

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 437**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/EP2016/058324**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166269**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16717345 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3283645**

54 Título: **PCR múltiple para detectar fusiones génicas**

30 Prioridad:

17.04.2015 US 201562149381 P

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

24.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEGOVICH, ANN;
DUA, RAJIV;
KUO, DWIGHT;
MA, XIAOJU MAX y
ORDINARIO, ELLEN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 728 437 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

PCR múltiple para detectar fusiones génicas

5 **Antecedentes de la invención**

Una serie de cánceres se asocian con fusiones génicas. Quizás el primer ejemplo informado es la asociación de BCR-ABL con leucemia mielógena crónica (LMC) en los años 60 (Nowell y Hungerford (1960), *J. Natl. Cancer Inst.* 25:85). Desde entonces, el seguimiento de las fusiones de genes asociados con leucemia se ha desarrollado adicionalmente y se ha informado de cientos de fusiones génicas más para cánceres en muchos tejidos diferentes (Gerrard *et al.* (2011), *Am. J. Hematology* 86:313; Presner y Chinnaiyan (2009), *Curr. Opin Genet. Dev.* 19:82).

Otro ejemplo es el receptor tirosina cinasa ALK. Las fusiones EML4-ALK (proteína asociada con microtúbulos equinodermos tipo 4-cinasa del linfoma anaplásico) se asocian con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM). En este caso, la porción extracelular N terminal de ALK se reemplaza por EML4 (KIF5B, HIP1, KLC1, TFG también se pueden fusionar con ALK de manera similar). La expresión del gen de fusión resultante se impulsa por el promotor EML4 fuerte, dando como resultado una expresión mayor del dominio tirosina cinasa intracelular de ALK. Además, EML4 forma una superhélice que da como resultado una dimerización independiente de ligando y una activación constitutiva del dominio tirosina cinasa de ALK.

La detección de una fusión génica es importante para dirigir el tratamiento. La mayoría de los procedimientos actuales de detección requieren biopsia de tejido tumoral, lo que no es factible para muchos pacientes con cáncer, en especial en estadios tardíos. La detección en secciones de tejido biopsiadas se lleva a cabo típicamente por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) o inmunohistoquímica (IHQ). Las pruebas tienen altas tasas de positivos falsos y fondo, en parte debido al corte durante el procedimiento de seccionamiento. Por tanto, se requiere que los citólogos expertos observen múltiples secciones de tejido, lo que necesita una biopsia considerable de un paciente debilitado. También se ha intentado la detección de fusiones usando RT-PCR, pero esto no ha tenido éxito debido a la naturaleza altamente variable de las fusiones génicas. En el caso de EML4-ALK4, al menos 20 fusiones diferentes dan como resultado la tirosina cinasa activada. Otra dificultad con la RT-PCR es la cantidad y calidad del material genético del tejido tumoral, por ejemplo, en una forma incluida en parafina fijada en formol (FFPE) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.* (2014), *J. Thorac. Oncol.* 9:307; Liu *et al.* (2015), *PLoSOne* 10: e0117032). Gruber *et al.* (ídem) divulga un procedimiento de qRT-PCR para determinar los niveles de expresión relativos de regiones 3' y 5' del gen ALK usando diferencias de expresión para calificar los reordenamientos génicos con una alta concordancia con el análisis FISH.

Debido a que la detección requiere mucho tiempo y recursos, la tasa de prueba es relativamente baja. Los cánceres asociados con fusiones de ALK son muy sensibles a inhibidores de ALK tales como crizotinib y ceretinib. Las fusiones génicas con reordenado durante la transcripción (RET), tales como con KIF5B o CCDC6, también son sensibles al tratamiento, por ejemplo, con vandetanib (véase, Matsubara *et al.* (2007), *J. Thorac. Oncol.* 7:1872). La tasa baja de pruebas para fusiones génicas representa por tanto una gran oportunidad perdida para el tratamiento.

45 **Sumario de la invención**

En el presente documento se proporcionan procedimientos y composiciones para detectar fusiones genéticas, por ejemplo, genes de fusión.

Se proporciona una composición que comprende (1) al menos un primer par de cebadores que es específico para un sitio de fusión entre una primera región genética y una segunda región genética, en la que la primera y segunda regiones genéticas no son adyacentes en un genoma natural, y en la que el al menos un par de cebadores comprende al menos un cebador directo que comienza en el lado 5' del sitio de fusión y al menos un cebador inverso que comienza en el lado 3' del sitio de fusión; (2) un segundo par de cebadores específico para una porción de la primera región genética que está hacia 5' del sitio de fusión; (3) un tercer par de cebadores específico para una porción de la primera región genética que está hacia 3' del sitio de fusión; y una sonda marcada específica para cada uno de los productos de amplificación resultantes de cada uno de dichos pares de cebadores. De forma alternativa, el segundo y tercer pares de cebadores pueden ser específicos para la segunda región genética.

En algunos modos de realización, la primera región genética está en un gen (por ejemplo, gen 1). En algunos modos de realización, la segunda región genética está en un gen (por ejemplo, gen 2). En algunos modos de realización, la primera y segunda regiones genéticas están en los genes, donde el punto de fusión entre los genes no se encuentra en un genoma natural. En algunos modos de realización, el al menos un primer par de cebadores (1) comprende al menos un cebador directo que comienza en el gen 2, hacia 5' del sitio de fusión, y opcionalmente incluye el sitio de fusión. En algunos modos de realización, el al menos un primer par de cebadores (1) comprende al menos un cebador inverso que comienza en el gen 1, hacia 3' del sitio de fusión, y

opcionalmente incluye el sitio de fusión. En algunos modos de realización, el al menos un primer par de cebadores comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más pares de cebadores.

5 En algunos modos de realización, la composición comprende además al menos un par de cebadores específico para una secuencia de control, por ejemplo, un control interno. Los ejemplos de controles que se pueden usar para los ensayos divulgados actualmente incluyen, pero no se limitan a, SDH (succinato deshidrogenasa), LDHA (lactato deshidrogenasa A), NONO, PGK (fosfoglicerato cinasa 1), PPIH, HPRT1, beta-actina, GADPH, ACTB, y ARNr 16S.

10 En algunos modos de realización, cada conjunto de cebadores ((1), (2), (3) y el opcional al menos un par de cebadores de control) se asocia con un marcador diferente (por ejemplo, tinte) que emite una señal distinta de los otros marcadores. El marcador se puede unir directa o indirectamente al cebador directo o bien al cebador inverso de cada par de cebadores. En algunos modos de realización, se retienen los marcadores de modo que se marcan los productos de amplificación que resultan de cada conjunto de cebadores ((1), (2), (3) y el opcional al menos un par de cebadores). Además, la composición comprende al menos una sonda marcada específica para cada uno de los productos de amplificación que resultan de cada conjunto de cebadores ((1), (2), (3) y el opcional al menos un par de cebadores).

20 En algunos modos de realización, la composición comprende además una ADN polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa termoestable tal como Taq o un derivado de Taq. En algunos modos de realización, la composición comprende además transcriptasa inversa. En algunos modos de realización, la composición comprende además un tampón susceptible de polimerización por la ADN polimerasa y la transcriptasa inversa.

25 En algunos modos de realización, la composición comprende además una muestra biológica de un individuo o grupo de individuos. En algunos modos de realización, al individuo se le ha diagnosticado cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma de pulmón de células escamosas, adenocarcinoma de pulmón), carcinoma de vejiga, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, glioma, carcinoma de tiroides, cáncer de ovario, leucemia, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer renal o cáncer de mama.

30 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (suero o plasma), lavado broncoalveolar o biopsia de tejido. En algunos modos de realización, la muestra biológica incluye 100 nM o menos del polinucleótido que comprende el gen de fusión, por ejemplo, 0,01-100 nM, 0,01-25 nM, 0,01-5 nM, 0,02-0,5 nM o 0,02-0,1 nM.

35 En algunos modos de realización, la primera región genética (gen 1) se selecciona del grupo que consiste en ALK, RET, ROS, NTRK, BRAF, ABL y FGFR. En algunos modos de realización, la primera región genética es ALK, y la segunda región genética (gen 2) se selecciona del grupo que consiste en EML4, KIF5B, HIP1, KLC1 y TFG. En algunos modos de realización, la primera región genética es RET, y la segunda región genética (gen 2) se selecciona del grupo que consiste en KIF5B, CCDC6, NCOA4 y TRIM33.

40 En algunos modos de realización, el gen 1 es ALK y el gen 2 es EML4. En algunos modos de realización, el al menos un primer par de cebadores comprende al menos un cebador directo que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1-51, y al menos un cebador inverso que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:52-62. En algunos modos de realización, el segundo par de cebadores comprende un cebador directo que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:63-67 y un cebador inverso que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:68-72. En algunos modos de realización, el tercer par de cebadores comprende un cebador directo que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:73-77 y un cebador inverso que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:78-82.

45 En algunos modos de realización, el gen 1 es RET y el gen 2 es CCDC6. En algunos modos de realización, el primer par de cebadores comprende al menos un cebador directo que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:83-160, y al menos un cebador inverso que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:161-198. En algunos modos de realización, el segundo par de cebadores comprende un cebador directo que comprende la secuencia de SEQ ID NO:199 y un cebador inverso que comprende la secuencia de SEQ ID NO:200. En algunos modos de realización, el tercer par de cebadores comprende un cebador directo que comprende la secuencia de SEQ ID NO:201 y un cebador inverso que comprende la secuencia de SEQ ID NO:202.

50 Se proporcionan además procedimientos para detectar una fusión genética en una muestra biológica, es decir, un procedimiento para detectar si una muestra biológica de un individuo incluye un polinucleótido con una fusión genética o un gen de fusión. El procedimiento comprende (1) llevar a cabo una reacción de amplificación con una muestra biológica y las composiciones como se describe en el presente documento y anteriormente; (2) determinar la cantidad de producto de amplificación de al menos un primer par de cebadores (por ejemplo,

detectando la señal del marcador asociado con el al menos un primer par de cebadores); (3) detectar la presencia o ausencia de una diferencia en la cantidad de producto de amplificación del segundo par de cebadores y la cantidad de producto de amplificación del tercer par de cebadores (por ejemplo, detectando y comparando las señales de los marcadores asociados con el segundo y tercer pares de cebadores); y (4) detectar una fusión genética si (i) la cantidad de producto de amplificación del al menos un primer par de cebadores determinada en la etapa (2) es mayor que la cantidad de producto de amplificación del al menos un primer par de cebadores y un polinucleótido de control que no porta el gen de fusión; o (ii) la presencia de una diferencia se detecta en la etapa (3), en la que la reacción de amplificación se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) y en la que la muestra biológica es ARN de plasma del individuo.

En algunos modos de realización, el procedimiento se lleva a cabo con una muestra biológica y composición que comprende (a) al menos un primer par de cebadores (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más pares de cebadores) específico para un sitio de fusión entre una primera región genética (por ejemplo, gen 1) y una segunda región genética (por ejemplo, gen 2), en la que la primera y segunda regiones genéticas no son adyacentes en un genoma natural, y en la que el al menos un par de cebadores comprende al menos un cebador directo que comienza en el lado 5' del sitio de fusión y al menos un cebador inverso que comienza en el lado 3' del sitio de fusión; (b) un segundo par de cebadores específico para una porción de la primera región genética que está en 5' del sitio de fusión; y (c) un tercer par de cebadores específico para una porción de la primera región genética que está en 3' del sitio de fusión.

En algunos modos de realización del procedimiento, el al menos un primer par de cebadores (1) comprende al menos un cebador directo que comienza en el gen 2, en 5' del sitio de fusión, y opcionalmente incluye el sitio de fusión. En algunos modos de realización del procedimiento, el al menos un primer par de cebadores (1) comprende al menos un cebador inverso que comienza en el gen 1, en 3' del sitio de fusión, y opcionalmente incluye el sitio de fusión.

En algunos modos de realización del procedimiento, la composición comprende además al menos un par de cebadores específico para una secuencia de control, por ejemplo, un control interno. Los ejemplos de controles que se pueden usar para los ensayos divulgados actualmente incluyen, pero no se limitan a, SDH (succinato deshidrogenasa), LDHA (lactato deshidrogenasa A), NONO, PGK (fosfoglicerato cinasa 1), PPIH, HPRT1, beta-actina, GADPH, ACTB, y ARNr 16S. Como se explicó anteriormente, cada conjunto de cebadores se puede asociar con un marcador diferente (por ejemplo, tinte) que emite una señal distinta de los otros marcadores.

En algunos modos de realización del procedimiento, la composición comprende además una ADN polimerasa, y opcionalmente una transcriptasa inversa. En algunos modos de realización del procedimiento, la composición comprende además dNTP y/o tampón susceptible de polimerización por la ADN polimerasa y la transcriptasa inversa.

También se divulga un procedimiento, en el que la muestra es ácido nucleico aislado, por ejemplo, ADN o ARN, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (suero o plasma), lavado broncoalveolar o biopsia de tejido. En algunos modos de realización, el procedimiento se lleva a cabo en una muestra biológica que tiene 100 nM o menos del polinucleótido que comprende el gen de fusión, por ejemplo, 0,01-100 nM, 0,01-25 nM, 0,01-5 nM, 0,02-0,5 nM o 0,02-0,1 nM.

En algunos modos de realización, el procedimiento se lleva a cabo en una muestra biológica de un individuo, por ejemplo, un individuo diagnosticado de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma de pulmón de células escamosas, adenocarcinoma de pulmón), carcinoma de vejiga, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, glioma, carcinoma de tiroides, cáncer de ovario, leucemia, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer renal o cáncer de mama.

En algunos modos de realización del procedimiento, la primera región genética (gen 1) se selecciona del grupo que consiste en ALK, RET, ROS, NTRK, BRAF, ABL y FGFR. En algunos modos de realización, la primera región genética es ALK, y la segunda región genética (gen 2) se selecciona del grupo que consiste en EML4, KIF5B, HIP1, KLC1 y TFG. En algunos modos de realización del procedimiento, la primera región genética es RET, y la segunda región genética (gen 2) se selecciona del grupo que consiste en KIF5B, CCDC6, NCOA4 y TRIM33.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además recomendar un curso de tratamiento si se descubre una fusión genética. En algunos modos de realización, el curso de tratamiento incluye radioterapia o quimioterapia (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel). En algunos modos de realización, el curso de tratamiento incluye la administración de un fármaco que selecciona específicamente un gen implicado en la fusión genética. Por ejemplo, se puede recomendar o administrar un inhibidor de cinasa o inhibidor del receptor tirosina cinasa cuando uno de los genes implicados en la fusión genética es una cinasa que, como resultado de la fusión genética, tiene una expresión o nivel de actividad mayor que sin la fusión. Los ejemplos de fármacos que se pueden recomendar o administrar incluyen imatinib, gefinitib, toceranib, erlotinib, tykerb,

sunitinib, nilotinib, sorafenib, bosutinib, neratinib, vatalnib, afatinib, crizotinib, ceretinib, GSK1838705A, TAE-684, CEP-14083, AP26113 y NMS-E628. Véase, por ejemplo, Grande *et al.* (2011), *Mol. Cancer Ther.* 10:569, y Rajan y Schrupp (6 de abril de 2015), *Sem. Thoracic Cardiovascular Surgery*. En algunos modos de realización, se detecta una fusión génica que implica a ALK, y el curso de tratamiento incluye la recomendación o administración de un fármaco seleccionado del grupo que consiste en crizotinib, ceretinib, GSK1838705A, TAE-684, CEP-14083, AP26113 y NMS-E628. En algunos modos de realización, se detecta una fusión génica que implica a RET y el curso de tratamiento incluye la recomendación o administración de un fármaco seleccionado del grupo que consiste en sorafenib, vandetanib, motesanib, sunitinib y XL-184 (véase, por ejemplo, Mologni (2011), *Curr. Med. Chem.* 18:162).

Se proporcionan además kits para detectar una fusión genética como se describe en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de qRT-PCR (PCR con transcriptasa inversa cuantitativa) usando ARN de células naturales (control), y ARN natural enriquecido con ARN de células con fusiones EML4-ALK en las proporciones indicadas. Las muestras en las columnas de izquierda a derecha en los gráficos están en el mismo orden que se enumera de arriba a abajo debajo de los gráficos. El panel superior muestra Ct para cada conjunto de cebadores. Los conjuntos de cebadores se describen en el triángulo en la parte inferior izquierda, junto con los tintes respectivos (FAM, HEX, JA270 y Cy5.5). El panel inferior muestra los valores de Ct relativo (CtR) basados en el control interno de la succinato deshidrogenasa (SDH-IC). Cabe destacar la diferencia entre la amplificación hacia 5' del sitio de fusión y la amplificación hacia 3' del sitio de fusión a la derecha. Las estrellas indican muestras con una fusión EML4-ALK detectada. Cada disminución en el valor de Ct se correlaciona con un incremento en la cantidad de molde de 2 veces.

La figura 2 muestra los resultados de qRT-PCR para detectar CCDC6-RET. El panel superior muestra los valores de Ct para ARN natural (CRL5908), o natural enriquecido con la cantidad indicada de ARN de células que portan el CCDC6-RET (LC2AD). El panel inferior muestra los valores de CtR, y la diferencia entre la amplificación hacia 5' del sitio de fusión y la amplificación hacia 3' del sitio de fusión a la derecha. De nuevo, las muestras en las columnas de izquierda a derecha en los gráficos están en el mismo orden que se enumera de arriba a abajo al lado de los gráficos.

La figura 3 muestra los valores de Ct para los conjuntos de cebadores indicados (igual que en la figura 2). Las muestras en las columnas de izquierda a derecha en el gráfico están en el mismo orden que se enumera de arriba a abajo al lado del gráfico. En este caso, las muestras incluyen ARN de ARNcc, así como ARN de células positivas para CCDC6-RET valoradas en ARN natural.

La figura 4 muestra los valores de CtR de los datos mostrados en la figura 3. De nuevo, la diferencia entre la amplificación hacia 5' del sitio de fusión y la amplificación hacia 3' del sitio de fusión se muestra a la derecha. Las estrellas indican la detección de una fusión CCDC6-RET.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

Los autores de la presente invención han descubierto un procedimiento múltiple, cuantitativo y novedoso de detección de fusiones entre regiones genéticas. Los procedimientos divulgados actualmente requieren solo una cantidad pequeña de muestra del paciente que se puede recoger de forma no invasiva, por ejemplo, ARN libre circulante (ARNcc) de plasma.

Las pruebas actuales requieren biopsia o bien grandes cantidades de plasma, debido a la cantidad limitada de ácidos nucleicos circulantes que se originan de un tumor. Los procedimientos descritos actualmente permiten un ensayo de un tubo extremadamente sensible para detectar fusiones génicas en al menos dos formas. En el primero, se usan múltiples cebadores específicos para diversas fusiones para amplificar a través del sitio de fusión. En el segundo, se usan dos conjuntos de cebadores que amplifican fuera del sitio de fusión. Un conjunto de cebadores amplifica una región del gen afectado que está secuencia arriba del sitio de fusión (hacia 5' del sitio de fusión), y el otro conjunto de cebadores amplifica una región del gen afectado que está secuencia abajo del sitio de fusión (hacia 3' del sitio de fusión).

Finalmente, se puede incluir un conjunto de cebadores de control específico para una secuencia conocida para garantizar la presencia y calidad del ácido nucleico en la muestra. El procedimiento por tanto utiliza cuatro conjuntos de cebadores: (i) específico del sitio de fusión, (ii) hacia 5' del sitio de fusión; (iii) hacia 3' del sitio de fusión; y opcionalmente (iv) control. Cada uno de (i), (ii), (iii) y (iv) se puede asociar con un marcador o tinte diferente y detectarse usando un detector de 4 canales.

Los cebadores específicos de sitio de fusión (i) incluyen al menos un cebador directo (5') y al menos uno inverso (3'), pero pueden incluir múltiples variantes de cada uno para capturar diferentes variantes del sitio de fusión. Como se muestra en los ejemplos en el presente documento, se usaron siete cebadores directos diferentes y dos cebadores inversos diferentes para detectar el sitio de fusión para ALK. Se usaron nueve cebadores directos diferentes y dos cebadores inversos diferentes para detectar el sitio de fusión para RET. Los cebadores específicos de sitio de fusión (i) se pueden disponer en cualquier lado de, pero sin incluir el sitio de fusión, o se pueden disponer de modo que uno de los cebadores cubra el sitio de fusión. El cebador directo o bien inverso, o ambos, se pueden marcar de modo que todos los productos de amplificación de los cebadores específicos de sitio de fusión (i) incluyan el mismo marcador.

Los cebadores hacia 5' del sitio de fusión (ii) y los cebadores hacia 3' del sitio de fusión (iii) se pueden diseñar para cualquier gen de fusión miembro, dependiendo del tipo de fusión. El objetivo es comparar la cantidad de regiones genéticas en cualquier lado del sitio de fusión. Si son iguales, entonces no hay fusión presente. Es decir, una región 5' del punto de ruptura y una región 3' del punto de ruptura todavía están intactas. Si no son iguales, un lado del gen se expresa a un nivel menor que el otro lado, indicando que se ha producido una fusión. Por ejemplo, con EML4-ALK, se detectaría una fusión si los cebadores hacia 5' del sitio de fusión dieran como resultado una señal de amplificación menor que los cebadores hacia 3' del sitio de fusión (véase el ejemplo 1 y la figura 1). De nuevo, el cebador directo, el cebador inverso o ambos se pueden marcar de modo que todos los productos de amplificación de (ii) incluyan el mismo marcador, y todos los productos de amplificación de (iii) incluyan el mismo marcador.

El número de cebadores en el conjunto de cebadores específicos de variante (i) se puede expandir para detectar varias variantes diferentes de una fusión genética dada. Los cebadores hacia 5' del sitio de fusión (ii) y los cebadores hacia 3' del sitio de fusión (iii) proporcionan una copia de seguridad, en caso de que una fusión variante particular no se amplifique y se detecte por el conjunto de cebadores específicos de variante (i).

El conjunto de cebadores de control (iv) puede ser específico para cualquier ácido nucleico que se espera que aparezca en el plasma, por ejemplo, un gen constitutivo. De nuevo, el directo o el inverso o bien ambos se pueden marcar de modo que los productos de amplificación de (iv) incluyan el mismo marcador.

II. Definiciones

Una "fusión genética" es una secuencia cromosómica híbrida formada por la unión de dos ubicaciones cromosómicas que se separaron previamente. La fusión se puede producir entre genes en el mismo cromosoma (por ejemplo, delección intersticial o inversión cromosómica) o en cromosomas diferentes (por ejemplo, translocación).

Un "gen de fusión" es un gen híbrido formado por la unión de dos genes que se separaron previamente. El gen de fusión no necesita incluir necesariamente la secuencia codificante de ambos genes, pero puede incluir la secuencia no codificante de uno de los genes, por ejemplo, el promotor o las regiones 3' no traducidas. La denominación de los genes que comprenden un gen de fusión como "gen 1", "gen 2", "gen A", "gen B", etc., se usa para distinguir entre genes que forman la fusión y no se refiere necesariamente a la posición de los genes en la fusión.

Los términos "sitio de fusión", "punto de fusión", "punto de ruptura" y términos similares se refieren al punto en una fusión genética donde un nucleótido de un gen o ubicación genética se encuentra adyacente a un nucleótido de otro gen o ubicación genética.

Los términos "región diana", "porción diana", "fragmento diana" y términos similares se refieren a una región de una secuencia de ácido nucleico diana que se va a amplificar y/o analizar.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) e incluyen ácidos nucleicos naturales (adenosina, guanidina, citosina, uracilo y timidina), no naturales y modificados. El término no se limita por la longitud (por ejemplo, número de monómeros) del polímero. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario y en general contendrá enlaces fosfodiéster 5'-3', aunque en algunos casos, los análogos nucleotídicos pueden tener otras uniones. Los monómeros se denominan típicamente nucleótidos. El término "nucleótido no natural" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que contiene una base nitrogenada, glúcido o grupo fosfato modificado, o que incorpora un resto no natural en su estructura. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen didesoxinucleótidos, nucleótidos biotinilados, aminados, desaminados, alquilados, bencilados y marcados con fluoróforo.

El término "cebador" se refiere a un ácido nucleico corto (un oligonucleótido) que actúa como un punto de inicio de la síntesis de cadenas polinucleotídicas por un ácido nucleico polimerasa en condiciones adecuadas. Las reacciones de síntesis y amplificación de polinucleótidos incluyen típicamente un tampón apropiado, dNTP y/o rNTP, y uno o más cofactores opcionales, y se llevan a cabo a una temperatura adecuada. Un cebador incluye

típicamente al menos una región hibridada a la diana que es al menos sustancialmente complementaria a la secuencia diana. Esta región tiene típicamente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos. Un "par de cebadores" se refiere a un cebador directo y un cebador inverso (a veces llamados cebadores 5' y 3') que son complementarios a las cadenas opuestas de una secuencia diana y se diseñan para amplificar la secuencia diana. Los cebadores directo e inverso se disponen dentro de una distancia amplificable entre sí en la secuencia diana, por ejemplo, aproximadamente 10-5000 nucleótidos, o aproximadamente 25-500 nucleótidos. Un "conjunto de cebadores" se refiere a uno o más pares de cebadores, o una combinación de al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso. Por ejemplo, un conjunto de cebadores puede incluir 3 cebadores directos y 1 cebador inverso, de modo que se pueden producir potencialmente 3 productos de amplificación distintos.

Un conjunto de cebadores o par de cebadores que es específico para una secuencia (o porción de un gen) que está hacia 5' (o 3') de un sitio de fusión (o punto de ruptura) se refiere a cebadores usados para amplificar una secuencia que no incluye el sitio de fusión o punto de ruptura.

Como se usa en el presente documento, "sonda" quiere decir cualquier molécula que se puede unir selectivamente a una biomolécula diana específicamente destinada, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de interés que se va a unir, capturar o hibridar por las sondas.

Las palabras "complementario" o "complementariedad" se refieren a la capacidad de un ácido nucleico en un polinucleótido para formar un par de bases con otro ácido nucleico en un segundo polinucleótido. Por ejemplo, la secuencia A-G-T (A-G-U para ARN) es complementaria a la secuencia T-C-A (U-C-A para ARN). La complementariedad puede ser parcial, en la que solo algunos de los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con el emparejamiento de bases, o completa, donde todos los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con el emparejamiento de bases. Una sonda o cebador se considera "específico para" una secuencia diana si es al menos parcialmente complementario a la secuencia diana. Dependiendo de las condiciones, el grado de complementariedad de la secuencia diana es típicamente mayor para un ácido nucleico más corto tal como un cebador (por ejemplo, más de un 80 %, 90 %, 95 % o mayor) que para una secuencia más larga.

Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, o dos o más polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o aminoácidos, que son iguales (por ejemplo, aproximadamente un 60 % de identidad, por ejemplo, al menos cualquiera de un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o identidad mayor en una región especificada, cuando se compara y alinea para obtener la correspondencia máxima en un margen de comparación o región designada) como se mide usando los algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto, o por alineación manual e inspección visual. Véase, por ejemplo, el sitio web del NCBI en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Se dice entonces que dichas secuencias son "sustancialmente idénticas". El porcentaje de identidad se determina típicamente sobre secuencias óptimamente alineadas, de modo que la definición se aplica a las secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como a las que tienen sustituciones. Los algoritmos usados comúnmente en la técnica representan huecos y similares. Típicamente, la identidad existe en una región que comprende una secuencia que tiene una longitud de al menos aproximadamente 8-25 aminoácidos o nucleótidos, o en una región que tiene una longitud de 50-100 aminoácidos o nucleótidos, o en toda la longitud de la secuencia de referencia.

El término "alelo" se refiere a una variante de secuencia de un gen. Una o más diferencias genéticas pueden constituir un alelo.

El término "kit" se refiere a cualquier fabricación (por ejemplo, un envase o un recipiente) que incluye al menos un reactivo, tal como una sonda de ácido nucleico o conjunto de sondas o similares, para amplificar, capturar, marcar/convertir o detectar específicamente ARN o ADN como se describe en el presente documento.

El término "condiciones de amplificación" se refiere a condiciones en una reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, amplificación por PCR) que permiten la hibridación y extensión dependiente de molde de los cebadores. El término "amplicón" se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene toda o un fragmento de la secuencia de ácido nucleico diana y que se forma como producto de la amplificación *in vitro* por cualquier procedimiento de amplificación adecuado. Diversas condiciones de PCR se describen en *PCR Strategies* (Innis *et al.*, 1995, Academic Press, San Diego, CA) en el capítulo 14; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.*, Academic Press, NY, 1990)

El término "ácido nucleico polimerasa termoestable" o "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa, que es relativamente estable a temperaturas elevadas cuando se compara, por ejemplo, con polimerasas de *E. coli*. Una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en condiciones de termociclado típicas de la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Las polimerasas termoestables ejemplares incluyen las de *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp.* Z05 (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.674.738) y mutantes de *Thermus sp.* Z05 polimerasa, *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus*

filiformis, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, familia *Hot Spring B/clon 7*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosipho africanus*, y versiones modificadas de las mismas.

5 El término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a cualquier composición que contiene o que se sospecha que contiene ácido nucleico de un individuo. El término incluye componentes purificados o separados de células, tejidos o sangre, por ejemplo, ADN, ARN, proteínas, porciones sin células o lisados celulares. En algunos modos de realización, el análisis se realiza en muestras de plasma aisladas de sangre; los términos "detectado en la sangre del paciente" y "detectado en el plasma del paciente" se usan de manera intercambiable para querer decir
10 que la sangre se obtiene del paciente y el plasma derivado de la misma se usa para el análisis. Una muestra también se puede referir a otros tipos de muestras biológicas, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre completa y componentes de sangre (capa leucocítica), saliva, orina, lágrimas, semen, líquidos vaginales, biopsias tisulares y otros líquidos y tejidos, incluyendo tejidos incluidos en parafina. Las muestras también pueden incluir constituyentes y componentes de cultivos *in vitro* de células obtenidas de un individuo, incluyendo líneas celulares.
15

Una muestra o valor de "control" se refiere a una muestra que sirve como referencia, normalmente una referencia conocida, para su comparación con una muestra de prueba o condiciones de prueba. Por ejemplo, se puede tomar una muestra de prueba de una condición de prueba, por ejemplo, de un individuo que se sospecha que tiene cáncer, y comparar con muestras de condiciones conocidas, por ejemplo, de un individuo sin cáncer (control negativo), o de un individuo que se sabe que tiene cáncer (control positivo). En el contexto de la presente divulgación, un ejemplo de un control negativo sería una muestra biológica de un individuo sano (sin cáncer) conocido, y un ejemplo de un control positivo sería una muestra biológica de un paciente o línea celular conocida por tener una fusión génica particular. Un control también puede representar un valor promedio o un intervalo recogido de una serie de pruebas o resultados. También se puede preparar un control para las condiciones de reacción. Por ejemplo, un control positivo para la presencia de ácido nucleico podría incluir cebadores o sondas que detectarían una secuencia que se sabe que está presente en la muestra, mientras que un control negativo estaría libre de ácidos nucleicos. Un experto en la técnica reconocerá que se pueden diseñar controles para la evaluación de cualquier número de parámetros. Por ejemplo, se puede idear un control para comparar el beneficio terapéutico basado en datos farmacológicos (por ejemplo, semivida) o medidas terapéuticas (por ejemplo, comparación de beneficio y/o efectos secundarios). Se pueden diseñar controles para aplicaciones *in vitro*. Un experto en la técnica entenderá qué controles son valiosos en una situación dada y podrá analizar datos basados en comparaciones con valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la significación de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado son muy variables en los controles, la variación en las muestras de prueba no se considerará significativa.
20
25
30
35

El término "diagnóstico" se refiere a la probabilidad relativa de que un sujeto tenga un trastorno tal como cáncer o determinado tipo de cáncer (por ejemplo, resultante de una fusión génica). De forma similar, el término "pronóstico" se refiere a una probabilidad relativa de que se pueda producir un determinado resultado futuro en el sujeto. Por ejemplo, en el contexto de la presente divulgación, diagnóstico se puede referir a la clasificación de un cáncer o a la probabilidad de que un individuo responda a un tratamiento particular. Los términos no pretenden ser absolutos, como se apreciará por cualquier experto en el campo del diagnóstico médico.
40

Los términos "terapia", "tratamiento" y "mejoría" se refieren a cualquier reducción en la gravedad de los síntomas. En el caso de tratar el cáncer, el tratamiento se puede referir a, por ejemplo, reducir el tamaño del tumor, número de células cancerosas, tasa de crecimiento, actividad metastásica, reducir la muerte celular de células no cancerosas, reducción de náuseas y otros efectos secundarios de quimioterapia o radioterapia, etc. Los términos "tratar" y "prevenir" no pretenden ser términos absolutos. El tratamiento y la prevención se pueden referir a cualquier retraso en el inicio, mejoría de los síntomas, mejora en la supervivencia del paciente, incremento en el tiempo o tasa de supervivencia, etc. El tratamiento y la prevención pueden ser completos (niveles indetectables de células neoplásicas) o parciales, de modo que se encuentren menos células neoplásicas en un paciente de lo que se hubiera producido sin el tratamiento. El efecto del tratamiento se puede comparar con un individuo o conjunto de individuos que no reciben el tratamiento (por ejemplo, individuos que tienen la misma fusión genética), o con el mismo paciente antes del tratamiento o en un momento diferente durante el tratamiento. En algunos aspectos, la gravedad de la enfermedad se reduce en al menos un 10 %, en comparación, por ejemplo, con el individuo antes de la administración o con un individuo de control que no esté en tratamiento. En algunos aspectos, la gravedad de la enfermedad se reduce en al menos un 25 %, 50 %, 75 %, 80 % o 90 %, o en algunos casos, ya no es detectable usando técnicas de diagnóstico estándar.
45
50
55

El término "ciclo umbral" o "Ct" es una medida de concentración relativa y se usa comúnmente en la PCR en tiempo real (también conocida como qPCR). Ct se refiere a la intersección de una curva de amplificación y una línea umbral. La línea umbral a menudo se establece en un punto cuando se puede detectar la señal sobre el fondo, o cuando una reacción de amplificación entra en la fase exponencial. El Ct se puede ver afectado por la concentración de la diana y las condiciones de amplificación, por ejemplo, el efecto de las condiciones sobre los marcadores detectables y la eficacia de amplificación. Un Ct mayor corresponde a un tiempo más largo para alcanzar el valor umbral, ya sea debido a la baja concentración de diana o amplificación ineficaz.
60
65

Los términos "individuo", "sujeto", "paciente" y términos similares se usan de manera intercambiable y se refieren a, excepto donde se indique, mamíferos tales como humanos y primates no humanos, así como conejos, ratas, ratones, perros, gatos y otras especies de mamíferos. El término no indica necesariamente que al sujeto se le haya diagnosticado una enfermedad particular, sino que se refiere típicamente a un individuo bajo supervisión médica. Un paciente puede estar buscando tratamiento, seguimiento, ajuste o modificación de un régimen terapéutico existente, etc. Un paciente puede incluir individuos que no han recibido tratamiento, están recibiendo actualmente tratamiento, se han sometido a cirugía y los que han interrumpido el tratamiento.

Los términos "marcador", "marca", "resto detectable" y términos similares se refieren a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen tintes fluorescentes, agentes luminiscentes, radioisótopos (por ejemplo, ^{32}P , ^3H), reactivos electrodenso o un resto basado en afinidad, por ejemplo, una "marca His" para purificación, o una "marca estreptavidina" que interactúa con biotina.

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Pfaffl, *Methods: The ongoing evolution of qPCR*, vol. 50 (2010); van Pelt-Verkuil *et al.*, *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, Springer (2010); Lackie, *DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier (4.^a ed. 2007); Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989). El término "un" o "una" pretende querer decir "uno/a o más". Los términos "comprender", "comprende" y "que comprende", cuando preceden la recitación de una etapa o un elemento, pretenden querer decir que la adición de otras etapas o elementos es opcional y no se excluye.

III. Genes de fusión

Son conocidos una serie de genes de fusión asociados con cáncer y aparecen en todos los tipos de cánceres. Estos se producen comúnmente cuando un miembro de la fusión es una cinasa implicada en una vía de señalización procrecimiento, y el otro miembro contribuye a la expresión o señalización elevada o constitutiva. Las composiciones y procedimientos descritos actualmente se pueden usar para detectar cualquier fusión genética, ya que se pueden diseñar cebadores para amplificar y detectar el sitio de fusión, y para amplificar y detectar regiones secuencia arriba y secuencia abajo del sitio de fusión. Además, debido a que los procedimientos divulgados se pueden llevar a cabo con cantidades limitadas de ARNcc, no se requiere la localización de un tumor y la biopsia.

Los ejemplos de genes de fusión que se pueden detectar de acuerdo con la presente divulgación incluyen los que implican tirosina cinasas tales como ALK, RET, ROS, NTRK (receptor tirosina cinasa neurótrofo), BRAF, ABL y FGFR (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos). Los ejemplos particulares incluyen pero no se limitan a EML4-ALK, KIF5B-ALK, HIP1-ALK, KLC1-ALK, TFG-ALK, KIF5B-RET, CCDC6-RET, NCOA4-RET, TRIM33-RET, ERC1-RET, BCR-ABL, FGFR3-TACC3, C11orf95-RELA, DNAJB1-PRKACA, TMPRSS2-ERG, PML-RARA, EGFR-SEPT14, RPS6KB1-VMP1, ETV6-NTRK3, SND1-BRAF, MLL-MLLT10, MLL-ELL, EHMT1-GRIN1, NSD1-ZFN346, PPP1CB-PLB1, KDM2A-RHOD, NSD1-NUP98 y MLL-MLLT4 (véase, por ejemplo, Yoshihara *et al.* (15 de diciembre de 2014), *Oncogene*).

IV. Preparación de la muestra

Las muestras para someter a prueba fusiones genéticas se pueden obtener de cualquier fuente, pero se obtienen ventajosamente de manera no invasiva, por ejemplo, de sangre o una fracción de sangre. Las muestras para los presentes procedimientos son ARN de plasma de un individuo. Los procedimientos para aislar ácidos nucleicos de muestras biológicas son conocidos, por ejemplo, como se describe en Sambrook, y varios kits están disponibles comercialmente (por ejemplo, High Pure RNA Isolation Kit, High Pure Viral Nucleic Acid Kit, y MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit de Roche).

Se prepara ARN y se usa como molde para la amplificación por PCR, para lo que se requiere una etapa de transcripción inversa para preparar el ADNc. A continuación se puede usar una ADN polimerasa tal como Taq u otra polimerasa termoestable para efectuar la amplificación.

Como se muestra en los ejemplos, los procedimientos divulgados actualmente son extraordinariamente sensibles, y se pueden usar para detectar mutaciones de fusión de tan solo 20 copias en una muestra diluida 1:4000 en ARN natural. Esto permite la detección en muestras donde la secuencia diana es muy rara, por ejemplo, ARN libre circulante (ARNcc).

La muestra de acuerdo con la presente invención es ARN aislado de plasma sanguíneo. Dependiendo de la afección del paciente, se pueden obtener aproximadamente 1-10 ml de plasma para someter a prueba (normalmente aproximadamente 2 ml). Los kits para aislar ARN libre circulante están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Norgen Biotek Corp o Qiagen.

V. Amplificación y detección

5 Se puede llevar a cabo la amplificación de ácido nucleico usando cualquier procedimiento dependiente de cebadores. En algunos modos de realización, la amplificación es cuantitativa, de modo que la abundancia relativa o real de una diana de amplificación dada se puede determinar por la cantidad del producto de amplificación.

10 Se pueden usar procedimientos basados en ADN para los procedimientos de amplificación y detección actualmente divulgados, por ejemplo, PCR. En algunos modos de realización, se usa PCR en tiempo real o cuantitativa (RT-PCR o qPCR). La qPCR permite la detección y medición fiables de productos generados durante cada ciclo del procedimiento de PCR. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica, y los kits y reactivos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Roche Molecular Systems, Life Technologies, Bio-Rad, etc. Véase, por ejemplo, Pfaffl (2010), *Methods: The ongoing evolution of qPCR* vol. 50. En algunos modos de
15 realización, la amplificación y la detección se llevan a cabo en presencia de una sonda doble marcada (por ejemplo, una sonda TaqMan, CPT, LNA o MGB) marcada con un extintor y un fluoróforo (véase, por ejemplo, Gasparic *et al.* (2010), *Anal. Bioanal. Chem.* 396:2023).

20 En algunos modos de realización, se lleva a cabo una etapa de transcripción inversa preliminar (también denominada RT-PCR, que no se debe confundir con PCR en tiempo real). Véase, por ejemplo, Hierro *et al.* (2006), 72:7148. El término "qRT-PCR", como se usa en el presente documento, se refiere a transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa. Se pueden llevar a cabo ambas reacciones en un único tubo sin interrupción, por ejemplo, para añadir reactivos.

25 También se pueden usar procedimientos de amplificación basados en ARN, por ejemplo, amplificación mediada por transcripción (TMA) o amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA). Véase, por ejemplo, Fakruddin *et al.* (2013), *J Pharm Bioallied Sci.* 5:245; van Deursen *et al.* (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:e15; Kamisango *et al.* (1999), *J Clin. Microbiol.* 37:310.

30 Además de la sonda marcada, se pueden marcar uno o ambos cebadores en un par de cebadores con cualquier sustancia o componente que emita o genere directa o indirectamente una señal detectable. En algunos modos de realización, los marcadores son fluoróforos (tintes), se informa de muchos de estos en la literatura y son conocidos por los expertos en la técnica, y muchos de estos están disponibles comercialmente. Los fluoróforos se describen, por ejemplo, en Cardullo *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8790; Hochstrasser *et al.* (1992), *Biophysical Chemistry* 45: 133; Selvin (1995), *Methods in Enzymology* 246: 300; Steinberg, *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 83-114 (1971); y Wang *et al.*, *Anal. Chem.* 67:1197-1203 (1995).
35

Los siguientes son ejemplos de fluoróforos que se pueden usar como marcadores: ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbena-2,2'-disulfónico; acridina; acridina-isotiocianato; ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS); 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato [0070] N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; BODIPY; Brilliant Yellow; cumarina; 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Coumarin 120)/ 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151); tintes de cianina; cianosina 4',6'-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5''-dibromopirogallol-sulfonaftaleína (Bromopirogallol Red); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbena-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbena-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina; eosina-isotiocianato; eritrosina B; eritrosina-isotiocianato; etidio; 5-carboxifluoresceína (FAM); 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF); 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE); fluoresceína; fluoresceína-isotiocianato; fluorescamina; IR144; IR1446; verde de malaquita-isotiocianato; 4-metilumbeliferona; orto-cresolftaleína; nitrotirosina; pararosnilina; rojo fenol; ficoeritrina (incluyendo pero sin limitarse a los tipos B y R); o-ftaldialdehído; pireno; butirato de pireno; butirato de succinimidilo-1-pireno; puntos cuánticos; Reactive Red 4 (Cibacron Brilliant Red 3B-A); 6-carboxi-X-rodamina (ROX); 6-carboxirrodamina (R6G); rodamina-cloruro de sulfonilo de Lissamine rodamina B; rodamina B; rodamina 123; rodamina X-isotiocianato; sulforrodamina B; sulforrodamina 101; derivado de cloruro de sulfonilo de sulforrodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametilrodamina; tetrametilrodamina-isotiocianato (TRITC); riboflavina; ácido rosólico; y derivados de quelatos de lantánidos.
40
45
50
55

Se puede usar cualquiera de los fluoróforos (tintes) enumerados en los ensayos descritos actualmente para marcar un ácido nucleico como se describe en el presente documento. Se pueden unir fluoróforos por enlace covalente convencional, usando grupos funcionales apropiados en el fluoróforo y/o ácido nucleico.
60

Como se indica anteriormente, se puede usar una sonda doble marcada para la detección. La sonda doble marcada puede comprender un fluoróforo, tal como cualquiera de los fluoróforos enumerados anteriormente, y un extintor. Los extintores adecuados incluyen pero no se limitan a DDQ-I, Dabcyl, Eclipse, Iowa Black FQ, BHQ-1, QSY-7, BHQ-2, DDQ-II, Iowa Black RQ, QSY-21 y BHQ-3. Para fluoróforos que tienen un máximo de emisión de entre 500 y 550 nm (por ejemplo, FAM, TET y HEX), se puede seleccionar un extintor con un máximo de
65

absorción de entre 450 y 500 nm (por ejemplo, Dabcyl o BHQ-1). Para fluoróforos que tienen un máximo de emisión por encima de 550 nm (por ejemplo, rodamina y tintes Cy), se puede seleccionar un extintor con un máximo de absorción por encima de 550 nm (por ejemplo, BHQ-2). Véase, por ejemplo, Johansson (2003), *Meth. Mol. Biol.* 335:17 para consideraciones en la selección de pares tinte-extintor.

Los dispositivos de detección son conocidos en la técnica y se pueden seleccionar según sea apropiado para los marcadores seleccionados. Dispositivos de detección apropiados para la PCR cuantitativa incluyen los sistemas Cobas® y Light Cycler® (Roche), sistemas de PCR en tiempo real PRISM 7000 y 7300 (Applied Biosystems), etc.

VI. Kits

En algunos modos de realización, los reactivos y materiales para llevar a cabo los procedimientos actualmente divulgados se incluyen en un kit. En algunos modos de realización, el kit incluye componentes para obtener, almacenar y/o preparar la muestra. Dichos componentes incluyen, por ejemplo, jeringuillas y agujas estériles, tubos recubiertos con EDTA, tampones (por ejemplo, para unir ácido nucleico a, y elución de, una matriz), inhibidores de la RNasa y/o DNasa, etc.

En algunos modos de realización, el kit incluye cebadores para detectar una fusión genética, por ejemplo, una fusión génica. En algunos modos de realización, el kit comprende (i) al menos un primer par de cebadores específico para el sitio de fusión en la fusión genética; (ii) un segundo par de cebadores específico para una porción de secuencia arriba de (en dirección 5' a) el sitio de fusión; (iii) un tercer par de cebadores específico para una porción de secuencia abajo de (en dirección 3' a) el sitio de fusión; y una sonda marcada específica para cada uno de los productos de amplificación resultantes de cada uno de dichos pares de cebadores. Los pares de cebadores de (i), (ii) y (iii) están cada uno en recipientes separados, o dos o más se agrupan en un único recipiente. En algunos modos de realización, el kit comprende además un par de cebadores de control positivo (por ejemplo, una secuencia de un gen constitutivo, u otra secuencia que se espera que esté en la muestra) y/o un conjunto de cebadores de control negativo (por ejemplo, diseñado para amplificar una secuencia que no se espera que se someta a prueba en la muestra tal como la secuencia de un organismo diferente). El al menos un primer par de cebadores (i) puede incluir más de un par de cebadores que pueden detectar variantes de la fusión genética. En algunos modos de realización, los pares de cebadores múltiples incluyen cebadores directos múltiples que utilizan el mismo cebador inverso, o cebadores inversos múltiples que utilizan el mismo cebador directo.

En algunos modos de realización, cada uno de los conjuntos de cebadores se envasa en tubos separados, por ejemplo, para añadirse en las proporciones que se determinen por el usuario. En algunos modos de realización, uno o más o todos los conjuntos de cebadores se envasan en un único tubo con proporciones predeterminadas.

El kit también puede incluir enzimas, tales como la transcriptasa inversa y o la ADN polimerasa. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoestable que puede amplificar en condiciones de termociclado, por ejemplo, Taq o un derivado de Taq. En algunos modos de realización, el kit incluye dNTP. En algunos modos de realización, el kit incluye tampones propicios para polimerización/amplificación por las polimerasas seleccionadas.

En algunos modos de realización, el kit incluye controles, por ejemplo, un polinucleótido que es natural en la fusión genética que se va a detectar (es decir, sin fusión genética), o un polinucleótido que incluye la fusión genética que se va a detectar.

El kit también puede incluir consumibles tales como tubos de muestra o viales; recipientes de reacción (por ejemplo, tubos, placas de múltiples pocillos, chips o cámaras de microfluidos, etc.), así como instrucciones para su uso o referencia a un sitio web.

VII. Ejemplos

A. Ejemplo 1: Detección de fusiones EML4-ALK en plasma y ARN celular valorado

En este ejemplo, se sometió a prueba un procedimiento de RT-PCR cuantitativo múltiple para detectar las fusiones EML4-ALK. Se usan cuatro conjuntos de cebadores diferentes en un ensayo de único tubo para reducir la cantidad de muestra necesaria para lograr resultados fiables medibles.

Se pueden usar los cebadores mostrados en la tabla 1, además de un par de cebadores específico para SDH, marcado con Cy5.5. El primer conjunto de cebadores directos e inversos (SEQ ID NO:1-62) amplifica a través de diversas fusiones EML4-ALK. Se pueden usar cebadores directos e inversos en pares únicos o en cualquier combinación para amplificar diferentes productos de fusión, como se apreciará por un experto en la técnica. Los cebadores específicos para una región 5' del punto de ruptura en ALK (reemplazado por EML4 en la fusión) se muestran como SEQ ID NO:63-72 (cinco de cada una de las opciones de cebador directo e inverso). Los cebadores específicos para una región 3' del punto de ruptura (presente en ambos genes de fusión y no fusión)

se muestran como SEQ ID NO:73-82 (cinco de cada una de las opciones de cebador directo e inverso). Los cebadores inversos en todas las reacciones sirvieron como cebadores para las reacciones de transcriptasa inversa.

5 Tabla 1

Tinte de sonda	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
FAM	EML13F1	1	ACACCTGGGAAAGGACCTAAA
	EML13F2	2	CACACCTGGGAAAGGACCTAAA
	EML13F3	3	CCACACCTGGGAAAGGACCTA
	EML13F4	4	CCACACCTGGGAAAGGACCT
	EML13F5	5	CCACACCTGGGAAAGGACC
	EML13F6	6	CCACACCTGGGAAAGGAC
	EML13F7	7	CCCACACCTGGGAAAGGAC
	EML13F8	8	GCCCACACCTGGGAAAGGA
	EML13F9	9	AGCCCACACCTGGGAAAG
	EML13F10	10	GAGCCCACACCTGGGAAA
	EML20F1	11	CTCGGGAGACTATGAAATATTGTACT
	EML20F2	12	TCGGGAGACTATGAAATATTGTACT
	EML20F3	13	CGGGAGACTATGAAATATTGTACT
	EML20F4	14	CTCGGGAGACTATGAAATATTGTAC
	EML20F5	15	ACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F6	16	AACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F7	17	TAACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F8	18	TAACTCGGGAGACTATGAAATATTGT
	EML20F9	19	TAACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F10	20	ACTCGGGAGACTATGAAATATTGTAC
	EML6F1	21	AAGCATAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F2	22	AGCATAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F3	23	GCATAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F4	24	CATAAAGATGTCATCATCAACCAAG
	EML6F5	25	GCATAAAGATGTCATCATCAACCAAG
	EML6F6	26	GCATAAAGATGTCATCATCAACCA
	EML6F7	27	GCATAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F8	28	AGCATAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F9	29	AAGCATAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F10	30	AAGCATAAAGATGTCATCATCAAC
	EML2AF1	31	CTCAGTGAAAAAATCAGTCTCAAG
	EML2AF2	32	CTCAGTGAAAAAATCAGTCTCAAGT
	EML2AF3	33	TCAGTGAAAAAATCAGTCTCAAGTA
	EML2AF4	34	TCAGTGAAAAAATCAGTCTCAAGTAA
	EML2AF5	35	CAGTGAAAAAATCAGTCTCAAGTAAAG
	EML18F1	36	CAGCTCTGTGATGCGCTA
	EML18F2	37	CTCTCTGTGATGCGCTACT
	EML18F3	38	TCTCTGTGATGCGCTACTCAA
	EML18F4	39	GCTCTCTGTGATGCGCTAC
	EML18F5	40	CTGTGATGCGCTACTCAATAG
	KIF25F1	41	AGAAGAGGGCATTCTGCACA
	KIF25F2	42	GAGGGCATTCTGCACAGA

ES 2 728 437 T3

Tinte de sonda	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
	KIF25F3	43	GAGGGCATTCTGCACAGAT
	KIF25F4	44	GAAGAGGGCATTCTGCACAG
	KIF25F5	45	GGGCATTCTGCACAGATTG
	KIF17F1	46	GAAGTAGTCCAGCTTCGAGCA
	KIF17F2	47	TGAAGAACTAGTCCAGCTTCGA
	KIF17F3	48	CTAGTCCAGCTTCGAGCACAA
	KIF17F4	49	AAGAAGTAGTCCAGCTTCGAG
	KIF17F5	50	GTCCAGCTTCGAGCACAAAG
	EML14AF5	51	TCTGTGGGATCATGATCTGAATC
	Cebador inverso		
	ALK20R1	52	GCTCTGCAGCTCCATCTG
	ALK20R2	53	GGCTCTGCAGCTCCATCT
	ALK20R3	54	GGGCTCTGCAGCTCCATC
	ALK20R4	55	GGGCTCTGCAGCTCCAT
	ALK20R5	56	GGGCTCTGCAGCTCCA
	ALK20R6	57	TGCAGCTCCATCTGCATGG
	ALK20R7	58	GCAGCTCCATCTGCATGG
	ALK20R8	59	CAGCTCCATCTGCATGGC
	ALK20R9	60	AGCTCCATCTGCATGGC
	ALK20R10	61	GCTCCATCTGCATGGCT
A20REVC4	62	CGGAGCTTGCTCAGCTTGTA	
	Cebador directo		
HEX	ALKex4F1	63	GAGATCCTCCTGATGCCCA
	ALKex4F2	64	CTCCTGATGCCCACTCCA
	ALKex4F3	65	TGATGCCCACTCCAGGGAA
	ALKex4F4	66	TCCTCCTGATGCCCACTC
	ALKex4F5	67	GATCCTCCTGATGCCCAC
	Cebador inverso		
	ALKex5R1	68	TTGTCTGGACGCCCGATT
	ALKex5R2	69	GACGCCCGATTCTTCCCT
	ALKex5R3	70	TCTGGACGCCCGATTCTT
	ALKex5R4	71	TGTCTGGACGCCCGATTCT
	ALKex5R5	72	CTGGACGCCCGATTCTTC
	Cebador directo		
JA270	ALKex24F1	73	GCCTGTGGCTGTCAGTATT
	ALKex24F2	74	CTGTGGCTGTCAGTATTGGGA
	ALKex24F3	75	CTGTCAGTATTTGGAGGAAAACCA
	ALKex24F4	76	CCTGTGGCTGTCAGTATTTG
	ALKex24F5	77	TGTGGCTGTCAGTATTTGGAG
	Cebador inverso		
	ALKex25R1	78	CCTGACAGGTCAAGAGGCA
	ALKex25R2	79	TGACAGGTCAAGAGGCAGTT
	ALKex25R3	80	AGGTCAAGAGGCAGTTTCT
	ALKex25R4	81	CTGACAGGTCAAGAGGCAG
ALKex25R5	82	GGTCAAGAGGCAGTTTCTG	

Las condiciones de reacción fueron como sigue. Para cada reacción, se añadieron 25 ul de ARN de aporte a una mezcla de reacción de RT-PCR que comprendía cebadores directos e inversos, sonda marcada, tampón, dUTP, dTTP, dATP, dGTP, UNG, RT y enzima Z05 hasta un volumen final de 50 ul.

- 5 Se usaron las combinaciones de cebadores en la tabla 2 para generar los resultados representativos mostrados en la figura 1.

Tabla 2

Tinte de sonda	Cebador directo	Cebador inverso
FAM	EML13F1	ALK20R1
	EML20F2	
	EML6F3	
	EML2AF2	
	KIF17F2	
	KIF25F4	
	EML14AF5	A20REVC4
HEX (5')	ALKex4F1	ALKex5R3
JA270 (3')	ALKex24F2	ALKex25R3

- 10 Se realizaron las reacciones en un cobas® LC480 usando cuatro filtros para las reacciones múltiples: FAM, HEX, JA270 y CY5.5 (control interno).

- 15 Se ha sometido a prueba este procedimiento usando ARN de líneas celulares positivas para EML4-ALK NCI-H460 (HTB-177), NCI-H2228 y la línea celular EML4-ALK Fusion Variant 1 de Horizon Discovery, así como de muestras de tejido incluido en parafina fijado en formol de CPNM (FFPET) y de plasma.

- 20 En el caso del plasma, se extrajo ARNcc usando el kit Qiagen ExoRNA Easy Kit. Debido a que el rendimiento de ARNcc es demasiado bajo para medirse con exactitud, se aporta un volumen fijo (1/4 del total) del ARNcc de plasma extraído en la qRT-PCR.

- 25 En la qRT-PCR múltiple, un canal (FAM en este caso) detecta la amplificación de fusiones ALK específicas de variante, mientras que un segundo canal (HEX) detecta la amplificación de la región 5' del punto de ruptura, y un tercer canal (JA270) detecta la amplificación de la región 3' del punto de ruptura. Se usa un cuarto canal (Cy5.5) para el control de estandarización, que garantiza que el aporte de ARNcc fue suficiente en cantidad y calidad.

- 30 Los resultados representativos se muestran en la figura 1. Se obtuvo el ARN natural de la línea celular NCI-1975 (CRL-5908) y se obtuvo el ARN EML4-ALK de la línea celular EML4-ALK Fusion Variant 1. Se valoró el ARN EML-ALK en RNA natural como se indica para determinar el límite de detección.

- 35 Tanto el conjunto de cebadores específicos de variante de fusión (por ejemplo, SEQ ID NO:1-62) como los cebadores diseñados para medir de manera diferencial las regiones 5' y 3' del punto de fusión dieron como resultado la detección de productos de amplificación del gen de fusión. Los cebadores específicos de variante de fusión detectaron 25 pg de ARN positivo para fusión EML4-ALK mezclados en una dilución 1:4000 con ARN natural. La medida diferencial de 5' y 3' pudo detectar 1 ng de ARN EML4-ALK mezclado en una dilución 1:100 con ARN natural.

- 40 Estos resultados son impresionantes porque el ensayo múltiple es lo suficientemente sensible como para detectar 20 copias de especies de ARN de fusión en la reacción específica de variante. Las reacciones para medir diferencialmente las regiones 5' y 3' del punto de fusión pueden generar una señal positiva de una muestra mezclada con solo un 1 % del ARN que contiene la fusión. El ensayo múltiple también es extraordinariamente específico, ya que no se observó ninguna señal positiva con hasta 200 ng de ARN natural. Dado que el ARNcc de un tumor es en general raro en comparación con el ARNcc natural, estos resultados son alentadores incluso para el diagnóstico temprano.

45 **B. Ejemplo 2: Detección de fusiones CCDC6-RET en plasma y ARN celular valorado**

- En este ejemplo, se sometió a prueba la qRT-PCR múltiple para determinar su capacidad para detectar fusiones CCDC6-RET en ARN de líneas celulares, así como de plasma.

- 50 Se pueden usar los cebadores mostrados en la tabla 3 para detectar fusiones CCDC6-RET, además de un par de cebadores específico para SDH, marcado con Cy5.5.

5 Los cebadores directos (SEQ ID NO:83-160) y cebadores inversos (SEQ ID NO:161-198) representativos amplifican a través de diversas fusiones CCDC6-RET. Los cebadores representativos específicos para una región 5' del punto de ruptura en RET (reemplazado por CCDC6 en la fusión) se muestran como SEQ ID NO:199 y 200. Los cebadores representativos específicos para una región 3' del punto de ruptura (presente en ambos genes de fusión y no fusión) se muestran como SEQ ID NO:201 y 202. De nuevo, se pueden usar cebadores directos e inversos en pares únicos o en cualquier combinación para amplificar diferentes productos de fusión, como se apreciará por un experto en la técnica. Los cebadores inversos en todas las reacciones sirvieron como cebadores para las reacciones de transcriptasa inversa.

10 Tabla 3

Tinte de sonda	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
FAM	KIF15F1	83	GAATTGCTGTGGGAAATAATGATG
	KIF15F2	84	GAATTGCTGTGGGAAATAATGAT
	KIF15F3	85	ATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F4	86	TTGCTGTGGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F5	87	TGCTGTGGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F6	88	GCTGTGGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F7	89	GAATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAAA
	KIF15F8	90	GAATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAA
	KIF15F9	91	AATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAAA
	KIF15F10	92	ATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAAA
	KIF15F11	93	ATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAA
	KIF15F12	94	AATTGCTGTGGGAAATAATGATGTA
	KIF15F13	95	ATTGCTGTGGGAAATAATGATGTA
	KIF15F14	96	GAATTGCTGTGGGAAATAATGATGTA
	KIF15F15	97	GAATTGCTGTGGGAAATAATGATGT
	KIF16F1	98	CATGTCAGCTTCGTATCTCTCAA
	KIF16F2	99	ATGTCAGCTTCGTATCTCTCAA
	KIF16F3	100	CATGTCAGCTTCGTATCTCTCA
	KIF16F4	101	GCATGTCAGCTTCGTATCTCTC
	KIF16F5	102	CATGTCAGCTTCGTATCTCTC
	KIF16F6	103	GCATGTCAGCTTCGTATCTCT
	KIF16F7	104	GCATGTCAGCTTCGTATCTC
	KIF16F8	105	CAGCATGTCAGCTTCGTATC
	KIF16F9	106	TAGCAGCATGTCAGCTTCGTA
	KIF16F10	107	AGCAGCATGTCAGCTTCG
	KIF22F1	108	AGGACCTGGCTACAAGAGTTAA
	KIF22F2	109	GGACCTGGCTACAAGAGTTAA
	KIF22F3	110	GGACCTGGCTACAAGAGTTAAA
	KIF22F4	111	AGGACCTGGCTACAAGAGTTAAA
	KIF22F5	112	AGGACCTGGCTACAAGAGTTA
	KIF22F6	113	GGACCTGGCTACAAGAGTTA
	KIF22F7	114	GACCTGGCTACAAGAGTTAAAAAG
KIF22F8	115	ACCTGGCTACAAGAGTTAAAAAG	
KIF22F9	116	AGGACCTGGCTACAAGAGTT	
KIF22F10	117	GGACCTGGCTACAAGAGTT	
KIF23F1	118	TTGAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA	
KIF23F2	119	TGAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA	
KIF23F3	120	GAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA	
KIF23F4	121	AACAGCTCACTAAAGTGCACAAA	

Tinte de sonda	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
	KIF23F5	122	ACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
	KIF23F6	123	GAACAGCTCACTAAAGTGCACAA
	KIF23F7	124	AACAGCTCACTAAAGTGCACAA
	KIF23F8	125	ACAGCTCACTAAAGTGCACAA
	KIF23F9	126	GAACAGCTCACTAAAGTGCACA
	KIF23F10	127	AACAGCTCACTAAAGTGCACA
	CCDC1F1	128	TGCGCAAAGCCAGCGT
	CCDC1F2	129	CGACCTGCGCAAAGCCA
	CCDC1F3	130	GACCTGCGCAAAGCCAG
	CCDC1F4	131	CCTGCGCAAAGCCAGC
	CCDC1F5	132	ACCTGCGCAAAGCCAGC
	CCDC1F6	133	CTGCGCAAAGCCAGCGT
	CCDC1F7	134	GACCTGCGCAAAGCCAGC
	CCDC1F8	135	CGACCTGCGCAAAGCC
	NCO6F1	136	TGTATCTCCATGCCAGAGCAG
	NCO6F2	137	GTATCTCCATGCCAGAGCAG
	NCO6F3	138	CTGTATCTCCATGCCAGAGCA
	NCO6F4	139	GCTGTATCTCCATGCCAGAG
	NCO6F5	140	GGCTGTATCTCCATGCCAGA
	NCO6F6	141	GGCTGTATCTCCATGCCAG
	NCO6F7	142	AGGCTGTATCTCCATGCCA
	NCO6F8	143	GAGGCTGTATCTCCATGCCA
	NCO6F9	144	AGAGGCTGTATCTCCATGC
	NCO6F10	145	GAGAGGCTGTATCTCCATGC
	TRIM14F1	146	CAGGAGGAGTGCTTGCATG
	TRIM14F2	147	AGGAGGAGTGCTTGCATG
	TRIM14F3	148	CAGGAGGAGTGCTTGCAT
	TRIM14F4	149	CAGGAGGAGTGCTTGCA
	TRIM14F5	150	GCAGGAGGAGTGCTTGC
	TRIM14F6	151	GGCAGGAGGAGTGCTTG
	TRIM14F7	152	TGGCAGGAGGAGTGCTT
	TRIM14F8	153	ATGGCAGGAGGAGTGCT
	TRIM14F9	154	GATGGCAGGAGGAGTGCT
	TRIM14F10	155	GAGGATGGCAGGAGGAGT
	TRIM11F1	156	GCTGCCAGATATTCCACCCAT
	TRIM11F2	157	GCTGCCAGATATTCCACCCATA
	TRIM11F3	158	CTGCCAGATATTCCACCCATACA
	TRIM11F4	159	CATCGCTGCCAGATATTCCAC
	TRIM11F5	160	CTGCCAGATATTCCACCCATAC
	Cebador inverso		
	RET12R1	161	AGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R2	162	CTAGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R3	163	CTAGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTC
	RET12R4	164	CTAGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTT
	RET12R5	165	CTAGAGTTTTTCCAAGAACCAAGT
	RET12R6	166	CTAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG
	RET12R7	167	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R8	168	GAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT

Tinte de sonda	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
	RET12R9	169	AGTTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R10	170	GTTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R11	171	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R12	172	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTC
	RET12R13	173	AGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTC
	RET12R14	174	AGAGTTTTTCCAAGAACCAAGTT
	RET12R15	175	AGAGTTTTTCCAAGAACCAAGT
	RET12R16	176	CTCCTAGAGTTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R17	177	CTCCTAGAGTTTTTCCAAGAACCA
	RET12R18	178	TCCTAGAGTTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R19	179	CCTAGAGTTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R20	180	GAGTTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET8R1	181	GTCTCTTGCTGACTGCACAGG
	RET8R2	182	TCTCTTGCTGACTGCACAGG
	RET8R3	183	CTCTTGCTGACTGCACAGG
	RET8R4	184	TCTCTTGCTGACTGCACAG
	RET8R5	185	GTCTCTTGCTGACTGCACAG
	RET8R6	186	CGTCTCTTGCTGACTGCACA
	RET8R7	187	CCGTCTCTTGCTGACTGCA
	RET8R8	188	GCCGTCTCTTGCTGACTG
	RET8R9	189	AGCCGTCTCTTGCTGACT
	RET11DR1	190	CTCCGGAAGGTCATCTCAGCT
	RET11DR2	191	TCCGGAAGGTCATCTCAGCT
	RET11DR3	192	CCGGAAGGTCATCTCAGCT
	RET11DR4	193	TCCGGAAGGTCATCTCAGC
	RET11DR5	194	CTCCGGAAGGTCATCTCAG
	RET11DR6	195	CCTCCGGAAGGTCATCTCA
	RET11DR7	196	GCCTCCGGAAGGTCATCTC
	RET11DR8	197	GGCCTCCGGAAGGTCATC
	RET11DR9	198	GGCCTCCGGAAGGTCA
Tinte de sonda	Cebador directo		
HEX (5')	RETex5F1	199	TTCGTGCGGGCGACCGTA
	Cebador inverso		
	RETex6R1	200	GGTGCGGTTCTCCGAGAT
Tinte de sonda	Cebador directo		
JA270 (3')	RETex17F1	201	CCGGATGGAGAGGCCAGA
	Cebador inverso		
	RETex18R1	202	TTTTGTCCGGCTCCTGCT

Las condiciones de reacción fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1, y se usaron las combinaciones de cebadores en la tabla 4 para generar los resultados representativos mostrados en las figuras 2-4.

Tabla 4

Tinte de sonda	Cebador directo	Cebador inverso
FAM	KIF15F8	RET12R17
	KIF16F2	
	KIF22F1	
	KIF23F9	
	CCDC1F6	
	NCO6F5	
	TRIM14F8	
TRIM11F2	RET11DR9	
HEX	RETex5F1	RETex6R1
JA270	RETex17F1	RETex18R1

5 Se sometió a prueba este procedimiento usando ARN de la línea celular positiva para CCDC6-RET LC-2AD, línea celular natural CRL-5908 y "ARN humano universal" (UHR), una mezcla de ARN de diversos tejidos. También se sometió a prueba ARN de muestras de FFPET de CPNM, y plasma normal y de CPNM.

10 Los resultados se muestran en las figuras 2-4. La figura 2 muestra que, de manera similar a los resultados para EML4-ALK, se pudo detectar la fusión CCDC6-RET con una sensibilidad extraordinaria. La amplificación específica de variante pudo detectar tan solo 25 pg de ARN positivo para fusión mezclado con 100 ng de ARN natural, mientras que la medida diferencial de 5' y 3' pudo detectar la fusión con tan solo 10 ng de ARN.

15 La figura 3 muestra los valores de Ct para reacciones usando plasma. Se sometieron a prueba las muestras de plasma de CPNM RMS y se mostró que eran negativas para las fusiones CCDC6-RET. También se mezcló plasma normal con ARN de células positivas para fusión (LC2AD) o naturales (CRL-5908). Los datos corregidos con control se muestran en la figura 4. Solo las muestras con ARN de la línea celular positiva para fusión mostraron un resultado positivo.

20 De nuevo, los resultados son alentadores debido a la inesperada sensibilidad y especificidad. No se detectó ninguna fusión incluso en muestras de plasma de pacientes con CPNM.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> ROCHE Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Molecular Systems, Inc.	
	<120> PCR MÚLTIPLE PARA DETECTAR FUSIONES GÉNICAS	
10	<130> P32841-WO-KOE	
	<150> US 62/149.381	
	<151> 17/04/2015	
15	<160> 202	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
25	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 1	
	acacctggga aaggaccta a	21
30	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
40	<400> 2	
	cacacctggg aaaggaccta aa	22
45	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
50	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 3	
	ccacacctgg gaaaggacct a	21
55	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 4		
	ccacacctgg gaaaggacct		20
5	<210> 5		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 5		
15	ccacacctgg gaaaggacc		19
	<210> 6		
	<211> 18		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 6		
	ccacacctgg gaaaggac		18
	<210> 7		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 7		
40	cccacacctg ggaaaggac		19
	<210> 8		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 8		
	gcccacacct gggaaagga		19
	<210> 9		
	<211> 18		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 9		
	agccacacacc tgggaaag		18
5	<210> 10		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 10		
15	gagccacacac ctgggaaa		18
	<210> 11		
	<211> 26		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 11		
	ctcgggagac tatgaaatat tgtact		26
	<210> 12		
30	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 12		
40	tcgggagact atgaaatatt gtact		25
	<210> 13		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 13		
	cgggagacta tgaaatattg tact		24
	<210> 14		
	<211> 25		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 14		
	ctcgggagac tatgaaatat tgtac		25
5	<210> 15		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 15		
15	actcgggaga ctatgaaata ttgta		25
	<210> 16		
	<211> 26		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 16		
	aactcgggag actatgaaat attgta		26
	<210> 17		
30	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 17		
40	taactcggga gactatgaaa tattgta		27
	<210> 18		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 18		
	taactcggga gactatgaaa tattgt		26
	<210> 19		
	<211> 27		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 19		
	taactcggga gactatgaaa tattgta		27
5	<210> 20		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 20		
15	actcgggaga ctatgaaata ttgtac		26
	<210> 21		
	<211> 27		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 21		
	aagcataaag atgtcatcat caaccaa		27
	<210> 22		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 22		
40	agcataaaga tgtcatcatc aaccaa		26
	<210> 23		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 23		
	gcataaagat gtcacatca accaa		25
	<210> 24		
	<211> 25		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 24 cataaagatg tcatcatcaa ccaag	25
5	<210> 25 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 25 gcataaagat gtcacatcatca accaag	26
20	<210> 26 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 26 gcataaagat gtcacatcatca acca	24
35	<210> 27 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 27 gcataaagat gtcacatcatca acc	23
50	<210> 28 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 28 agcataaaga tgcacatcatc aacc	24
	<210> 29 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 29		
	aagcataaag atgtcatcat caacc		25
5	<210> 30		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 30		
15	aagcataaag atgtcatcat caac		24
	<210> 31		
	<211> 24		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 31		
	ctcagtgaaa aatcagtct caag		24
	<210> 32		
30	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 32		
40	ctcagtgaaa aatcagtct caagt		25
	<210> 33		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 33		
	tcagtgaaaa aatcagtctc aagta		25
	<210> 34		
	<211> 26		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 34		
	tcagtgaaaa aatcagtctc aagtaa		26
5	<210> 35		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 35		
15	cagtgaaaaa atcagtctca agtaaag		27
	<210> 36		
	<211> 20		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 36		
	cagctctctg tgatgcgcta		20
	<210> 37		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 37		
40	ctctctgtga tgcgctact		19
	<210> 38		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 38		
	tctctgtgat gcgctactca a		21
	<210> 39		
	<211> 19		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 39 gctctctgtg atgcgctac	19
5	<210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 40 ctgtgatgcg ctactcaata g	21
20	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 41 agaagagggc attctgcaca	20
35	<210> 42 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 42 gagggcattc tgcacaga	18
50	<210> 43 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 43 gagggcattc tgcacagat	19
	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 44		
	gaagaggggca ttctgcacag		20
5	<210> 45		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 45		
15	gggcattctg cacagattg		19
	<210> 46		
	<211> 21		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 46		
	gaactagtcc agcttcgagc a		21
	<210> 47		
30	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 47		
40	tgaagaacta gtccagcttc ga		22
	<210> 48		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 48		
	ctagtccagc ttcgagcaca a		21
	<210> 49		
	<211> 21		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 49 aagaactagt ccagcttcga g	21
5	<210> 50 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 50 gtccagcttc gagcacaag	19
20	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 51 tctgtgggat catgatctga atc	23
30	<210> 52 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
40	<400> 52 gctctgcagc tccatctg	18
45	<210> 53 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<400> 53 ggctctgcag ctccatct	18
60	<210> 54 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 54 gggctctgca gctccatc	18
5	<210> 55 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 55 gggctctgca gctccat	17
20	<210> 56 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 56 gggctctgca gctcca	16
35	<210> 57 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 57 tgcagctcca tctgcatgg	19
50	<210> 58 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 58 gcagctccat ctgcatgg	18
	<210> 59 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 59 cagctccatc tgcattggc	18
5	<210> 60 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 60 agctccatct gcatggc	17
20	<210> 61 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 61 gctccatctg catggct	17
35	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 62 cggagcttgc tcagcttgta	20
50	<210> 63 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 63 gagatcctcc tgatgccca	19
65	<210> 64 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

<400> 64
ctcctgatgc ccaactcca 18

5 <210> 65
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

15 <400> 65
tgatgcccac tccagggaa 19

20 <210> 66
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 66
tcctcctgat gcccaactc 18

30 <210> 67
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

40 <400> 67
gatcctcctg atgcccac 18

45 <210> 68
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

50 <400> 68
ttgtctggac gcccgatt 18

55 <210> 69
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 69
gacgcccgat tcttcact 18

5 <210> 70
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

15 <400> 70
tctggacgcc cgattctt 18

20 <210> 71
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

30 <400> 71
tgtctggacg cccgattc 18

35 <210> 72
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

45 <400> 72
ctggacgccc gattcttc 18

50 <210> 73
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

60 <400> 73
gcctgtggct gtcagtatt 19

65 <210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

	<400> 74		
	ctgtggctgt cagtatttgg a		21
5	<210> 75		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 75		
15	ctgtcagtat ttggaggaaa acca		24
	<210> 76		
	<211> 20		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 76		
	cctgtggctg tcagtatttg		20
	<210> 77		
30	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 77		
40	tgtggctgtc agtatttggg a g		21
	<210> 78		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 78		
	cctgacaggt caagaggca		19
	<210> 79		
	<211> 20		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 79		
	tgacaggtca agaggcagtt		20
5	<210> 80		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 80		
15	aggtcaagag gcagtttct		19
	<210> 81		
	<211> 19		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 81		
	ctgacaggtc aagaggcag		19
	<210> 82		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 82		
40	ggtcaagagg cagtttctg		19
	<210> 83		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 83		
	gaattgctgt gggaaataat gatg		24
	<210> 84		
	<211> 23		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 84		
	gaattgctgt gggaaataat gat		23
5	<210> 85		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 85		
15	attgctgtgg gaaataatga tgtaaag		27
	<210> 86		
	<211> 26		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 86		
	ttgctgtggg aaataatgat gtaaag		26
	<210> 87		
30	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 87		
40	tgctgtggga aataatgatg taaag		25
	<210> 88		
	<211> 24		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 88		
	gctgtgggaa ataatgatgt aaag		24
	<210> 89		
	<211> 28		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 89		
	gaattgctgt gggaaataat gatgtaa		28
5	<210> 90		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 90		
15	gaattgctgt gggaaataat gatgtaa		27
	<210> 91		
	<211> 27		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 91		
	aattgctgtg ggaataatg atgtaa		27
	<210> 92		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 92		
40	attgctgtgg gaaataatga tgtaa		26
	<210> 93		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 93		
	attgctgtgg gaaataatga tgtaa		25
	<210> 94		
	<211> 25		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 94		
	aattgctgtg ggaaataatg atgta		25
5	<210> 95		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 95		
15	attgctgtgg gaaataatga tgta		24
	<210> 96		
	<211> 26		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 96		
	gaattgctgt gggaaataat gatgta		26
	<210> 97		
30	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 97		
40	gaattgctgt gggaaataat gatgt		25
	<210> 98		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 98		
	catgtcagct tcgtatctct caa		23
	<210> 99		
	<211> 22		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 99 atgtcagctt cgtatctctc aa	22
5	<210> 100 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 100 catgtcagct tcgtatctct ca	22
20	<210> 101 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 101 gcatgtcagc ttcgtatctc tc	22
35	<210> 102 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 102 catgtcagct tcgtatctct c	21
50	<210> 103 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 103 gcatgtcagc ttcgtatctc t	21
	<210> 104 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 104 gcatgtcagc ttcgtatctc	20
5	<210> 105 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 105 cagcatgtca gcttcgtatc	20
20	<210> 106 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 106 tagcagcatg tcagcttcgt a	21
30	<210> 107 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
40	<400> 107 agcagcatgt cagcttcg	18
45	<210> 108 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 108 aggacctggc tacaagagtt aa	22
55	<210> 109 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 109 ggacctggct acaagagtta a	21
5	<210> 110 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 110 ggacctggct acaagagtta aa	22
20	<210> 111 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 111 aggacctggc tacaagagtt aaa	23
35	<210> 112 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 112 aggacctggc tacaagagtt a	21
50	<210> 113 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 113 ggacctggct acaagagtta	20
	<210> 114 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 114 gacctggcta caagagttaa aaag	24
5	<210> 115 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 115 acctggctac aagagttaaa aag	23
20	<210> 116 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 116 aggacctggc tacaagagtt	20
35	<210> 117 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 117 ggacctggct acaagagtt	19
50	<210> 118 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 118 ttgaacagct cactaaagtg cacaaa	26
	<210> 119 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 119 tgaacagctc actaaagtgc acaaa	25
5	<210> 120 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 120 gaacagctca ctaaagtgca caaa	24
20	<210> 121 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 121 aacagctcac taaagtgcac aaa	23
35	<210> 122 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 122 acagctcact aaagtgcaca aa	22
50	<210> 123 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 123 gaacagctca ctaaagtgca caa	23
	<210> 124 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 124		
	aacagctcac taaagtgcac aa		22
5	<210> 125		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 125		
15	acagctcact aaagtgcaca a		21
	<210> 126		
	<211> 22		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 126		
	gaacagctca ctaaagtgca ca		22
	<210> 127		
30	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 127		
40	aacagctcac taaagtgcac a		21
	<210> 128		
	<211> 16		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 128		
	tgcgcaaagc cagcgt		16
	<210> 129		
	<211> 17		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 129		
	cgacctgctgc aaagcca		17
5	<210> 130		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 130		
15	gacctgctgca aagccag		17
	<210> 131		
	<211> 16		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 131		
	cctgctgcaaaa gccagc		16
	<210> 132		
30	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 132		
40	acctgctgcaa agccagc		17
	<210> 133		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 133		
	ctgctgcaaaag ccagcgt		17
	<210> 134		
	<211> 18		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 134 gacctgcgca aagccagc	18
5	<210> 135 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 135 cgacctgcgc aaagcc	16
20	<210> 136 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 136 tgtatctcca tgccagagca g	21
35	<210> 137 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 137 gtatctccat gccagagcag	20
50	<210> 138 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 138 ctgtatctcc atgccagagc a	21
	<210> 139 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 139		
	gctgtatctc catgccagag		20
5	<210> 140		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 140		
15	ggctgtatct ccatgccaga		20
	<210> 141		
	<211> 19		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 141		
	ggctgtatct ccatgccag		19
	<210> 142		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 142		
40	aggctgtatc tccatgcca		19
	<210> 143		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 143		
	gaggctgtat ctccatgcca		20
	<210> 144		
	<211> 19		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 144 agaggctgta tctccatgc	19
5	<210> 145 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 145 gagaggctgt atctccatgc	20
20	<210> 146 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 146 caggaggagt gcttgcacg	19
35	<210> 147 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 147 aggaggagtg cttgcatg	18
50	<210> 148 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 148 caggaggagt gcttgcacg	18
65	<210> 149 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 149 caggaggagt gcttgca	17
5	<210> 150 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 150 gcaggaggag tgcttgc	17
20	<210> 151 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 151 ggcaggagga gtgcttg	17
35	<210> 152 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 152 tggcaggagg agtgctt	17
50	<210> 153 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 153 atggcaggag gaggctt	17
65	<210> 154 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 154		
	gatggcagga ggagtgc		17
5	<210> 155		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
15	<400> 155		
	gaggatggca ggaggagt		18
	<210> 156		
	<211> 21		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 156		
	gctgccagat attccaccca t		21
	<210> 157		
30	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
40	<400> 157		
	gctgccagat attccaccca ta		22
	<210> 158		
	<211> 23		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 158		
	ctgccagata ttccacccat aca		23
	<210> 159		
	<211> 21		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 159		
	catcgctgcc agatattcca c		21
5	<210> 160		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 160		
15	ctgccagata ttccacccat ac		22
	<210> 161		
	<211> 25		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 161		
	agagtttttc caagaaccaa gttct		25
	<210> 162		
30	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 162		
40	ctagagtttt tccaagaacc aagttct		27
	<210> 163		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 163		
	ctagagtttt tccaagaacc aagttc		26
	<210> 164		
	<211> 25		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 164 ctagagtttt tccaagaacc aagtt	25
5	<210> 165 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 165 ctagagtttt tccaagaacc aagt	24
20	<210> 166 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 166 ctagagtttt tccaagaacc aag	23
35	<210> 167 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 167 tagagttttt ccaagaacca agttcctt	27
50	<210> 168 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 168 gagtttttcc aagaaccaag ttctt	25
65	<210> 169 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 169		
	agttttttcca agaaccaagt tctt		24
5	<210> 170		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 170		
15	gtttttttccaa gaaccaagtt ctt		23
	<210> 171		
	<211> 26		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 171		
	tagagtttttt ccaagaacca agttct		26
	<210> 172		
30	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 172		
40	tagagtttttt ccaagaacca agttc		25
	<210> 173		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 173		
	agagttttttc caagaaccaa gttc		24
	<210> 174		
	<211> 23		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 174		
	agagtttttc caagaaccaa gtt		23
5	<210> 175		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 175		
15	agagtttttc caagaaccaa gt		22
	<210> 176		
	<211> 25		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 176		
	ctcctagagt tttccaaga accaa		25
	<210> 177		
30	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 177		
40	ctcctagagt tttccaaga acca		24
	<210> 178		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 178		
	tcctagagtt tttccaagaa ccaa		24
	<210> 179		
	<211> 23		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 179		
	cctagagttt ttccaagaac caa		23
5	<210> 180		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 180		
15	gagtttttcc aagaaccaag ttct		24
	<210> 181		
	<211> 21		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 181		
	gtctcttgct gactgcacag g		21
	<210> 182		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 182		
40	tctcttgctg actgcacagg		20
	<210> 183		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 183		
	ctcttgctga ctgcacagg		19
	<210> 184		
	<211> 19		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 184 tctcttgctg actgcacag	19
5	<210> 185 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 185 gtctcttgct gactgcacag	20
20	<210> 186 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 186 cgtctcttgc tgactgcaca	20
35	<210> 187 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 187 ccgtctcttg ctgactgca	19
50	<210> 188 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 188 gccgtctctt gctgactg	18
	<210> 189 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

	<400> 189		
	agccgtctct tgctgact		18
5	<210> 190		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 190		
15	ctccggaagg tcatctcagc t		21
	<210> 191		
	<211> 20		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
25	<400> 191		
	tccggaaggt catctcagct		20
	<210> 192		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 192		
40	ccggaaggtc atctcagct		19
	<210> 193		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
50	<400> 193		
	tccggaaggt catctcagc		19
	<210> 194		
	<211> 19		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
60	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		

	<400> 194 ctccggaagg tcatctcag	19
5	<210> 195 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
15	<400> 195 cctccggaag gtcattctca	19
20	<210> 196 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
30	<400> 196 gcctccggaagg gtcattctc	19
35	<210> 197 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
45	<400> 197 ggcctccggaagg gtcattctc	18
50	<210> 198 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
60	<400> 198 gggcctccggaagg gtcattctc	17
65	<210> 199 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	

<400> 199
ttcgtgcggg cgaccgta 18

5 <210> 200
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

15 <400> 200
ggtgcggttc tccgagat 18

<210> 201
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

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

25 <400> 201
ccggatggag aggccaga 18

30 <210> 202
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

40 <400> 202
ttttgtccgg ctctgtct 18

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - 5 – al menos un primer par de cebadores que es específico para un sitio de fusión entre el gen 1 y el gen 2, en la que el al menos un par de cebadores comprende al menos un cebador directo que comienza en el lado 5' del sitio de fusión y al menos un cebador inverso que comienza en el lado 3' del sitio de fusión;
 - 10 – un segundo par de cebadores específico para una porción del gen 1 que está en 5' del sitio de fusión;
 - un tercer par de cebadores específico para una porción del gen 1 que está en 3' del sitio de fusión; y
 - 15 – una sonda marcada específica para cada uno de los productos de amplificación resultantes de cada uno de dichos pares de cebadores.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un cuarto conjunto de cebadores específico para una secuencia de control.
- 20 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el al menos un primer par de cebadores comprende al menos tres pares de cebadores.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una ADN polimerasa termoestable.
- 25 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además transcriptasa inversa.
- 30 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una muestra biológica de un individuo, en la que la muestra biológica es ARN de plasma.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el gen 1 se selecciona de ALK, RET, ROS, NTRK, BRAF, ABL y FGFR.
- 35 8. La composición de la reivindicación 7, en la que el gen 1 es ALK y el gen 2 se selecciona del grupo que consiste en EML4, KIF5B, HIP1, KLC1 y TFG.
9. La composición de la reivindicación 7, en la que el gen 1 es RET y el gen 2 se selecciona del grupo que consiste en KIF5B, CCDC6, NCOA4 y TRIM33.
- 40 10. Un procedimiento para detectar si una muestra biológica de un individuo porta un gen de fusión, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 45 – llevar a cabo una reacción de amplificación con la muestra biológica del individuo y la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
 - determinar la cantidad de producto de amplificación del al menos un primer par de cebadores;
 - 50 – detectar la presencia o ausencia de una diferencia en la cantidad de producto de amplificación del segundo par de cebadores y la cantidad de producto de amplificación del tercer par de cebadores;
 - detectar un gen de fusión si:
 - 55 (i) la cantidad de producto de amplificación del al menos un primer par de cebadores es mayor que la cantidad de producto de amplificación del al menos un primer par de cebadores y un polinucleótido de control que no porta el gen de fusión; o
 - 60 (ii) la presencia de una diferencia se detecta en la cantidad de producto de amplificación del segundo par de cebadores y la cantidad de producto de amplificación del tercer par de cebadores;

en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) y en el que la muestra biológica es ARN de plasma del individuo.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el gen 1 se selecciona de ALK, RET, ROS, NTRK, BRAF, ABL y FGFR.
- 5 12. El procedimiento de la reivindicación 10 u 11, en el que el gen 1 es ALK, y el gen 2 se selecciona del grupo que consiste en EML4, KIF5B, HIP1, KLC1 y TFG.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 12, en el que el gen 1 es RET, y el gen 2 se selecciona del grupo que consiste en KIF5B, CCDC6, NCOA4 y TRIM33.
- 10 14. Un kit para detectar un gen de fusión en una muestra biológica de un individuo, comprendiendo dicho kit:
- 15
- al menos un primer par de cebadores que es específico para un sitio de fusión entre el gen 1 y el gen 2, en la que el al menos un par de cebadores comprende al menos un cebador directo que comienza en el lado 5' del sitio de fusión y al menos un cebador inverso que comienza en el lado 3' del sitio de fusión;
 - 20 - un segundo par de cebadores específico para una porción del gen 1 que está en 5' del sitio de fusión;
 - un tercer par de cebadores específico para una porción del gen 1 que está en 3' del sitio de fusión; y
 - 25 - una sonda marcada específica para cada uno de los productos de amplificación resultantes de cada uno de dichos pares de cebadores;
- en el que el primer, segundo y tercer par de cebadores están cada uno en recipientes separados, o dos o más se agrupan en un único recipiente.
- 30 15. El kit de la reivindicación 14, que comprende además un cuarto conjunto de cebadores específico para una secuencia de control, en el que el cuarto conjunto de cebadores está en un recipiente separado del primer, segundo y tercer pares de cebadores, o se agrupan en el mismo recipiente.
16. El kit de la reivindicación 14 o 15, que comprende además una ADN polimerasa termoestable.
- 35 17. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, que comprende además transcriptasa inversa.
18. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17, que comprende además al menos una muestra de control.

FIGURA 1

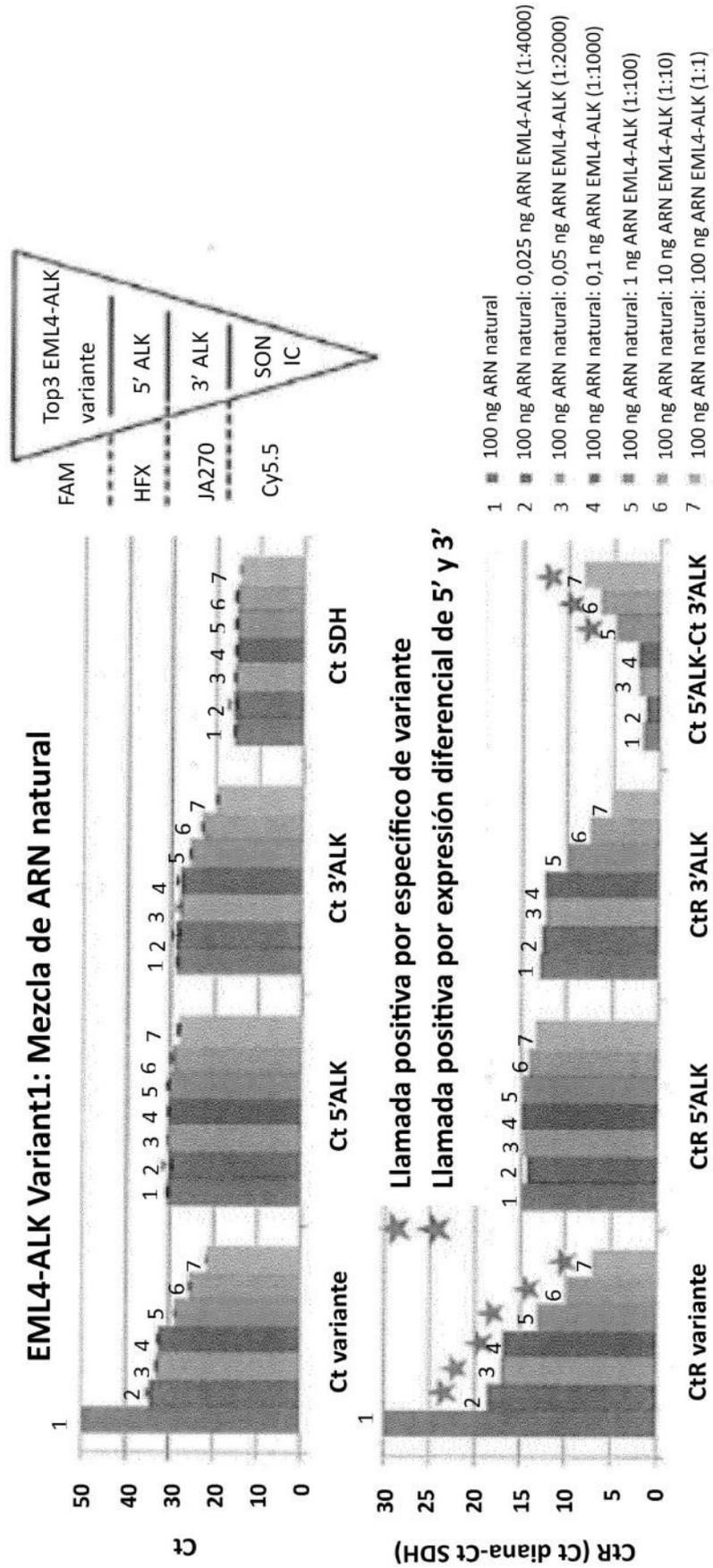


FIGURA 2

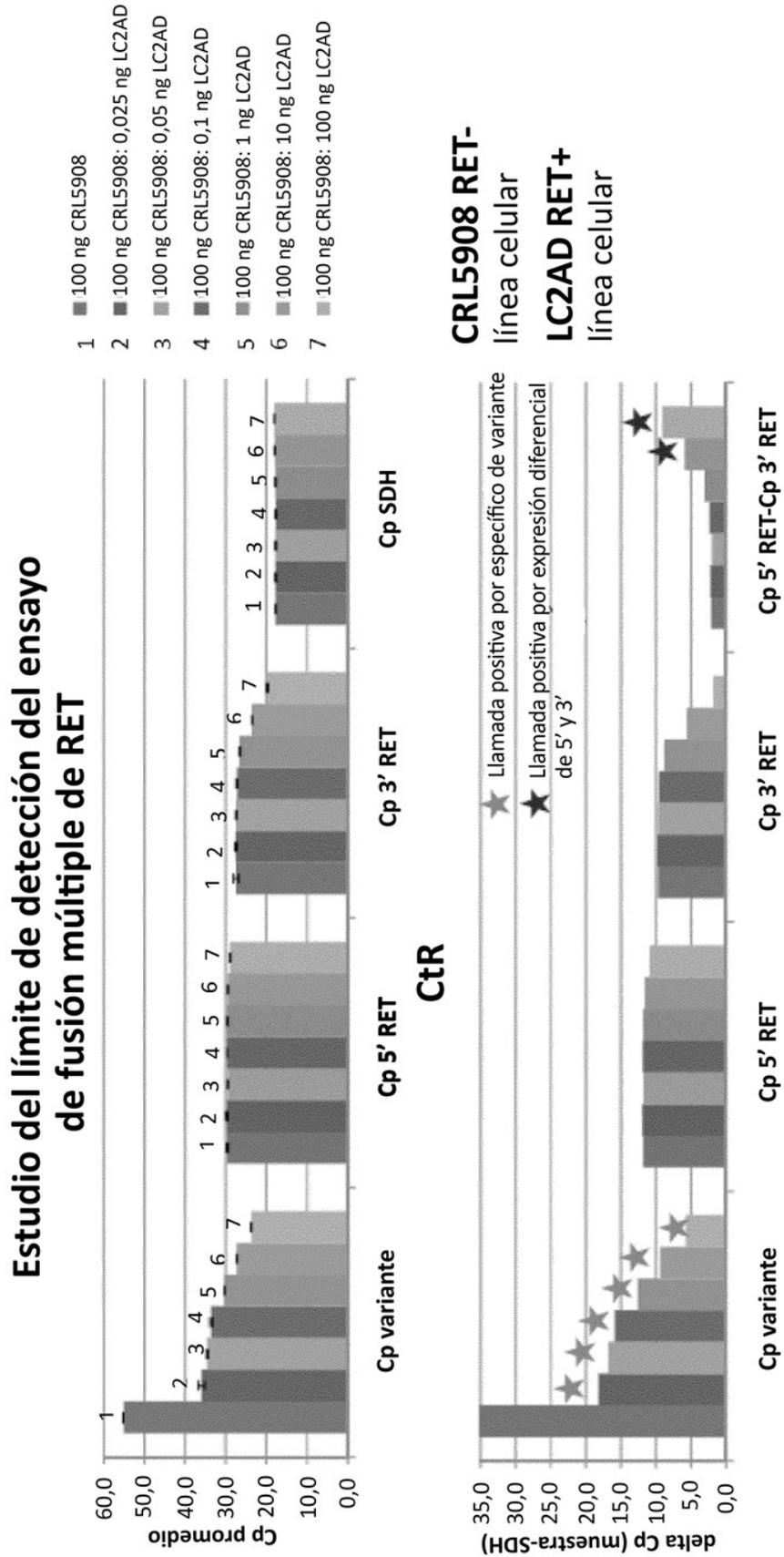
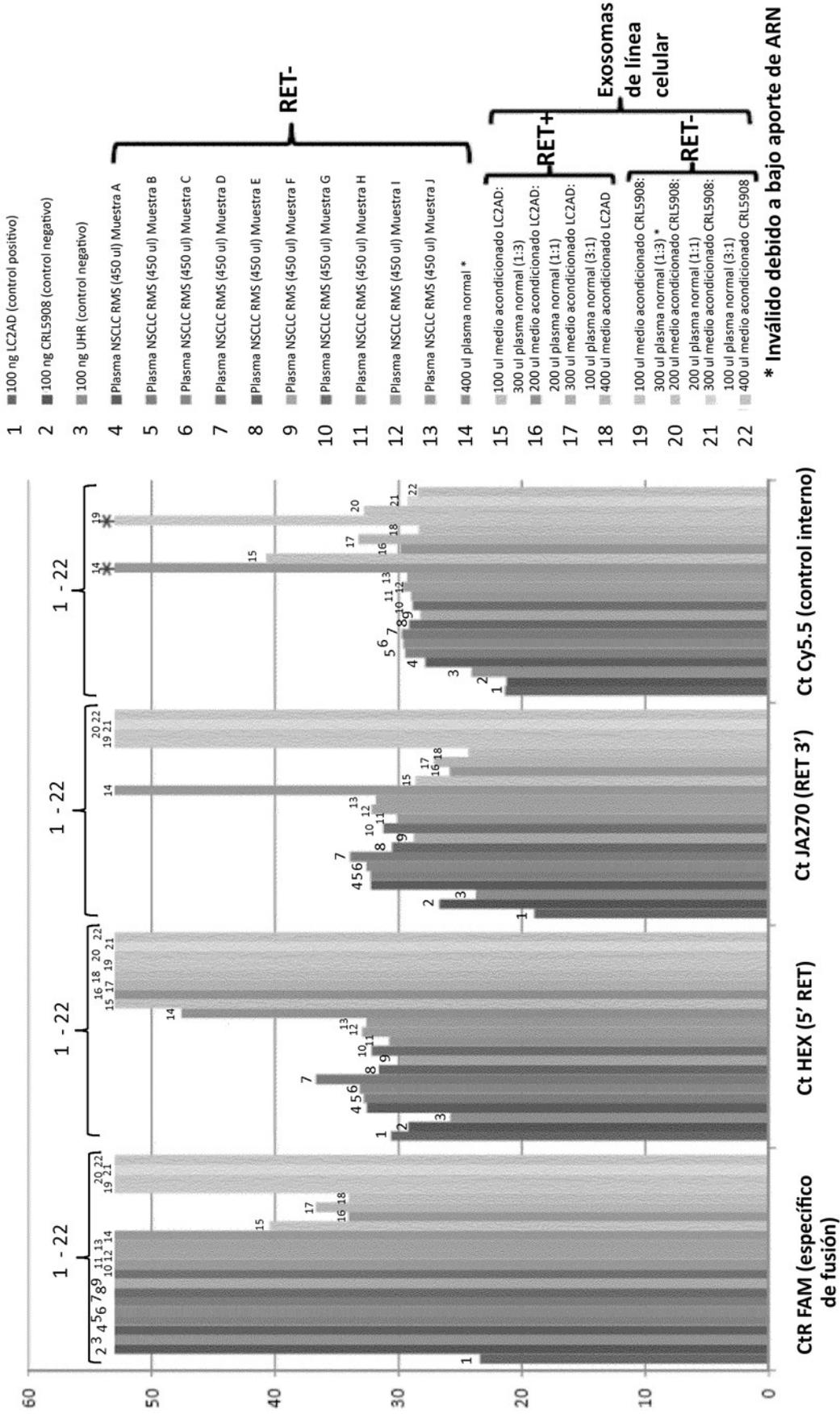


FIGURA 3



Detección de qRT-PCR de fusiones de RET en plasma y acondicionado

FIGURA 4

