

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 883 934**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6851 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2018 PCT/EP2018/064172**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018 WO18220004**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2018 E 18730279 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.06.2021 EP 3631011**

(54) Título: **Detección por PCR multiplex de fusiones de ALK, RET y ROS**

(30) Prioridad:

31.05.2017 US 201762513226 P

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

09.12.2021

(73) Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, DE y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**BEGOVICH, ANN;
CHEUNG, CINDY;
CHI, JAVELIN;
HILLMAN, GRANTLAND;
KUO, DWIGHT;
LEE, MICHAEL;
MA, XIAOJU MAX;
MANOHAR, CHITRA;
ORDINARIO, ELLEN;
RAJAMANI, JAYA y
TRUONG, HUAN**

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 883 934 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

Detección por PCR multiplex de fusiones de ALK, RET y ROS

5 **Antecedentes de la invención**

Una serie de cánceres se asocian con fusiones génicas (Yoshihara *et al.* (2015) *Oncogene* 34:4845). Quizás el primer ejemplo informado es la asociación BCR-ABL con leucemia mielógena crónica (LMC) en los años 60 (Nowell y Hungerford (1960) *J. Natl. Cancer Inst.* 25:85). Desde entonces, se ha informado de cientos de fusiones génicas más para cánceres en muchos tejidos diferentes (Presner y Chinnaiyan (2009) *Curr. Opin Genet. Dev.* 19:82).

Otro ejemplo es el receptor de tirosina cinasa ALK (cinasa de linfoma anaplásico). Las fusiones EML4-ALK (proteína asociada con microtúbulos de equinodermo de tipo 4-cinasa de 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 estimula por el fuerte promotor de EML4, lo que da como resultado una mayor expresión 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. Los ejemplos adicionales de fusiones de cinasas activadas implican RET (reordenado durante la transfección) y ROS1.

Se puede usar la detección de una fusión génica para dirigir el tratamiento. La mayoría de los procedimientos de detección requieren biopsia de tejido tumoral, lo que no es factible para muchos pacientes de cáncer, especialmente en estadios tardíos. La detección en cortes de tejido biopsiado típicamente se lleva a cabo por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) o inmunohistoquímica (IHQ). Las pruebas tienen altas tasas de positivos falsos y fondo, en parte debido a la cizalladura durante el procedimiento de corte. Por tanto, se requiere que los citólogos expertos observen múltiples cortes de tejido, lo que necesita una biopsia considerablemente grande de un paciente debilitado. De forma similar, una dificultad con el uso de RT-PCR es la cantidad y calidad del material genético del tejido tumoral, por ejemplo, en forma incluida en parafina fijada con formol (FFPE). Véase, por ejemplo, Liu *et al.* (2015) PLoS One 10: e0117032.

Debido a que la detección requiere mucho tiempo y recursos, la tasa de pruebas es relativamente baja. Los cánceres asociados con fusiones de ALK son muy sensibles a los inhibidores de ALK, tales como crizotinib y ceritinib. 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 baja tasa de pruebas para fusiones génicas representa, por tanto, una gran oportunidad perdida para el tratamiento.

40 El documento CN104818320 A (AMOY DIAGNOSTICS CO LTD) divulga cebadores y sondas para la detección por PCR de los tres genes (ALK, RET, ROS1), incluyendo amplificación multiplex de varias variantes de las mismas fusiones génicas en un único tubo, pero sin multiplex de 2 o 3 genes. El documento WO 2016/166269 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; F HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH]; ROCHE MOLECU) divulga procedimientos para la detección de las tres fusiones génicas midiendo el desequilibrio en la expresión de las dos partes de la fusión. El procedimiento usa varios pares de cebadores específicos para dichas fusiones, pero ninguna sonda específica para la detección de los amplicones ni ninguna amplificación multiplex de los tres genes.

50 **Sumario de la invención**

La descripción a continuación, en algunos respectos, puede ir más allá del contenido de la invención como tal, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. Esta descripción se proporciona como información adicional para situar la presente invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles herramientas, materiales o desarrollos técnicos relacionados. La información técnica adicional, que no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no es parte de la invención, incluso si se describe como "modo de realización" de la invención.

En el presente documento se proporcionan procedimientos multiplex y composiciones para detectar genes de fusión, en particular, los que implican ALK, RET y ROS1.

60 En el presente documento se proporcionan composiciones de ensayo multiplex que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK; (B) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; (C) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ROS1; y (D) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno. Se proporcionan además

composiciones de ensayo multiplex que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK; (B) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; y (C) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno. En el

- 5 presente documento también se divultan composiciones de ensayo multiplex que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; y (B) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno.

- 10 En algunos modos de realización, el al menos un gen de fusión de ALK se selecciona del grupo que consiste en: exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 2 de EML4-exón 20 de ALK, exón 18 de EML4-exón 20 de ALK, exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK y exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK; el al menos un gen de fusión de RET se selecciona del grupo que consiste en: exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET y exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET; y el al menos un gen de fusión de ROS1 se selecciona del grupo que consiste en: exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1, exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1, exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1, exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 35 de ROS1 y exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1, en cualquier combinación.

En algunos modos de realización, la composición comprende al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan más de 2 genes de fusión de ALK, más de 2 genes de fusión de RET y/o más de 2 genes de fusión de ROS1. En algunos modos de realización, la composición comprende al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1 y exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1.

- 30 En algunos modos de realización, el al menos un gen de fusión de ALK incluye: exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 2 de EML4-exón 20 de ALK, exón 18 de EML4-exón 20 de ALK, exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK y exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK; el al menos un gen de fusión de RET incluye: exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET y exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET; y el al menos un gen de fusión de ROS1 incluye: exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1, exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1, exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1, exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 35 de ROS1 y exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1. Es decir, la composición de ensayo incluye conjuntos de cebadores y sondas para amplificar y detectar todos los genes de fusión enumerados.

En algunos modos de realización, para que el conjunto de cebadores amplifique al menos un gen de fusión de ALK, el cebador directo y cebador inverso tienen secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-50 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, para que la sonda detecte al menos un gen de fusión de ALK, la secuencia de sonda se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:182-186. Las secuencias de cebadores directos e inversos y las secuencias de sonda se pueden usar conjuntamente en cualquier combinación apropiada para detectar cualquiera de las 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 variantes de fusión de ALK en cualquier combinación. En algunos modos de realización, para que el conjunto de cebadores amplifique al menos un gen de fusión de RET, el cebador directo y cebador inverso tienen secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:83-145 y 187, y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, para que la sonda detecte al menos un gen de fusión de RET, la secuencia de sonda se selecciona del grupo que consiste en: 189-194. Las secuencias de cebadores directos e inversos y las secuencias de sonda se pueden usar conjuntamente en cualquier combinación para detectar cualquiera de las 1, 2, 3, 4, 5 o 6 variantes de fusión de RET en cualquier combinación. En algunos modos de realización, para que el conjunto de cebadores detecte al menos un gen de fusión de ROS1, el cebador directo y cebador inverso tienen secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:195-212 y SEQ ID NO:213-226, respectivamente. En algunos modos de realización, para que la sonda detecte al menos un gen de fusión de ROS1, la secuencia de sonda se selecciona del grupo que consiste en: 227-230 y 51. Las secuencias de cebadores directos e inversos y las secuencias de sonda se pueden usar conjuntamente en cualquier combinación para detectar cualquiera de las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 variantes de fusión de ROS1 en cualquier combinación.

- 65 En algunos modos de realización, el marcador en la sonda marcada que detecta el control interno es diferente de los marcadores en las sondas marcadas que detectan los genes de fusión. En algunos modos de realización, los

- marcadores en todas las sondas marcadas son diferentes entre sí. En algunos modos de realización, se usa una única sonda marcada para detectar todos los al menos uno de los genes de fusión de ALK. En algunos modos de realización, se usa una única sonda marcada para detectar todos los al menos uno de los genes de fusión de RET.
- 5 En algunos modos de realización, se usa una única sonda marcada para detectar todos los al menos uno de los genes de fusión de ROS1. En algunos modos de realización, la sonda marcada se fija a un cebador en el al menos un conjunto de cebadores. En algunos modos de realización, la sonda marcada está separada del conjunto de cebadores.
- 10 En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de ALK, todos los conjuntos de cebadores que amplifican los genes de fusión de ALK incluyen un único cebador común. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de ALK, los conjuntos de cebadores incluyen cebadores exclusivos. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de RET, todos los conjuntos de cebadores que amplifican los genes de fusión de RET incluyen un único cebador común. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de RET, los conjuntos de cebadores incluyen cebadores exclusivos. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de ROS1, todos los conjuntos de cebadores que amplifican los genes de fusión de ROS1 incluyen un único cebador común. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de ROS1, los conjuntos de cebadores incluyen cebadores exclusivos.
- 15 En el presente documento se proporcionan además composiciones de ensayo multiplex que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK; (B) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; y (C) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno. En el presente documento también se proporcionan composiciones de ensayo multiplex que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; y (B) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno. En algunos modos de realización, se amplifica y detecta al menos un gen de fusión de ROS1 en un ensayo multiplex separado. En algunos modos de realización, el al menos un gen de fusión de ALK se selecciona del grupo que consiste en: exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 2 de EML4-exón 20 de ALK, exón 18 de EML4-exón 20 de ALK, exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK y exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK; y el al menos un gen de fusión de RET se selecciona del grupo que consiste en: exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET y exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET, en cualquier combinación. En algunos modos de realización, el al menos un gen de fusión de ROS1 se selecciona del grupo que consiste en: exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1, exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1, exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1, exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 35 de ROS1 y exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1.
- 20 En algunos modos de realización, la composición comprende al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan más de 2 genes de fusión de ALK y más de 2 genes de fusión de RET. En algunos modos de realización, la composición comprende al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET y exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET.
- 25 En algunos modos de realización, el al menos un gen de fusión de ALK incluye: exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 2 de EML4-exón 20 de ALK, exón 18 de EML4-exón 20 de ALK, exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK y exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK; y el al menos un gen de fusión de RET incluye: exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET y exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET.
- 30 En algunos modos de realización, el marcador en la sonda marcada que detecta el control interno es diferente de los marcadores en las sondas marcadas que detectan los genes de fusión. En algunos modos de realización, los marcadores en todas las sondas marcadas son diferentes entre sí. En algunos modos de realización, se usa una única sonda marcada para detectar todos los al menos uno de los genes de fusión de ALK. En algunos modos de realización, se usa una única sonda marcada para detectar todos los al menos uno de los genes de fusión de RET. En algunos modos de realización, la sonda marcada se fija a un cebador en el al menos un conjunto de cebadores. En algunos modos de realización, la sonda marcada está separada del conjunto de cebadores.
- 35 En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de ALK, todos los

- conjuntos de cebadores que amplifican los genes de fusión de ALK incluyen un único cebador común. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de ALK, los conjuntos de cebadores incluyen cebadores exclusivos. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de RET, todos los conjuntos de cebadores que amplifican los genes de fusión de RET incluyen un único cebador común. En algunos modos de realización, donde se amplifica y detecta más de un gen de fusión de RET, los conjuntos de cebadores incluyen cebadores exclusivos.
- 5 Los ejemplos de controles internos que se pueden usar para los ensayos divulgados actualmente incluyen, pero no se limitan a, SDHA (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, 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 retrotranscriptasa. En algunos modos de realización, la composición comprende además dNTP. En algunos modos de realización, la composición comprende además un tampón susceptible de polimerización por la ADN polimerasa y retrotranscriptasa.
- 15 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 células escamosas de pulmón, 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.
- 20 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.
- 25 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.
- 30 Se divultan además procedimientos de tratamiento de un individuo, por ejemplo, un individuo al que se le ha diagnosticado cáncer, que comprenden poner en contacto una muestra biológica del individuo con cualquiera de las composiciones de ensayo multiplex descritas en el presente documento (por ejemplo, que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK; (B) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; (C) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ROS1; y (D) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno); llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica; determinar que al menos un gen de fusión está presente si se detecta un gen de fusión; y tratar al individuo si al menos un gen de fusión está presente. Se proporcionan además procedimientos de tratamiento de un individuo, por ejemplo, un individuo al que se le ha diagnosticado cáncer, que comprenden poner en contacto una muestra biológica del individuo con cualquiera de las composiciones de ensayo multiplex descritas en el presente documento (por ejemplo, que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK; (B) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET y (C) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno); llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica; determinar que al menos un gen de fusión está presente si se detecta un gen de fusión; y tratar al individuo si al menos un gen de fusión está presente. Se proporcionan además procedimientos de tratamiento de un individuo, por ejemplo, un individuo al que se le ha diagnosticado cáncer, que comprenden poner en contacto una muestra biológica del individuo con cualquiera de las composiciones de ensayo multiplex descritas en el presente documento (por ejemplo, que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; y (B) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno); llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica; determinar que al menos un gen de fusión está presente si se detecta un gen de fusión; y tratar al individuo si al menos un gen de fusión está presente.
- 35 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.
- 40 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.
- 45 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.
- 50 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.
- 55 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.
- 60 En algunos modos de realización, la muestra es ácido nucleico enriquecido o aislado, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos modos de realización, la muestra es ARN, por ejemplo, aislado de sangre (por ejemplo, suero, plasma, otra fracción sanguínea), 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.

En algunos casos, el tratamiento es con un inhibidor de cinasa, por ejemplo, un inhibidor de cinasa selectivo, tal como alecrinib, crizotinib, ceritinib, lorlatinib, brigatinib, cabozantinib, apatinib, vandetanib, ponatinib, lenvatinib, DS6051b o variantes o combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, la tanda de tratamiento incluye radioterapia o quimioterapia (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel). En algunos modos de realización, el tratamiento es con GSK1838705A, TAE-684, CEP-14083, AP26113, NMS-E628,

sorafenib, vandetanib, motesanib, sunitinib y XL-184 (véase, por ejemplo, Mologni (2011) *Curr. Med. Chem.* 18:162).

En algunos casos, se realiza un seguimiento del individuo durante el tratamiento, por ejemplo, para determinar si la cantidad de producto de amplificación del gen de fusión se incrementa o disminuye, o si se detecta un gen de fusión diferente. En algunos modos de realización, el tratamiento se cambia si cambia la cantidad de producto de amplificación del gen de fusión, o si se detecta un gen de fusión diferente. Por ejemplo, si la cantidad del gen de fusión detectado originalmente disminuye, pero el cáncer progresá, se puede cambiar el tratamiento para que sea menos dirigido, por ejemplo, radio- o quimioterapia. Si la afección del individuo ha mejorado, se puede reducir el tratamiento.

En algunos modos de realización, la muestra biológica incluye ADN o ARN, por ejemplo, ácidos nucleicos separados o purificados. En algunos modos de realización, la muestra biológica es ARN de sangre, por ejemplo, plasma, suero u otra fracción sanguínea. En algunos modos de realización, la amplificación y detección se llevan a cabo usando qRT-PCR.

En algunos modos de realización, al individuo se le diagnostica cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma de células escamosas de pulmón, 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.

Se proporcionan además procedimientos para determinar la presencia de al menos un gen de fusión en una muestra de un individuo, por ejemplo, un individuo al que se le ha diagnosticado cáncer, que comprenden poner en contacto una muestra biológica del individuo con cualquiera de las composiciones de ensayo multiplex descritas en el presente documento (por ejemplo, que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK; (B) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; (C) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ROS1; y (D) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno); llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica; determinar que al menos un gen de fusión está presente si se detecta un gen de fusión. Se proporcionan además procedimientos para determinar la presencia de al menos un gen de fusión en una muestra de un individuo, por ejemplo, un individuo al que se le ha diagnosticado cáncer, que comprenden poner en contacto una muestra biológica del individuo con cualquiera de las composiciones de ensayo multiplex descritas en el presente documento (por ejemplo, que comprenden: (A) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK; (B) al menos un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET y (C) un conjunto de cebadores y sonda marcada que específicamente amplifican y detectan un control interno); llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica; determinar que al menos un gen de fusión está presente si se detecta un gen de fusión.

En algunos modos de realización, la muestra biológica incluye ADN o ARN, por ejemplo, ácidos nucleicos separados o purificados. En algunos modos de realización, la muestra biológica es ARN de sangre, por ejemplo, plasma, suero u otra fracción sanguínea. En algunos modos de realización, la amplificación y detección se llevan a cabo usando qRT-PCR.

En algunos modos de realización, al individuo se le diagnostica cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma de células escamosas de pulmón, 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 casos, el procedimiento comprende además determinar una tanda de tratamiento si al menos se detecta un gen de fusión. En algunos modos de realización, el tratamiento es con un inhibidor de cinasa, por ejemplo, un inhibidor de cinasa selectivo, tal como alectinib, crizotinib, ceritinib, lorlatinib, brigatinib, cabozantinib, apatinib, vandetanib, ponatinib, lenvatinib, DS6051b o variantes o combinaciones de los mismos. En algunos

modos de realización, la tanda de tratamiento incluye radioterapia o quimioterapia (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel). En algunos modos de realización, el tratamiento es con GSK1838705A, TAE-684, CEP-14083, AP26113, NMS-E628, sorafenib, vandetanib, motesanib, sunitinib y XL-184.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1A muestra que las variantes de fusión de ALK (FAM) indicadas son detectables a 50 copias en 0,1 ng de ARN WT (n=3). La figura 1B muestra que las variantes de fusión de RET (HEX) indicadas son detectables a 50 copias en 0,1 ng de ARN WT (n=3). La figura 1C muestra que las variantes de fusión de ROS1 (JA270) indicadas son detectables a 50 copias en 0,1 ng de ARN WT (n=3). La figura 1D muestra los valores de Ct del control interno para cada ARN de entrada.

10 La figura 2 muestra el límite de detección de fusiones de ALK y RET en un ensayo multiplex como se describe en el presente documento. El ensayo puede detectar 25 copias del transcripto de fusión diluido en UHR.

15 La figura 3 muestra datos de linealidad para variantes de fusión de ALK representativas

20 La figura 4 muestra datos de linealidad para variantes de fusión de RET representativas.

25 La figura 5 muestra datos de linealidad para variantes de fusión de ROS1 representativas

30 La figura 6 muestra los datos del LD para una variante de fusión de ALK representativa.

35 La figura 7 muestra los datos del LD para una variante de fusión de RET representativa.

40 La figura 8 muestra los datos del LD para una variante de fusión de ROS1 representativa.

Descripción detallada de la invención

30 I. **Introducción**

Los autores de la invención han descubierto un procedimiento multiplex, cuantitativo y novedoso de detección de fusiones entre regiones genéticas. Los procedimientos divulgados actualmente solo requieren una pequeña cantidad de muestra del paciente que se puede recoger de forma no invasiva, por ejemplo, ARN libre circulante (ARNlc) 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 en un tubo extremadamente sensible (hasta ~25 copias) para detectar múltiples fusiones génicas que predicen cáncer y la respuesta al tratamiento. Los presentes ensayos se pueden usar para la identificación de una variante de fusión, así como para el seguimiento y la vigilancia durante el tratamiento y/o progresión.

II. Definiciones

45 Una "fusión genética" es una secuencia cromosómica híbrida formada por la unión de dos localizaciones cromosómicas que previamente estaban separadas. 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).

50 Un "gen de fusión" es un gen híbrido formado por la unión de dos genes que previamente estaban separados, lo que da lugar a un reordenamiento estructural y/o variante en el genoma del tumor. 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 regiones no traducidas en 3'. 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 fusión de ALK, fusión de RET y fusión de ROS1 se refieren a genes de fusión que incluyen ALK, RET y ROS1 como un miembro, respectivamente.

55 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 localización genética se encuentra contiguo a un nucleótido de otro gen o localización genética.

60 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.

65 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 está limitado 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 típicamente se denominan 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 iniciación de la síntesis de hebras de polinucleótido por una ácido nucleico polimerasa en condiciones adecuadas. Las reacciones de síntesis y amplificación de polinucleótido 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 diana que es al menos sustancialmente complementaria a la secuencia diana. Esta región típicamente tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos. Un "par de cebadores" se refiere a un cebador directo y cebador inverso (a veces llamados cebadores 5' y 3') que son complementarios a hebras opuestas de una secuencia diana y están diseñados para amplificar la secuencia diana. Los cebadores directos e inversos se disponen dentro de una distancia amplificable entre sí en la secuencia diana, por ejemplo, aproximadamente 10-5000 nucleótidos, aproximadamente 25-500 nucleótidos o aproximadamente 60-120 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 puedan 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 en 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" significa cualquier molécula que se puede unir selectivamente a una biomolécula diana específicamente pretendida, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de interés que se va a unir, capturar o hibridar por las sondas. Las sondas típicamente están marcadas con un resto no natural, por ejemplo, un fluoróforo, cromóforo, marca de afinidad (por ejemplo, estreptavidina o biotina) y/o un extintor.
- Las palabras "complementario" o "complementariedad" se refieren a la capacidad de un ácido nucleico en un polinucleótido de 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 con respecto a la secuencia diana típicamente es 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 mayor de identidad en una región especificada, cuando se compara y alinea para una máxima correspondencia en un margen de comparación o región designada) como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros predeterminados, 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 típicamente se determina sobre secuencias ópticamente alineadas, de modo que la definición se aplica a secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como a las que tienen sustituciones. Los algoritmos usados comúnmente en la técnica consideran los 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 o grupo de sondas de ácido nucleico o similares, para específicamente amplificar, capturar, marcar/convertir o detectar 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. Los términos "amplicón" y "producto de amplificación" se refieren 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 amplificación *in vitro* por cualquier procedimiento de amplificación adecuado. Los márgenes de un amplicón dado típicamente se definen por la posición de la porción complementaria de los cebadores directos e inversos usados para la amplificación. Se describen condiciones de PCR adecuadas 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*, Z05 de *Thermus sp.* (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.674.738) y mutantes de la polimerasa de Z05 de *Thermus sp.*, *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, sps17 de *Thermus sp.*, *Deinococcus radiodurans*, familia B de aguas termales/clon 7, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosiphon africanus* y versiones modificadas de las mismas.
- El término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a cualquier composición que contiene o se supone 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 libre de 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 significar que se obtiene sangre 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 hemoderivados (por ejemplo, plaquetas, capa leucoplaquetaria), saliva, orina, lágrimas, semen, flujo vaginal, biopsias de tejido 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.
- 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 afección de prueba, por ejemplo, de un individuo que se sospecha que tiene cáncer, y comparar con muestras de afecciones conocidas, por ejemplo, de un individuo libre de cáncer (control negativo), o de un individuo que se sabe que tiene cáncer y/o una anomalía genética particular (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, sin mutación) conocida, y un ejemplo de un control positivo sería una muestra biológica de un paciente o línea celular que se sabe que tiene 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 determinar 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 serie de parámetros. Por ejemplo, se puede concebir un control para comparar el beneficio terapéutico en base a 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 comprenderá qué controles son valiosos en una situación dada y podrá analizar datos en base a 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 ampliamente variables en los controles, la variación en las muestras de prueba no se considerará significativa.
- Un "control interno" (CI) se refiere a un ácido nucleico que se espera que esté presente en la muestra, tal como un gen constitutivo que se expresa o está presente a un nivel bastante estándar en todas las muestras. El control interno se puede usar para estandarizar la cantidad y calidad del ácido nucleico en la muestra con la de otras muestras y garantizar que la reacción de amplificación y detección funciona. Los ejemplos de controles internos incluyen SDH (succinato deshidrogenasa), LDHA (lactato deshidrogenasa A), NONO, PGK (fosfoglicerato cinasa 1), PPIH, HPRT1, beta-actina, GADPH, ACTB y ARNr 16S.
- 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 sea sensible a un tratamiento particular. No se pretende que

los términos sean absolutos, como se apreciará por cualquier experto en el campo del diagnóstico médico.

- Los términos "respuesta al tratamiento", "mejoría" y términos similares se refieren a cualquier reducción de la gravedad de los síntomas. En el caso del tratamiento del cáncer, el tratamiento se puede referir a, por ejemplo, 5 reducir el tamaño del tumor, número de células cancerosas, tasa de crecimiento, actividad metastásica, reducir la muerte celular de células no cancerosas, náuseas reducidas y otros efectos secundarios de la quimioterapia o radioterapia, etc. No se pretende que los términos "tratar" y "prevenir" sean términos absolutos. El tratamiento y la prevención se pueden referir a cualquier retraso en la aparición, mejoría de los síntomas, mejora de la supervivencia del paciente, incremento del tiempo o tasa de supervivencia, etc. El tratamiento y la prevención 10 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 habría producido sin el tratamiento. El efecto del tratamiento se puede comparar con un individuo o grupo 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 15 menos un 10 %, en comparación, por ejemplo, con el individuo antes de la administración o con un individuo de control que no se someta a 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.
- 20 Los términos "tratar" y "administrar", con referencia a un paciente, incluyen recomendar, proporcionar o recetar un tratamiento particular al paciente, y no se limitan a tratar directa y físicamente al paciente.
- El término "ciclo umbral" o "Ct" es una medida de la concentración relativa y se usa comúnmente en la PCR ultrarrápida (también denominada qPCR). Ct se refiere a la intersección de una curva de amplificación y una 25 línea umbral. La línea umbral a menudo se establece en un punto cuando se puede detectar la señal por encima del 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 la amplificación. Un mayor Ct corresponde a un tiempo más largo para alcanzar el umbral, ya sea debido a la baja concentración de diana o amplificación ineficaz.
- 30 Los términos "individuo", "sujeto", "paciente" y términos similares se usan de manera intercambiable y se refieren a seres humanos, excepto donde se indique. Otros mamíferos se pueden considerar sujetos, tales como primates no humanos, así como conejos, ratas, ratones, perros, gatos y otras especies de mamíferos. El término 35 no indica necesariamente que al sujeto se le haya diagnosticado una enfermedad particular, sino que típicamente se refiere a un individuo bajo supervisión médica. Un paciente puede estar buscando tratamiento, seguimiento, ajuste o modificación de una pauta terapéutica existente, etc. Un paciente puede incluir individuos que no hayan recibido tratamiento, actualmente estén recibiendo tratamiento, hayan tenido una cirugía y aquellos que hayan interrumpido el tratamiento.
- 40 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 , ^{3}H), reactivos electrodensos o un resto basado en afinidad, por ejemplo, una "marca His" para su purificación, o una "marca de estreptavidina" que interactúe con biotina.
- 45 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. Véanse, 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). Se pretende que el término "un" o "una" signifique "uno/a o más". Se pretende que los términos "comprender", "comprende" y "que comprende", cuando preceden a la mención de una etapa o un elemento, signifiquen que la adición de otras etapas o elementos es opcional y no se excluye.

55 III. Genes de fusión

Son conocidos una serie de genes de fusión asociados con cáncer y aparecen en todos los tipos de cánceres. Los ejemplos incluyen cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma de células escamosas de pulmón, 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 y cáncer de mama. Se producen comúnmente genes de fusión asociados con cáncer 60 cuando un miembro de la fusión es una cinasa implicada en una vía de señalización de procrecimiento, y el otro miembro contribuye a la expresión o señalización elevada o constitutiva. Este es el caso de las fusiones de ALK, RET y ROS1. Los compañeros de fusión comunes para ALK son EML4 y KIF5B. Los compañeros de fusión comunes para RET son KIF5B, CCDC6 y NCOA4. Se sabe que varios genes se fusionan con ROS1, incluyendo 65 CD74, EZR, TPM3, SDC4, SLC34A2 y LRIG3 (véase, por ejemplo, Yoshihara *et al.* (2015) *Oncogene* 34:4845).

Las presentes composiciones y procedimientos se centran en el diseño de ensayos multiplex para detectar fusiones de ALK, RET y ROS1. Una biopsia invasiva o extracción de sangre en exceso a menudo no es factible para los pacientes de cáncer. Las presentes composiciones y procedimientos permiten la detección de varias fusiones génicas accionables con una muestra relativamente pequeña del paciente, que puede ser una muestra de plasma no invasiva.

El diseño de estos ensayos altamente multiplexados puede variar. Cuando se detectan múltiples fusiones de ALK, por ejemplo, se pueden usar un cebador y sonda comunes que se hibridan a secuencias en el gen ALK cerca del punto de fusión, y cebadores específicos para diversos compañeros de fusión. Por tanto, por ejemplo, si se detectan 5 fusiones de ALK diferentes, el ensayo puede incluir 15 oligonucleótidos (10 cebadores y 5 sondas) o 7 oligonucleótidos (1 cebador común, 1 sonda común y 5 cebadores específicos).

En algunos modos de realización, el ensayo multiplex detecta 2, 3, 4, 5, 6 o 7 fusiones de ALK y 2, 3, 4, 5 o 6 fusiones de RET en una única reacción de amplificación y detección. En algunos modos de realización, el ensayo multiplex detecta además 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 fusiones de ROS1 en la misma reacción. En algunos modos de realización, las fusiones de ROS1 se detectan en una reacción de amplificación y detección separada. En algunos modos de realización, la reacción de amplificación y detección incluye además un control interno (por ejemplo, un gen constitutivo).

La presencia de fusiones de ALK, RET y ROS1 indica que un paciente de cáncer será sensible a un inhibidor de cinasa selectivo. Estos incluyen alectinib, crizotinib, ceritinib, lorlatinib, brigatinib, cabozantinib, apatinib, vandetanib, ponatinib, lenvatinib, DS-6051b y variantes o combinaciones de los mismos. Se puede realizar un seguimiento del estado de fusión de un paciente durante el tratamiento para determinar si el enfoque terapéutico se puede cambiar, por ejemplo, a un inhibidor de cinasa diferente o quimio- o radioterapia más estándar.

IV. Preparación de la muestra

Se pueden obtener muestras para someter a prueba fusiones genéticas de cualquier fuente, pero se obtienen de forma ventajosa de manera no invasiva, por ejemplo, de sangre o una fracción sanguínea (por ejemplo, plasma, suero, plaquetas, etc.). Las muestras para los presentes procedimientos también se pueden tomar de orina, lavado broncoalveolar o biopsia de tejido. 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, kit de aislamiento de ARN High Pure, kit de ácidos nucleicos víricos High Pure, y kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales con MagNA Pure LC de Roche).

En algunos modos de realización, se prepara ADN y se usa como molde para los procedimientos de amplificación y detección divulgados actualmente. En algunos modos de realización, se prepara ARN. Cuando se usa ARN como molde para la amplificación por PCR, se requiere una etapa de retrotranscripción para preparar ADNc. Entonces, se puede usar una ADN polimerasa, tal como Taq u otra polimerasa termoestable para llevar a cabo la amplificación.

En algunos modos de realización, la muestra de ARN se aísla 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.

Como se muestra en los ejemplos, los procedimientos divulgados actualmente para la preparación de la muestra y la amplificación/detección con oligonucleótidos específicos de diana personalizados son extraordinariamente sensibles y se pueden usar para detectar mutaciones de fusiones génicas desde tan solo aproximadamente 50 —y, en algunos casos, aproximadamente 20— copias en una muestra diluida 1:4000 en un fondo de ARN natural. Esto permite la detección de variantes de fusión en muestras donde la secuencia diana sea muy escasa, por ejemplo, ARN libre de células (ARNlc) circulante. Los fondos variables de ARN y ADN en plasma no restan valor a la especificidad de la detección, incluso a bajos números de copias.

V. Amplificación y detección

Se puede llevar a cabo la amplificación de ácido nucleico usando cualquier procedimiento dependiente de cebador. 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.

Se pueden usar procedimientos basados en ADN para los procedimientos de amplificación y detección divulgados actualmente, por ejemplo, PCR. En algunos modos de realización, se usa PCR ultrarrápida 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 realización, la amplificación y detección se llevan a cabo en presencia de una sonda doblemente marcada (por ejemplo, una sonda TaqMan, CPT, ANB o MGB) marcada con un extintor y un fluoróforo (véase, por ejemplo, Gasparic *et al.* (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 396:2023).

- 5 En algunos modos de realización, se lleva a cabo una etapa de retrotranscripción preliminar (también denominada RT-PCR, que no se debe confundir con PCR ultrarrápida). Véase, por ejemplo, Hierro *et al.* (2006) 72:7148. El término "qRT-PCR" como se usa en el presente documento se refiere a retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa. Se pueden llevar a cabo ambas reacciones en un único tubo sin interrupción, por ejemplo, para añadir reactivos.
10

También se pueden usar procedimientos de amplificación basados en ARN, por ejemplo, amplificación mediada por transcripción (TMA) o amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA). Véanse, 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.

- Algunos de los oligonucleótidos usados en los presentes ensayos (cebadores y sondas) incluyen modificaciones de bases de alquilo para potenciar la amplificación selectiva, en particular, en un formato multiplex.

20 Se pueden marcar una sonda o 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), informándose sobre muchos de ellos en la literatura y conociéndose por los expertos en la técnica, y estando muchos de ellos disponibles comercialmente. Se describen fluoróforos, 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).

25

Los siguientes son ejemplos de fluoróforos que se pueden usar como marcadores: ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'disulfónico; acridina; acridina-isotiocianato; ácido 5-(2'-aminoethyl)aminonaftalen-1-sulfónico (EDANS); 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenilnaftalimida-3,5-disulfonato [0070] N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; BODIPY; amarillo brillante; cumarina; 7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120)/7-amino-4-trifluorometilcumarina (cumarán 151); tintes de cianina; cianosina, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftalen-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-cresoltaleína; nitrotirosina; pararosanilina; 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; rojo reactivo 4 (rojo brillante Cibacron 3B-A); 6-carboxi-X-rodamina (ROX); 6-carboxirrodamina (R6G); cloruro de sulfonil lisamina rodamina B; rodamina; 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 lantánido.

- 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 fijar fluoróforos por enlace covalente convencional, usando grupos funcionales apropiados en el fluoróforo y/o ácido nucleico.

Como se indica anteriormente, se puede usar una sonda doblemente marcada para la detección. La sonda doblemente 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 tengan un máximo de emisión entre 500 y 550 nm (por ejemplo, FAM, TET y HEX), se puede seleccionar un extintor con máximos de absorción entre 450 y 500 nm (por ejemplo, dabcyl o BHQ-1). Para fluoróforos que tengan un máximo de emisión por encima de 550 nm (por ejemplo, rodamina y tintes Cy), se puede seleccionar un extintor con máximos de absorción por encima de 550 nm (por ejemplo, BHQ-2). Véase, por ejemplo, Johansson (2003), *Meth. Mol.* 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. Los dispositivos de detección apropiados para la PCR cuantitativa incluyen los sistemas cobas® y Light Cycler® (Roche), los sistemas de PCR ultrarrápida PRISM 7000 y 7300 (Applied Biosystems), etc.

VI. Kits

En algunos aspectos de la presente divulgación, los reactivos y materiales para llevar a cabo los procedimientos divulgados actualmente están incluidos en un kit. En algunos casos, el kit incluye componentes para obtener, almacenar y/o preparar la muestra. Dichos componentes incluyen, por ejemplo, agujas y jeringuillas estériles, tubos revestidos con EDTA, tampones (por ejemplo, para la unión de ácido nucleico a y elución de una matriz), inhibidores de RNasa y/o DNasa, etc.

En algunos casos, el kit incluye cebador(es) directo(s) y cebador(es) inverso(s) para amplificar variante(s) de fusión de ALK que tiene(n) secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-50 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye sonda(s) para detectar variante(s) de fusión de ALK que tiene(n) secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:182-186. Las secuencias de cebadores directos e inversos y las secuencias de sonda se pueden usar conjuntamente en cualquier combinación apropiada para detectar cualquiera de las 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 variantes de fusión de ALK en cualquier combinación. En algunos modos de realización, el kit incluye cebador(es) directo(s) y cebador(es) inverso(s) para amplificar variante(s) de fusión de RET que tiene(n) secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:83-145 y 187 y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye sonda(s) para detectar variante(s) de fusión de RET que tiene(n) secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: 189-194. Las secuencias de cebadores directos e inversos y las secuencias de sonda se pueden usar conjuntamente en cualquier combinación para detectar cualquiera de las 1, 2, 3, 4, 5 o 6 variantes de fusión de RET en cualquier combinación. En algunos modos de realización, el kit incluye cebador(es) directo(s) y cebador(es) inverso(s) para amplificar variante(s) de fusión de ROS1 que tiene(n) secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:195-212 y SEQ ID NO:213-226, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye sonda(s) para detectar variantes de fusión de ROS1 que tienen secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: 227-230 y 51. Las secuencias de cebadores directos e inversos y las secuencias de sonda se pueden usar conjuntamente en cualquier combinación para detectar cualquiera de las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 variantes de fusión de ROS1 en cualquier combinación.

En algunos casos, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 13 de EML-exón 20 de ALK que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-10 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 20 de EML-exón 20 de ALK que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:11-20 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 6 de EML-exón 20 de ALK que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:21-30 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 2 de EML-exón 20 de ALK que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:31-35 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 18 de EML-exón 20 de ALK que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:36-40 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 24 de KIF-exón 20 de ALK que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:41-45 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 17 de KIF-exón 20 de ALK que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:46-50 y SEQ ID NO:52-61 y 181, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye una sonda para detectar una fusión de ALK que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:182-186.

En algunos casos, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 15 de KIF-exón 12 de RET que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:83-97 y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 16 de KIF-exón 12 de RET que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:98-107 y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 22 de KIF-exón 12 de RET que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:108-117 y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 23 de KIF-exón 12 de RET que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:118-127 y 187, y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 1 de CCDC-exón 12 de RET que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:128-135 y 118, y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 6 de NCO-exón 12 de RET que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:136-145 y SEQ ID NO:161-180, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye una sonda para detectar una fusión de RET que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:189-194.

En algunos casos, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón

6 de CD74-exón 34 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:195-197 y SEQ ID NO:222-226, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:195-197 y SEQ ID NO:213-215, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:208 y SEQ ID NO:222-226, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:211-212 y SEQ ID NO:216-221, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 4 de SDC4-exón 34 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:200-202 y SEQ ID NO:222-226, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:198-199 y SEQ ID NO:213-215, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 2 de SDC4-exón 34 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:198-199 y SEQ ID NO:222-226, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:200-202 y SEQ ID NO:213-215, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:203-205 y SEQ ID NO:222-226, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 13 de SLC34A2-exón 32 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:203-205 y SEQ ID NO:213-215, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:206-207 y SEQ ID NO:213-215, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 4 de SLC34A2-exón 34 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:206-207 y SEQ ID NO:222-226, respectivamente. En algunos modos de realización, el kit incluye un cebador directo y cebador inverso para amplificar una variante de fusión exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1 que tiene secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:209-210 y SEQ ID NO:216-221, respectivamente.

En algunos casos, cada uno de los conjuntos de cebadores está envasado en tubos separados, por ejemplo, para añadirse en proporciones que se vayan a determinar por el usuario. En algunos modos de realización, uno o más o todos los conjuntos de cebadores están envasados en un único tubo con proporciones predeterminadas.

El kit también puede incluir enzimas, tales como retrotranscriptasa y/o 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 la polimerización/amplificación por las polimerasas seleccionadas.

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

El kit también puede incluir material fungible, tal 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

55 A. Ejemplo 1: Ensayos multiplex para la detección del panel de fusiones de ALK, RET y ROS1

En este ejemplo, se sometió a prueba un procedimiento de RT-PCR cuantitativa multiplex para detectar fusiones de ALK, RET y ROS1 (panel ALK/RET/ROS1). Se usan cuatro conjuntos diferentes de cebadores y sondas en un ensayo en un único tubo (o recipiente, pocillo, cámara, compartimento) para reducir la cantidad de muestra necesaria para lograr resultados medibles y fiables. Estos cuatro conjuntos corresponden a (i) ALK (detectada con una o más sondas marcadas con un primer marcador), (ii) RET (detectado con una o más sondas marcadas con un segundo marcador), (iii) ROS1 (detectado con una o más sondas marcadas con un tercer marcador) y (iv) un control interno (detectado con una sonda marcada con un cuarto marcador). Los marcadores se pueden seleccionar de los divulgados en el presente documento y en algunos modos de realización son distinguibles entre sí. En el presente ejemplo, se detectan fusiones de ALK con una sonda marcada con FAM, se detectan fusiones de RET con una sonda marcada con HEX, se detectan fusiones de ROS1 con una sonda marcada con

JA270 y se detecta el control interno con una sonda marcada con Cy5.5.

La cobertura del ensayo altamente multiplexado se muestra en la tabla 1 con el número de variante de fusión indicado entre paréntesis.

5

Tabla 1

Marcador	Gen	Fusión	Cobertura	Oligonucleótidos
FAM	ALK	Exón 13 de EML4-exón 20 de ALK (V1) Exón 20 de EML4-exón 20 de ALK (V2) Exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK (V3) Exón 2 de EML4-exón 20 de ALK (V5) Exón 18 de EML4-exón 20 de ALK (V8) Exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK (V6) Exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK (V7)	7 fusiones 94 % de fusiones de ALK	15 cebadores 2 sondas
HEX	RET	Exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET (V1) Exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET (V2) Exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET (V3) Exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET (V4) Exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET (V8) Exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET (V9)	6 fusiones 97 % de fusiones de RET	
JA270	ROS1	Exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1 (V2) Exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1 (V1) Exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1 (V10) Exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1 (V13) Exón 4 de SDC4-exón 34 de ROS1 (V5) Exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1 (V3) Exón 2 de SDC4-exón 34 de ROS1 (V14) Exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1 (V4) Exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1 (V7) Exón 13 de SLC34A2-exón 32 de ROS1 (V6) Exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1 (V8) Exón 4 de SLC34A2-exón 34 de ROS1 (V9) Exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1 (V11)	12 fusiones 95 % de fusiones de ROS1	11 cebadores 3 sondas
CY5.5	CI	CI	N/A	2 cebadores 1 sonda

10

El multiplex puede incluir diversas combinaciones de detección de fusiones génicas y, en algunos modos de realización, se someten a ensayo y detectan menos fusiones. En la tabla 2 se muestra un ejemplo de un formato de ensayo para la detección de fusiones de ALK y RET. Las fusiones en ROS1 se pueden detectar por separado, o en un ensayo paralelo, por ejemplo, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 2

Marcador	Gen	Fusión	Cobertura	Oligonucleótidos
FAM	ALK	Exón 13 de EML4-exón 20 de ALK (V1) Exón 20 de EML4-exón 20 de ALK (V2) Exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK (V3) Exón 2 de EML4-exón 20 de ALK (V5) Exón 18 de EML4-exón 20 de ALK (V8) Exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK (V6) Exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK (V7)	7 fusiones 94 % de fusiones de ALK	15 cebadores 2 sondas
HEX	RET	Exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET (V1) Exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET (V2) Exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET (V3) Exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET (V4) Exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET (V8) Exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET (V9)	6 fusiones 97 % de fusiones de RET	
CY5.5	CI	CI	N/A	2 cebadores 1 sonda

Tabla 3

5

Marcador	Gen	Fusión	Cobertura	Oligonucleótidos
FAM	ROS1	Exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1 (V1) Exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1 (V3) Exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1 (V4) Exón 13 de SLC34A2-exón 32 de ROS1 (V6) Exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1 (V8)	12 fusiones 95 % de fusiones de ROS1	11 cebadores 3 sondas
HEX	RET	Exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1 (V2) Exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1 (V10) Exón 4 de SDC4-exón 34 de ROS1 (V5) Exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1 (V7) Exón 4 de SLC34A2-exón 34 de ROS1 (V9) Exón 2 de SDC4-exón 34 de ROS1 (V14)		
JA270	ROS1	Exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1 (V13) Exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1 (V11)		
CY5.5	CI	CI	N/A	2 cebadores 1 sonda

Los oligonucleótidos mostrados en las tablas 4-6 se pueden seleccionar para su uso en los ensayos. El primer conjunto de cebadores directos e inversos se amplifica en todas las fusiones EML4-ALK y KIF5B-ALK. Los cebadores se designan con el nombre del gen (por ejemplo, EML para EML4), exón (por ejemplo, 13 para el exón 13) y designación (por ejemplo, F1 para directo 1). Los símbolos <t_bb_dA>, <t_bb_dC>, <t_bb_dT>, <t_bb_dG> se refieren a A, C, T y G modificadas con p-tert-butilbencilo, respectivamente. 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. En el presente ejemplo, se minimizó el número de oligonucleótidos en la reacción, como se indica en las tablas 1-3. Los cebadores inversos en todas las reacciones sirvieron como cebadores para las reacciones con retrotranscriptasa.

10

15

Tabla 4: oligonucleótidos para su uso en la amplificación y detección de fusiones de ALK

Tinte de sonda (por ejemplo)	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
FAM	EML13F1	1	ACACCTGGAAAGGACCTAAA
	EML13F2	2	CACACCTGGAAAGGACCTAAA
	EML13F3	3	CCACACCTGGAAAGGACCTA
	EML13F4	4	CCACACCTGGAAAGGACCT
	EML13F5	5	CCACACCTGGAAAGGACCC
	EML13F6	6	CCACACCTGGAAAGGAC
	EML13F7	7	CCCACACCTGGAAAGGAC
	EML13F8	8	GCCCACACCTGGAAAGGA
	EML13F9	9	AGCCCACACCTGGAAAG
	EML13F10	10	GAGCCCACACCTGGAAA
	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	AAGCATAAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F2	22	AGCATAAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F3	23	GCATAAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F4	24	CATAAAAGATGTCATCATCAACCAAG
	EML6F5	25	GCATAAAAGATGTCATCATCAACCAAG
	EML6F6	26	GCATAAAAGATGTCATCATCAACCA
	EML6F7	27	GCATAAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F8	28	AGCATAAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F9	29	AAGCATAAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F10	30	AAGCATAAAAGATGTCATCATCAAC
	EML2F1	31	CTCAGTAAAAAATCAGTCTCAAG
	EML2F2	32	CTCAGTAAAAAATCAGTCTCAAGT
	EML2F3	33	TCAGTAAAAAATCAGTCTCAAGTA
	EML2F4	34	TCAGTAAAAAATCAGTCTCAAGTAA
	EML2F5	35	CAGTAAAAAATCAGTCTCAAGTAAAG
	EML18F1	36	CAGCTCTGTGATGCGCTA
	EML18F2	37	CTCTCTGTGATGCGCTACT
	EML18F3	38	TCTCTGTGATGCGCTACTCAA
	EML18F4	39	GCTCTCTGTGATGCGCTAC
	EML18F5	40	CTGTGATGCGCTACTCAATAG
	KIF24F1	41	AGAAGAGGGCATTCTGCACA

KIF24F2	42	GAGGGCATTCTGCACAGA
KIF24F3	43	GAGGGCATTCTGCACAGAT
KIF24F4	44	GAAGAGGGCATTCTGCACAG
KIF24F5	45	GGGCATTCTGCACAGATTG
KIF17F1	46	GAACTAGTCCAGCTCGAGCA
KIF17F2	47	TGAAGAACTAGTCCAGCTTCGA
KIF17F3	48	CTAGTCCAGCTTCGAGCACAA
KIF17F4	49	AAGAAACTAGTCCAGCTTCGAG
KIF17F5	50	GTCCAGCTTCGAGCACAAAG
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
ALK20R11	181	TGCAGCTCCATCTGCATGGCT TGCAGCTCCATCTGCATGG< t_bb_dC>T
Sonda		
ALK20RP9_Q6	182	<TINTE-Thr>CCGCCG<BHQ_2>GAAGCACCAGGAGC
ALK20P4	183	<TINTE-Thr>TACCGCC<BHQ_2> GGAAGCACCAAGGAGCTGCA
ALK20P5	184	<TINTE-Thr>TACCGCC<BHQ_2> GGAAGCACCAAGGAGCTGC
ALK20P6	185	<TINTE-Thr>TACCGCC<BHQ_2> GGAAGCACCAAGGAGCTG
ALK20P7	186	<TINTE-Thr>TACCGCC<BHQ_2> GGAAGCACCAAGGAGCT

Tabla 5: oligonucleótidos para su uso en la amplificación y detección de fusiones de RET

Tinte de sonda (por ejemplo)	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
HEX	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

ES 2 883 934 T3

KIF15F11	93	ATTGCTGTGGAAATAATGATGTA
KIF15F12	94	AATTGCTGTGGAAATAATGATGTA
KIF15F13	95	ATTGCTGTGGAAATAATGATGTA
KIF15F14	96	GAATTGCTGTGGAAATAATGATGTA
KIF15F15	97	GAATTGCTGTGGAAATAATGATGT
KIF16F1	98	CATGTCAGCTTCACTCTCAA
KIF16F2	99	ATGTCAGCTTCACTCTCAA
KIF16F3	100	CATGTCAGCTTCACTCTCAA
KIF16F4	101	GCATGTCAGCTTCACTCTC
KIF16F5	102	CATGTCAGCTTCACTCTC
KIF16F6	103	GCATGTCAGCTTCACTCT
KIF16F7	104	GCATGTCAGCTTCACTC
KIF16F8	105	CAGCATGTCAGCTTCACTC
KIF16F9	106	TAGCAGCATGTCAGCTTCA
KIF16F10	107	AGCAGCATGTCAGCTTC
KIF22F1	108	AGGACCTGGCTACAAGAGTTAA
KIF22F2	109	GGACCTGGCTACAAGAGTTAA
KIF22F3	110	GGACCTGGCTACAAGAGTTAAA
KIF22F4	111	AGGACCTGGCTACAAGAGTTAAA
KIF22F5	112	AGGACCTGGCTACAAGAGTTA
KIF22F6	113	GGACCTGGCTACAAGAGTTA
KIF22F7	114	GACCTGGCTACAAGAGTTAAAAG
KIF22F8	115	ACCTGGCTACAAGAGTTAAAAG
KIF22F9	116	AGGACCTGGCTACAAGAGTT
KIF22F10	117	GGACCTGGCTACAAGAGTT
KIF23F1	118	TTAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
KIF23F2	119	TGAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
KIF23F3	120	GAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
KIF23F4	121	AACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
KIF23F5	122	ACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
KIF23F6	123	GAACAGCTCACTAAAGTGCACAA
KIF23F7	124	AACAGCTCACTAAAGTGCACAA
KIF23F8	125	ACAGCTCACTAAAGTGCACAA
KIF23F9	126	GAACAGCTCACTAAAGTGCACA
KIF23F10	127	AACAGCTCACTAAAGTGCACA
KIF23F13	187	TTAACAGCTCACTAAAGTGCAC
CCDC1F1	128	TGCGCAAAGCCAGCGT
CCDC1F2	129	CGACCTGCGCAAAGCCA
CCDC1F3	130	GACCTGCGCAAAGCCAG
CCDC1F4	131	CCTGCGCAAAGCCAGC
CCDC1F5	132	ACCTGCGCAAAGCCAGC
CCDC1F6	133	CTGCGCAAAGCCAGCGT
CCDC1F7	134	GACCTGCGCAAAGCCAGC
CCDC1F8	135	CGACCTGCGCAAAGCC

	CCDC1F14	188	CAAAGCCAGCGTGACCA
	NC06F1	136	TGTATCTCCATGCCAGAGCAG
	NC06F2	137	GTATCTCCATGCCAGAGCAG
	NC06F3	138	CTGTATCTCCATGCCAGAGCA
	NC06F4	139	GCTGTATCTCCATGCCAGAG
	NC06F5	140	GGCTGTATCTCCATGCCAGA GGCTGTATCTCCATGCCAG< t_bb_dA >
	NC06F6	141	GGCTGTATCTCCATGCCAG
	NC06F7	142	AGGCTGTATCTCCATGCCA
	NC06F8	143	GAGGCTGTATCTCCATGCCA
	NC06F9	144	AGAGGCTGTATCTCCATGC
	NCO6F10	145	GAGAGGCTGTATCTCCATGC
Cebador inverso			
	RET12R1	161	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R2	162	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R3	163	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTT
	RET12R4	164	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTT
	RET12R5	165	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGT
	RET12R6	166	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAG
	RET12R7	167	TAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R8	168	GAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R9	169	AGTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R10	170	GTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R11	171	TAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R12	172	TAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTTC
	RET12R13	173	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTTC
	RET12R14	174	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGTT
	RET12R15	175	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGT
	RET12R16	176	CTCCTAGAGTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R17	177	CTCCTAGAGTTTTCCAAGAACCA
	RET12R18	178	TCCTAGAGTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R19	179	CCTAGAGTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R20	180	GAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
Sonda			
	RET12P3_HEX	189	< TINTE_Thr > ATCCAAA< BHQ_2 > GTGGGAATT CCCTCGGAAGAAC
	RET12P4_HEX	190	< TINTE_Thr > CCAAAGT< BHQ_2 > GGGAAATT CCCTCGGAAGAAC
	RET12P8_HEX	191	< TINTE_Thr > TCCAAG< BHQ_2 > TGGGAATT CCCTCGGAAGAA
	RET12P14_HEX	192	< TINTE_Thr > CCAAAGT< BHQ_2 > GGGAAATT CCCTCGGAAGAAC
	RET12P18_HEX	193	< TINTE_Thr > TCCAAG< BHQ_2 > TGGGAATT CCCTCGGAAGAAC
	RET12P13_HEX	194	< TINTE_Thr > ATCCAAA< BHQ_2 > GTGGGAATT CCCTCGGAAGAAC

Tabla 6: oligonucleótidos para su uso en la amplificación y detección de fusiones de ROS1

Tinte sonda (por ejemplo)	Cebador directo	SEQ ID NO	Secuencia
JA270	CD74ex6F2	195	CACTGACGCTCCACCGAA
	CD74ex6F1	196	AAGCCCACGTGACGCTCCA
	CD74ex6F3	197	ACTGACGCTCCACCGAAA
	SDC4ex2F1	198	GAGCTGTCTGGCTCTGG< t_BB_dA >
	SDC4ex2F2	199	TGTCTGGCTCTGGAGATCT TGTCTGGCTCTGGAGAT< t_bb_dC > T
	SDC4ex4F1	200	TTGAGAGAACGGAGGTCTT
	SDC4exF2	201	TGAGAGAACGGAGGTCTT
	SDC4ex4F3	202	TTGAGAGAACGGAGGTCTT
	SLC34A2ex13F1	203	ATAACCATTAGCAGAGAGGCT
	SLC34A2ex13F2	204	AACCATTAGCAGAGAGGCTCA
	SLC34A2ex13F3	205	ATAACCATTAGCAGAGAGGCT
	SLC34A2ex4F1	206	AGTAGCGCCTTCAGCT
	SLC34A2ex4F2	207	GCCTTCCAGCTGGTTGGA
	EZRex10F2	208	GAAGACAAAGAAGGCAGAGAGA
	LRIG3ex16F1	209	TTCTTACCAACATGACAGTAGT
	LRIG3ex16F2	210	TCTTACCAACATGACAGTAGT
	TPM3ex8F1	211	GAAAAGACAATTGATGACCTGGA GAAAAGACAATTGATGACCTGG< t_BB_dA >
	TPM3ex8F5	212	AAGCTGGAAAAGACAATTGATGAC
	Cebador inverso		
	ROS1ex32R1	213	GTATTGAATTTTACTCCCTCTAGTAATTG
	ROS1ex32R2	214	GTATTGAATTTTACTCCCTCTAGTAATT
	ROS1ex32R3	215	GTATTGAATTTTACTCCCTCTAGTAATT
	ROS1ex35R1	216	TATAAGCACTGTCACCCCT
	ROS1ex35R2	217	ATAAGCACTGTCACCCCT
	ROS1ex35R3	218	TATAAGCACTGTCACCCCT
	ROS1ex35R4	219	CTTGCTTCGTTATAAGCACTGTCA
	ROS1ex35R5	220	AACTCTTGTCTCGTTATAAGCACTGT
	ROS1ex35R6	221	AGCCAACCTTTGTCTTCGTTATAAGCA
	ROS1ex34LRev1	222	CAGTGGGATTGTAACAACCAGAAAT
	ROS1ex34LRev2	223	GTCAGTGGGATTGTAACAACCAGA
	ROS1ex34LRev3	224	GTCAGTGGGATTGTAACAACCA
	ROS1ex34LRev4	225	CAGTGGGATTGTAACAACCAGAAA
	ROS1ex34LRev5	226	CAGTGGGATTGTAACAACCAGAA
	Sonda		
	ROS1EX32P2	227	< TINTE_Thr > TGGAGTCCCCAA< BHQ_2 > TAAACCAGGCATCCCA
	ROS1EX34P1	228	< TINTE_Thr > TGATTTGGAT< BHQ_2 > ACCAGAAACAAGTTCATAC
	ROS1EX32P3	229	< TINTE_Thr > TGGAGTC< BHQ_2 > CCAAATAAACCAGGC< t_BB_dA > TTCCCA
	ROS1EX34P3	230	< TINTE_Thr > TGATTT< BHQ_2 > TGGATACCAGAAACAAGTTCATAC

	ROS1EX35P1	51	<TINTE_Thr>TCTGGCATAGAA<BHQ_2> GATTAAAGAATCAAAAAAGTGCCAAG
--	------------	----	--

Se ha sometido a prueba este procedimiento usando ARN de líneas celulares NCI-H2228 positivas para EML4-ALK y línea celular con variante de fusión 1 EML4-ALK de Horizon Discovery, línea celular LC2AD con CCDC6-RET, así como de muestras de plasma y de tejido incluido en parafina fijado con formol (FFPET) de CPNM.

- 5 En el caso del plasma, se extrajo ARNlc usando el kit de extracción de ARN de FFPET High Pure de Roche con tampón de lisis MagNA Pure y enzima esperasa. Debido a que el rendimiento de ARNlc es demasiado bajo para medirse con exactitud, se introduce un volumen fijo (1/24 del total) del ARNlc de plasma extraído en la qRT-PCR.
- 10 Las condiciones de reacción fueron como sigue. Para cada reacción, se añadieron 25 ul de ARN de entrada a una mezcla de reacción de RT-PCR que comprendía cebadores directos e inversos, sonda marcada, tampón, dUTP, dTTP, dATP, dGTP, UNG y enzima Z05 hasta un volumen final de 50 ul. Las reacciones se efectuaron en multiplex, cada una con cebadores y sondas específicos para cada variante de fusión indicada en la tabla 1.
- 15 Los resultados se confirmaron usando un ensayo de secuenciación de nueva generación que detecta las variantes de fusión cubiertas en el ensayo de qRT-PCR.
- 20 Se estableció el máximo Ct (ciclo umbral) en 38, lo que significa que una señal debe ser detectable frente al fondo dentro de un Ct de 38. Los datos se muestran en las figuras 1A, 1B, 1C y 1D. Se sabía que el ARN de entrada para cada reacción tenía la variante de fusión indicada. Cada reacción se repitió tres veces.
- 25 La figura 1A muestra que cada variante de fusión de ALK es detectable a 50 copias. La figura 1B muestra que cada variante de fusión de RET es detectable a 50 copias. La figura 1C muestra que cada variante de fusión de ROS1 es detectable a 50 copias. La figura 1D muestra que la eficacia y entrada para la reacción fueron equivalentes, como se indican por los Ct del control interno.

B. Ejemplo 2: Sensibilidad de las fusiones de ALK y RET en transcritos valorados

- 30 Se sometió a prueba la qRT-PCR multiplex para el límite de detección de las variantes de fusión de ALK y RET mostradas en el ejemplo 1, tabla 1. Se sometió a prueba el ensayo multiplex valorando transcritos positivos para fusión de ALK o RET en 0,1 ng de ARN humano universal (UHR) a 250, 100, 50 o 25 copias. Las reacciones de amplificación y detección se repitieron 3 veces.
- 35 Como se muestra en la figura 2, todas las variantes de fusión de ALK y RET sometidas a prueba fueron detectables hasta 25 copias.

C. Ejemplo 3: Estudios de linealidad y otros estudios del límite de detección (LD)

- 40 Se llevaron a cabo otros estudios para determinar la linealidad de detección para las fusiones de ALK, RET y ROS1, como se muestra y describe en las figuras 3-5.
- 45 Los estudios de sensibilidad o límite de detección (LD) se muestran y describen en las figuras 6-8. El LD para cada ensayo se muestra en las tablas 7 y 8. Las 7 variantes de fusión de ALK, 6 de RET y 13 de ROS1 son detectables hasta menos de 10 copias. Las variantes de fusión predominantes están marcadas con un *.

Tabla 7

Fusión	Tasa de éxito	LD para un 95 % de probabilidad
E13:A20*	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
E20:A20*	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
E6:A20*	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
E2:A20	11/12 a 6,25 copias	6,45 copias
K17:A20	12/12 a 6,25 copias (11/12 a 12,5 copias)	4,78 copias
K24:A20	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
E18:A20	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
K15:R12*	11/12 a 6,25 copias	6,45 copias
K16:R12*	11/12 a 6,25 copias	6,45 copias
K22:R12	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
K23:R12	11/12 a 6,25 copias	6,45 copias

C1:R12*	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
N6:R12	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias

Tabla 8

Variante de fusión	Tasa de éxito	LD para un 95 % de probabilidad
C6:R32	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
C6:R34*	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
SD2:R32	11/12 a 6,25 y 12,5 copias	11,07 copias
SD4:R34	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
SL13:R32	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
SL13:R34	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
SL4:R32	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
SL4:R34	11/12 a 6,25 copias	6,45 copias
E10:R34*	11/12 a 6,25 copias	6,45 copias
L16:R35	11/12 a 12,5 copias; 12/12 a 6,25 copias	4,78 copias
T8:R35	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias
SD2:R34	12/12, todos los niveles sometidos a prueba	<6,25 copias

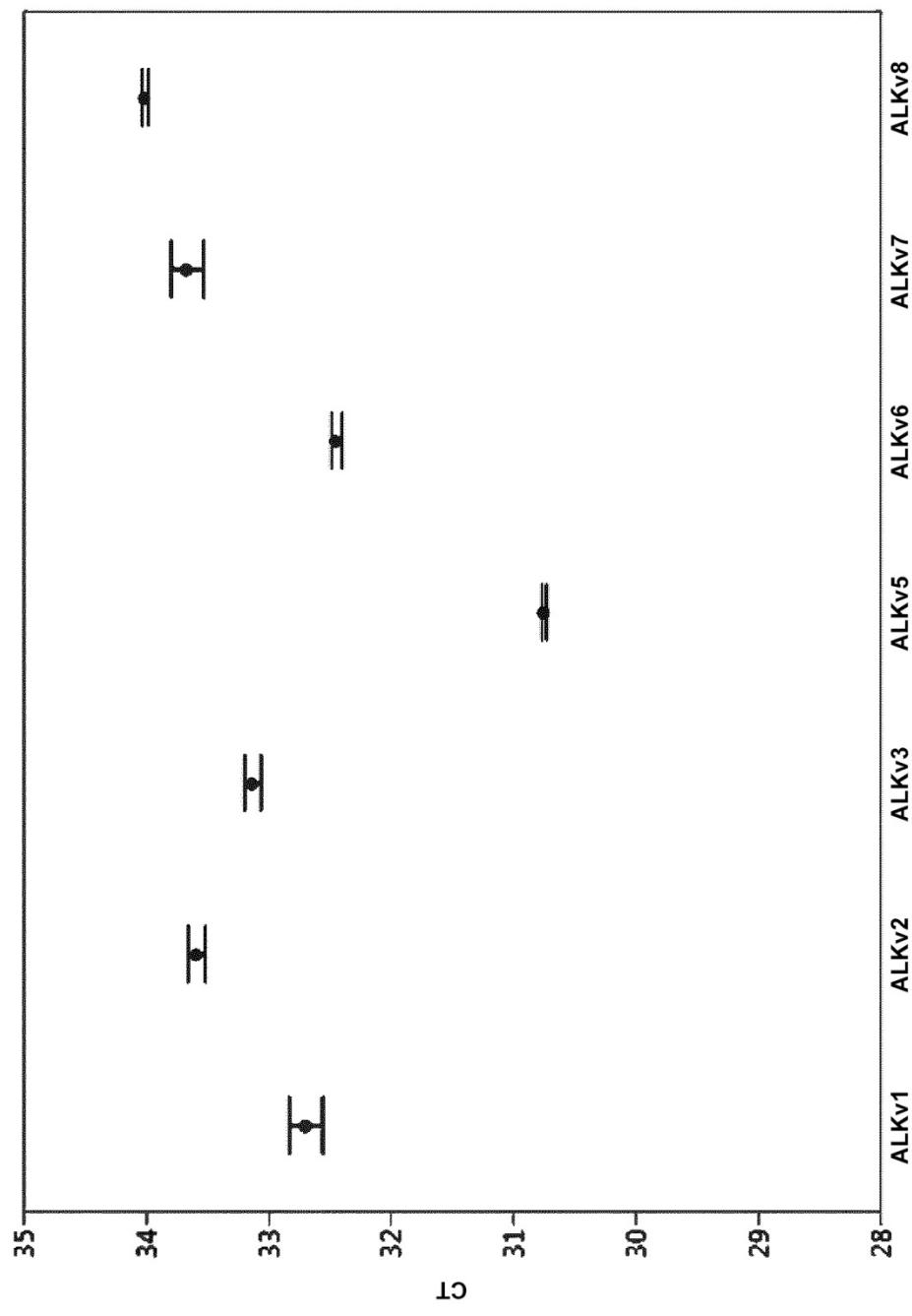
REIVINDICACIONES

1. Una composición de ensayo multiplex que comprende:
- 5 A. al menos un conjunto de cebadores y sonda que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ALK;
- B. al menos un conjunto de cebadores y sonda que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de RET; y
- 10 C. un conjunto de cebadores y sonda que específicamente amplifican y detectan un control interno.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además
- 15 D. al menos un conjunto de cebadores y sonda que específicamente amplifican y detectan al menos un gen de fusión de ROS1;
3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que el al menos un gen de fusión de ALK se selecciona del grupo que consiste en: exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 2 de EML4-exón 20 de ALK, exón 18 de EML4-exón 20 de ALK, exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK y exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK.
- 20 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que A incluye al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan más de 2 genes de fusión de ALK.
- 25 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que A incluye al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan exón 13 de EML4-exón 20 de ALK, exón 20 de EML4-exón 20 de ALK, exón 6a/b de EML4-exón 20 de ALK, exón 2 de EML4-exón 20 de ALK, exón 18 de EML4-exón 20 de ALK, exón 17 de KIF5B-exón 20 de ALK y exón 24 de KIF5B-exón 20 de ALK.
- 30 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el al menos un gen de fusión de RET se selecciona del grupo que consiste en: exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET y exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET.
- 35 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que B incluye al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan más de 2 genes de fusión de RET.
- 40 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que B incluye al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan exón 15 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 16 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 22 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 23 de KIF5B-exón 12 de RET, exón 1 de CCDC6-exón 12 de RET y exón 6 de NCOA4-exón 12 de RET.
- 45 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en la que el al menos un gen de fusión de ROS1 se selecciona del grupo que consiste en: exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1, exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1, exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1, exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 32v2 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 35 de ROS1 y exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1.
- 50 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en la que D incluye al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan más de 2 genes de fusión de ROS1.
- 55 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en la que D incluye al menos un conjunto de cebadores y sonda que amplifican y detectan exón 6 de CD74-exón 34 de ROS1, exón 6 de CD74-exón 32 de ROS1, exón 10 de EZR-exón 34 de ROS1, exón 8 de TPM3-exón 35 de ROS1, exón 4 de SDC4-exón 34 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 32v2 de ROS1, exón 2 de SDC4-exón 32 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 34 de ROS1, exón 13 de SLC34A2-exón 32v2 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 32 de ROS1, exón 4 de SLC34A2-exón 35 de ROS1 y exón 16 de LRIG3-exón 35 de ROS1.
- 60 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además una ADN polimerasa termoestable.
- 65 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además retrotranscriptasa.

14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además una muestra biológica de un individuo.
- 5 15. La composición de la reivindicación 14, en la que la muestra biológica incluye ARN de plasma.
16. Un procedimiento de identificación de un individuo con cáncer que comprende:
- 10 (a) poner en contacto una muestra biológica del individuo con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13;
- (b) llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica;
- 15 (c) determinar que al menos un gen de fusión está presente si se detecta un gen de fusión en la etapa (b);
- (d) con lo que la presencia de al menos un gen de fusión en la muestra de dicho individuo indica la sensibilidad de dicho individuo a un tratamiento con inhibidor de cinasa si al menos un gen de fusión está presente.
- 20 17. Un procedimiento de determinación de la probabilidad de respuesta de un individuo con cáncer al tratamiento con inhibidor de cinasa que comprende:
- 25 (a) poner en contacto una muestra biológica del individuo con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13;
- (b) llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica;
- 30 (c) determinar que al menos un gen de fusión está presente si se detecta un gen de fusión en la etapa (b); y
- (d) determinar que el individuo probablemente responderá al tratamiento con inhibidor de cinasa.
- 35 18. Un procedimiento para determinar la presencia de al menos un gen de fusión en una muestra biológica de un individuo con cáncer que comprende:
- 40 (a) poner en contacto una muestra biológica del individuo con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13;
- (b) llevar a cabo una amplificación y detección en condiciones que permitan la formación y detección de un producto de amplificación en presencia de al menos un gen de fusión en la muestra biológica;
- (c) determinar la presencia de al menos un gen de fusión si se detecta un gen de fusión en la etapa (b).
- 45 19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que la muestra biológica incluye ADN o ARN.
20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que la muestra biológica es ARN de plasma del individuo.
- 50 21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que la amplificación y detección se llevan a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción cuantitativa (qRT-PCR).

ES 2 883 934 T3

FIGURA 1A: ALK



ES 2 883 934 T3

FIGURA 1B: RET

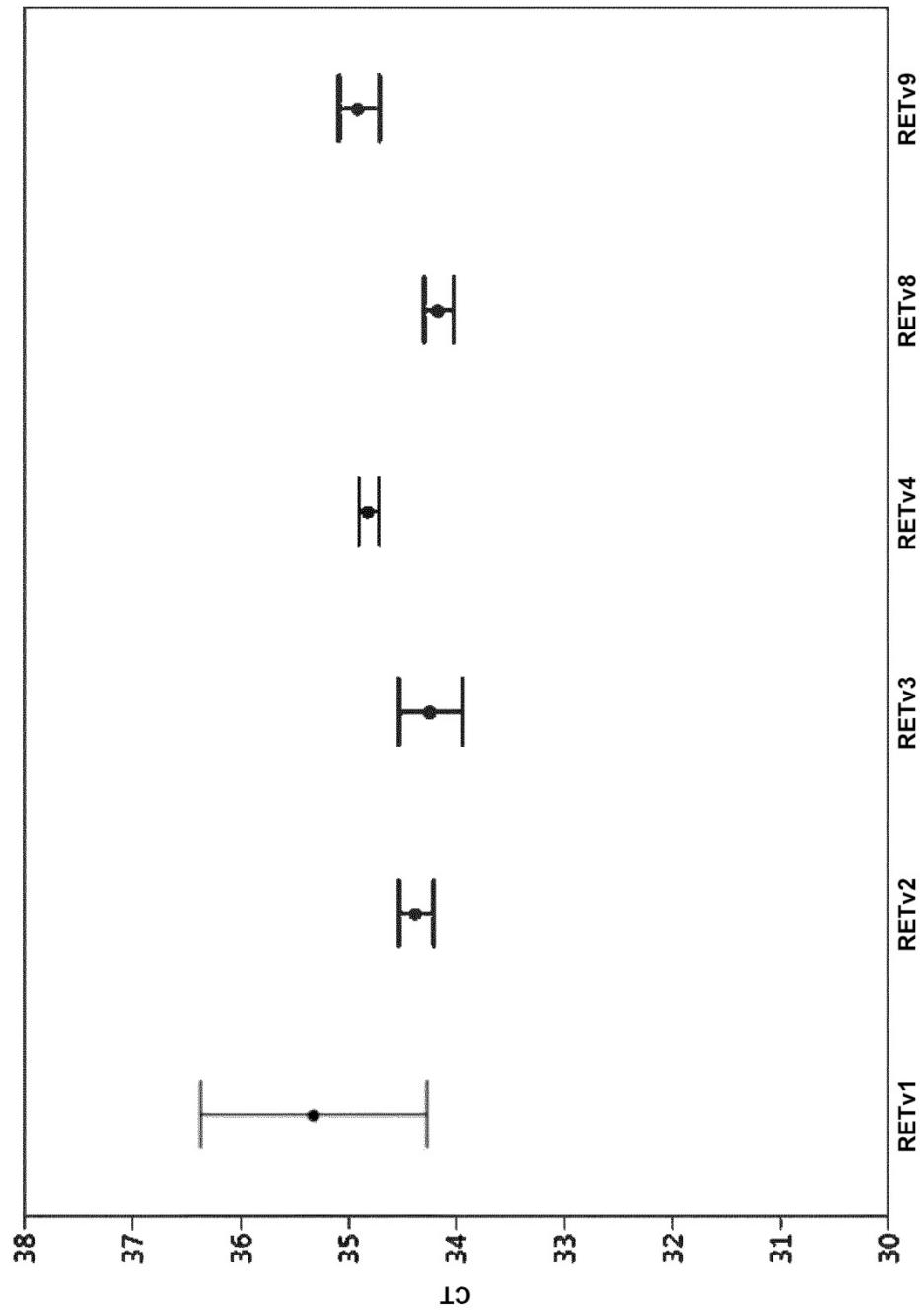


FIGURA 1C: ROS1

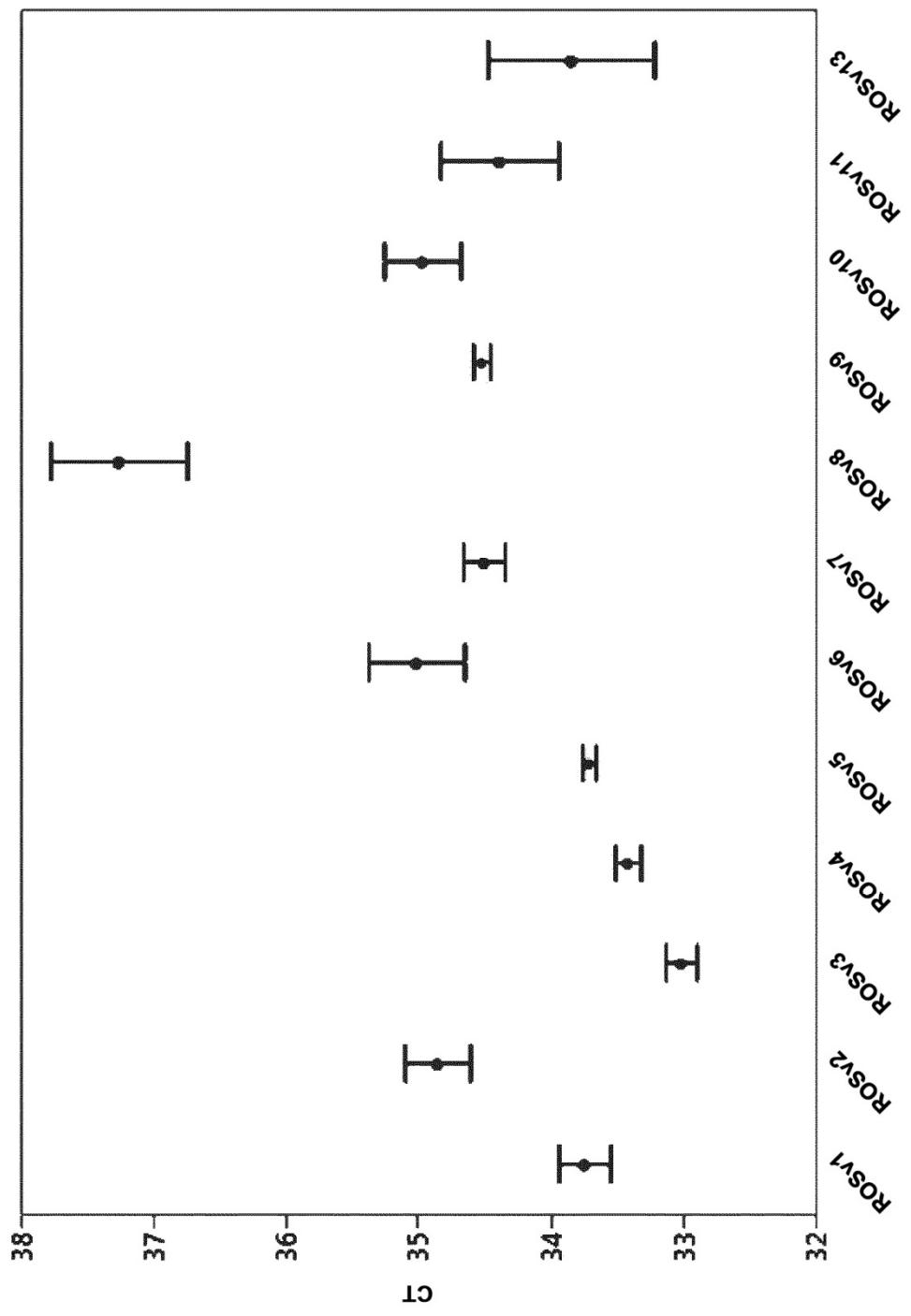


FIGURA 1D: Control interno

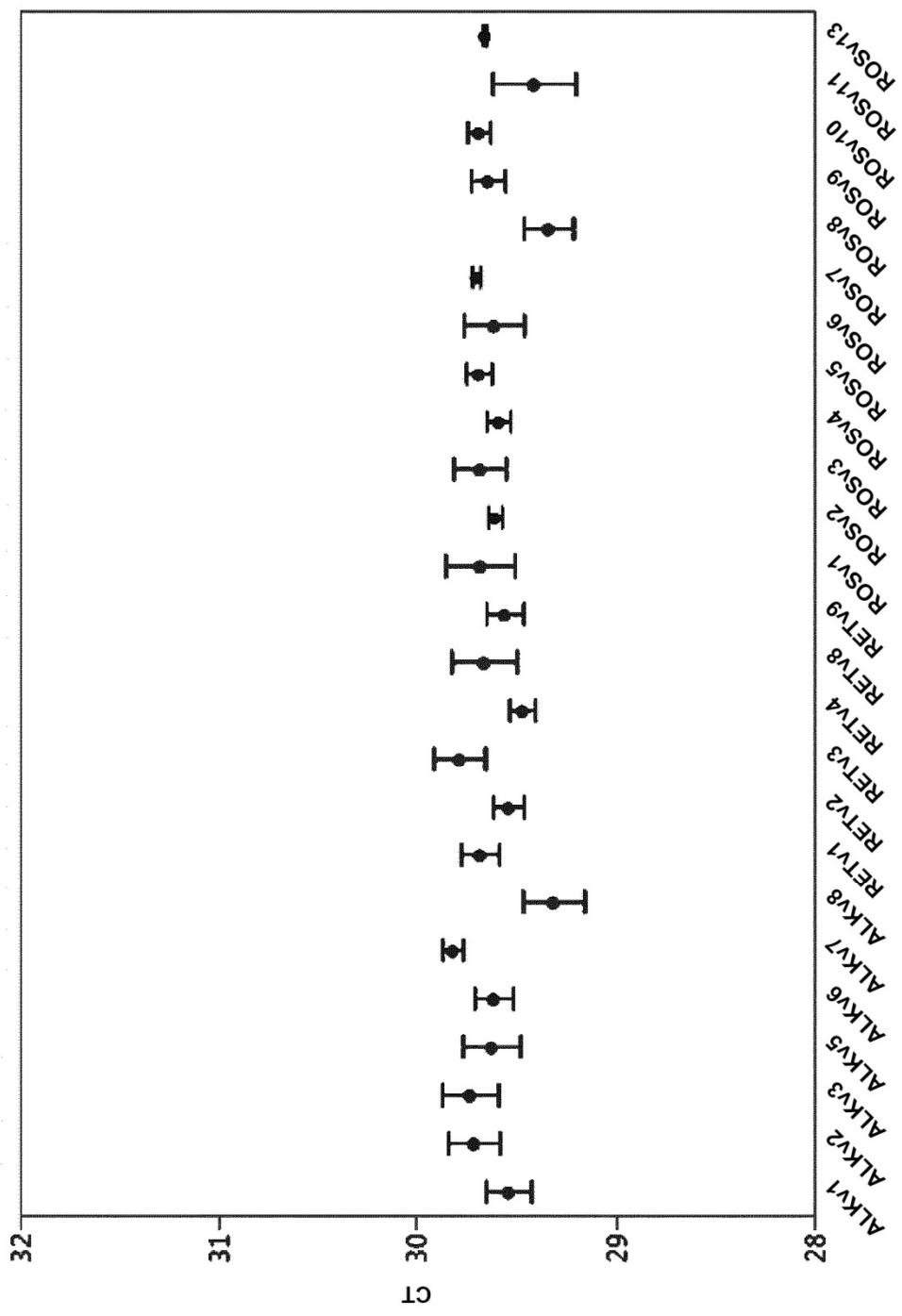


FIGURA 2

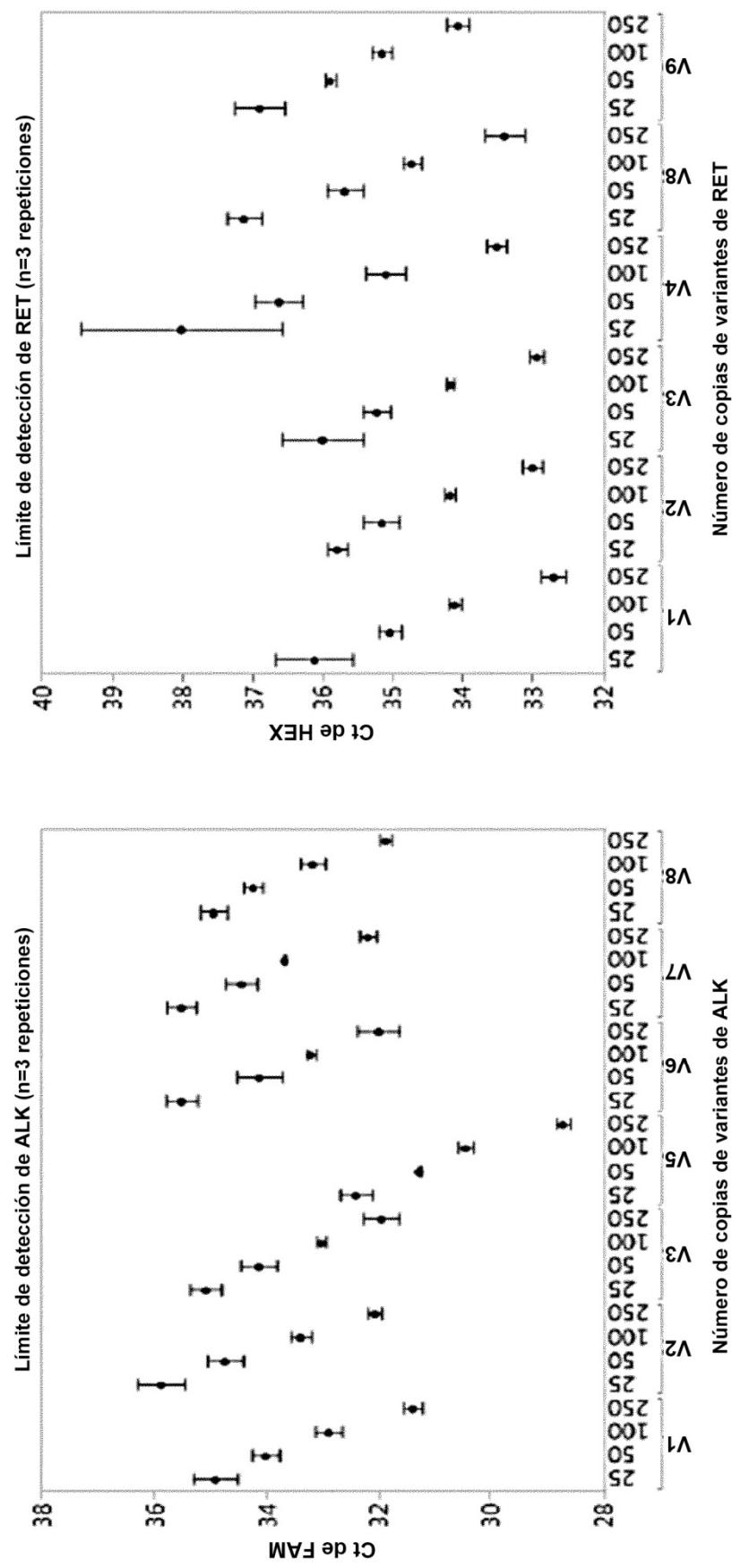


Figura 3

- Cada transcripto de ARN de fusión sometido a prueba en un fondo de 0,5 ng de UHR
 - 5 niveles agregados en UHR: 10000, 5000, 1000, 500, 100 y 50
 - 3 réplicas por nivel; número de copias de entrada estimado por ddPCR
- Variantes de ALK representativas mostradas

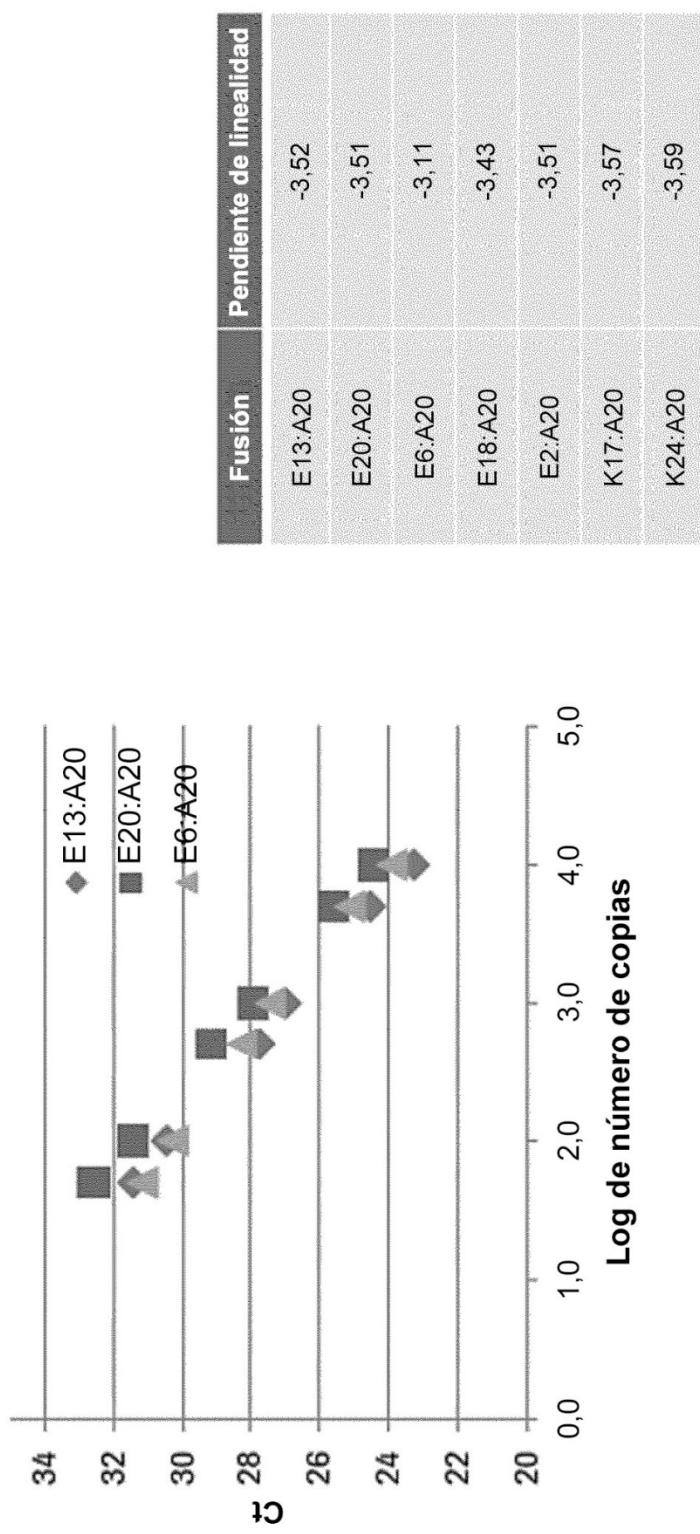


Figura 4

- Cada transcripto de ARN de fusión sometido a prueba en un fondo de 0,5 ng de UHR
 - 5 niveles agregados en UHR: 10000, 5000, 1000, 500, 100 y 50
 - 3 réplicas por nivel; número de copias de entrada estimado por ddPCR
- Variantes de RET representativas mostradas

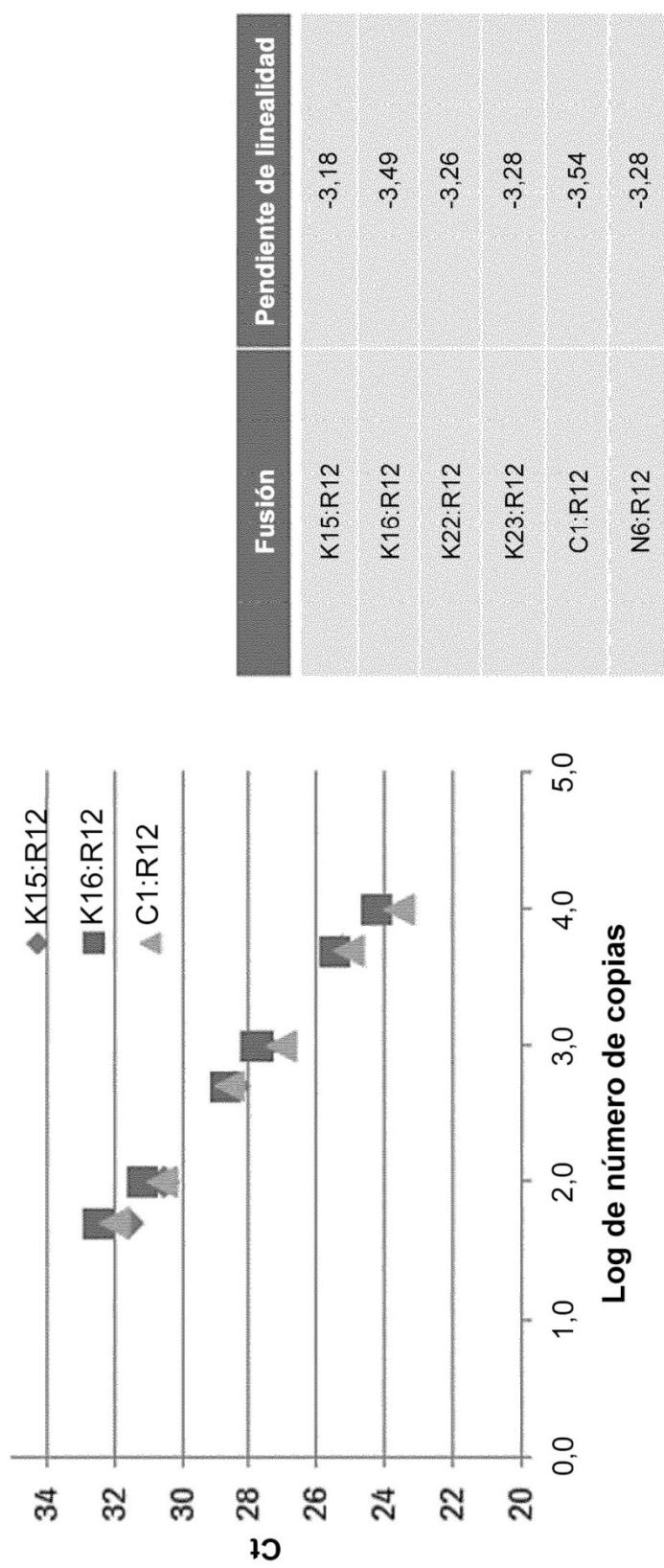


Figura 5

- Cada transcripto de ARN de fusión sometido a prueba en un fondo de 0,5 ng de UHR
 - 5 niveles agregados en UHR: 10000, 5000, 1000, 500, 100 y 50
 - 3 réplicas por nivel; número de copias de entrada estimado por ddPCR
- Variantes de ROS1 representativas mostradas

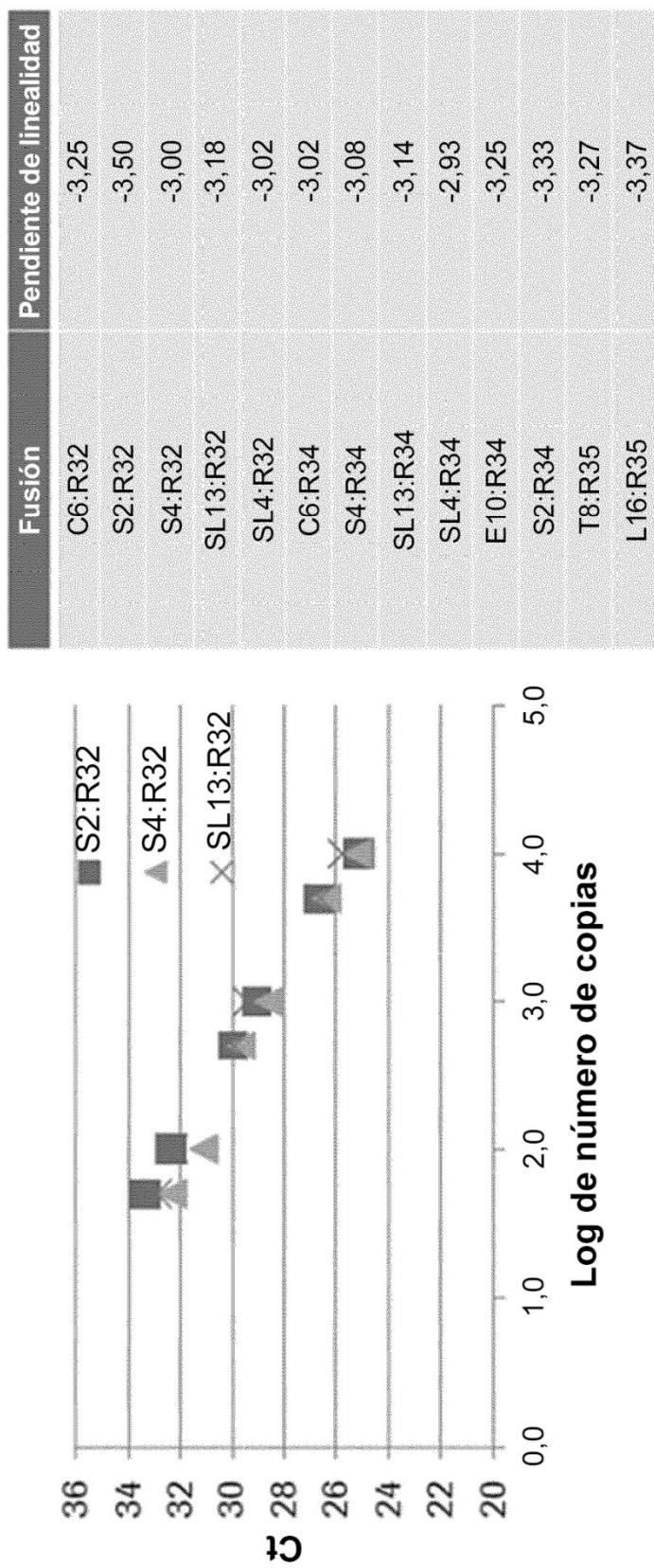


Figura 6

- Cada transcripto de ARN de fusión sometido a prueba en un fondo de 0,5 ng de UHR
 - Fondo de UHR incrementado para someter a prueba la solidez del ensayo;
 - previamente sometido a prueba a 0,1 ng
 - 5 niveles agregados en UHR: 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 copias por reacción de PCR
 - 12 réplicas por nivel; número de copias de entrada estimado por ddPCR
- Variante de ALK representativa mostrada

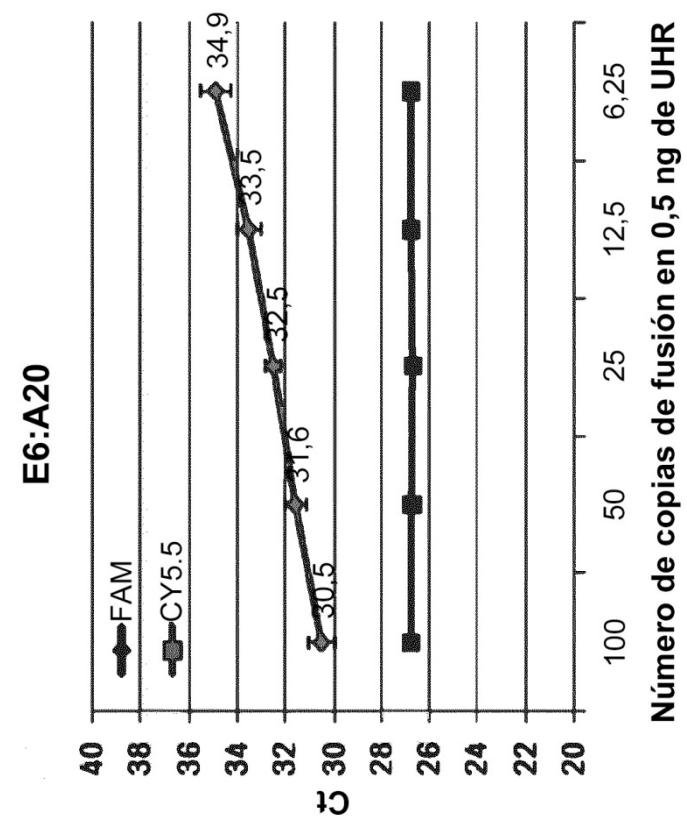


Figura 7

- Cada transcripto de ARN de fusión sometido a prueba en un fondo de 0,5 ng de UHR
 - Fondo de UHR incrementado para someter a prueba la solidez del ensayo;
 - 5 niveles agregados en UHR: 100, 50, 25, 12, 5 y 6,25 copias por reacción de PCR
 - 12 réplicas por nivel; número de copias de entrada estimado por ddPCR
- Variante de RET representativa mostrada

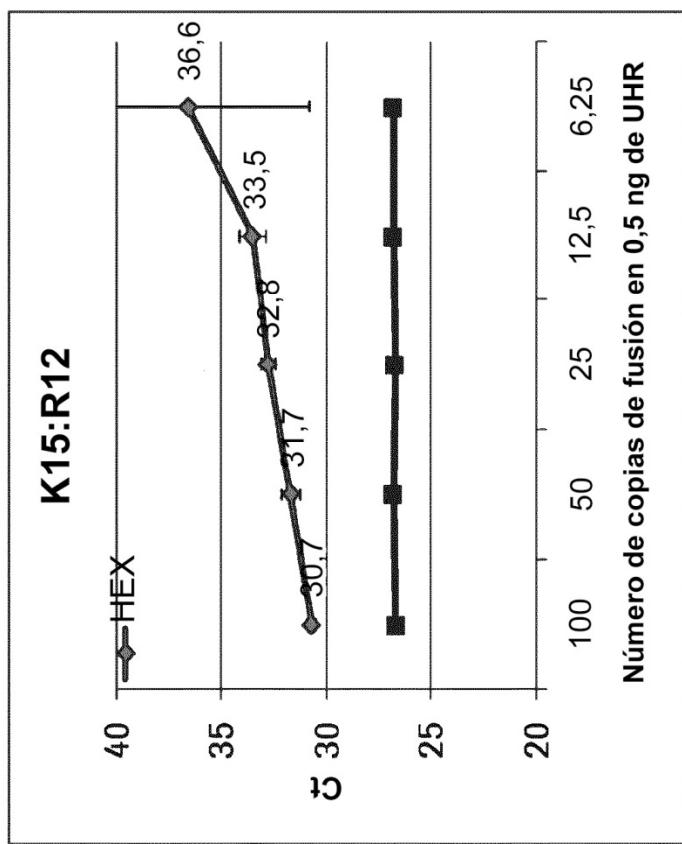


Figura 8

- Cada transcripto de ARN de fusión sometido a prueba en un fondo de 0,5 ng de UHR
 - Fondo de UHR incrementado para someter a prueba la solidez del ensayo;
 - previamente sometido a prueba a 0,1 ng
 - 5 niveles agregados en UHR: 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 copias por reacción de PCR
 - 12 réplicas por nivel; número de copias de entrada estimado por ddPCR
- Variante de ROS1 representativa mostrada

