 5  
 <400> 20  
 gagccccttg cagcctaacg gcag 24  
 10 <210> 21  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 21  
 20 agccccttgc agcctaacgg cagt 24  
 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 30 <400> 22  
 gcccccttgca gcctaacggc agtg 24  
 <210> 23  
 35 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 23  
 ccccttgca cctaacggca gtgg 24  
 45 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 24  
 55 tggagcgcg caggttattc cagg 24  
 <210> 25  
 <211> 24

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 25  
  
 ggagcgcggc aggtattcc agga 24  
 10  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 26  
 20  
 gagcgcggca ggtattcca ggat 24  
  
 <210> 27  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 30  
 <400> 27  
  
 ttgaactcag tctcgcccc cgct 24  
 35 <210> 28  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 28  
 45 tgaactcagt ctcgcccc gctt 24  
  
 <210> 29  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55 <400> 29  
  
 gaactcagtc tcggccccg ctg 24  
  
 <210> 30

<211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 30  
 10 tacgggcagc agaacccttc ttat 24  
 <210> 31  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 31  
 acgggcagca gaacccttct tatg 24  
 <210> 32  
 25 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 32  
 cgggcagcag aacccttct atga 24  
 35 <210> 33  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 33  
 45 atagagcggc tccagcgtt ccctgcggcg taggaggcgg tccagactat 50  
 <210> 34  
 <211> 50  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55 <400> 34  
 gcggccggca cctcattcat ttctaccggt ctctagtagt gcagcttcgg 50

<210> 35  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 35  
 10 caaggcttcg ccgtcatcga ggccattcc agcgactgt cgcacgctt 50  
  
 <210> 36  
 <211> 50  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20  
 <400> 36  
  
 gtgctggcac caactcgga actggccaa caggtgcagc aagtagctg 50  
  
 25 <210> 37  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 37  
  
 35 caatctgaga agaacaacct acctgtcct tgatgaagca gatagaatg 50  
  
 <210> 38  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 45 <400> 38  
  
 gcaattaatc ccaagttgct tcagttggtc gaagacagag gttcaggtcg 50  
  
 <210> 39  
 50 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 55 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 39  
  
 gtcacattct cctgccctgg cgctgacaag ggtccagcct ccgatgacct 50

# ES 2 578 370 T3

<210> 40  
<211> 50  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 40

gtgacacctg catgatgaat gtcacaagc gctgcgtgat gaattgtccc 50

<210> 41  
15 <211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 41

ccgcatctac atccaggccc acatcgacag ggacgtcctc attgtcctcg 50

25 <210> 42  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 42

35 gaaagacaag aggcttgcaa ggaccctgaa gaggtcggag catcatacag 50

<210> 43  
<211> 50  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 43

ctcatgagat ggtatcagcc acccaatgac tggcgtatct tggctctgtg 50

50 <210> 44  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 44

gagagacacc tccaacttcg acaaagagtt caccagacag cctgtggaac 50

<210> 45  
 <211> 50  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 45

cttcagttg cttgctgtt agcctgttg accttcgagc ctgctgctc 50

15 <210> 46  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 46

25 cacaggactc ggccacctgc ccttctgca cggactggcc agctcaaga 49

<210> 47  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 47

gtctgggatg ggagccacag gcacctgag gacctccctg gaccaagcc 50

<210> 48  
 40 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 45 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 48

ggaggcaggt cgggaggaag aagaggtgga ggtgtggtg tggaggagag 50

50 <210> 49  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 49

ES 2 578 370 T3

cctgctgga ccctgttggg ggctgaagac ctctggccag ctggcttccg 50

<210> 50  
 5 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 50

cagcagaact aggttctgag ccacgggtca gggtgccacc ctgctgctgg 50

15 <210> 51  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 51

25 caagctggcc gaggttgcag tccatgagct gggaaaggag gcagtgctct 50

<210> 52  
 <211> 50  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 52

ttgggagaaa cagcagaggc ctcaagttc gggctgaagc caacagagtc 50

40 <210> 53  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 53

50 gtttcgggct gaagccaaca gagtccaac cagtgggcgt atccaagat 50

<210> 54  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 54

ctgcagccac tcagtagtct tctgtggtca cagaagtaaa cattgttggc 50

5 <210> 55  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 55

15 gcaggcttac caatttccat agtctcatga ggccgaaatg aattacaatg 50

<210> 56  
 <211> 50  
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 56

ccactagga atctccagat gaactattaa tgcactgtct tatgcctctc 50

<210> 57

30 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 57

tttatgacgg gcccggtgct gaagggcagg gaacaacttg atgggtctac 50

40 <210> 58  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 58

50 gaaggaggat gttcccatct tggcagtcct tatgcggata gagatgtctg 50

<210> 59  
 <211> 50

55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 59

gccagaacca tgccaaatat ggtctgtga ctcaggatcc gttctctgcg 50

5 <210> 60  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 60

15 caagggtaa agtgggaaac caggagctaa cggctcagt ggagaacgtg 50

<210> 61  
<211> 50  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 61

gtccttgatg tgcagctggc attccttca cttctctca gccgagctc 50

30 <210> 62  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 62

40 caccctatga cattggtgt cctgatcaag aattggtgt ggacgttggc 50

<210> 63  
<211> 50  
<212> ADN  
45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 63

ccaaccggc cctggattcc actccggtc caccatcgct gctggagcag 50

<210> 64  
55 <211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 578 370 T3

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 64  
 5 ctttctcatt cgagctcaag gactgccctg gtcactgact atggaagatg 50  
 <210> 65  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 65  
 tgcagaaagc cttagagaag caccgcatgt acatgggcca gcggtatgtg 50  
 <210> 66  
 20 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 66  
 tttagcctag ctgctgctta cggagtgcaa gggagaactc tgagaagcag 50  
 30 <210> 67  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 67  
 40 gagccatgac tgttgctgca ctccagcctg agtgacagag tgagaccctg 50  
 <210> 68  
 <211> 50  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 50 <400> 68  
 gagatggagt ctgtatcgc ccaggctaga gtgcagtggc ctggtcttg 50  
 55 <210> 69  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 69  
 5 gctggctctg ctgctctcgc gatattgcg cgagcctgct tccttcttc 50  
  
 <210> 70  
 <211> 50  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 70  
  
 ctgctctcgc gatattgcg cgagcctgct tccttcttc ctccttgcc 50  
 20 <210> 71  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 71  
 30 tatttgcgcg agcctgcttc ctcttctct ccctggccag tccgctgctc 50  
  
 <210> 72  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 40 <400> 72  
  
 gactacctgc cgaggatctt gtgattctgg agaactaggc cgaaactcag 50  
 45 <210> 73  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 73  
  
 atcttgcttc tccaccctta gtggtagctt atgcatagc aggcacagtg 50  
 55 <210> 74  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 74  
 ggtccctcc acatatgaag atggacatg gcaggataca actgattgtg 50

<210> 75  
 10 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 75  
 gtgtgtcga ctgacctgc taattctg ttctggaatc gagagaagac 50

20 <210> 76  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 76  
 30 ctccagggtt caacccttg gctggtcag gaaagcaaacc accacaagcc 50

<210> 77  
 <211> 50  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <400> 77  
 ggtattcgc atgcacgagt tgtatctca acttctgagg aggaggaagc 50

45 <210> 78  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 78  
 55 ctgtataca tgtgacagt actttgtgct gaaattcag ctattccaga 50

<210> 79  
 <211> 50  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 79

ttgttctta cagaaagtgt tgattgccag gttgcttata gcactttaag 50

10 <210> 80  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 80

20 cttcgtctt ccacagcagt attattgtct ttgtggagt gactaatgat 50

<210> 81  
<211> 50  
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 81

gagggtggcgg cgagaagatg gcgactcga acaatccgcg gaaattcagc 50

<210> 82

35 <211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 82

ggcgagaaga tggcgacttc gaacaatccg cggaattca gcgagaagat 50

45 <210> 83  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 83

55 tggcgacttc gaacaatccg cggaattca gcgagaagat cgcgctgcac 50

<210> 84  
<211> 50

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 84  
  
 gctcccatca ccttactggt gtcccgatgg agccgtctca gaggccgagg 50  
 10  
 <210> 85  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 85  
 20  
 ccaagtgctc tggccctgct ggccctggc ctccagggt cctggccagg 50  
  
 <210> 86  
 <211> 50  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 30  
 <400> 86  
  
 ggtgctggct ctgatgattc cagagcctgt atccaccttc tgggctcctg 50  
 35 <210> 87  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 87  
 45 ctccctctcc tatcgagca caatgaaagc ctgtgatcg ccgtgactcc 50  
  
 <210> 88  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55 <400> 88  
  
 cagacttgcc tgcaatagcc agcagtagcc tctttccacc tcaccatccc 50  
  
 <210> 89

<211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 89  
 10 caccacctga gctgtgaagg acgatatgaa cgaggtagg ccgagagctc 50  
 <210> 90  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 90  
 caacaaactc ctaattgc tctaatagat aggtatggtt taatcttcc 50  
 <210> 91  
 25 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 91  
 ctgacaggat agattgaaat gttataggtt tggttggagt aaccaaacag 50  
 35 <210> 92  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 92  
 45 ttcccacaa tcctctactt cagtgggatg ctgtgtctag tgattaaaca 50  
 <210> 93  
 <211> 50  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55 <400> 93  
 ctctccgtg acctcctct cctcttctc ctgagaaact tcgcccagc 50

<210> 94  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 94  
 10 cccggcacag catatatagc agtgacgagg atgatgagga cttgagatg 50  
  
 <210> 95  
 <211> 50  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20  
 <400> 95  
  
 tgtgtgacca tgactatgat gggctgctc ccaagtctgg aaagcgtcac 50  
  
 25 <210> 96  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 96  
  
 35 gggagacaga aactgtggtt gatagccagt cactgcctta agaacatttg 50  
  
 <210> 97  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 45 <400> 97  
  
 gatagccagt cactgcctta agaacatttg atgcaagatg gccagcactg 50  
  
 <210> 98  
 50 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 55 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 98  
  
 agccagtcac tgccctaaga acatttgatg caagatggcc agcactgaac 50

<210> 99  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 10 <400> 99  
  
 gcacgccgag tgaactgaa tctttggcta ttaaggagg actgggttg 50  
  
 <210> 100  
 15 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 100  
  
 cattcatcga ggcacttctt ccacatgtcc gtgcaattgc ctatactgg 50  
 25  
 <210> 101  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 101  
 35  
 ccttgccaaa ctgcgcaaag atattcgcca ggagtatcga gaggactttg 50  
  
 <210> 102  
 <211> 50  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 45  
 <400> 102  
  
 gcatcagcca aactcattgc catgacaact cttgtactg tgtccgtgcc 50  
  
 50 <210> 103  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 103

gtacaactgt aggtgacgag tagtcagtta ttgcttgcta gctacacacc 50

<210> 104  
 <211> 50  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 104

cagcctatac tgctagcagc tgctcatact gcagtcaatt actggaagcg 50

15 <210> 105  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 105

25 cagcggacgg aaccattcca aacagcctag tctcgtgctg agagcctctc 50

<210> 106  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 106

gtgtcacgct gggcgctctt tagagaggac tgggacaaga gttgcggacg 50

<210> 107  
 40 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 45 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 107

ggcggacacc gtcaggagcg cagagatcgg ccctactaga tgcagagacc 50

50 <210> 108  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 108

tgtgagcatg ctcagtatca ttgtggagaa ccaagagggc ctcttaactg 50

<210> 109  
 5 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 109

gatatcattgt ggagaaccaa gagggcctct taactgtaac aatgttcattg 50

15 <210> 110  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 110

25 gtttcatccg gtaactgct tctttcgctc cgctacaaca acaaactgctc 50

<210> 111  
 <211> 50  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 111

gggactatta aggaggctct gtcggtggtg agcgacgacc agtccctctt 50

40 <210> 112  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 112

50 gcaggagtgg atcaatcagc cagtgagggt caacgtcaag cgggagtatg 50

<210> 113  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 113  
cttcttaggg taacactaag taccttctag acaacatgtc tacctaaatg 50

5 <210> 114  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 114

15 ggtaacact aagtaccttc tagacaacat gtctacctaa atgaaatggg 50  
<210> 115  
<211> 50  
<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 115  
caacatgtct acctaaatga aatgggatgt gtttcggaac attgtctcc 50  
<210> 116

30 <211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

35 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 116  
gagtaggcgc gagctaagca ggaggcggag gcggaggcgg agggcgaggg 50

40 <210> 117  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 117

50 gcgcggcagg tcatattgaa cattccagat acctatcatt actcgatgct 50  
<210> 118  
<211> 50

55 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 118

5 cactactcta ccatggttct gcctcctggc caagcaggct ggttgcaag 50

<210> 119  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 119

15 gaatgattct acagctagga cttaccttg aatggaaag tcatgcaatc 50

<210> 120  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 120

ctgtagagag cagcattccc agggaccttg gaaacagttg gcactgtaag 50

30 <210> 121  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 121

40 ccggccgtgc ggccggaggg agcggccgga tggagcggag gatgaaagcc 50

<210> 122  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 122

ggatgaaagc cggatacttg gaccagcaag tgcctacac ctcagcagc 50

<210> 123  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 123

5 ccttcagcag caaatcgccc ggaaatggga gcttgcgca agcgctgatc 50

<210> 124  
<211> 50  
<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 124

ctttctctg cccttcta ggcccaggcc tgggttgta ctccacctc 50

<210> 125  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 125

ctaggcccag gcctggggtt gtactccac ctccaccaca tctgccagac 50

30 <210> 126  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 126

40 gggttgtac ttccactcc accacatctg ccagacctta ataaaggccc 50

<210> 127  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 127

gggagagtgt gcaagagatc gctgcgggac aggttctag agatcgctcc 50

55 <210> 128  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

# ES 2 578 370 T3

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 128  
 5      cccgagggac atgagagaag aggagcggcg ctcaggttat tccaggatct                      50  
  
 <210> 129  
 <211> 50  
 10 <212> ADN  
     <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15  
 <400> 129  
  
     gagcggcgct caggtattc caggatcttt ggagaccga ggaagccgt                      50  
 20 <210> 130  
     <211> 50  
     <212> ADN  
     <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
     <223> Oligonucleótido sintético  
  
     <400> 130  
 30 gcactgtggc ttggattca ctagccctga gcctgatgtt gctggctatc                      50  
  
     <210> 131  
     <211> 50  
     <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
     <220>  
     <223> Oligonucleótido sintético  
 40 <400> 131  
  
     ccttctgcac agatgtggca cctgcaacc aggagcagga gccggaggag                      50  
 45 <210> 132  
     <211> 50  
     <212> ADN  
     <213> Secuencia Artificial  
  
     <220>  
 50 <223> Oligonucleótido sintético  
  
     <400> 132  
  
     cagcaggtgc agcagagatg gctacagctc aggagctggg aaggtgatgg                      50  
 55 <210> 133  
     <211> 50  
     <212> ADN  
     <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 5 <400> 133  
 gatgctactg gccgctgaag ggcttctgcg tctccatgga aggcgccctc 50  
 <210> 134  
 10 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 134  
 tagcctaaga cccggagctt ttcacctgcg tctccatgga aggcgccctc 50  
 20 <210> 135  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 135  
 30 gatgctactg gccgctgaag ggctttttc cagagagttc ttggtcgttg g 51  
 <210> 136  
 <211> 50  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 40 <400> 136  
 tagcctaaga cccggagctt ttcactttcc agagagtctc ttggtcgttgg 50  
 45 <210> 137  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 137  
 55 gatgctactg gccgctgaag ggcttacttc tctgctgct cccgatggtt 50  
 <210> 138  
 <211> 50  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 138

tagcctaaga cccggagctt ttcacacttc ttctgctgct cccggatgt 50

10 <210> 139  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 139

20 gatgctactg gccgctgaag ggcttctcc ttagttgatg gtcagcggaa t 51

<210> 140  
<211> 51  
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 140

tagcctaaga cccggagctt ttcaccttc ttagttgatg gtcagcggaa t 51

<210> 141

35 <211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 141

gatgctactg gccgctgaag ggctttgaa ctctgcttaa atccagtggc 50

45 <210> 142  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 142

55 tagcctaaga cccggagctt ttcactgaa ctctgcttaa atccagtggc 50

<210> 143  
<211> 50

ES 2 578 370 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 143  
  
 gatgctactg gccgctgaag ggcttgacg tcgaaggctg ccttcagtgc 50  
 10  
 <210> 144  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 144  
 20  
 tagcctaaga cccggagctt ttactgacg tcgaaggctg ccttcagtgc 50  
  
 <210> 145  
 <211> 50  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 30  
 <400> 145  
  
 gatgctactg gccgctgaag ggcttcgatg ccctctgcga agttggggta 50  
 35 <210> 146  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 146  
 45 tagcctaaga cccggagctt ttaccgatg ccctctgcga agttggggta 50  
  
 <210> 147  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55 <400> 147  
  
 gcgctccac aacgctcgac cggcggaggc gccttccat ggagacgcag 50  
  
 <210> 148

<211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 148  
 10 gcgctccac aacgctcgac cggcggaggg cgccttccat ggagacgcag 50  
 <210> 149  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 149  
 ggacgccgtc cgtcctcac gtggaccaac gaccaagaac tctctggaaa 50  
 <210> 150  
 25 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 150  
 ggacgccgtc cgtcctcac gtggaccaac gaccaagaac tctctggaaa 50  
 35 <210> 151  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 151  
 45 gcagcgcacg tgctcagccg tagtgaacat ccgggagcag cagaagaagt 50  
 <210> 152  
 <211> 50  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55 <400> 152  
 gcagcgcacg tgctcagccg tagtgaacat ccgggagcag cagaagaagt 50

# ES 2 578 370 T3

<210> 153  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 153  
 10 ccacgtccct tcctagagac gcttaattcc gctgaccatc aataaggaag 50  
  
 <210> 154  
 <211> 50  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20  
 <400> 154  
  
 ccacgtccct tcctagagac gcttaattcc gctgaccatc aacaaggaag 50  
  
 25 <210> 155  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 155  
  
 35 tggctgtaga acacgcgagc ggtcgccac tggatttaag cagagttaa 50  
  
 <210> 156  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 45 <400> 156  
  
 tggctgtaga acacgcgagc ggtcgccac tggatttaag cagagttaa 50  
  
 <210> 157  
 50 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 55 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 157  
  
 ctggcagcca cggacgcgga acgaggcact gaaggcagcc ttcgacgtca 50

<210> 158  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 10 <400> 158  
  
 ctggcagcca cggacgcgga acgaggcact gaaggcagcc ttcgacgtca 50  
  
 <210> 159  
 15 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 159  
  
 gcggactgtg gtaccatgcc gaccgtaccc caacttcgca gagggcatcg 50  
 25  
 <210> 160  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 160  
 35  
 gcggactgtg gtaccatgcc gaccgtaccc caacttcgca gagggcatcg 50  
  
 <210> 161  
 <211> 50  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 45  
 <400> 161  
  
 aagccctca gcggccagta gcatctgctc tccttactg tttggaggtg 50  
  
 50 <210> 162  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 162

ES 2 578 370 T3

gtgaaaagct cgggtctta ggctatgctc tcctcactg tttggagtg 50

<210> 163  
 <211> 50  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10  
 <400> 163

aagccctca gcgccagta gcatctgctc tcctcactg tttggagtg 50

15 <210> 164  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 164

25 gtgaaaagct cgggtctta ggctatgctc tcctcactg tttggagtg 50

<210> 165  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 165

aagccctca gcgccagta gcatctgctc tcctcactg tttggagtg 50

<210> 166  
 40 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 45 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 166

gtgaaaagct cgggtctta ggctatgctc tcctcactg tttggagtg 50

50 <210> 167  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 167

aagccctca gcgccagta gcatctgctc tccttactg tttggagtg 50

<210> 168  
 5 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 168

gtgaaaagct cgggtctta ggctatgctc tccttactg tttggagtg 50

15 <210> 169  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 169

25 aagccctca gcgccagta gcatctgctc tccttactg tttggagtg 50

<210> 170  
 <211> 50  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 170

gtgaaaagct cgggtctta ggctatgctc tccttactg tttggagtg 50

40 <210> 171  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 171

50 aagccctca gcgccagta gcatctgctc tccttactg tttggagtg 50

<210> 172  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 172

gtgaaaagct ccgggtcta ggctatgctc tcctcactg tttggaggtg 50

5 <210> 173  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 173

15 aagccctca gcggccagta gcactgctc tcctcactg tttggaggtg 50

<210> 174  
 <211> 50  
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 174

gtgaaaagct ccgggtcta ggctatgctc tcctcactg tttggaggtg 50

<210> 175

30 <211> 73  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 175

acgatggcga gggcgcttc catggagacg cagaagcct tcagcgcca gtagcatctg 60

40 actttgagcc tca 73

<210> 176  
 <211> 44

45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 176

gcagaagccc ttcagcgcc agtagcatct gactttgagc ctca 44

55 <210> 177  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 177  
 5 tagagccac acctgggaaa ggacctaaag tgtaccgccg gaagcaccag 50  
  
 <210> 178  
 <211> 50  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 178  
  
 ctaactcggg agactatgaa atattgtact tgtaccgccg gaagcaccag 50  
  
 20 <210> 179  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 179  
  
 30 caagcataaa gatgtcatca tcaaccaagt gtaccgccgg aagcaccagg 50  
  
 <210> 180  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 40 <400> 180  
  
 tcaactcgcg aaaaaaacag ccaagtgtac cgccggaagc accaggagct 50  
  
 <210> 181  
 45 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 181  
  
 catgatctga atcctgaaag agaaatagag atatgctgga tgagccctga 50  
 55 <210> 182  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 182  
 aaaatcagtc tcaagtaaag tgtaccgccg gaagcaccag gagctgcaag 50

<210> 183  
 10 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 183  
 ctcaagtaa ggttcagagc tcaggggagg atatggagat ccagggaggc 50

20 <210> 184  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 184  
 30 aacagctctc tgtgatgcg tactcaatag tgtaccgccg gaagcaccag 50

<210> 185  
 <211> 50  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <400> 185  
 gcggtggtag cagctgttac ctccgccgc ctctgttcgg agggtcgcgg 50

45 <210> 186  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 186  
 55 gagccgaggc gccggtgaga gcaaggacgc tgcaaactg cgcagcgcg 50

<210> 187  
 <211> 50  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 187

cagcaggcag acagtccgaa gcctcccg agcggagaga tagctgagg 50

10 <210> 188  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 188

20 ccaactgccca cctccctca accatagtag ttctctgta ccgagcgag 50

<210> 189  
<211> 50  
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 189

gctactcgcg cctgcagagg aagagtctgg cagttgactt cgtggtgccc 50

<210> 190

35 <211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 190

cgcaagctcc ggcgtgcca gacagttggtg ctggagctgg gcgaggaggc 50

45 <210> 191  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 191

55 ctgctccagt tcaatctcag cgagctgttc agttggtgga ttcgccaagg 50

<210> 192  
<211> 50

# ES 2 578 370 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 192

gaagaaggcg tcggaagtgg gcagagaggg aaggctgtcc gcggaattc 50

10 <210> 193  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 193

20 ccaactactg cttgctggc aagacctct ccatcagtga cctgaaggag 50

<210> 194  
 <211> 50

25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 194

gagagaccgg ccctgccccg agccagccct cctccctggc catgctggac 50

35 <210> 195  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 195

45 gacctgtcca ggccctgga gagtggccaa gattggagac ttcgggatgg 50

<210> 196  
 <211> 50  
 <212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 196

tgtaatcaac accgcttgc cgatagaata tggccactt gtggaagagg 50

<210> 197

<211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 197

10 ctcagtccaa ccctcctcg gagtgcaca aggtccacgg atccagaaac 50  
 <210> 198  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 198  
 ggaggggaagc tgtactgtcc cacctaacgt tgcaactggg agactccgg 50  
 <210> 199

25 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 199

ctcactgctc ctgagccct cttcgctgac tgccaatag aaggaggtac 50  
 35 <210> 200  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 200

45 gttcaggcta cgtcactcc cttgtgggaa tgcaattac ggctaccagc 50

**REIVINDICACIONES**

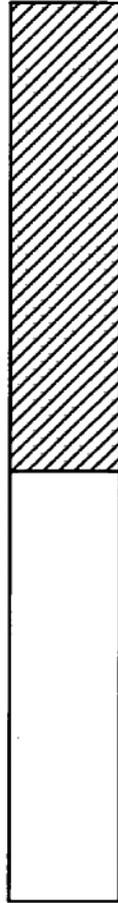
1. Un método para detectar la presencia de una fusión génica en una muestra aislada obtenida de un sujeto que comprende:
- 5 poner en contacto la muestra con una primera sonda complementaria con un primer ácido nucleico 5' con respecto a un punto de fusión entre el primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico, en condiciones suficientes para que la primera sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico;
- 10 poner en contacto la muestra con una segunda sonda complementaria con el primer ácido nucleico 3' con respecto al punto de fusión entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico en condiciones suficientes para que la segunda sonda hibride especialmente en el primer ácido nucleico;
- poner en contacto la muestra con una nucleasa específica para ácidos nucleicos monocatenarios;
- 15 detectar la presencia de la primera sonda y la segunda sonda;
- determina una relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda; y
- 20 detectar la presencia de fusión génica si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es significativamente diferente de 1.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la fusión génica no comprende una porción 3' del primer ácido nucleico si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es mayor de aproximadamente
- 25 uno.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la fusión génica no comprende una porción 5' del primer ácido nucleico si la relación de la primera sonda con respecto a la segunda sonda es menos de aproximadamente
- 30 uno.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la detección de la primera sonda y la segunda sonda comprende poner en contacto la muestra con una primera sonda de detección que es capaz de hibridar con la primera sonda y una segunda sonda de detección que es capaz de hibridar con la segunda sonda.
- 35 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la primera sonda comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NO: 187, 189, 191 o 192 o el complemento de las mismas, la segunda sonda comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en una de las SEQ ID NO: 197-200 o el complemento de las mismas, o una combinación de dos o más de las mismas.
- 40 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente:
- poner en contacto la muestra con una sonda de fusión que comprende una porción 5' complementaria con el primer ácido nucleico y una porción 3' complementaria con el segundo ácido nucleico en condiciones suficientes para que la sonda hibride específicamente en la fusión génica, donde la sonda de fusión abarca un punto de fusión del primer
- 45 ácido nucleico y el segundo ácido nucleico, antes de poner en contacto la muestra con la nucleasa;
- detectar la presencia de la sonda de fusión;
- determinar una relación de la sonda de fusión con respecto a la primera sonda, determinando así un porcentaje de la fusión génica en la muestra con respecto al primer ácido nucleico o determinar una relación de la sonda de fusión
- 50 con respecto a la segunda sonda, determinando así un porcentaje de la fusión génica en la muestra con respecto al segundo ácido nucleico.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:
- 55 i) la primera sonda y la segunda sonda comprenden cada una adicionalmente una etiqueta detectable; o
- ii) la primera sonda y la segunda sonda comprenden cada una etiqueta detectable diferente o la misma etiqueta detectable.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la sonda de fusión, la primera sonda, y/o la segunda sonda tienen cada una de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de longitud.
- 5 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico son ARN o ARNm.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico son ADN o ADNc.
- 10 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra comprende tejido, una biopsia tumoral, sangre o un fluido corporal.

**FIG. 1** Sonda de fusión

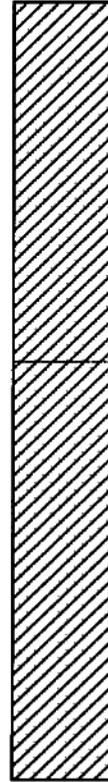


Sonda de fusión



Sitio de fusión

**Fusión**



**Gen 2**



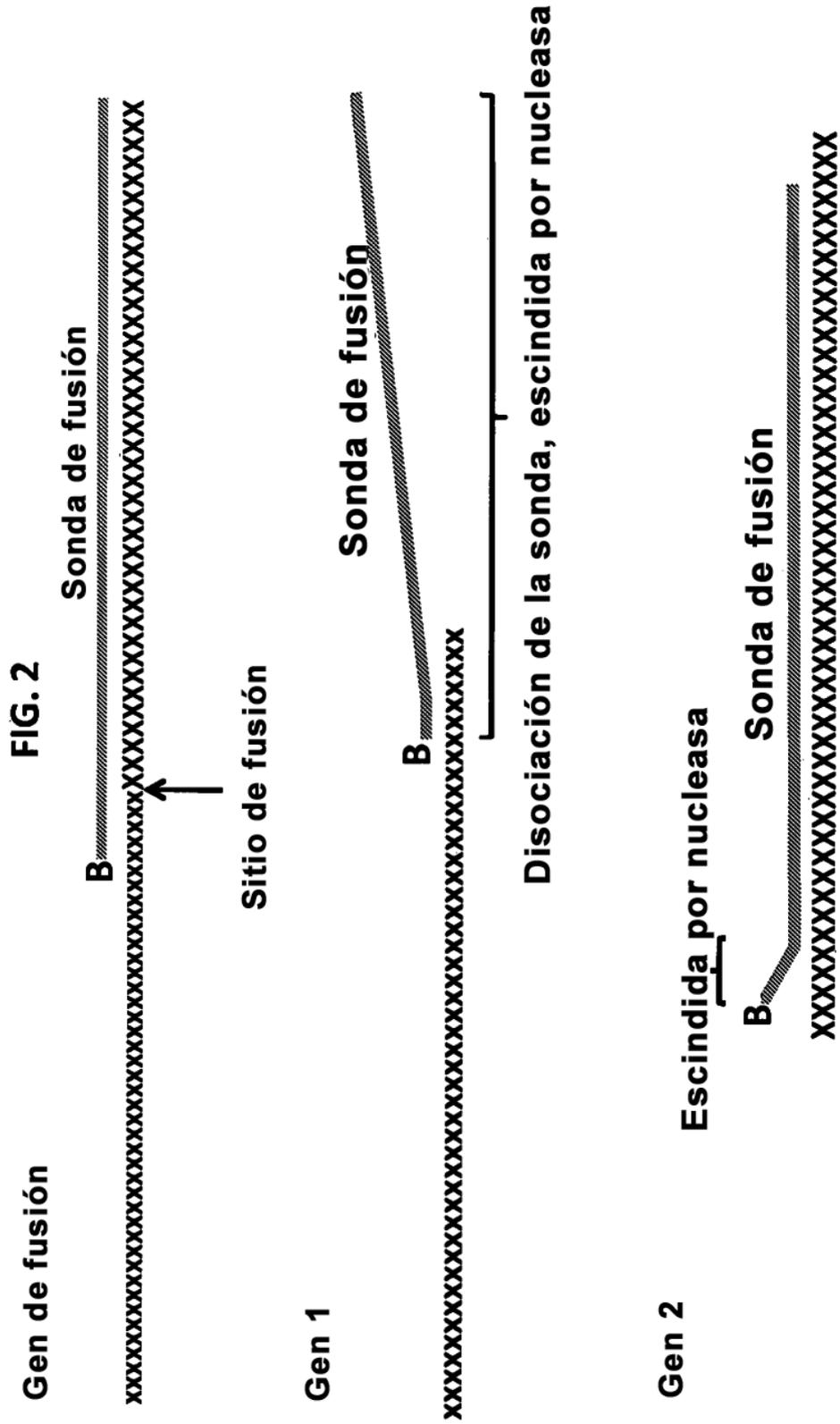
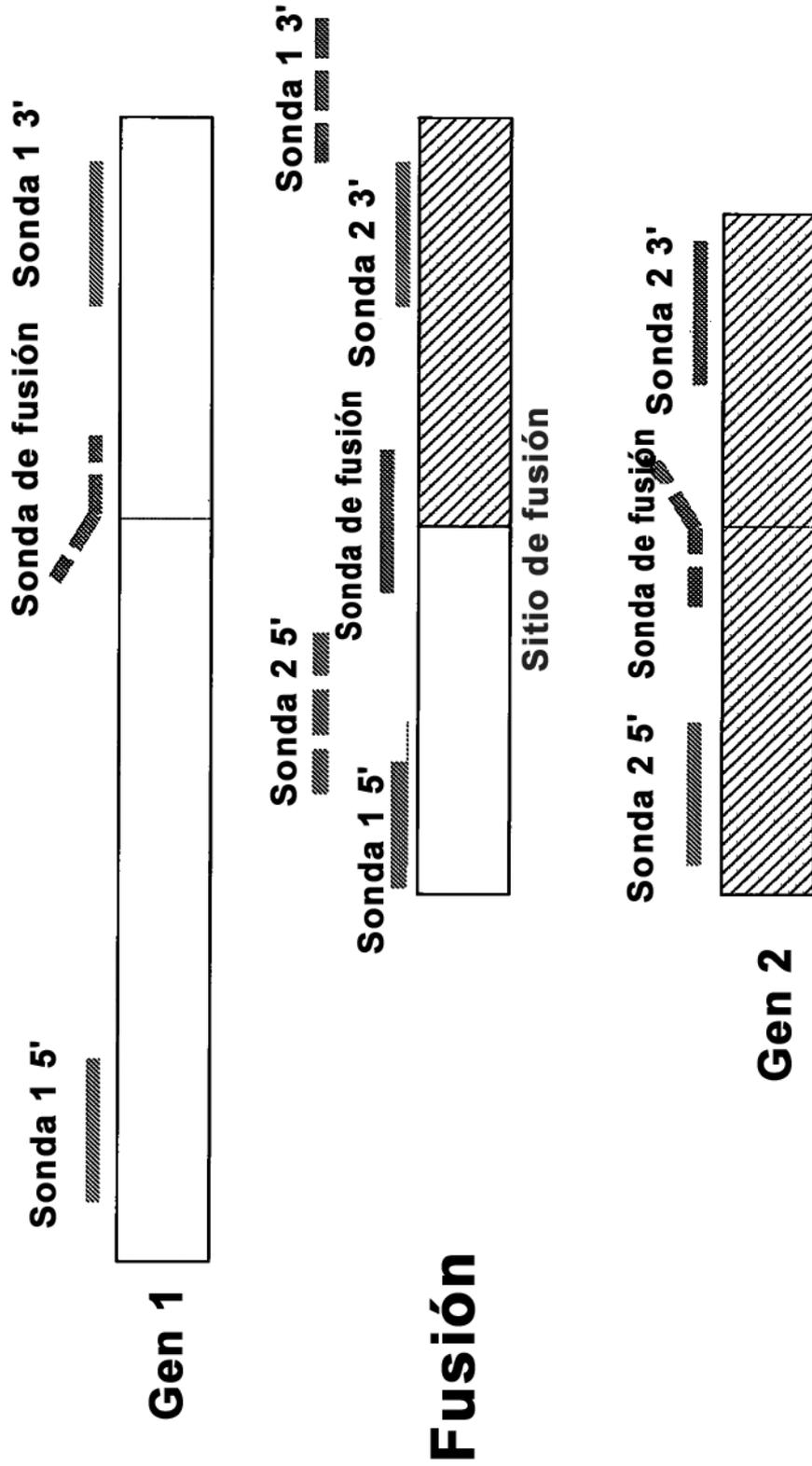


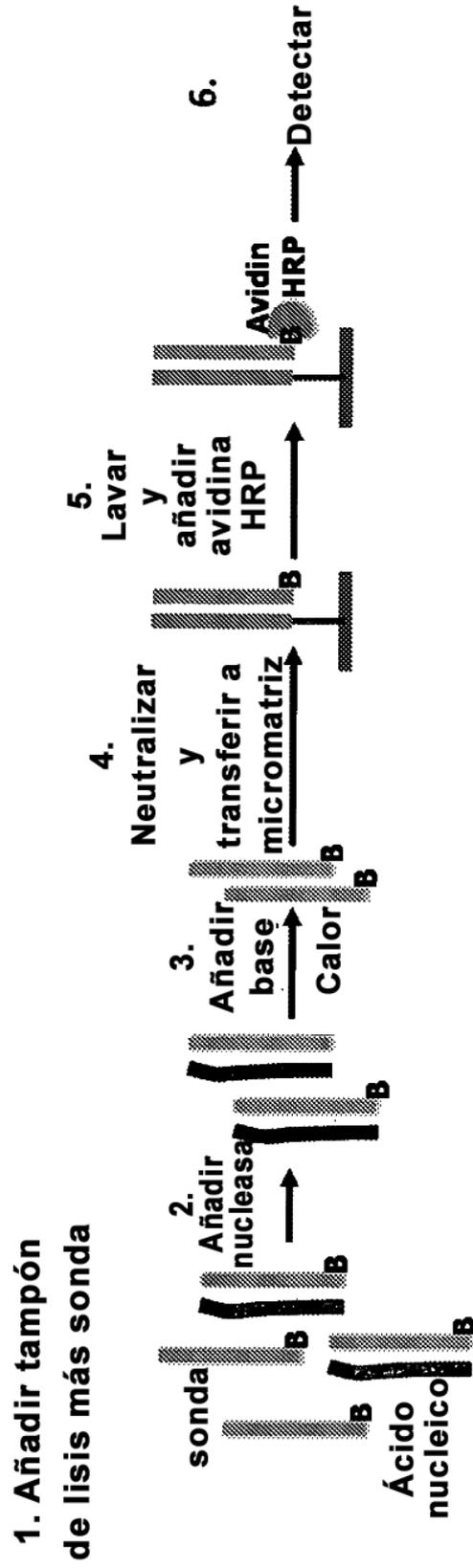
FIG. 3



**Ensayo de fusión de BCR/ABL**  
**FIG. 4**

		Transcripción <i>in vitro</i> (muestra)														
		E1A2	E6A2	E12A2	E13A2	E14A2	E19A2	E20A2	E1A3	E6A3	E12A3	E13A3	E14A3	E19A3	E20A3	
Diana de matrices		E1A2	SI	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	
		E6A2	No	SI	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		E12A2	No	No	SI	SI	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		E13A2	No	No	No	SI	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		E14A2	No	No	No	No	SI	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		E19A2	No	No	No	No	No	SI	No	No	No	No	No	No	No	No
		E20A2	No	No	No	No	No	No	SI	No	No	No	No	No	No	No
		E1A3	No	No	No	No	No	No	No	SI	No	No	No	No	No	No
		E6A3	No	No	No	No	No	No	No	No	SI	No	No	No	No	No
		E12A3	No	No	No	No	No	No	No	No	No	SI	SI	No	No	No
		E13A3	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	SI	No	No	No
		E14A3	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	SI	No	No
		E19A3	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	SI	No
		E20A3	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	SI

FIG. 5A



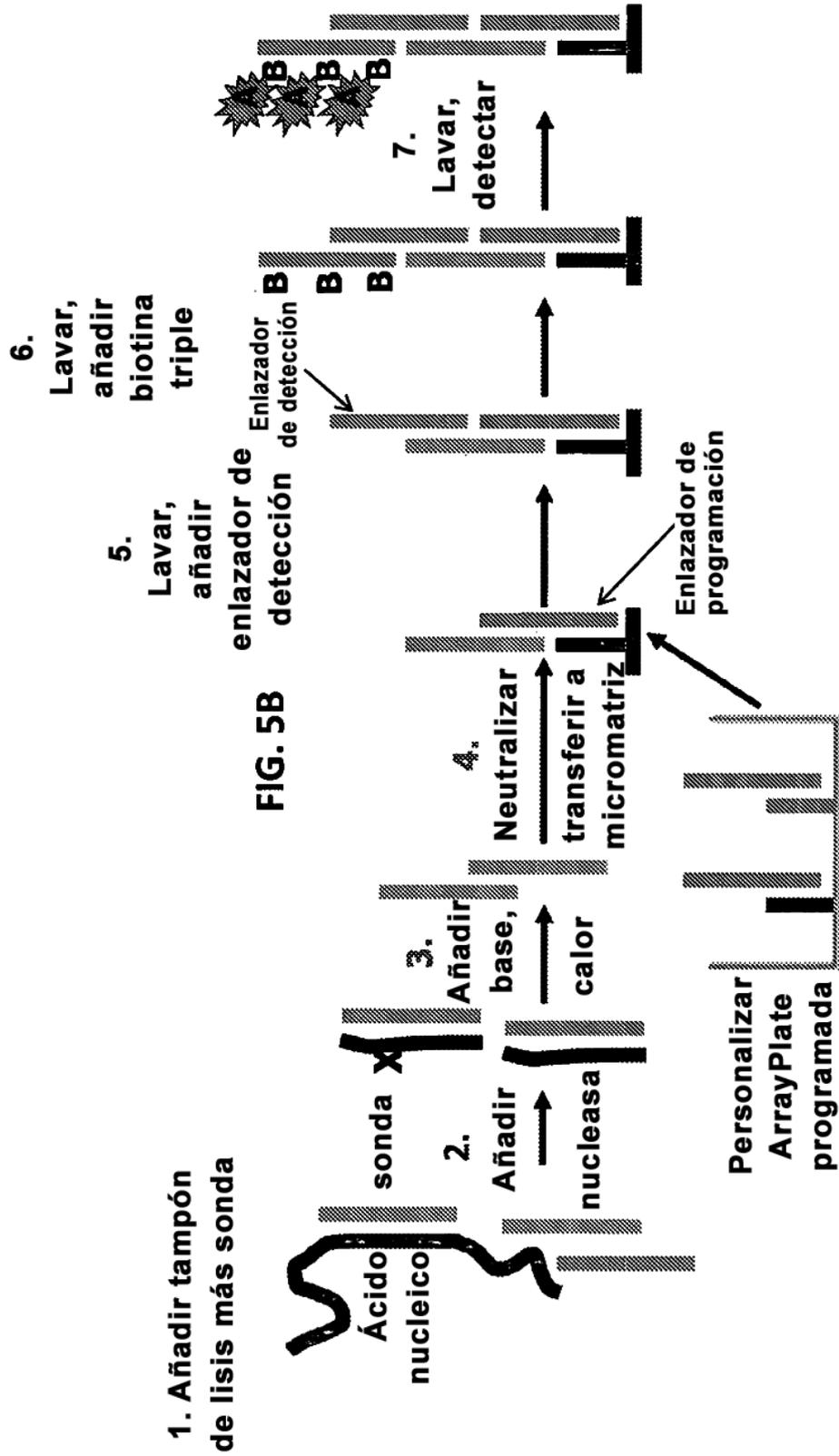
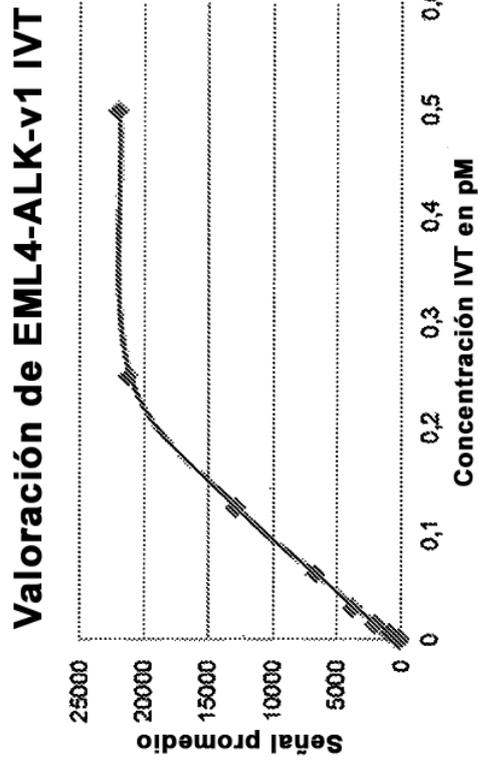
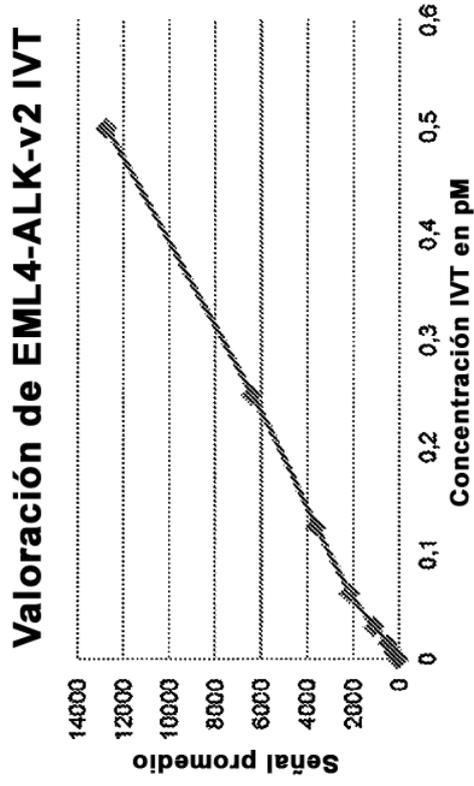


FIG. 5B

**FIG. 6A**

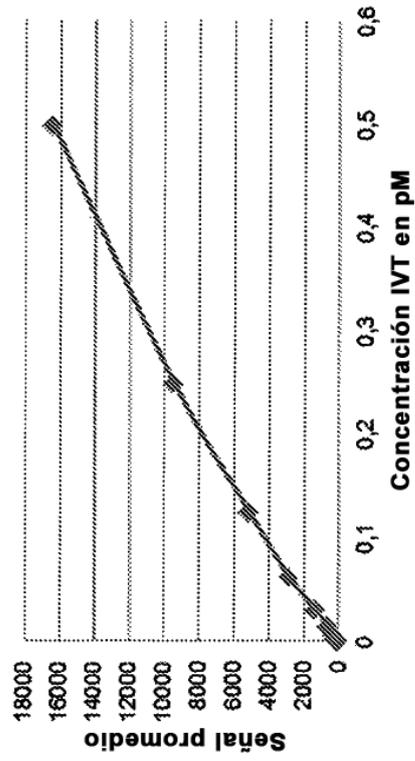


**FIG. 6B**



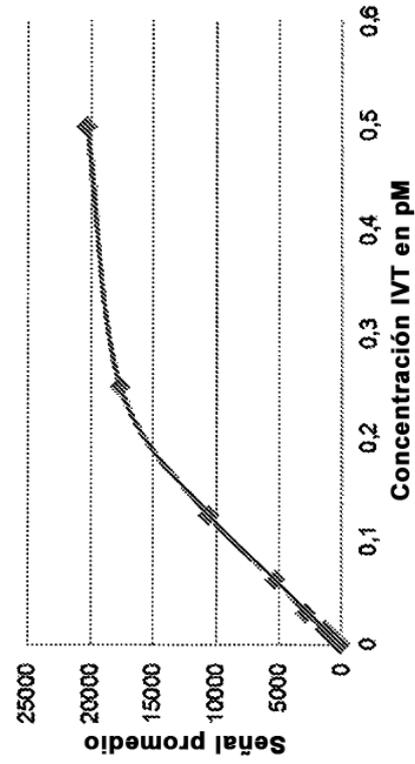
**FIG. 6C**

**Valoración de EML4-ALK-v3a IVT**

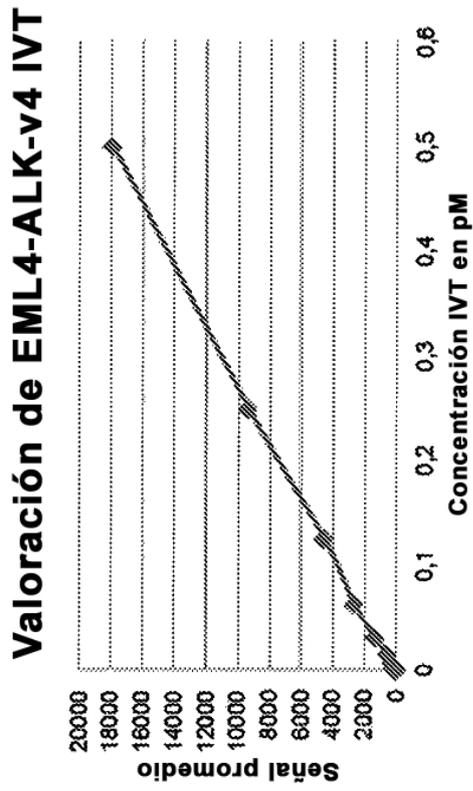


**FIG. 6D**

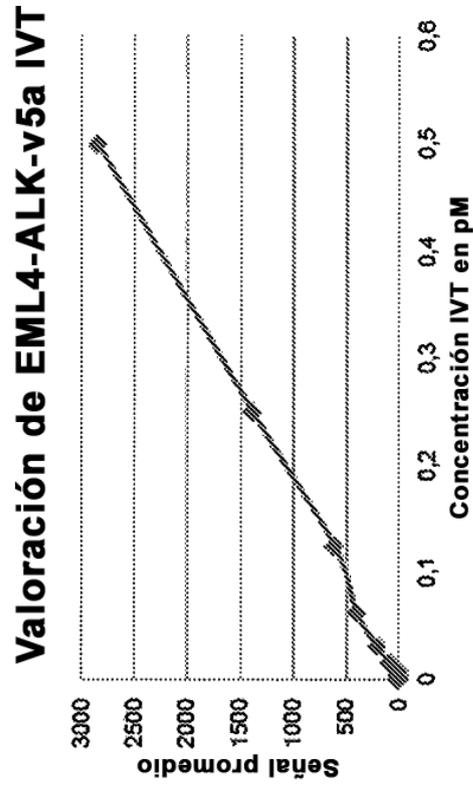
**Valoración de EML4-ALK-v3b-3 IVT**



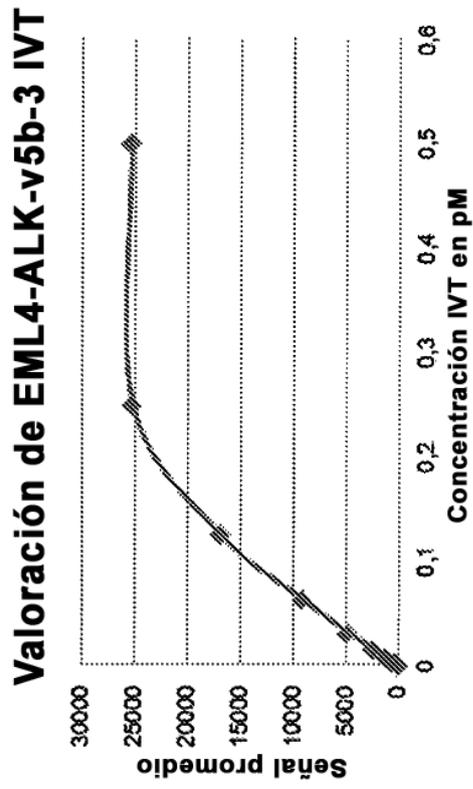
**FIG. 6E**



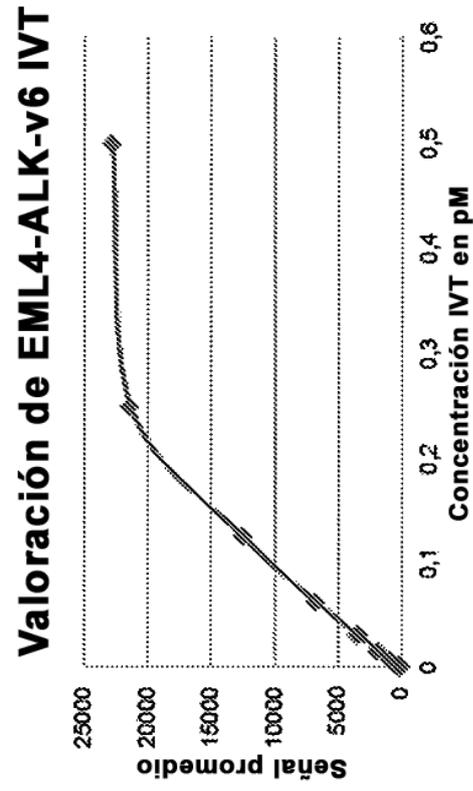
**FIG. 6F**



**FIG. 6G**



**FIG. 6H**



**FIG. 7A** **IVT ALK de longitud completa**

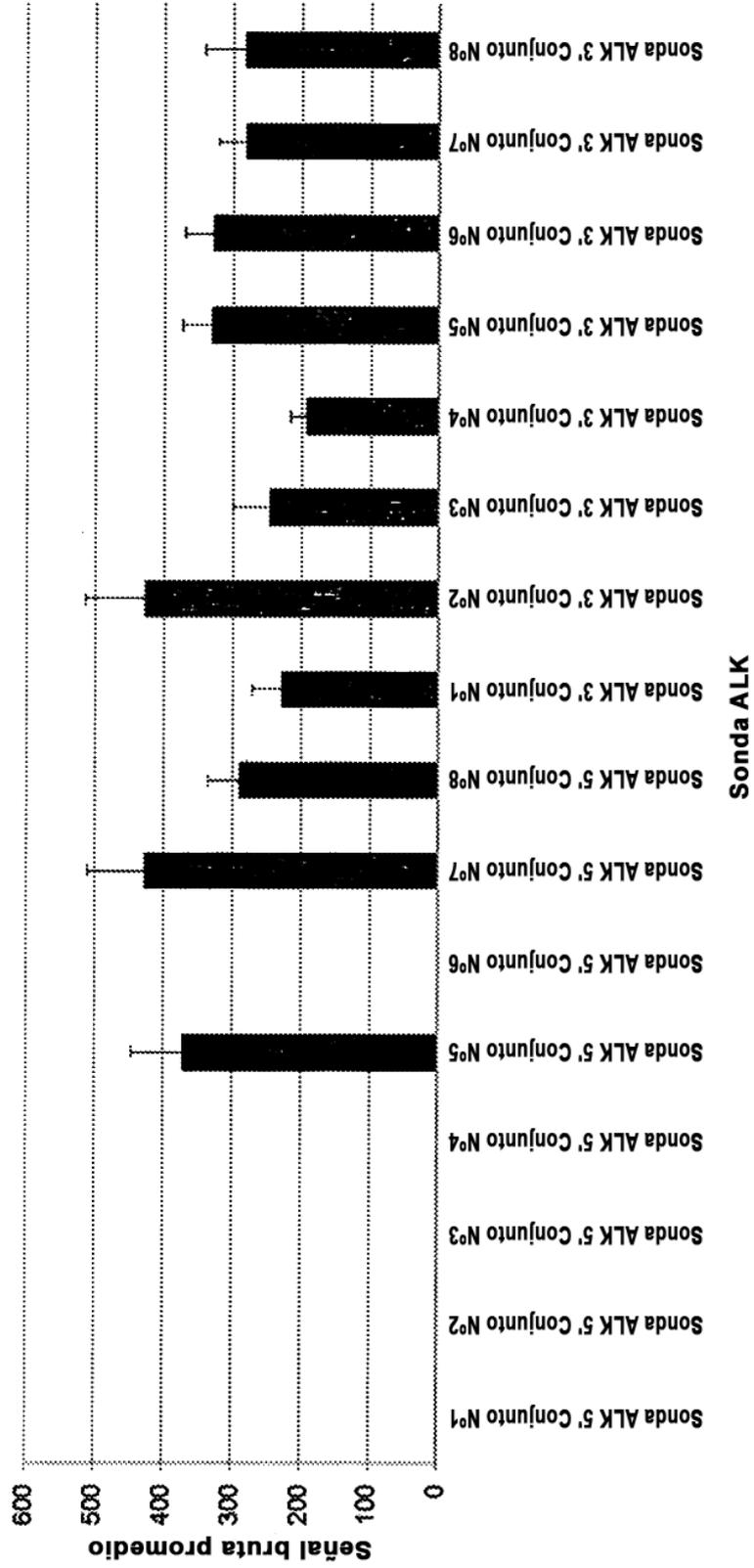


FIG. 7B

