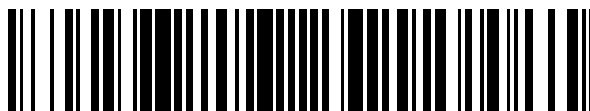


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 306**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/EP2014/054766**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14709926 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2971075**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para detectar mutaciones en el gen PI3KCA (PIK3CA) humano**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361780017 P

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

26.11.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:

TSAN, ALISON

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 691 306 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

Procedimientos y composiciones para detectar mutaciones en el gen PI3KCA (PIK3CA) humano

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al diagnóstico del cáncer y al diagnóstico con fines terapéuticos para tratamientos del cáncer. En particular, la invención se refiere a procedimientos y a composiciones para la detección de mutaciones que son útiles para el diagnóstico y pronóstico, así como para predecir la eficacia del tratamiento del

10 cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) son cinasas lipídicas intracelulares que regulan las vías de señalización que controlan la proliferación celular y la supervivencia, adhesión y motilidad celulares (Vivanco y Sawyers, (2002) *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*, Nature Rev. Cancer 2:489). El PI3KCA (PIK3CA) es un miembro de la familia de genes PI3K que codifica la subunidad catalítica de la cinasa p110 α . Este gen es de pertinencia única para la neoplasia: de todos los genes PI3K sometidos a prueba, solo el PI3KCA se encontró mutado en múltiples cánceres. En un estudio se encontraron mutaciones somáticas en el gen

20 PI3KCA en un 32 % de los cánceres de colon, en un 27 % de los glioblastomas, en un 25 % de los cánceres gástricos, en un 8 % de los cánceres de mama y en un 4 % de los cánceres de pulmón (Samuels *et al.* (2004) *High frequency of mutations in the PI3KCA gene in human cancers*, Science 304:554). Los estudios subsiguientes también informaron de mutaciones en el cáncer uterino (24 %), ovárico (10 %) y cervicouterino (10 %) (Brana y Sui, (2012) *Clinical development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer treatment*, BMC Medicine 2012, 10:161).

25

La PI3K activa la vía Akt/mTOR intracelular activando específicamente la proteína Akt. Un enfoque genético reveló que la activación constitutiva de esta vía por parte del PI3KCA mutante contribuye a la resistencia a los

30 tratamientos que se dirigen a EGFR (Berns *et al.* (2007) *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer*, Cancer Cell 12:395). Al mismo tiempo, se demostró que se puede suprimir una actividad de PI3KCA inalterada (no mutada) mediante inhibidores específicos, superando, por tanto, el efecto del elemento en dirección 5' regulado erróneamente en la vía (por ejemplo, EGFR) y, recientemente se han desarrollado agentes terapéuticos que se dirigen a la propia PI3KCA (p110 α) (revisados en Weickhardt *et al.* (2010) *Strategies for Overcoming Inherent and Acquired Resistance to EGFR Inhibitors by Targeting Downstream Effectors in the RAS/PI3K Pathway*, Current Cancer Drug Targets, 10:824; y Brana y Sui, (2012) *Clinical development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer treatment*, BMC Medicine 2012, 10:161).

35

En conjunto, estos estudios demuestran la necesidad de disponer de procedimientos y herramientas para

40 detectar mutaciones somáticas en el gen PI3KCA para proporcionar asistencia sanitaria personalizada a pacientes que buscan tratamientos del cáncer dirigidos.

40

Hasta la fecha, se han identificado más de 30 mutaciones somáticas en el gen PI3KCA (patente de EE. UU. n.º 8.026.053; M. Gymnopoulos *et al.* (2007), *Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 104:5569-5574). La mayoría de las mutaciones se agrupan en los exones 9 y 20. Sin embargo, también se ha descrito una serie de mutaciones clínicamente significativas en los exones 1, 4 y 7. Un ensayo de diagnóstico se debe dirigir a tantas de estas mutaciones como sea posible. Además, se requiere una discriminación precisa (alta especificidad), puesto que el resultado del ensayo

45

50 determinará el tratamiento del cáncer de un paciente.

50

En la técnica se describen cebadores específicos de alelo para la detección de diversos mutantes de PI3KCA, incluyendo H1047L y H1047R (véanse, por ejemplo, los documentos WO2009/040557, WO2011/131151 y WO2011/087928). El documento WO 2009/040557 divulga además el uso de emparejamientos erróneos de cebadores adicionales cerca del extremo 3' para potenciar la especificidad de las reacciones. El documento US2010/0286143 describe reacciones en las que una única base, como ddNTP marcados, se añade a sondas específicas de alelo durante la etapa de extensión; sin embargo, no se divulgan cebadores específicos para la PCR específica de alelo.

55

55

SUMARIO DE LA INVENCION

60

La invención comprende oligonucleótidos para detectar una mutación H1047Y en el gen PIK3CA humano, que son al menos un 90 % idénticos a y tienen el nucleótido terminal 3' de la SEQ ID NO: 39, que comprenden 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en los que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3'.

65

65

En otro modo de realización, la invención es un procedimiento de ensayo de una muestra para determinar la presencia de la mutación H1047Y en el gen PIK3CA humano que comprende poner en contacto la muestra con un oligonucleótido con nucleótido específico de alelo que comparte al menos un 90 % de identidad con y que tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 39, que comprende 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en el que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3'. En variaciones de este modo de realización, el oligonucleótido se selecciona de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.

En otro modo de realización más, la invención es un conjunto de oligonucleótidos para detectar H1047Y y una o más mutaciones de las mutaciones H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K en el gen PIK3CA que comprende una combinación de dos o más oligonucleótidos, en el que un oligonucleótido que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el nucleótido terminal 3' de la SEQ ID NO: 39, que comprende 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en el que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3' y al menos un oligonucleótido específico de alelo para cada mutación distinta de H0147Y comparte al menos un 90 % de identidad con y tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208 y 219. En variaciones de este modo de realización, los oligonucleótidos se seleccionan de las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.

En otro modo de realización más, la invención es una mezcla de reacción para detectar H1047Y y una o más mutaciones de las mutaciones H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K en el gen PIK3CA que comprende dos o más oligonucleótidos específicos de alelo, en la que un oligonucleótido que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el nucleótido terminal 3' de la SEQ ID NO: 39, que comprende 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en la que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3' y al menos un oligonucleótido específico de alelo para cada mutación distinta de H0147Y comparte al menos un 90 % de identidad con y tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208, 219. En variaciones de este modo de realización, la mezcla de reacción comprende una o más de SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.

En otro modo de realización más, la invención es un procedimiento de evaluación del cáncer en un paciente detectando en la muestra del paciente la mutación H1047Y y una o más mutaciones H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K en el gen PIK3CA usando dos o más oligonucleótidos específicos de alelo, en el que un oligonucleótido que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el nucleótido terminal 3' de la SEQ ID NO: 39, que comprende 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en el que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3' y al menos un oligonucleótido específico de alelo para cada mutación distinta de H0147Y comparte al menos un 90 % de identidad con y tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208, 219. En variaciones de este modo de realización, el uno o más oligonucleótidos se seleccionan de: SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes definiciones de los términos usados en el presente documento.

El término "X[n]Y" se refiere a una mutación de aminoácido que da como resultado una sustitución del aminoácido X por el aminoácido Y en la posición [n] dentro de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el término "H1047R" se refiere a una mutación en la que la histidina en la posición 1047 se reemplaza por arginina.

El término "cebador específico de alelo" o "cebador EA" se refiere a un cebador que se hibrida a más de una variante de la secuencia diana, pero que puede discriminar entre las variantes de la secuencia diana en que solo con una de las variantes el cebador se extiende de manera eficaz mediante la ácido nucleico polimerasa en condiciones adecuadas. Con otras variantes de la secuencia diana, la extensión es menos eficaz o ineficaz.

El término "cebador común" se refiere al segundo cebador del par de cebadores que incluye un cebador específico de alelo. El cebador común no es específico de alelo, es decir, no discrimina entre las variantes de la secuencia diana entre las que sí discrimina el cebador específico de alelo.

El término "evaluación", en relación con el cáncer, se refiere a deducir el estado o condición del cáncer, así como a determinar la necesidad de disponer de procedimientos de diagnóstico o tratamientos, a evaluar la eficacia potencial de los tratamientos, a realizar un seguimiento del cáncer del sujeto o a cualquier otra etapa o procedimiento relacionado con el tratamiento o diagnóstico de un cáncer.

Los términos "complementarias" o "complementariedad" se usan en referencia a las cadenas antiparalelas de polinucleótidos relacionadas mediante las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los términos "perfectamente complementarias" o "100 % complementarias" se refieren a las secuencias complementarias que tienen apareamiento de Watson-Crick de todas las bases entre las cadenas antiparalelas, es decir, no hay ningún emparejamiento erróneo entre dos bases cualesquiera en la doble hélice polinucleotídica. Sin embargo, se forman dobles hélices entre cadenas antiparalelas incluso en ausencia de complementariedad perfecta. Los términos "parcialmente complementaria" o "incompletamente complementaria" se refieren a cualquier alineación de bases entre cadenas polinucleotídicas antiparalelas que sea menos de un 100 % perfecta (por ejemplo, existe al menos un emparejamiento erróneo o una base no emparejada en la doble hélice polinucleotídica). Las dobles hélices entre cadenas parcialmente complementarias son, en general, menos estables que las dobles hélices entre cadenas perfectamente complementarias.

El término "muestra" se refiere a cualquier composición que contiene o que se sospecha que contiene ácido nucleico. Esto incluye una muestra de tejido o líquido aislado de un individuo, por ejemplo, piel, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial, orina, lágrimas, glóbulos sanguíneos, órganos y tumores, y también muestras de cultivos *in vitro* establecidos a partir de células obtenidas de un individuo, incluyendo tejidos incluidos en parafina fijados con formol (FFPET) y ácidos nucleicos aislados de los mismos. Para detectar una mutación somática, la muestra comprende típicamente un fragmento de un tumor sólido (primario o metastásico) o células derivadas de tumor encontradas en cualquier parte del cuerpo, por ejemplo, en la sangre circulante.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable. "Oligonucleótido" es un término usado a veces para describir un polinucleótido más corto. Un oligonucleótido puede comprender al menos 6 nucleótidos, por ejemplo, al menos aproximadamente 10-12 nucleótidos, o al menos aproximadamente 15-30 nucleótidos correspondientes a una región de la secuencia de nucleótidos designada.

El término "secuencia principal" se refiere a la secuencia de nucleótidos en un polinucleótido u oligonucleótido. Las modificaciones de nucleótidos, tales como modificaciones de bases nitrogenadas, modificaciones de azúcares u otras modificaciones de la cadena principal, no son parte de la secuencia principal. Los marcadores, tales como cromóforos conjugados a los oligonucleótidos, tampoco son parte de la secuencia principal. Por tanto, dos oligonucleótidos pueden compartir la misma secuencia principal, pero diferir con respecto a las modificaciones y a los marcadores.

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria de ácido nucleico en condiciones adecuadas para dicha síntesis. Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y normalmente se marca de manera detectable. La sonda puede tener modificaciones, tales como una modificación en el extremo 3' que haga que la sonda no sea extensible mediante las ácido nucleico polimerasas y uno o más cromóforos. Un oligonucleótido con la misma secuencia puede servir como un cebador en un ensayo y como una sonda en un ensayo diferente.

El término "nucleótido modificado" se refiere a una unidad en un polímero de ácido nucleico que contiene una base, azúcar o grupo fosfato modificados, o que incorpora un resto no natural en su estructura. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen nucleótidos con una base nitrogenada modificada, por ejemplo, alquilada o de otro modo sustituida con un grupo no presente entre las bases nitrogenadas convencionales implicadas en el apareamiento de Watson-Crick. A modo de ilustración y no de limitación, los nucleótidos modificados incluyen aquellos con bases sustituidas con grupos metilo, etilo, bencilo o butilbencilo.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "diana" se refiere a una porción de la secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar, detectar o bien ambas cosas.

Los términos "hibridada" e "hibridación" se refieren a las interacciones por apareamiento de bases entre dos ácidos nucleicos que dan como resultado la formación de una doble hélice. No es un requisito que dos polinucleótidos tengan un 100 % de complementariedad a lo largo de su longitud completa para lograr la hibridación.

La presente invención comprende procedimientos y composiciones para la determinación rápida y precisa de la presencia de la mutación H1047Y y una o más de otras mutaciones en el gen PI3KCA en muestras de pacientes. La invención posibilita la detección de la mutación H1047Y y, opcionalmente, de una o más de las mutaciones seleccionadas de H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y

Q546K, así como una búsqueda simultánea de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de las mutaciones enumeradas anteriormente.

5 Una técnica que es sensible y susceptible de multiplexación es la PCR específica de alelo (PCR-EA) descrita, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.627.402. Esta técnica detecta mutaciones o polimorfismos en secuencias de ácido nucleico en presencia de variantes naturales de las secuencias. En una PCR específica de alelo satisfactoria se amplifica la variante deseada del ácido nucleico diana, mientras que las demás variantes no, al menos no a un nivel detectable.

10 Una medida de la discriminación de una PCR específica de alelo es la diferencia entre los valores de C_t (ΔC_t) en las reacciones de amplificación que implican los dos alelos. Cada reacción de amplificación se caracteriza por una "curva de crecimiento" o "curva de amplificación" en el contexto de un ensayo de amplificación de ácido nucleico que es un gráfico de una función, en el que una variable independiente es el número de ciclos de amplificación y una variable dependiente es un parámetro medible dependiente de la amplificación medido en cada ciclo de amplificación, tal como la fluorescencia emitida por un fluoróforo. Típicamente, el parámetro medible dependiente de la amplificación es la cantidad de fluorescencia emitida por la sonda tras la hibridación, o tras la hidrólisis de la sonda por la actividad nucleasa de la ácido nucleico polimerasa, véase Holland *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7276-7280 y la patente de EE. UU. n.º 5.210.015. Una curva de crecimiento se caracteriza por un "valor umbral" (o valor de C_t) que es un número de ciclos en los que se logra una magnitud predeterminada del parámetro medible. Un valor de C_t más bajo representa una amplificación más rápida, mientras que el valor de C_t más alto representa una amplificación más lenta. En el contexto de una reacción específica de alelo, la diferencia entre los valores de C_t de los dos moldes representa una discriminación alélica en la reacción.

25 En una PCR específica de alelo, al menos un cebador es específico de alelo, de tal manera que solo (o preferentemente) se produzca la extensión del cebador cuando esté presente la variante específica de la secuencia y no se produzca (o se produzca de manera menos eficaz, es decir, con una ΔC_t sustancial) cuando esté presente otra variante. El diseño de cebadores específicos de alelo satisfactorios es una técnica impredecible. Aunque es habitual diseñar un cebador para una secuencia conocida, no existe ninguna fórmula para diseñar un cebador que pueda discriminar entre secuencias muy similares. La discriminación es especialmente problemática cuando uno o más cebadores específicos de alelo que se dirigen a uno o más sitios polimórficos están presentes en la misma mezcla de reacción.

35 Típicamente, el nucleótido discriminante en el cebador, es decir, el nucleótido que solo se empareja con una variante de la secuencia diana, es el nucleótido terminal 3'. Sin embargo, el extremo 3' del cebador solo es uno de muchos determinantes de especificidad. Por ejemplo, los emparejamientos erróneos adicionales también pueden afectar a la discriminación (véase la pub. de solicitud de patente de EE. UU. n.º US20100099110). Otro enfoque es incluir nucleótidos no naturales o modificados que alteran el apareamiento de bases entre el cebador y la secuencia diana (patente de EE. UU. n.º 6.001.611). La cinética de extensión reducida y, por tanto, la especificidad de un cebador están influenciadas por muchos factores, incluyendo el contexto de secuencia global del emparejamiento erróneo y otros ácidos nucleicos presentes en la reacción. El efecto de estos factores externos sobre cada emparejamiento erróneo adicional, así como de cada nucleótido no natural adicional solo o en combinación, no se puede predecir. Los solicitantes sometieron a prueba múltiples variantes de los cebadores y descubrieron que, sorprendentemente, determinadas variantes son drásticamente diferentes con respecto a su capacidad para discriminar entre secuencias diana estrechamente relacionadas.

50 Para una extensión satisfactoria de un cebador, la complementariedad en el extremo 3' del cebador es más crucial que la complementariedad en el extremo 5' del cebador (Innis *et al.* eds. *PCR Protocols*, (1990) Academic Press, capítulo 1, pp. 9-11). Por lo tanto, la presente invención engloba los cebadores divulgados en las tablas 1-13, así como equivalentes de los mismos con variaciones en el extremo 5'.

55 En un modo de realización, la presente invención comprende oligonucleótidos para detectar la mutación H1047Y en PI3KCA y, opcionalmente, mutaciones en PI3KCA seleccionadas de H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K, así como una búsqueda simultánea de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de las mutaciones mencionadas anteriormente. En un modo de realización, la invención comprende un oligonucleótido que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el extremo 3' de la SEQ ID NO: 39, que comprende 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en el que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3' y, opcionalmente, uno o más oligonucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208 y 219 (tablas 1-13), así como variaciones al menos un 90 % idénticas a y que tienen el nucleótido terminal 3' de dichos oligonucleótidos, para detectar específicamente mutaciones en el gen PI3KCA humano. Como se ilustra en las tablas 1-13, los oligonucleótidos que comparten un 90 % de identidad con un oligonucleótido dado incluyen aquellos que tienen 1, 2 o 3 emparejamientos erróneos con respecto a ese oligonucleótido. Como se ilustra además en las tablas 1-13, los oligonucleótidos que comparten un 90 % de identidad con un oligonucleótido dado también incluyen aquellos que tienen uno o más nucleótidos no naturales. Como se ilustra además en las tablas 1-13, los emparejamientos erróneos y los

nucleótidos no naturales se producen típicamente dentro de la porción terminal 3' del oligonucleótido, específicamente dentro de los 5 penúltimos nucleótidos. Sin embargo, algunos oligonucleótidos que comparten un 90 % de identidad con un oligonucleótido dado también incluyen aquellos que tienen 1, 2 o 3 emparejamientos erróneos en cualquier parte del oligonucleótido, por ejemplo, en la porción 5' del oligonucleótido. Como se demuestra en los ejemplos a continuación, los oligonucleótidos de la presente invención se caracterizan por una ΔC_i positiva sustancial determinada usando la fórmula $\Delta C_i = C_i(\text{natural}) - C_i(\text{mutante})$, lo que indica que la amplificación del molde natural es más lenta de manera detectable que la del molde mutante.

10 *Leyendas de las tablas*

Los nucleótidos subrayados están emparejados erróneamente tanto con la secuencia natural como con la mutante. Las siguientes abreviaturas se usan para los nucleótidos con bases modificadas: A* y C* son respectivamente, N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina y N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina, C^ es N4-etil-desoxicitosina; y C# es N4-metil-desoxicitosina.

15

Tabla 1: Oligonucleótidos para detectar la mutación H1047L

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
1	TTTTGTTGTCCAGCCACCATGAT
2	TTTTGTTGTCCAGCCACCATGAA
3	TTTTGTTGTCCAGCCACCATG <u>C</u> A
4	TTTTGTTGTCCAGCCACCATG <u>G</u> A
5	TTTTGTTGTCCAGCCACCATG <u>I</u> A
6	TTTTGTTGTCCAGCCACCAT <u>C</u> AA
7	TTTTGTTGTCCAGCCACCAT <u>T</u> AA
8	TTTTGTTGTCCAGCCACCAT <u>A</u> AA
9	TTTTGTTGTCCAGCCACCA <u>A</u> GAA
10	TTTTGTTGTCCAGCCACCA <u>C</u> GAA
11	TTTTGTTGTCCAGCCACCA <u>G</u> GAA
12	GTTTTTGTGTCCAGCCACCATGAA
13	GTTTTTGTGTCCAGCCACCATGAA*
14	GTTTTTGTGTCCAGCCACCATGA*A
15	CC*GTTTTTGTGTGTC#CAGC#CACC#ATGA*A
16	AATCC#ATTGTTGTGTGTC#CAGC#CACC#ATGAA*

20 Tabla 2: Oligonucleótidos para detectar la mutación H1047R

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
17	TTTGTGTGTCCAGCCACCATGAT
18	TTTGTGTGTCCAGCCACCATGCC
19	TTTGTGTGTCCAGCCACCATGGC
20	TTTGTGTGTCCAGCCACCATGTC
21	TTTGTGTGTCCAGCCACCATCAC
22	TTTGTGTGTCCAGCCACCATTAC
23	TTTGTGTGTCCAGCCACCATAAC
24	TTTGTGTGTCCAGCCACCAAGAC
25	TTTGTGTGTCCAGCCACCACGAC
26	TTTGTGTGTCCAGCCACCAGGAC
27	TTTGTGTGTCCAGCCACCATGAT
28	TTTGTGTGTCCAGCCACCATGCC
29	TTTCATGAAACAAATGAATGATGCAGG
30	TTTCATGAAACAAATGAATGATGCATG

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
31	TTTCATGAAACAAATGAATGATGCAAG
32	TTTCATGAAACAAATGAATGATGCCCCG
33	TTTCATGAAACAAATGAATGATGCGCG
34	TTTCATGAAACAAATGAATGATGCTCG
35	TTTCATGAAACAAATGAATGATGGACG
36	TTTCATGAAACAAATGAATGATGTACG
37	TTTCATGAAACAAATGAATGATGAACG

Tabla 3: Oligonucleótidos para detectar la mutación H1047Y

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
38	TTTGTTGTCCAGCCACCATGATG
39	TTTGTTGTCCAGCCACCATGAAA
40	TTTGTTGTCCAGCCACCATGACA
41	TTTGTTGTCCAGCCACCATGAGA
42	TTTGTTGTCCAGCCACCATGCTA
43	TTTGTTGTCCAGCCACCATGGTA
44	TTTGTTGTCCAGCCACCATGTTA
45	TTTGTTGTCCAGCCACCATCATA
46	TTTGTTGTCCAGCCACCATTATA
47	TTTGTTGTCCAGCCACCATATAA
48	GTTTTGTTGTCCAGCCACCATGA*TA
49	TTGTGTTGTCCAGCCACCATGA*TA
50	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGCGT
51	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGCTT
52	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGGAT
53	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGTAT
54	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGAAT
55	AGTGTTTCATGAAACAAATGAATGATGCA*T
56	AGTGTTTCATGAAACAAATGAATGATGC*AT
57	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGC^GT
58	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATTCA*T
59	AGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGC^TT

5 Tabla 4: Oligonucleótidos para detectar la mutación N345K

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
60	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAAT
61	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAAA
62	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGACA
63	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAGA
64	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGATA
65	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGCAA
66	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGGAA
67	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGTAA
68	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTCAA
69	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTTAAA
70	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTAAAA
71	ATAGAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAAA

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
72	ATGAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAAA*
73	ATGAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAA*A
74	ATGAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGA*AA
75	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAC*A
76	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGC*AA
77	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAC#A
78	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGGGAAA*
79	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTC*AAA
80	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGGGAA*A
81	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTC#AAA
82	ATAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTC#AAA*

Tabla 5: Oligonucleótidos para detectar la mutación E542K

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
83	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTG
84	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTA
85	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCAA
86	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCCA
87	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCGA
88	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTGTA
89	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTTTA
90	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTATA
91	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTACTA
92	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCCCTA
93	CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCGCTA
94	CAGTTTCTACACGAGATCCTCTCTCTA
95	GAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTA*
96	GAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTC*TA
97	CAGTTTCTACACGAGATCCTCTCTC*TA

5 Tabla 6: Oligonucleótidos para detectar la mutación E545A

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
98	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGA
99	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGC
100	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTCC
101	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTTC
102	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTAC
103	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACAGC
104	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACCGC
105	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACGGC
106	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAGTGC
107	GAGATCCTCTCTCTGAAATCATTGC
108	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAATGC
109	GGGATCCTCTCTCTGAAATCACTGC
110	GGGATCCTCTCTCTGAAATCAC*TGC
111	GGGATCCTCTCTCTGAAATCACTGC*
112	GAGATCCTCTCTCTGAAATCGCTGC*

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
113	GAGATCCTCTCTCTGAAATCATTGC*
114	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTC*C
115	GAGATCCTCTCTCTGAAATCA*CTLC
116	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACCC*GC
117	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTA*C
118	GAGATCCTCTCTCTGAAATCGCC^GC
119	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACCGC*
120	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACGGC*
121	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAC^TC^C
122	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAC^GGC
123	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAC*CGC
124	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACA*GC
L-Gclamp	

Tabla 7: Oligonucleótidos para detectar la mutación E545G

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
125	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGA
126	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGG
127	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTCG
128	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTAG
129	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTTG
130	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACAGG
131	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACCGG
132	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACGGG
133	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAGTGG
134	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAATGG
135	GAGATCCTCTCTCTGAAATCATTGG
136	GGGATCCTCTCTCTGAAATCACTGG
137	GGGATCCTCTCTCTGAAATCAC*TGG
138	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTC*G
139	GAGATCCTCTCTCTGAAATCA*CTC^G
140	GAGATCCTCTCTCTGAAATCA*CTTG
141	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTA*G
142	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTC^G
143	GAGATCCTCTCTCTGAAATCAA*TGG
144	CTATACGAGATCCTCTCTCTIAAATCAC*TGG
145	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTAG
146	AGATCCTCTCTCTGAAATCACGGG

5 Tabla 8: Oligonucleótidos para detectar la mutación E545K

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
147	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTG
148	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTA
149	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACAA
150	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACCA
151	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACGA
152	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCAGTA

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
153	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCAATA
154	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCATT
155	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCCCTA
156	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCCCTA
157	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCTCTA
158	AGGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTA
159	AGGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTA*
160	AGGAGATCCTCTCTCTGAAATCAC^TA
161	AGGAGATCCTCTCTCTGAAATCA*CTA
162	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCAA*TA
163	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACA*A
164	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATC#AA*TA
165	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACC*A
166	ACGAGATCCTCTCTCTGAAATCC*CTA

Tabla 9: Oligonucleótidos para detectar la mutación Q546K

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
167	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGC
168	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGA
169	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGACA
170	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAAA
171	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGATA
172	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGCCA
173	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGTGA
174	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTGGGA
175	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTCAGA
176	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTAAGA
177	AGATCCTCTCTCTGAAATCACTTAGA
178	AGGTCCTCTCTCTGAAATCACTGAGA
179	GAGGCCTCTCTCTGAAATCACTGAGA*
180	GAGGCCTCTCTCTGAAATCACTGA*GA
181	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAAA
182	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGGGA
183	GAGATCCTCTCTCTGAAATCACTAAGA

5 Tabla 10: Oligonucleótidos para detectar la mutación Q546E

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
184	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGC
185	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGG
186	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGAAG
187	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGACG
188	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGATG
189	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGCCG
190	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGGGG
191	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGTGG
192	ATCCTCTCTCTGAAATCACTAAGG
193	ATCCTCTCTCTGAAATCACTCAGG
194	ATCCTCTCTCTGAAATCACTTAGG

Tabla 11: Oligonucleótidos para detectar la mutación Q546L

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
195	TCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCA
197	TCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCT
198	TCCTCTCTCTGAAATCACTGAGAT
199	TCCTCTCTCTGAAATCACTGAGGT
200	TCCTCTCTCTGAAATCACTGAGTT
201	TCCTCTCTCTGAAATCACTGAACT
202	TCCTCTCTCTGAAATCACTGACCT
203	TCCTCTCTCTGAAATCACTGATCT
204	TCCTCTCTCTGAAATCACTGCGCT
205	TCCTCTCTCTGAAATCACTGGGCT
206	TCCTCTCTCTGAAATCACTGTGCT

5 Tabla 12: Oligonucleótidos para detectar la mutación G1049R

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
207	CATGAAACAAATGAATGATGCACATCATG
208	CATGAAACAAATGAATGATGCACATCATC
209	CATGAAACAAATGAATGATGCACATCA <u>A</u> C
210	CATGAAACAAATGAATGATGCACATCA <u>C</u> C
211	CATGAAACAAATGAATGATGCACATCA <u>G</u> C
212	CATGAAACAAATGAATGATGCACATC <u>C</u> TC
213	CATGAAACAAATGAATGATGCACATC <u>G</u> TC
214	CATGAAACAAATGAATGATGCACATC <u>T</u> TC
215	CATGAAACAAATGAATGATGCACATA <u>A</u> ATC
216	CATGAAACAAATGAATGATGCACAT <u>G</u> ATC
217	CATGAAACAAATGAATGATGCACAT <u>T</u> ATC

Tabla 13: Oligonucleótidos para detectar la mutación M1043I

SEQ ID NO:	SECUENCIA 5'-3'
218	AGCCACCATGATGTGCATCATTC
219	AGCCACCATGATGTGCATCATT <u>A</u>
220	AGCCACCATGATGTGCATCATA <u>A</u>
221	AGCCACCATGATGTGCATCATG <u>A</u>
222	AGCCACCATGATGTGCATCA <u>A</u> TA
223	AGCCACCATGATGTGCATCA <u>C</u> TA
224	AGCCACCATGATGTGCATCAG <u>T</u> A
225	AGCCACCATGATGTGCATC <u>C</u> TTA
226	AGCCACCATGATGTGCATCG <u>T</u> TA
227	AGCCACCATGATGTGCATC <u>T</u> TTA
228	AGGCACCATGATGTGCATCATT <u>A</u>
229	AGGCACCATGATGTGCATCATT <u>A</u> *
230	AGGCACCATGATGTGCATCA* <u>T</u> TA

10

La presente invención se refiere además a un oligonucleótido para detectar una mutación en una o más posiciones de nucleótido entre los codones 1042 y 1050 en el gen PIK3CA que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el nucleótido terminal 3' de la SEQ ID NO: 39 y de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 208 y 219. Los oligonucleótidos comprenden 3 o menos

emparejamientos erróneos con una de dichas secuencias, excluyendo el nucleótido terminal 3' y/o al menos un emparejamiento erróneo entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3'. Los oligonucleótidos comprenden además al menos un nucleótido modificado entre los 5 nucleótidos terminales en el extremo 3'. Los oligonucleótidos son, en particular, adecuados para detectar la mutación H1047Y y una o más de las mutaciones M1043I, H1047L, H1047R y/o H1049R. Se describe además un oligonucleótido para detectar la mutación N345K en el gen PIK3CA que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el nucleótido terminal 3' de la SEQ ID NO: 61. Los oligonucleótidos pueden comprender 3 o menos emparejamientos erróneos con la SEQ ID NO: 61, excluyendo el nucleótido terminal 3' y/o al menos un emparejamiento erróneo entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3'. Los oligonucleótidos pueden comprender además al menos un nucleótido modificado entre los 5 nucleótidos terminales en el extremo 3'.

Otro modo de realización descrito es un oligonucleótido para detectar una mutación en una o más posiciones de nucleótido entre los codones 541 y 547 en el gen PIK3CA que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el nucleótido terminal 3' de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 84, 99, 126, 148, 168, 185 y 197. Los oligonucleótidos pueden comprender 3 o menos emparejamientos erróneos con una de dichas secuencias, excluyendo el nucleótido terminal 3' y/o al menos un emparejamiento erróneo entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3'. Los oligonucleótidos pueden comprender además al menos un nucleótido modificado entre los 5 nucleótidos terminales en el extremo 3'. Los oligonucleótidos son, en particular, adecuados para detectar una o más de las mutaciones E542K, E545A, E545G, E545K, Q546K, Q546L y/o Q546E.

En otro modo de realización, la presente invención es un procedimiento diagnóstico de detección de la mutación H1047Y en el gen PI3KCA (PIK3CA) humano y una o más mutaciones seleccionadas de H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K, así como una búsqueda simultánea de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de las mutaciones enumeradas anteriormente usando la SEQ ID NO: 39 del oligonucleótido y, opcionalmente, uno o más de los oligonucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 99, 126, 148, 168, 185, 197, 208, 219 o variaciones al menos un 90 % idénticas a y que tienen el nucleótido terminal 3' de dichos oligonucleótidos. En variaciones de este modo de realización, el procedimiento comprende usar uno o más oligonucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra de prueba que contenga ácidos nucleicos con uno o más de los oligonucleótidos en presencia del correspondiente cebador en dirección 3' y una sonda de detección. De forma ventajosa, se puede realizar la detección de mutaciones posicionadas cerca en una única reacción. En algunos modos de realización, una única reacción contiene dos o más oligonucleótidos específicos de alelo, por ejemplo, se pueden combinar las SEQ ID NO: 39 y 8, 21 y 46 en una mezcla de reacción junto con un único cebador en dirección 3' y una única sonda de detección. De manera similar, una única reacción puede contener dos o más de las SEQ ID NO: 39 y 93, 113, 141, 166, 170 y 199, que se pueden combinar en una mezcla de reacción junto con un único cebador en dirección 3' y una única sonda de detección. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra de prueba que contenga ácidos nucleicos con uno o más de los oligonucleótidos en presencia del correspondiente cebador en dirección 3' (es decir, un cebador que pueda hibridar a la cadena opuesta del ácido nucleico diana para posibilitar la amplificación exponencial), nucleósidos trifosfato y una ácido nucleico polimerasa, de tal manera que uno o más cebadores específicos de alelo solo se extiendan de manera eficaz cuando está presente una mutación en PI3KCA en la muestra; y detectar la presencia o ausencia de una mutación en PI3KCA detectando directa o indirectamente la presencia o ausencia de la extensión del cebador.

En un modo de realización particular, la presencia de la extensión del cebador se detecta con una sonda. La sonda se puede marcar con un marcador radioactivo o uno cromóforo (fluoróforo), por ejemplo, un marcador que incorpore FAM, JA270, colorantes de la familia de CY5 o colorantes de HEX. Como un ejemplo de detección usando una sonda marcada de manera fluorescente, se puede detectar la mutación mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt-PCR), en la que la hibridación de la sonda da como resultado la digestión enzimática de la sonda y la detección de la fluorescencia resultante (procedimiento de la sonda TaqMan™, Holland *et al.* (1991) P.N.A.S. USA 88:7276-7280). De forma alternativa, la presencia del producto de extensión y el producto de amplificación se puede detectar mediante electroforesis en gel seguida de tinción o mediante transferencia e hibridación como se describe, por ejemplo, en Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning, 3ª ed.* CSHL Press, capítulos 5 y 9.

En otro modo de realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene un tumor que alberga posiblemente células con un gen PI3KCA mutante. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra del paciente con dos o más oligonucleótidos, en el que un oligonucleótido es la SEQ ID NO: 39 y al menos otro oligonucleótido se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100 (99), 127 (126), 148, 170 (168), 185, 197, 208, 219 o variaciones al menos un 90 % idénticas a y que tienen el nucleótido terminal 3' de dichos oligonucleótidos, en presencia de un correspondiente segundo cebador o cebadores, efectuar la amplificación específica de alelo, y detectar la presencia o ausencia de una mutación en PI3KCA detectando la presencia o ausencia de la extensión del cebador, y, si al menos se encuentra o no se encuentra una mutación, someter al paciente al régimen de tratamiento apropiado. En algunos modos de realización, el tratamiento comprende administrar un inhibidor de la proteína codificada por el gen PI3KCA (proteína p110 alfa). En otros

modos de realización, el tratamiento comprende administrar un inhibidor de una proteína en dirección 5' en la vía, por ejemplo, la proteína EGFR, si no se encuentran mutaciones en PI3KCA, y administrar un tratamiento alternativo si se encuentran las mutaciones. En variaciones de este modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra del paciente con uno o más oligonucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.

En otro modo de realización más, la invención es un kit que contiene reactivos para detectar mutaciones en el gen PI3KCA, específicamente la mutación H1047Y y una o más de las mutaciones seleccionadas de H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K, así como una búsqueda simultánea de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de las mutaciones enumeradas anteriormente. Los reactivos comprenden dos o más oligonucleótidos, en los que un oligonucleótido es la SEQ ID NO: 39 y al menos un oligonucleótido se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100 (99), 127 (126), 148, 170 (168), 185, 197, 208, 219 o variaciones al menos un 90 % idénticas a y que tienen el nucleótido terminal 3' de dichos oligonucleótidos, uno o más correspondientes segundos cebadores, y, opcionalmente, una o más sondas. En variaciones de este modo de realización, los reactivos comprenden la SEQ ID NO: 39 y uno o más oligonucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 11, 32, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228. El kit puede comprender además reactivos necesarios para la realización del ensayo de amplificación y detección, tales como nucleósidos trifosfato, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la polimerasa. En algunos modos de realización, la sonda se marca de manera detectable. En dichos modos de realización, el kit puede comprender reactivos para marcar y detectar el marcador.

En otro modo de realización más, la invención es una mezcla de reacción para detectar mutaciones en el gen PI3KCA, específicamente la mutación H1047Y y una o más de las mutaciones seleccionadas de H1047L, H1047R, H1047Y, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K, así como una búsqueda simultánea de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de las mutaciones enumeradas anteriormente. La mezcla comprende dos o más oligonucleótidos, en la que un oligonucleótido es la SEQ ID NO: 39 y al menos un oligonucleótido se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208, 219 o variaciones al menos un 90 % idénticas a y que tienen el nucleótido terminal 3' de dichos oligonucleótidos, uno o más correspondientes segundos cebadores, y, opcionalmente, una o más sondas. En variaciones de este modo de realización, la mezcla de reacción comprende uno o más oligonucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228. La mezcla de reacción puede comprender además reactivos tales como nucleósidos trifosfato, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la polimerasa.

En otro modo de realización más, la invención es un procedimiento de evaluación del cáncer en un paciente detectando, en la muestra de un paciente, mutaciones en el gen PI3KCA, específicamente la mutación H1047Y y una o más de las mutaciones seleccionadas de H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K, así como una búsqueda simultánea de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de las mutaciones enumeradas anteriormente, para la mutación H1047Y usando la SEQ ID NO: 39 del oligonucleótido y para cada una de las demás mutaciones usando un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208, 219 o variaciones al menos un 90 % idénticas a y que tienen el nucleótido terminal 3' de dichos oligonucleótidos. En variaciones de este modo de realización, los oligonucleótidos se seleccionan de las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.

Ejemplos

Condiciones de reacción ejemplares

En todos los ejemplos a continuación se usaron las siguientes condiciones de reacción. Cada reacción incluía las 10⁴ copias o molde de ADN mutante o natural, 0,1 µM de cada cebador selectivo y común, sonda de detección, uracil-N-glucosilasa, ADN polimerasa y un tampón adecuado para la ADN polimerasa. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de termociclado en el instrumento LIGHTCYCLER® 480 (Roche Molecular Diagnostics, Indianapolis, Ind.): 50 °C durante 5 minutos, seguido de 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos) y 65 ciclos de 93 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos). Los datos de fluorescencia se obtuvieron al inicio de cada etapa a 62 °C. Se usaron los valores de C_t de cada reacción para calcular ΔC_t. Se muestran el C_t promedio y la desviación estándar para cada ejemplo.

Ejemplo 1

Resultados de los cebadores para detectar la mutación H1047L en el gen PI3KCA humano

SEQ ID NO:	C _t wt	DE	C _t mut	DE	Δ C _t
1 (emparejamiento WT)	18,4	0,1	24,1	0,3	-5,7
2	31,8	0,2	18,8	0,1	13,0

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
3	43,2	3,0	18,9	0,1	24,3
4	35,6	0,5	20,8	0,0	14,8
5	45,1	5,3	19,7	0,0	25,4
6	61,9	5,2	21,0	0,0	40,9
7	38,8	1,4	19,7	0,1	19,1
8	55,3	6,0	19,8	0,1	35,5
9	49,2	5,3	18,8	0,1	30,3
10	44,8	5,2	19,0	0,0	25,8
11	47,8	1,4	18,9	0,0	28,9
12	31,8	0,2	19,7	0,1	12,1
13	39,6	1,5	19,9	0,0	19,7
14	18,4	0,1	24,1	0,3	-5,7
15	31,8	0,2	18,8	0,1	13,0
16	43,2	3,0	18,9	0,1	24,3

Ejemplo 2

Resultados de los cebadores para detectar la mutación H1047R en el gen PI3KCA humano.

5

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
17 (emparejamiento WT)	18,2	0,2	20,4	0,0	-2,2
18	32,2	0,3	18,9	0,0	13,3
19	31,7	0,3	19,5	0,0	12,2
20	33,9	0,4	19,5	0,0	14,4
21	35,5	1,0	20,1	0,3	15,4
22	32,7	0,7	19,4	0,1	13,3
23	33,7	0,6	19,5	0,0	14,2
24	31,9	0,4	18,9	0,0	12,9
25	29,8	1,0	18,9	0,1	10,9
26	35,4	0,7	22,3	0,1	13,2
27	37,1	0,6	22,8	0,0	14,3
28	37,0	0,7	22,7	0,0	14,3
29	41,7	5,1	22,3	0,1	19,4
30	40,2	2,4	24,7	0,2	15,5
31	43,4	3,2	25,1	0,5	18,3
32	65,0	0,0	33,5	0,0	31,5
33	38,8	0,9	23,1	0,3	15,8
34	38,4	0,7	23,1	0,3	15,2
35	43,0	1,8	24,6	0,5	18,5
36	40,4	0,0	22,7	0,2	17,8
37	38,3	0,9	23,2	0,0	15,1

Ejemplo 3

Resultados de los cebadores para detectar la mutación H1047Y en el gen PI3KCA humano.

10

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
38 (emparejamiento WT)	18,0	0,2	19,3	0,0	-1,3
39	47,5	2,9	22,6	0,0	24,9
40	32,8	0,3	19,3	0,0	13,5
41	37,3	2,4	24,6	0,1	12,7

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
42	33,2	0,4	18,9	0,0	14,3
43	34,4	0,8	19,4	0,0	15,0
44	35,0	0,9	19,1	0,2	15,9
45	36,1	2,4	20,2	0,0	15,9
46	36,0	0,4	19,5	0,2	16,5
47	35,8	0,8	19,5	0,1	16,3
48	30,0	0,2	19,6	0,1	10,4
49	34,4	0,5	19,7	0,0	14,7
50	33,3	0,3	20,4	0,0	12,9
51	45,8	7,9	23,3	0,0	22,5
52	45,1	7,6	21,8	0,1	23,4
53	52,9	6,5	24,1	0,1	28,8
54	60,8	10,4	27,2	0,0	33,5
55	34,7	1,2	19,3	0,0	15,4
56	33,1	1,3	19,8	0,0	13,3
57	38,2	1,3	22,9	0,7	15,3
58	65,0	0,0	42,5	0,3	22,5
59	61,6	6,1	24,6	0,1	37,0

Ejemplo 4

Resultados de los cebadores para detectar la mutación N345K en el gen PI3KCA humano.

5

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
60 (emparejamiento WT)	21,6	0,1	27,4	0,0	-5,8
61	34,1	0,1	23,8	0,0	10,3
62	44,2	1,0	24,0	0,1	20,2
63	43,5	1,6	25,4	0,1	18,0
64	44,0	1,3	24,4	0,1	19,6
65	33,7	0,3	23,9	0,1	9,8
66	25,5	0,3	23,2	0,1	2,3
67	33,9	0,4	23,8	0,0	10,1
68	44,7	1,4	25,9	0,1	18,8
69	39,7	0,3	25,7	0,0	14,0
70	47,9	1,1	27,0	0,6	20,9
71	35,2	0,5	23,6	0,0	11,5
72	55,7	9,4	24,6	0,0	31,1
73	60,7	8,2	27,5	0,2	33,2
74	32,6	0,4	23,4	0,3	9,2
75	65,0	0,0	29,6	0,0	35,4
76	29,6	0,2	26,6	0,1	3,0
77	58,8	4,0	25,4	0,1	33,4
78	65,0	0,0	25,4	2,1	39,6
79	45,4	4,2	27,5	0,1	17,8
80	62,4	6,3	29,7	0,3	32,8
81	51,4	5,2	26,0	0,1	25,4
82	65,0	0,0	40,8	0,0	24,2

Ejemplo 5

Resultados de los cebadores para detectar la mutación E542K en el gen PI3KCA humano

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
83 (emparejamiento WT)	23,9	0,5	30,8	0,2	-6,9
84	37,4	0,2	24,4	0,0	13,0
85	64,6	1,0	30,8	0,3	33,8
86	55,7	5,0	27,6	0,0	28,1
87	38,4	0,5	37,3	0,5	1,2
88	48,0	1,4	45,3	0,5	2,7
89	60,8	4,8	29,1	0,8	31,7
90	58,5	6,2	28,3	0,1	30,2
91	49,6	3,3	24,4	0,1	25,2
92	46,7	1,8	24,4	0,1	22,2
93	52,9	6,1	25,0	0,5	27,9
94	39,5	0,8	24,2	0,3	15,3
95	65,0	0,0	32,8	0,2	32,2
96	47,0	1,2	23,6	0,1	23,4
97	50,8	3,2	46,5	1,9	4,3

Ejemplo 6

5 *Resultados de los cebadores para detectar la mutación E545A en el gen PI3KCA humano*

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
98 (emparejamiento WT)	23,9	0,3	35,1	0,2	-11,2
99	24,4	0,2	24,1	0,2	0,3
100	48,4	3,8	25,6	0,0	22,9
101	47,6	3,5	25,6	0,3	22,0
102	42,6	1,2	24,9	0,0	17,7
103	35,5	1,0	24,5	0,2	11,0
104	39,3	1,5	24,6	0,0	14,7
105	35,8	1,0	24,7	0,1	11,1
106	32,4	0,5	24,4	0,1	8,0
107	36,2	0,8	24,7	0,0	11,5
108	40,5	0,8	24,8	0,2	15,7
109	24,9	0,6	23,7	0,2	1,3
110	35,2	0,8	25,5	1,7	9,7
111	31,0	0,7	22,9	0,0	8,2
112	41,6	1,7	23,5	0,1	18,1
113	45,1	1,1	23,8	0,0	21,3
114	65,0	0,0	35,6	0,0	29,4
115	65,0	0,0	65,0	0,0	0,0
116	60,7	1,2	34,3	0,1	26,4
117	65,0	0,0	48,7	0,3	16,3
118	65,5	1,5	35,3	0,3	30,2
119	64,9	0,3	33,6	0,4	31,3
120	65,0	0,0	34,3	0,4	30,7
121	65,0	0,0	58,2	9,6	6,8
122	56,6	4,6	33,4	0,1	23,2
123	65,0	0,0	39,7	0,0	25,3
124	60,1	1,8	34,1	0,5	26,0

Ejemplo 7

ES 2 691 306 T3

Resultados de los cebadores para detectar la mutación E545G en el gen PI3KCA humano

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
125 (emparejamiento WT)	23,7	0,5	25,1	0,2	-1,4
126	24,3	0,3	24,2	0,1	0,0
127	43,4	0,5	24,9	0,0	18,4
128	28,1	0,9	25,1	0,2	3,0
129	38,3	1,7	24,9	0,1	13,4
130	37,7	0,3	24,5	0,0	13,2
131	35,1	0,6	24,3	0,2	10,9
132	37,5	1,2	24,5	0,2	13,0
133	29,8	0,5	24,3	0,1	5,5
134	35,9	0,3	24,6	0,1	11,3
135	33,6	0,6	24,2	0,3	9,5
136	24,5	0,4	23,7	0,1	0,8
137	31,0	0,4	25,8	1,5	5,2
138	54,3	7,8	25,4	0,3	28,9
139	65,0	0,0	39,0	0,0	26,0
140	56,3	4,7	30,0	0,2	26,3
141	43,9	0,9	23,7	0,3	20,3
142	43,8	1,1	24,1	0,3	19,7
143	65,0	0,0	39,2	0,4	25,8
144	30,2	1,0	26,3	0,0	4,0
145	65,0	0,0	65,0	0,0	0,0
146	37,9	0,7	23,8	0,2	14,1

5 **Ejemplo 8**

Resultados de los cebadores para detectar la mutación E545K en el gen PI3KCA humano

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
147 (emparejamiento WT)	23,5	0,3	25,4	0,2	-1,9
148	29,1	0,5	23,9	0,0	5,2
149	45,7	2,7	26,4	0,0	19,3
150	42,1	1,1	24,9	0,1	17,2
151	26,5	0,5	30,9	0,1	-4,3
152	40,7	1,7	24,4	0,1	16,3
153	47,3	2,3	26,7	0,0	20,6
154	44,7	2,0	25,7	0,2	19,0
155	37,9	0,9	24,0	0,3	13,9
156	35,8	0,5	24,1	0,2	11,7
157	41,6	1,1	24,1	0,2	17,5
158	31,2	0,7	24,9	0,0	6,3
159	56,3	1,6	34,5	0,4	21,9
160	28,2	0,6	22,9	0,4	5,3
161	45,4	1,5	25,6	0,3	19,8
162	51,2	5,7	29,8	0,2	21,4
163	58,7	7,0	32,0	0,0	26,8
164	48,7	2,7	29,5	0,1	19,2
165	49,5	7,1	30,5	0,4	19,0
166	42,0	2,0	24,5	0,0	17,5

Ejemplo 9

Resultados de los cebadores para detectar la mutación Q546K en el gen PI3KCA humano

5

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
167 (emparejamiento WT)	23,3	0,5	25,8	0,1	-2,5
168	34,9	0,4	41,8	0,6	-6,9
169	26,2	0,6	28,4	0,0	-2,2
170	55,2	2,8	25,9	0,0	29,2
171	44,6	1,8	26,7	0,1	17,9
172	42,1	1,0	24,6	0,3	17,4
173	37,2	1,1	25,3	0,1	11,9
174	35,3	1,3	24,5	0,0	10,7
175	65,0	0,0	65,0	0,0	0,0
176	44,7	0,9	26,6	0,2	18,1
177	41,5	0,4	26,0	0,2	15,6
178	37,4	0,9	44,5	0,3	-7,0
179	65,0	0,0	65,0	0,0	0,0
180	65,0	0,0	65,0	0,0	0,0
181	48,9	2,9	25,2	0,1	23,7
182	33,4	0,3	24,4	0,0	9,0
183	40,1	1,1	25,8	0,1	14,3

Ejemplo 10

Resultados de los cebadores para detectar la mutación Q546E en el gen PI3KCA humano

10

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
184 (emparejamiento WT)	21,5	0,4	31,9	0,5	-10,4
185	30,8	0,5	22,6	0,0	8,2
186	36,7	1,2	24,6	0,1	12,1
187	39,0	0,6	27,8	0,0	11,1
188	56,8	5,8	27,6	0,4	29,2
189	38,3	0,7	23,5	0,1	14,8
190	35,0	0,4	23,9	0,1	11,2
191	43,7	0,8	23,8	0,1	19,9
192	50,5	3,8	25,3	0,4	25,3
193	38,3	0,8	26,4	0,1	11,8
194	52,7	3,1	24,7	0,1	28,1

Ejemplo 11

Resultados de los cebadores para detectar la mutación Q546L en el gen PI3KCA humano

15

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
195 (emparejamiento WT)	22,2	0,4	33,9	0,1	-11,7
197	31,2	0,7	21,9	0,1	9,3
198	63,0	2,5	29,5	0,1	33,5
199	56,5	3,0	23,2	0,3	33,3
200	47,1	2,3	22,8	0,0	24,2
201	56,4	5,6	23,1	0,2	33,3
202	51,9	4,6	24,3	0,2	27,6

ES 2 691 306 T3

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
203	55,9	2,6	23,5	0,2	32,4
204	42,4	0,6	22,6	0,1	19,8
205	39,7	0,9	22,4	0,4	17,3
206	44,8	1,7	22,4	0,2	22,4

Ejemplo 12

Resultados de los cebadores para detectar la mutación G1049R en el gen PI3KCA humano

5

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
207 (emparejamiento WT)	18,8	0,1	30,3	0,1	-11,5
208	32,2	0,4	20,4	0,0	11,8
209	36,1	0,5	22,3	0,1	13,8
210	41,6	2,1	20,7	0,1	20,9
211	43,4	1,6	26,4	0,0	16,9
212	49,9	8,2	20,1	0,3	29,8
213	48,3	5,6	20,4	0,1	28,0
214	41,3	2,2	20,8	0,0	20,5
215	43,5	4,9	20,8	0,1	22,8
216	48,3	2,9	20,7	0,1	27,7
217	53,0	5,1	20,5	0,1	32,5

Ejemplo 13

Resultados de los cebadores para detectar la mutación M1043I en el gen PI3KCA humano

10

SEQ ID NO:	Ct wt	DE	Ct mut	DE	Δ Ct
218	17,8	0,1	30,8	0,0	-13,0
219	46,7	4,2	19,5	0,1	27,1
220	53,8	6,5	26,7	0,0	27,1
221	51,0	9,1	32,1	0,3	19,0
222	38,7	2,5	22,0	0,0	16,7
223	52,1	5,0	21,7	0,0	30,4
224	50,6	5,2	25,6	0,0	25,0
225	51,5	9,1	20,5	0,0	31,0
226	52,0	2,5	19,7	0,0	32,3
227	50,0	5,0	20,5	0,0	29,5
228	61,5	5,8	20,1	0,0	41,3
229	65,0	0,0	35,5	0,0	29,5
230	65,0	0,0	23,2	0,1	41,8

Aunque la invención se haya descrito en detalle con referencia a ejemplos específicos, será evidente para un experto en la técnica que se puedan realizar diversas modificaciones dentro del alcance de la presente invención. Por tanto, no se debe limitar el alcance de la invención por los ejemplos descritos en el presente documento, sino por las reivindicaciones presentadas a continuación.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
 F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
 5
 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA DETECTAR MUTACIONES EN EL GEN PI3KCA
 (PIK3CA) HUMANO
 <130> 31384 WO-KOE
 10
 <150> 61/780.017
 <151> 13-03-2013
 <160> 230
 15
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 25
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 1
ttttgttgtc cagccaccat gat 23
 30
 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 2
 40
ttttgttgtc cagccaccat gaa 23
 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 45
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 50
 <400> 3
ttttgttgtc cagccaccat gca 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 55
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 60
 <400> 4
ttttgttgtc cagccaccat gga 23
 65

ES 2 691 306 T3

5 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

10 <400> 5
ttttgttgtc cagccacat gta 23

15 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 6
ttttgttgtc cagccacat caa 23

25 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 7
ttttgttgtc cagccacat taa 23

35 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 8
ttttgttgtc cagccacat aaa 23

45 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50 <400> 9
ttttgttgtc cagccaccaa gaa 23

55 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 65

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 10
ttttgttgtc cagccaccac gaa 23

<210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

15

<400> 11
ttttgttgtc cagccaccag gaa 23

20

<210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30

<400> 12
gtttttgttg tccagccacc atgaa 25

35

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

<400> 13
gtttttgttg tccagccacc atgaa 25

50

<210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

<400> 14
gtttttgttg tccagccacc atgaa 25

65

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(26)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina
 35
 <400> 15
ccggtttttgt tgtccagcca ccatgaa 27
 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (30)..(30)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina
 5
 <400> 16
aatccattgt tgttgtccag ccaccatgaa 30
 <210> 17
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 17
tttgttgtcc agccaccatg at 22
 20
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 30 <400> 18
tttgttgtcc agccaccatg cc 22
 <210> 19
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 19
tttgttgtcc agccaccatg gc 22
 45 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 20
 55 **tttgttgtcc agccaccatg tc** 22
 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 65

ES 2 691 306 T3

<400> 21
tttgttgtcc agccaccatc ac 22

5 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 22
tttgttgtcc agccaccatt ac 22

20 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 23
tttgttgtcc agccaccata ac 22

35 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 24
tttgttgtcc agccaccaag ac 22

50 <210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 25
tttgttgtcc agccaccacg ac 22

65 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

75 <400> 26
tttgttgtcc agccaccagg ac 22

80 <210> 27
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 27
tttgttgtcc agccacccatg at 22
 10
 <210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 20
 <400> 28
tttgttgtcc agccacccatg cc 22

 <210> 29
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 29
tttcatgaaa caaatgaatg atgcagg 27
 35
 <210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 45
 <400> 30
tttcatgaaa caaatgaatg atgcatg 27

 <210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 55
 <400> 31
tttcatgaaa caaatgaatg atgcaag 27

 <210> 32
 <211> 27
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <221> fuente

	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 32	
5	tttcatgaaa caaatgaatg atgcccg	27
	<210> 33	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 33	
	tttcatgaaa caaatgaatg atgcgcg	27
	<210> 34	
20	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 34	
	tttcatgaaa caaatgaatg atgctcg	27
30	<210> 35	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 35	
40	tttcatgaaa caaatgaatg atggacg	27
	<210> 36	
	<211> 27	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 36	
	tttcatgaaa caaatgaatg atgtacg	27
55	<210> 37	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 37	
65	tttcatgaaa caaatgaatg atgaacg	27

ES 2 691 306 T3

	<210> 38	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
10	<400> 38	
	tttgttgtcc agccaccatg atg	23
	<210> 39	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
20	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 39	
	tttgttgtcc agccaccatg aaa	23
25	<210> 40	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 40	
35	tttgttgtcc agccaccatg aca	23
	<210> 41	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 41	
	tttgttgtcc agccaccatg aga	23
	<210> 42	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
55	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 42	
	tttgttgtcc agccaccatg cta	23
60	<210> 43	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

ES 2 691 306 T3

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 43
tttgttgc cc agccaccatg gta 23

10 <210> 44
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 44
tttgttgc cc agccaccatg tta 23

25 <210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

35 <400> 45
tttgttgc cc agccaccatc ata 23

40 <210> 46
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50 <400> 46
tttgttgc cc agccaccatt ata 23

55 <210> 47
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 47
tttgttgc cc agccaccata ata 23

<210> 48
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>
 <221> base_modificada

<222> (23)..(23)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

5 <400> 48
gttttgttgt ccagccacca tgata 25

10 <210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

25 <400> 49
ttgtgttgtc cagccacat gata 24

30 <210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 50
agtatttcat gaaacaaatg aatgatgcgt 30

45 <210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

55 <400> 51
agtatttcat gaaacaaatg aatgatgctt 30

60 <210> 52
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 52
agtatttcat gaaacaaatg aatgatggat 30

<210> 53
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 53
agtatttcat gaaacaaatg aatgatgtat 30

10 <210> 54
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 54
agtatttcat gaaacaaatg aatgatgaat 30

25 <210> 55
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (29)..(29)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

35 <400> 55
agtgtttcat gaaacaaatg aatgatgcat 30

40 <210> 56
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(28)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

55 <400> 56
agtgtttcat gaaacaaatg aatgatgcat 30

60 <210> 57
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(28)
 <223> N4-etil-desoxicitosina

<400> 57
agtatttcat gaaacaaatg aatgatgcgt 30

5 <210> 58
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (29)..(29)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

20 <400> 58
agtatttcat gaaacaaatg aatgattcat 30

25 <210> 59
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(28)
 <223> N4-etil-desoxicitosina

40 <400> 59
agtatttcat gaaacaaatg aatgatgctt 30

45 <210> 60
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

55 <400> 60
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaat 30

60 <210> 61
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

70 <400> 61
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaaa 30

75 <210> 62
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 5
 <400> 62
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaca 30
 <210> 63
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 63
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaga 30
 20 <210> 64
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 30 <400> 64
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgata 30
 <210> 65
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 65
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgcaa 30
 45 <210> 66
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 66
 55 **ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtggaa** 30
 <210> 67
 <211> 30
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 65

<400> 67
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgtaa 30

5 <210> 68
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 68
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtcaaa 30

20 <210> 69
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 69
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgttaaa 30

35 <210> 70
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 70
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtaaaa 30

50 <210> 71
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 71
atagaaattc tttgtgcaac ctacgtgaaa 30

65 <210> 72
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (30)..(30)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

<400> 72
atgaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaaa 30

5 <210> 73
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (29)..(29)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

20 <400> 73
atgaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaaa 30

25 <210> 74
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(28)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

40 <400> 74
atgaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaaa 30

45 <210> 75
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (29)..(29)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

60 <400> 75
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaca 30

65 <210> 76
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>
 <221> base_modificada

ES 2 691 306 T3

<222> (28)..(28)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

 <400> 76
 5 **ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgcaa** 30

 <210> 77
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 15

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (29)..(29)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 20
 <400> 77
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtgaca 30

 <210> 78
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (30)..(30)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

 <400> 78
 40 **ataaaaattc tttgtgcaac ctacgggaaa** 30

 <210> 79
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (27)..(27)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

 55 <400> 79
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtcaaa 30

 <210> 80
 <211> 30
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 65 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (29)..(29)
 5 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

 <400> 80
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgggaaa 30

 10 <210> 81
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (27)..(27)
 <223> N4-metil-desoxicitosina

 25 <400> 81
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtcaaa 30

 <210> 82
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (27)..(27)
 <223> N4-metil-desoxicitosina
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (30)..(30)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina
 45
 <400> 82
ataaaaattc tttgtgcaac ctacgtcaaa 30

 <210> 83
 50 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 83
caatttctac acgagatcct ctctctg 27
 60
 <210> 84
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 84
caatttctac acgagatcct ctctcta 27

<210> 85
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 85
caatttctac acgagatcct ctctcaa 27

20 <210> 86
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 86
caatttctac acgagatcct ctctcca 27

<210> 87
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 87
caatttctac acgagatcct ctctcga 27

45 <210> 88
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50 <400> 88
caatttctac acgagatcct ctctgta 27

55 <210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 89

	caatttctac acgagatcct ctcttta	27
	<210> 90	
	<211> 27	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
10	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 90	
	caatttctac acgagatcct ctctata	27
15	<210> 91	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 91	
25	caatttctac acgagatcct ctcacta	27
	<210> 92	
	<211> 27	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
35	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 92	
	caatttctac acgagatcct ctcccta	27
40	<210> 93	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 93	
50	caatttctac acgagatcct ctcgcta	27
	<210> 94	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 94	
	cagtttctac acgagatcct ctctcta	27
	<210> 95	
	<211> 31	
65	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
5	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (31)..(31)	
10	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
	<400> 95	
	gaagcaattt ctacacgaga tcctctctct a	31
15	<210> 96	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<220>	
25	<221> base_modificada	
	<222> (29)..(29)	
	<223> N4- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxicitosina	
	<400> 96	
30	gaagcaattt ctacacgaga tcctctctct a	31
	<210> 97	
	<211> 27	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (25)..(25)	
	<223> N4- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxicitosina	
45	<400> 97	
	cagtttctac acgagatcct ctctcta	27
	<210> 98	
50	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 98	
60	gagatcctct ctctgaaatc actga	25
	<210> 99	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 691 306 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 99
gagatcctct ctctgaaatc actgc 25

<210> 100
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 100
gagatcctct ctctgaaatc actcc 25

20 <210> 101
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 101
gagatcctct ctctgaaatc acttc 25

<210> 102
 <211> 25
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 102
gagatcctct ctctgaaatc actac 25

45 <210> 103
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 103
gagatcctct ctctgaaatc acagc 25

55 <210> 104
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 104

	gagatcctct ctctgaaatc accgc	25
5	<210> 105 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	gagatcctct ctctgaaatc accgc	25
15	<210> 106 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
25	gagatcctct ctctgaaatc agtgc	25
30	<210> 107 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	gagatcctct ctctgaaatc attgc	25
40	<210> 108 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
50	gagatcctct ctctgaaatc aatgc	25
55	<210> 109 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	gggatcctct ctctgaaatc actgc	25
65	<210> 110 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina
 10
 <400> 110
gggatcctct ctctgaaatc actgc 25
 <210> 111
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina
 25
 <400> 111
gggatcctct ctctgaaatc actgc 25
 30
 <210> 112
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina
 45
 <400> 112
gagatcctct ctctgaaatc gctgc 25
 <210> 113
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina
 60
 <400> 113
gagatcctct ctctgaaatc attgc 25
 65
 <210> 114
 <211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

 <400> 114
 15 **gagatcctct ctctgaaatc actcc** 25

 <210> 115
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> Gclamp
 35
 <400> 115
gagatcctct ctctgaaatc actcc 25

 <210> 116
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (23)..(23)
 50 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

 <400> 116
gagatcctct ctctgaaatc accgc 25

 <210> 117
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 65

<223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

<400> 117
gagatcctct ctctgaaatc actac 25

5

<210> 118
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (23)..(23)
 <223> N4-etil-desoxicitosina

20

<400> 118
gagatcctct ctctgaaatc gccgc 25

<210> 119
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

35

<400> 119
gagatcctct ctctgaaatc accgc 25

40

<210> 120
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

55

<400> 120
gagatcctct ctctgaaatc acggc 25

<210> 121
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> N4-etil-desoxicitosina
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> N4-etil-desoxicitosina
 10

<400> 121
gagatcctct ctctgaaatc actcc 25

<210> 122
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> N4-etil-desoxicitosina
 25

<400> 122
gagatcctct ctctgaaatc acggc 25
 30

<210> 123
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina
 45

<400> 123
gagatcctct ctctgaaatc accgc 25

<210> 124
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (23)..(23)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina
 60

<400> 124
gagatcctct ctctgaaatc acagc 25

<210> 125
 65

ES 2 691 306 T3

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

10 <400> 125
gagatcctct ctctgaaatc actga 25

<210> 126
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 126
gagatcctct ctctgaaatc actgg 25

<210> 127
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 127
gagatcctct ctctgaaatc actcg 25

35 <210> 128
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 128
gagatcctct ctctgaaatc actag 25

<210> 129
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

55 <400> 129
gagatcctct ctctgaaatc acttg 25

60 <210> 130
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

ES 2 691 306 T3

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 130
gagatcctct ctctgaaatc acagg 25

10 <210> 131
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 131
gagatcctct ctctgaaatc accgg 25

25 <210> 132
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

35 <400> 132
gagatcctct ctctgaaatc acggg 25

40 <210> 133
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50 <400> 133
gagatcctct ctctgaaatc agtgg 25

55 <210> 134
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 134
gagatcctct ctctgaaatc aatgg 25

70 <210> 135
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

80 <400> 135
gagatcctct ctctgaaatc attgg 25

<210> 136
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 10
 <400> 136
gggatcctct ctctgaaatc actgg 25

 <210> 137
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 20

 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (22)..(22)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

 <400> 137
gggatcctct ctctgaaatc actgg 25
 30
 <210> 138
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina
 45
 <400> 138
gagatcctct ctctgaaatc actcg 25

 <210> 139
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 55

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 60 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 65 <223> N4-etil-desoxicitosina

<400> 139
gagatcctct ctctgaaatc actcg 25

5 <210> 140
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

20 <400> 140
gagatcctct ctctgaaatc acttg 25

25 <210> 141
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

35 <400> 141
gagatcctct ctctgaaatc actag 25

40 <210> 142
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> N4-etil-desoxicitosina

55 <400> 142
gagatcctct ctctgaaatc actcg 25

60 <210> 143
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)

	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
	<400> 143 gagatcctct ctctgaaatc aatgg	25
5	<210> 144 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<220> <221> base_modificada <222> (21)..(21) <223> Inosina	
20	<220> <221> base_modificada <222> (28)..(28) <223> N4- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxicitosina	
25	<400> 144 ctatacgaga tcctctctct naaatcactg g	31
30	<210> 145 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
40	<400> 145 agatcctctc tctgaaatca ctag	24
45	<210> 146 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<400> 146 agatcctctc tctgaaatca cggg	24
60	<210> 147 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
70	<400> 147 acgagatcct ctctctgaaa tcaactg	26
75	<210> 148 <211> 26	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 148
acgagatcct ctctctgaaa tcacta 26
 10
 <210> 149
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 20 <400> 149
acgagatcct ctctctgaaa tcacaa 26

 <210> 150
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 150
acgagatcct ctctctgaaa tcacca 26
 35 <210> 151
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 151
 45 **acgagatcct ctctctgaaa tcacga** 26

 <210> 152
 <211> 26
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 55 <400> 152
acgagatcct ctctctgaaa tcagta 26

 <210> 153
 <211> 26
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <221> fuente

	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 153 acgagatcct ctctctgaaa tcaata	26
5	<210> 154 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 154 acgagatcct ctctctgaaa tcatta	26
20	<210> 155 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 155 acgagatcct ctctctgaaa tccta	26
35	<210> 156 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 156 acgagatcct ctctctgaaa tcgcta	26
50	<210> 157 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 157 acgagatcct ctctctgaaa tctcta	26
65	<210> 158 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
75	<400> 158 aggagatcct ctctctgaaa tcacta	26
80	<210> 159	

	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<220>	
10	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(26)	
	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
	<400> 159	
15	aggagatcct ctctctgaaa tcacta	26
	<210> 160	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (24)..(24)	
	<223> N4-etil-desoxicitosina	
30	<400> 160	
	aggagatcct ctctctgaaa tcacta	26
	<210> 161	
35	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<220>	
	<221> base_modificada	
45	<222> (23)..(23)	
	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
	<400> 161	
50	aggagatcct ctctctgaaa tcacta	26
	<210> 162	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (24)..(24)	
	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
65	<400> 162	

	acgagatcct ctctctgaaa tcaata	26
	<210> 163	
	<211> 26	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
10	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (25)..(25)	
15	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
	<400> 163	
	acgagatcct ctctctgaaa tcacaa	26
20	<210> 164	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<220>	
30	<221> base_modificada	
	<222> (22)..(22)	
	<223> N4-metil-desoxicitosina	
	<220>	
35	<221> base_modificada	
	<222> (24)..(24)	
	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
	<400> 164	
40	acgagatcct ctctctgaaa tcaata	26
	<210> 165	
	<211> 26	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
50	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (25)..(25)	
	<223> N4- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxicitosina	
55	<400> 165	
	acgagatcct ctctctgaaa tcacca	26
	<210> 166	
60	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<221> fuente	

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (23)..(23)
 <223> N4-*terc*-butil-bencil-desoxicitosina

<400> 166
acgagatcct ctctctgaaa tcccta 26

10 <210> 167
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 167
agatcctctc tctgaaatca ctgagc 26

25 <210> 168
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 168
agatcctctc tctgaaatca ctgaga 26

35 <210> 169
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 169
agatcctctc tctgaaatca ctgaca 26

50 <210> 170
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 170
agatcctctc tctgaaatca ctgaaa 26

60 <210> 171
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

	<400> 171 agatcctctc tctgaaatca ctgata	26
5	<210> 172 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 172 agatcctctc tctgaaatca ctgcga	26
20	<210> 173 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 173 agatcctctc tctgaaatca ctgtga	26
35	<210> 174 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 174 agatcctctc tctgaaatca ctggga	26
50	<210> 175 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 175 agatcctctc tctgaaatca ctcaga	26
65	<210> 176 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
75	<400> 176 agatcctctc tctgaaatca ctaaga	26
80	<210> 177	

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

10 <400> 177
agatcctctc tctgaaatca cttaga 26

<210> 178
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 178
aggtcctctc tctgaaatca ctgaga 26

<210> 179
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (27)..(27)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

35 <400> 179
gaggtcctct ctctgaaatc actgaga 27

40 <210> 180
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

55 <400> 180
gaggtcctct ctctgaaatc actgaga 27

<210> 181
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

65

	<400> 181		
	gagatcctct ctctgaaatc actgaaa		27
5	<210> 182		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
15	<400> 182		
	gagatcctct ctctgaaatc actggga		27
20	<210> 183		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
30	<400> 183		
	gagatcctct ctctgaaatc actaaga		27
35	<210> 184		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
45	<400> 184		
	atcctctctc tgaaatcact gagc		24
50	<210> 185		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
60	<400> 185		
	atcctctctc tgaaatcact gagg		24
65	<210> 186		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
70	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
75	<400> 186		
	atcctctctc tgaaatcact gaag		24
80	<210> 187		
	<211> 24		

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 187
atcctctctc tgaaatcact gacg 24
 10
 <210> 188
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 20
 <400> 188
atcctctctc tgaaatcact gatg 24

 <210> 189
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 189
atcctctctc tgaaatcact gcgg 24
 35
 <210> 190
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 45
 <400> 190
atcctctctc tgaaatcact gggg 24

 <210> 191
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 55
 <400> 191
atcctctctc tgaaatcact gtgg 24

 <210> 192
 <211> 24
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <221> fuente

	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
5	<400> 192 atcctctctc tgaaatcact aagg	24
	<210> 193 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 193 atcctctctc tgaaatcact cagg	24
20	<210> 194 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 194 atcctctctc tgaaatcact tagg	24
	<210> 195 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
40	<400> 195 tcctctctct gaaatcactg agca	24
45	<210> 196 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 196 tcctctctct gaaatcactg agca	24
55	<210> 197 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
65	<400> 197 tcctctctct gaaatcactg agct	24

	<210> 198	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
10	<400> 198	
	tcctctctct gaaatcactg agat	24
	<210> 199	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
20	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 199	
	tcctctctct gaaatcactg aggt	24
25	<210> 200	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 200	
35	tcctctctct gaaatcactg agtt	24
	<210> 201	
	<211> 24	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 201	
	tcctctctct gaaatcactg aact	24
	<210> 202	
50	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 202	
60	tcctctctct gaaatcactg acct	24
	<210> 203	
	<211> 24	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<221>	fuelle	
	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
5	<400>	203	
		tcctctctct gaaatcactg atct	24
	<210>	204	
	<211>	24	
10	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<221>	fuelle	
15	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400>	204	
		tcctctctct gaaatcactg cgct	24
20	<210>	205	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<221>	fuelle	
	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400>	205	
30		tcctctctct gaaatcactg ggct	24
	<210>	206	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
35	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<221>	fuelle	
	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
40	<400>	206	
		tcctctctct gaaatcactg tgct	24
45	<210>	207	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<221>	fuelle	
50	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400>	207	
55		catgaaaca atgaatgatg cacatcatg	29
	<210>	208	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
60	<220>		
	<221>	fuelle	
	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
65	<400>	208	

	catgaaaca atgaatgatg cacatcatc	29
	<210> 209	
	<211> 29	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
10	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 209	
	catgaaaca atgaatgatg cacatcaac	29
15	<210> 210	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 210	
25	catgaaaca atgaatgatg cacatcacc	29
	<210> 211	
	<211> 29	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
35	<400> 211	
	catgaaaca atgaatgatg cacatcagc	29
	<210> 212	
40	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
45	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 212	
50	catgaaaca atgaatgatg cacatcctc	29
	<210> 213	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 213	
	catgaaaca atgaatgatg cacatcgtc	29
	<210> 214	
	<211> 29	
65	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
5	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 214	
	catgaaacaa atgaatgatg cacatcttc	29
10	<210> 215	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 215	
20	catgaaacaa atgaatgatg cacataatc	29
	<210> 216	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 216	
	catgaaacaa atgaatgatg cacatgatc	29
	<210> 217	
35	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 217	
45	catgaaacaa atgaatgatg cacattatc	29
	<210> 218	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<400> 218	
	agccaccatg atgtgatca ttc	23
	<210> 219	
	<211> 23	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
65	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 219 agccaccatg atgtgcatca tta	23
5	<210> 220 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 220 agccaccatg atgtgcatca taa	23
20	<210> 221 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 221 agccaccatg atgtgcatca tga	23
35	<210> 222 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 222 agccaccatg atgtgcatca ata	23
50	<210> 223 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 223 agccaccatg atgtgcatca cta	23
65	<210> 224 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
75	<400> 224 agccaccatg atgtgcatca gta	23
80	<210> 225 <211> 23 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
5	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 225	
	agccaccatg atgtgcatcc tta	23
10	<210> 226	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 226	
20	agccaccatg atgtgcatcg tta	23
	<210> 227	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 227	
	agccaccatg atgtgcatct tta	23
	<210> 228	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 228	
45	aggcaccatg atgtgcatca tta	23
	<210> 229	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (23) .. (23)	
	<223> N6- <i>terc</i> -butil-bencil-desoxiadenina	
60	<400> 229	
	aggcaccatg atgtgcatca tta	23
	<210> 230	
	<211> 23	
65	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<220>

<221> base_modificada

<222> (20) .. (20)

10 <223> N6-*terc*-butil-bencil-desoxiadenina

<400> 230

aggcaccatg atgtgcatca tta

23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido para detectar una mutación H1047Y en el gen PIK3CA que es al menos un 90 % idéntico a y que tiene el nucleótido terminal 3' de la SEQ ID NO: 39, que comprende 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en el que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3'.
- 10 2. Un procedimiento de ensayo de una muestra para determinar la presencia de la mutación H1047Y en el gen PIK3CA humano, que comprende poner en contacto la muestra con un oligonucleótido con nucleótido específico de alelo que comparte al menos un 90 % de identidad con y que tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 39, que comprende 3 o menos emparejamientos erróneos, excluyendo el nucleótido terminal 3', en el que al menos un emparejamiento erróneo o al menos un nucleótido modificado está entre los penúltimos 5 nucleótidos en el extremo 3'.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido es la SEQ ID NO: 46.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, que comprende además al menos un oligonucleótido específico de alelo para cada mutación distinta de H1047Y que comparte al menos un 90 % de identidad con y que tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208 y 219.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido se selecciona de las SEQ ID NO: 8, 21, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.
- 30 6. Un conjunto de oligonucleótidos para detectar la mutación H1047Y y una o más de las mutaciones H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K en el gen PIK3CA, que comprende una combinación de dos o más oligonucleótidos, en el que un oligonucleótido es idéntico a un oligonucleótido de la reivindicación 1 y al menos un oligonucleótido específico de alelo para cada mutación distinta de H1047Y que comparte al menos un 90 % de identidad con y tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208 y 219.
- 35 7. El conjunto de la reivindicación 6, en el que el oligonucleótido es la SEQ ID NO: 46 y/o el oligonucleótido específico de alelo se selecciona de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 21, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.
- 40 8. El conjunto de la reivindicación 6, que comprende las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.
- 45 9. Una mezcla de reacción para detectar la mutación H1047Y y una o más mutaciones H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K en el gen PIK3CA, que comprende un oligonucleótido idéntico a un oligonucleótido de la reivindicación 1 y al menos un oligonucleótido específico de alelo para cada mutación distinta de H1047Y que comparte al menos un 90 % de identidad con y que tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208, 219.
- 50 10. La mezcla de reacción de la reivindicación 9, en la que el oligonucleótido es la SEQ ID NO: 46 y/o el oligonucleótido específico de alelo se selecciona de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 21, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.
- 55 11. La mezcla de reacción de la reivindicación 9, que comprende las SEQ ID NO: 8, 21, 46, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.
- 60 12. Un procedimiento de evaluación del cáncer en un paciente detectando en la muestra del paciente la mutación H1047Y y una o más de las mutaciones H1047L, H1047R, N345K, E542K, E545A, E545G, E545K, G1049R, M1043I, Q546E, Q546L y Q546K en el gen PIK3CA, que comprende poner en contacto la muestra con un oligonucleótido idéntico a un oligonucleótido de la reivindicación 1 y un oligonucleótido con nucleótido específico de alelo para cada mutación distinta de H1047Y que comparte al menos un 90 % de identidad con y que tiene el mismo nucleótido terminal 3' que un oligonucleótido seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 61, 84, 100, 127, 148, 170, 185, 197, 208, 219.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el oligonucleótido es la SEQ ID NO: 46 y/o el oligonucleótido específico de alelo se selecciona de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 21, 78, 93, 113, 141, 166, 170, 194, 199, 217 y 228.