

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 097**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08015997 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2036990**

54 Título: **Ensayo diagnóstico de sensibilidad a los inhibidores de la quinasa B-Raf**

30 Prioridad:

11.09.2007 US 993391 P

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

25.06.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LANGLAND, RACHEL;
SHARP, THAD;
WILL, STEPHEN y
WU, LIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 471 097 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

Ensayo diagnóstico de sensibilidad a los inhibidores de la quinasa B-Raf

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El gen *BRAF* codifica B-Raf, una serina/treonina quinasa, que acopla la señalización de RAS activado con las MAPK quinazas posteriores (Wellbrock *et al.*, Cancer Res. 64:2338-2342, 2004). Las mutaciones oncogénicas en B-Raf resultan en una ganancia de función de quinasa, de manera que la ruta de Raf-MEK-ERK resulta constitutivamente activa en ausencia de los factores de crecimiento típicos. Esta activación constitutiva se correlaciona con un mal pronóstico en el melanoma metastásico (Houben *et al.*, *supra*, 2004). Se ha informado de mutaciones activadoras en *BRAF* en una diversidad de neoplasias. Por ejemplo, se encuentran presentes mutaciones en *BRAF* hasta en 70% de los casos de melanoma humano. Una mutación de una sola base (T>A) en la posición nucleotídica 1.799 en el codón 600 del exón 15 conduce a una sustitución de valina por glutamato (V600E), que se encuentra presente en más de 85% de los melanomas con una mutación en B-Raf (Davies *et al.*, Nature 417: 949-954, 2002; Garnett y Marais, Cancer Cell 6: 313-319, 2004; Gray-Schopfer *et al.*, Cancer Metastasis Rev. 24:165-183, 2005; Houben *et al.*, 2004). Menos comúnmente, V600E resulta de la mutación de dos bases TG>AA en las posiciones nucleotídicas 1799-1800 (Houben *et al.*, J. Carcinog. 3:6, 2004).

20 Se conocen varios inhibidores de quinasa, incluyendo los que inhiben B-Raf. Entre dichos inhibidores se incluyen PLX4032, que inhibe selectivamente la actividad de quinasa de B-Raf V600E. La presente invención proporciona métodos de identificación de los pacientes positivos para V600E con el fin de seleccionar el tratamiento con un inhibidor de B-Raf quinasa, por ejemplo PLX4032.

25 Langland *et al.*, 2006 ("Development of a companion diagnostic test for inhibitors of V600E BRAF", URL: <http://aacrmeetingabstracts.org/cgi/content/abstract/2006/2/A13>) da a conocer un método para determinar la sensibilidad de las células de cáncer a PLX4032 basándose en la detección de la mutación *BRAF*^{V600E} mediante PCR TaqMan en tiempo real. Sin embargo, no se dan a conocer secuencias de ningún cebador o sonda específico.

30 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La invención proporciona métodos y kits para la detección de pacientes que son candidatos al tratamiento con un inhibidor de B-Raf quinasa. De esta manera, en un aspecto, la invención proporciona un método para determinar la sensibilidad de las células de cáncer a un inhibidor de B-Raf, comprendiendo el método: (i) proporcionar una muestra de ácidos nucleicos procedentes de células de cáncer de un paciente que presenta un cáncer, (ii) amplificar una secuencia polinucleotídica diana en la muestra de ácidos nucleicos utilizando una pareja de cebadores que amplifica la secuencia polinucleotídica diana, en la que la secuencia polinucleotídica diana comprende un sitio mutado V600E, V600D o V600K en *BRAF* y se lleva a cabo la amplificación en presencia de una sonda oligonucleotídica marcada que comprende la secuencia indicada en SEC ID nº 1, en la que "n" es desoxiinosina, y detecta la presencia de una secuencia mutada en el sitio mutado V600E en *BRAF*, e (iii) detectar la presencia o ausencia de un sitio mutado V600E, V600D o V600K en *BRAF*, determinando de esta manera la sensibilidad del cáncer al inhibidor de B-Raf. En algunas realizaciones, la sonda presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 1. La amplificación puede llevarse a cabo en presencia de una segunda sonda que detecta la presencia de una secuencia de tipo salvaje en el sitio de mutación V600E. En algunas realizaciones, la segunda sonda comprende por lo menos 15 nucleótidos de SEC ID nº 2. En algunas realizaciones, la segunda sonda presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 2. En determinadas realizaciones, la sonda puede marcarse con un marcaje fluorescente. La sonda puede marcarse además con dos marcajes, en la que uno de los marcajes es un pigmento fluorescente y el otro marcaje es una fracción inhibidora.

50 En algunas realizaciones, ambos cebadores de la pareja de cebadores utilizada en la reacción de amplificación se hibridan con el exón 15 de *BRAF*. En algunas realizaciones, uno de los cebadores de la pareja de cebadores utilizada en las reacciones de amplificación comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3, por ejemplo uno de los cebadores en la pareja de cebadores puede presentar la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3. En realizaciones adicionales, uno de los cebadores en las parejas de cebadores comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 4. Por ejemplo, el cebador puede presentar la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 4. En realizaciones adicionales, la pareja de cebadores utilizada para la amplificación comprende cebadores que presentan las secuencias de nucleótidos indicadas en SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.

60 En algunas realizaciones, la etapa de amplificar la reacción comprende una RT-PCR.

El método puede utilizarse para detectar cánceres que presentan una mutación en la posición aminoácida 600 de B-Raf, por ejemplo una mutación V600E. En algunas realizaciones el cáncer es melanoma. En otras realizaciones, el

cáncer es cáncer de colon o cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, la muestra de ácidos nucleicos utilizada en los métodos de la invención para detectar la mutación puede proceder de una biopsia de la piel. En otras realizaciones la muestra es de una biopsia de colon. La muestra también puede proceder de tejido incluido en parafina. El método de la invención puede comprender además el registro de un diagnóstico de que el paciente es sensible a un inhibidor de B-Raf, tal como un inhibidor de B-Raf específico de mutante, por ejemplo PLX4032.

En algunas realizaciones de la invención, el método comprende además la administración de un inhibidor de B-Raf en el paciente. El inhibidor de B-Raf puede ser un inhibidor de B-Raf específico de mutante, tal como PLX4032.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un candidato para el tratamiento con PLX4032, comprendiendo el método: obtener una muestra de un sujeto y detectar una molécula biológica que comprende una mutación V600E en *BRAF* a partir de la muestra, identificando de esta manera el candidato para el tratamiento con PLX4032. En algunas realizaciones la molécula biológica es un ácido nucleico. En otras realizaciones la molécula biológica es un polipéptido. El polipéptido puede obtenerse, por ejemplo, de una muestra que comprende células de cáncer del paciente. En algunas realizaciones, el polipéptido puede detectarse utilizando un inmunoensayo. El método puede comprender además la administración de PLX4032 en el sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para detectar un paciente que es un candidato para el tratamiento con un inhibidor de B-Raf, en el que el kit comprende una primera sonda específica de alelo, en el que la primera sonda resulta adecuada para detectar una mutación V600E, V600D o V600K en *BRAF* y comprende la secuencia indicada en SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, la sonda presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 1. Un kit de la invención puede comprender además una segunda sonda específica de alelo, en el que la segunda sonda detecta la secuencia de *BRAF* de tipo salvaje y comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 2. En algunas realizaciones la segunda sonda presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 2.

En realizaciones adicionales, un kit de la invención comprende además una pareja de cebadores que amplifica una región diana de *BRAF* que comprende un sitio de mutación V600E. Por ejemplo, la pareja de cebadores puede comprender un cebador que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3. En determinado aspecto, el cebador presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3. En otras realizaciones, la pareja de cebadores puede comprender cebadores que comprenden por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4. En algunas realizaciones, la pareja de cebadores comprende cebadores que presentan las secuencias de nucleótidos indicadas en SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.

De esta manera, en algunas realizaciones, un kit de la invención puede comprender: una sonda que presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 1; una sonda que presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 2; un cebador que presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3, y un cebador que presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una alineación de un amplicón B-Raf V600E (SEC ID nº 5) con una región correspondiente del cromosoma X (SEC ID nº 6). Los sitios de cebador de B-Raf V600E se muestran con flechas. El amplicón incluye partes del exón 15 (mayúscula) y del intrón 15 (minúscula). Las líneas verticales indican las posiciones de identidad entre las secuencias de *BRAF* y del cromosoma X. El codón 600 se muestra en una caja; GTG corresponde a valina (V). La región de unión a la sonda se subraya mediante sombreado; la sonda mutante (MU) es más larga que la sonda de tipo salvaje (WT), por dos nucleótidos (5'-CT en la región subrayada) y ambas sondas se unen al complemento de la secuencia mostrada.

La figura 2 muestra una alineación de una región del exón 15 de B-Raf circundante al codón 600 (flecha) (SEC ID nº 7) con regiones homólogas de A-Raf (SEC ID nº 8) y C-Raf (SEC ID nº 9). Los asteriscos marcan las diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de B-Raf (por ejemplo Mercer y Pritchard, *Biochim. Biophys. Acta* 1653:25-40, 2003).

La figura 3 muestra una alineación de un amplicón de B-Raf V600E (SEC ID nº 15) con las secuencias correspondientes de los genes *ARAF* (codifica A-Raf) (SEC ID nº 11) y *RAF1* (codifica C-Raf) (SEC ID nº 10). Los nucleótidos en minúscula difieren de la secuencia de *BRAF*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

5 En el contexto de la presente solicitud, "V600E" se refiere a una mutación en *BRAF* (T>A en la posición nucleotídica 1799) que resulta en la sustitución de una glutamina por una valina en la posición aminoácida 600 de B-Raf. "V600E" también se conoce como "V599E" (1976T>A) bajo un sistema de numeración anterior (Kumar *et al.*, Clin. Cancer Res. 9:3362-3368, 2003).

10 En el contexto de la presente invención, un "inhibidor de B-Raf quinasa" inhibe la actividad de una B-Raf quinasa. Dicho inhibidor puede inhibir además la actividad de otras quinasas, incluyendo otras raf quinasas.

15 Un "inhibidor de B-Raf quinasa específico de mutante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un inhibidor de B-Raf que presenta selectividad para un B-Raf mutante, tal como B-Raf que presenta una mutación en el residuo de valina en la posición aminoácida 600, por ejemplo una mutación V600E, en comparación con B-Raf de tipo salvaje. Dicho inhibidor es por lo menos dos veces, más frecuentemente por lo menos tres veces, o más potente que un inhibidor de B-Raf mutante, por ejemplo un B-Raf con una mutación V600E, en comparación con el tipo salvaje. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un "inhibidor de B-Raf específico de mutante" puede presentar una IC_{50} para la actividad de inhibición de quinasa (ensayo bioquímico) de aproximadamente 30 nM para B-Raf V600E, mientras que la IC_{50} correspondiente para B-Raf de tipo salvaje es de aproximadamente 100 nM. La potencia puede compararse también en términos de valores de IC_{50} para los ensayos celulares, por ejemplo ensayos celulares que miden la inhibición del crecimiento. Un "inhibidor de B-Raf específico de mutante" en el contexto de la presente invención también puede inhibir quinasas diferentes de B-Raf, por ejemplo otras raf quinasas.

25 El término "hibridación" se refiere a la formación de una estructura de dúplex con dos ácidos nucleicos de cadena sencilla en virtud del apareamiento de bases complementarias. La hibridación puede producirse entre cadenas de ácidos nucleicos exactamente complementarias o entre cadenas de ácidos nucleicos que contienen regiones menores de desapareamiento. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sustancialmente complementarias" se refiere a secuencias que son complementarias excepto por regiones menores de desapareamiento. Típicamente, el número total de nucleótidos desapareados en una región hibridante no es superior a 3 nucleótidos para secuencias de una longitud aproximada de 15 nucleótidos. Las condiciones bajo las que se hibridan únicamente cadenas de ácidos nucleicos exactamente complementarias se denominan condiciones de hibridación "restrictivas" o "específicas de secuencia". Los dúplex estables de ácidos nucleicos sustancialmente complementarios pueden conseguirse bajo condiciones de hibridación menos restrictivas. El experto en la materia de la tecnología de ácidos nucleicos podrá determinar la estabilidad de los dúplex empíricamente mediante la consideración de varias variables, incluyendo, por ejemplo, la longitud y concentración de pares de bases de los oligonucleótidos, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases desapareados. Por ejemplo, el software informático para calcular la estabilidad de los dúplex se encuentra disponible comercialmente de National Biosciences, Inc. (Plymouth, Minn.), por ejemplo OLIGO, versión 5, o de DNA Software (Ann Arbor, Michigan), por ejemplo Visual OMP 6.

45 Las condiciones de hibridación específicas de secuencia restrictivas, bajo las que un oligonucleótido se hibridará únicamente con la secuencia diana exactamente complementaria, son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, las referencias generales proporcionadas en la sección sobre detección de polimorfismos en secuencias de ácidos nucleicos). Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Generalmente, las condiciones restrictivas se selecciona que sean aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de los pares de bases se han disociado. La relajación de la astringencia de las condiciones de hibridación permite la existencia de tolerancia de los desapareamientos de secuencia; el grado de desapareamiento tolerado puede controlarse mediante un ajuste adecuado de las condiciones de hibridación.

55 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que actúa como punto de inicio de la síntesis de ADN bajo condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de cuatro nucleósido trifosfato diferentes y un agente para la polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Un cebador es preferentemente un oligodesoxirribonucleótido de cadena sencilla. El cebador incluye una "región hibridante" exacta o sustancialmente complementaria a la secuencia diana, preferentemente de una longitud de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos. Un oligonucleótido cebador puede consistir enteramente de la región hibridante o puede contener elementos adicionales que permitan la detección, inmovilización o manipulación del producto amplificado, pero que no alteren la capacidad del cebador de servir como reactivo de partida para la síntesis de ADN. Por ejemplo, puede incluirse una cola de secuencia de ácidos nucleicos en el extremo 5' del cebador que se hibride con un oligonucleótido de captura.

Un cebador "específico de alelo", tal como se utiliza en la presente memoria, es un cebador que se hibrida con una secuencia diana de manera que el extremo 3', habitualmente el nucleótido 3', del cebador se alinee con un sitio de interés, por ejemplo el nucleótido 1799, que es la segunda posición dentro del codón 600 de *BRAF*, y es exactamente complementario al alelo de tipo salvaje o alelo mutante en la posición de interés. Tal como se utiliza en la presente memoria, el cebador es "específico para" el alelo respecto al que es exactamente complementario en el extremo 3', por ejemplo en el nucleótido 3' ó penúltimo nucleótido. En general, la extensión del cebador resulta inhibida en el caso de que exista un desapareamiento en el extremo 3' del cebador. Un cebador específico de alelo, al hibridarse con el alelo exactamente complementario, es extensible con una eficiencia mayor. El mismo cebador, al hibridarse con el otro alelo, no es tan fácilmente extensible debido al desapareamiento en el extremo 3', por ejemplo el nucleótido 3' ó penúltimo nucleótido en el extremo 3', del cebador en el dúplex de hibridación. De esta manera, la utilización de un cebador específico de alelo proporciona discriminación alélica basada en la formación diferencial de un producto de extensión.

El término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida selectivamente con un ácido nucleico diana bajo condiciones adecuadas.

Una sonda "específica de alelo" contiene una "región hibridante" exacta o sustancialmente complementaria a la secuencia diana, y es exactamente complementaria a la secuencia diana en el sitio de interés, por ejemplo el nucleótido 1.799 en el codón 600 de *BRAF*. De esta manera, por ejemplo, una sonda específica del alelo V600E detecta selectivamente una secuencia de mutación V600E, mientras que una sonda específica de alelo de *BRAF* de tipo salvaje detecta selectivamente la secuencia de tipo salvaje. Un ensayo de hibridación realizado utilizando la sonda bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas permite la detección selectiva de una secuencia diana específica que comprende el sitio de interés. La región que se hibrida con la sonda preferentemente presenta una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 nucleótidos, más preferentemente presenta una longitud de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos. La utilización de bases modificadas o análogos de bases que afectan a la estabilidad de la hibridación, los cuales son bien conocidos de la técnica, puede permitir la utilización de sondas más cortas o más largas con una estabilidad comparable. Un oligonucleótido sonda puede consistir enteramente de la región hibridante o puede contener elementos adicionales que permitan la detección o la inmovilización de la sonda, pero que no alteren significativamente las características de hibridación de la región hibridante.

La expresión "secuencia diana" o "región diana" se refiere a una región de un ácido nucleico que debe analizarse y que comprende el sitio polimórfico de interés.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a cebadores, sondas y fragmentos oligómeros. Las expresiones no se encuentran limitadas por la longitud y son genéricas de polímeros lineales de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro N-glucósido de una base purina o pirimidina, o de bases purina o pirimidina modificadas. Entre dichas expresiones se incluyen el ADN de doble cadena y de cadena sencilla, así como el ARN de doble cadena y de cadena sencilla. Los oligonucleótidos de la invención pueden utilizarse como cebadores y/o sondas.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, enlaces fosfotriéster, fosforamidoato, siloxano, carbonato, carboximetil-éster, acetamidoato, carbamato, tioéster, fosforamidoato como puente, metilén-fosfonato como puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosfoditioato, fosforotioato como puente, o sulfona, y combinaciones de dichos enlaces.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender las cinco bases biológicas (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases diferentes de las cinco bases biológicas. Estas bases pueden servir a varios propósitos, por ejemplo a la estabilidad o desestabilización de la hibridación; a la estimulación o inhibición de la degradación de sondas; o como puntos de unión para fracciones detectables o fracciones inhibitorias. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener una o más fracciones de bases modificadas, no estándares o derivatizadas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, N6-metil-adenina, N6-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-uracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosil-queosina, inosina, N6-isopentenil-adenina, 1-metil-guanina, 1-metil-inosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metil-adenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metil-citosina, N6-metil-adenina, 7-metil-guanina, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilcuosina, 5'-metoxycarboximetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, 2-metiltio-N6-isopentenil-adenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metil-uracilo, metil-éster de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w,2,6-di-aminopurina y 5-propinil-pirimidina. Pueden

encontrarse otros ejemplos de fracciones de bases modificadas, no estándares o derivatizadas en las patentes US nº 6.001.611, 5.955.589, 5.844.106, 5.789.562, 5.750.343, 5.728.525 y 5.679.785.

5 Además, un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender una o más fracciones sacáridas modificadas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, arabinosa, 2-fluoro-arabinosa, xilulosa y una hexosa.

Introducción

10 La invención proporciona un ensayo diagnóstico de V600E para la utilización en la selección de pacientes de cáncer, por ejemplo pacientes de cáncer de melanoma, pacientes de cáncer de colon, pacientes de cáncer del tiroides y pacientes con cánceres ováricos serosos de grado bajo, los cuales son candidatos para el tratamiento con un inhibidor de B-Raf, tal como un inhibidor de B-Raf mutante selectivo, por ejemplo PLX4032. De esta manera, el ensayo diagnóstico puede utilizarse para clasificar los pacientes según su probabilidad de responder al tratamiento con PLX4032.

15 Típicamente, la mutación V600E (también conocida como V599E (1796T>A)) se detecta utilizando un método que comprende determinar la presencia de una mutación de una sola base (T>A) en la posición nucleotídica 1.799 en el codón 600 del exón 15. Esta mutación también puede resultar de la mutación de dos bases TG>AA en las posiciones nucleotídicas 1.799-1.800. La mutación de dos bases también puede detectarse mediante la evaluación de la posición 1.799. En algunas realizaciones también puede evaluarse un ácido nucleico para la presencia de una sustitución en la posición 1.800.

20 Otras mutaciones también pueden presentarse en el codón 600. Entre ellas se incluyen V600K, V600D y V600R. En algunas realizaciones, una sonda que detecta una mutación V600E también puede detectar otras mutaciones del codón 600, por ejemplo V600D, V600K y/o V600R. En algunas realizaciones, una sonda también puede detectar una mutación en el codón 601.

25 La presencia de una mutación V600E típicamente se determina mediante la evaluación del ácido nucleico, por ejemplo ADN genómico o ARNm, para la presencia de una sustitución de base en la posición 1.799. Se encuentra disponible una amplia diversidad de ensayos. En algunas realizaciones el ensayo es un ensayo de nucleasa 5'.

V600E también puede detectarse mediante la detección de la presencia de un B-Raf V600E mutante, por ejemplo utilizando un inmunoensayo.

35 La presencia de V600E indica que el paciente es un candidato para el tratamiento de un inhibidor de B-Raf, tal como un inhibidor de B-Raf específico de mutante. Por lo tanto, la invención comprende además un método en el que un paciente que se ha determinado que presenta una mutación V600E es tratado con un inhibidor de B-Raf, tal como un inhibidor de B-Raf específico de mutante, por ejemplo PLX4032.

40 Las muestras biológicas

45 La mutación V600E puede detectarse en diversos tipos de cáncer, incluyendo el melanoma, el cáncer colorrectal, el cáncer de tiroides, por ejemplo el cáncer de tiroides papilar, y el cáncer ovárico, por ejemplo el carcinoma seroso de grado bajo. En algunas realizaciones, las mutaciones V600E se detectan en cáncer de pulmón, gliomas, cáncer de próstata, cáncer de mama, sarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pituitaria y cánceres que se producen en el intestino grueso, tracto biliar, ojo, páncreas, estómago, sistema nervioso central, y tejido hematopoyético y linfoide.

50 Se detecta una mutación V600E en una muestra biológica de un paciente. La muestra biológica típicamente comprende una célula de cáncer. Por ejemplo, la muestra puede ser una biopsia tumoral, por ejemplo de un neoplasma melanocítico maligno, un tumor colorrectal o un tumor de tiroides, o de una muestra de tejido de un sitio metastásico. En otras realizaciones, la muestra biológica puede ser sangre u otro líquido, en el que el líquido comprende una célula de cáncer. En otras realizaciones, la muestra biológica puede comprender ácidos nucleicos circulantes (sin células).

55 La mutación con frecuencia se detecta en ácidos nucleicos que se obtienen de la muestra biológica. El ácido nucleico que se evalúa para la presencia de una mutación puede ser ARN o ADN. En algunas realizaciones la mutación se detecta en ADN genómico.

60 Puede obtenerse una muestra biológica utilizando cualquiera de entre varios métodos de la técnica. Además, puede tratarse una muestra biológica con un fijador, tal como formaldehído, e incluirse en parafina y cortarse para la utilización. Alternativamente puede utilizarse tejido fresco o congelado. En otras realizaciones pueden utilizarse aspirados con aguja fina.

Detección de una mutación V600E en una secuencia de ácidos nucleicos

Las técnicas de detección para evaluar los ácidos nucleicos para la presencia de una mutación V600E implican procedimientos bien conocidos en el campo de la genética molecular. Además, muchos de los métodos implican la amplificación de ácidos nucleicos. Se proporcionan en la técnica guías extensas para la realización de dichos procedimientos. Entre las referencias ejemplares se incluyen manuales tales como PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (editores: Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, incluyendo las actualizaciones mediante suplementos hasta abril de 2004; Sambrook & Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3a ed., 2001).

Aunque los métodos típicamente utilizan etapas de PCR, también pueden utilizarse otros protocolos de amplificación. Entre los métodos de amplificación adecuados se incluyen la reacción en cadena de la ligasa (ver, por ejemplo, Wu y Wallace, Genomics 4:560-569, 1988), el ensayo de desplazamiento de cadena (ver, por ejemplo, Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396, 1992; patente US nº 5.455.166) y varios sistemas de amplificación basados en la transcripción, incluyendo los métodos descritos en las patentes US nº 5.437.990, 5.409.818 y 5.399.491; el sistema de amplificación mediada por transcripción (SAT) (Kwoh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989); y la replicación de secuencias autosostenida (3SR) (Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990; documento nº WO 92/08800). Alternativamente, pueden utilizarse métodos que amplifican la sonda hasta niveles detectables, tales como la amplificación de Q β -replicasa (Framer y Lizardi, Nature 339:401-402, 1989; Lomeli *et al.*, Clin. Chem. 35:1826-1831, 1989). Se proporciona una revisión de los métodos de amplificación conocidos en, por ejemplo, Abramson y Myers, Current Opinion in Biotechnology 4:41-47, 1993.

Típicamente, la detección de V600E se lleva a cabo mediante la evaluación de los ácidos nucleicos procedentes del paciente en un ensayo que comprende cebadores y/o sondas oligonucleótidas. Los oligonucleótidos pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, habitualmente síntesis química. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando reactivos e instrumentos disponibles comercialmente. Alternativamente, pueden obtenerse de fuentes comerciales. Los métodos de síntesis de los oligonucleótidos son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; Beaucage *et al.*, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; y el método en soporte sólido de la patente US nº 4.458.066). Además, pueden utilizarse modificaciones de los métodos de síntesis anteriormente indicados a fin de modificar deseablemente el comportamiento enzimático con respecto a los oligonucleótidos sintetizados. Por ejemplo, la incorporación de enlaces fosfodiéster modificados (por ejemplo fosforotioato, metilfosfonatos, fosfoamidato o boranofosfato) o enlaces diferentes de un derivado de ácido fosforoso en un oligonucleótido puede utilizarse para evitar el corte en un sitio seleccionado. Además, la utilización de azúcares modificados con 2'-amino tiende a favorecer el desplazamiento sobre la digestión del oligonucleótido al hibridarse con un ácido nucleico que también es el molde para la síntesis de una nueva cadena de ácidos nucleicos.

La mayoría de ensayos para detectar una mutación V600E al nivel de los ácidos nucleicos comporta uno de entre varios protocolos generales: hibridación utilizando oligonucleótidos específicos de alelo, extensión de cebadores, ligación específica de alelo, secuenciación o técnicas de separación electroforética, por ejemplo polimorfismo de conformación de cadena sencilla (PCCS) y análisis de heterodúplex. Entre los ensayos ejemplares se incluyen los ensayos de 5' nucleasa, la incorporación de pigmento terminador dirigida por el molde, ensayos de oligonucleótidos específicos de alelo de baliza molecular, ensayos de extensión de bases únicas y análisis de mutaciones utilizando la secuenciación de pirofosfato en tiempo real. El análisis de las secuencias amplificadas puede llevarse a cabo utilizando diversas tecnologías, tales como microchips, ensayos de polarización de fluorescencia y la espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI). Dos métodos adicionales que pueden utilizarse son ensayos basados en el corte invasivo con nucleasas Flap y metodologías que utilizan sondas candado.

La determinación de la presencia o ausencia de un alelo V600E se lleva a cabo generalmente mediante el análisis de una muestra de ácidos nucleicos que se obtienen de una muestra biológica que comprende células de cáncer de un paciente que debe analizarse. Con frecuencia, la muestra de ácidos nucleicos comprende ADN genómico. El ADN genómico típicamente se obtiene de muestras tumorales, aunque también puede obtenerse de otras células o tejidos, por ejemplo de un sitio metastásico o de la sangre.

La muestra de ácidos nucleicos que debe analizarse también puede ser ARN. Por ejemplo, puede analizarse el ARNm de una muestra biológica con el fin de determinar la presencia o la ausencia de una mutación V600E. La muestra de ácidos nucleicos se obtiene de células en las que se expresa el ácido nucleico diana, por ejemplo un tumor primario o tejido de un sitio metastásico. Dicho análisis puede llevarse a cabo en primer realizando una transcripción inversa del ARN diana utilizando, por ejemplo, una transcriptasa inversa vírica, y después amplificando el ADNc resultante, o utilizando una reacción de transcripción inversa-polimerasa (RT-PCR) a alta temperatura, tal como se indica en las patentes US nº 5.310.652, nº 5.322.770, nº 5.561.058, nº 5.641.864 y nº 5.693.517.

Se describen brevemente metodologías utilizadas frecuentemente para el análisis de muestras de ácidos nucleicos para detectar sustituciones de nucleótidos. Sin embargo, puede utilizarse cualquier método conocido de la técnica en la invención con el fin de detectar la presencia de sustituciones de nucleótidos.

5 Sondas específicas de alelo

10 La hibridación específica de alelo se basa en distinguir entre dos moléculas de ADN que difieren en por lo menos una base mediante la hibridación de un oligonucleótido que es específico para una de las secuencias variantes con un producto amplificado obtenido de la amplificación de la muestra de ácidos nucleicos. Un ensayo específico de alelo puede comprender además dos oligonucleótidos específicos de alelo, por ejemplo una sonda específica de alelo para la primera variante y una sonda específica de alelo para la segunda variante, en las que las sondas se hibridan diferencialmente a una variante frente a la otra. La hibridación específica de alelo típicamente utiliza oligonucleótidos cortos, por ejemplo de una longitud de entre 15 y 35 nucleótidos. Los principios y guías para diseñar dicha sonda se encuentran disponibles en la técnica, por ejemplo en las referencias citadas en la presente memoria. 15 Las condiciones de hibridación deberían ser suficientemente restrictivas para que exista una diferencia significativa de intensidad de hibridación entre alelos, y preferentemente una respuesta esencialmente binaria, en la que una sonda se hibrida con únicamente uno de los alelos. Algunas sondas se diseñan para hibridarse con un segmento de ADN diana de manera que el sitio de interés, que es la posición nucleotídica 1.799 en el codón 600 del exón 15 de *BRAF*, se alinea con una posición central (por ejemplo en un oligonucleótido de 15 bases en la posición 7, en un oligonucleótido de base 16 en la posición 8 ó 9) de la sonda, aunque este diseño no resulta necesario. 20

La cantidad y/o presencia de un alelo se determina mediante la medición de la cantidad de sonda específica de alelo que se hibrida con la muestra. Típicamente, el oligonucleótido se marca con un marcaje tal como un marcaje fluorescente. Por ejemplo, una sonda específica de alelo que es específica para una sustitución de nucleótido V600E se hibrida con ácidos nucleicos obtenidos de una muestra biológica bajo condiciones de hibridación que resultan en la hibridación preferente con un alelo. La intensidad de fluorescencia se mide para determinar si se ha hibridado un oligonucleótido específico. 25

En una realización de la exposición, el nucleótido presente en la posición V600E se identifica mediante hibridación bajo condiciones de hibridación específicas de secuencia con una sonda oligonucleotídica exactamente complementaria a la secuencia mutante (o de tipo salvaje) de *BRAF* que comprende el sitio mutante V600E. La secuencia hibridante de sonda y las condiciones de hibridación específicas de secuencia se seleccionan de manera que un único desapareamiento en el sitio de la mutación desestabiliza el dúplex de hibridación suficientemente para que no se forme eficazmente. De esta manera, bajo condiciones de hibridación específicas de secuencia, sólo se formarán dúplex estables entre la sonda y la secuencia alélica exactamente complementaria. De esta manera, los oligonucleótidos de una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 nucleótidos, preferentemente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos, que son exactamente complementarios a una secuencia alélica en una región que comprende el sitio de mutación se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención. 30 35 40

En una realización alternativa de la invención, el nucleótido presente en el sitio de mutación se identifica mediante hibridación bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas con un oligonucleótido sustancialmente complementario al alelo mutante o de tipo salvaje en una región que comprende el sitio de mutación y exactamente complementario al alelo en el sitio de mutación. Debido a los desapareamientos que se producen en los sitios que no se encuentran mutados, existen desapareamientos en ambas secuencias alélicas, la diferencia en el número de desapareamientos en un dúplex formado con la secuencia alélica diana y en un dúplex formado con la secuencia alélica no diana correspondiente es la misma que cuando se utiliza un oligonucleótido exactamente complementario a la secuencia del alelo diana. En esta realización, se relajan suficientemente las condiciones de hibridación para permitir la formación de dúplex estables con la secuencia diana, manteniendo simultáneamente una astringencia suficiente para impedir la formación de dúplex estables con secuencias no diana. Bajo estas condiciones de hibridación suficientemente específicas, sólo se formarán dúplex estables entre la sonda y la secuencia alélica diana. De esta manera, los oligonucleótidos de una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 nucleótidos, preferentemente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos, que son sustancialmente complementarios a una secuencia alélica en una región que comprende el sitio de mutación y son exactamente complementarios a la secuencia alélica en el sitio de mutación se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención. 45 50 55

La utilización de oligonucleótidos sustancialmente, y no exactamente, complementarios puede resultar deseable en formatos de ensayos en los que la optimización de las condiciones de hibridación se encuentra limitada. Por ejemplo, en un formato de ensayo de sonda inmovilizada multi-diana, las sondas para cada diana se inmovilizan sobre un único soporte sólido. Las hibridaciones se llevan a cabo simultáneamente mediante la puesta en contacto con el soporte sólido de una solución que contiene el ADN diana. Debido a que todas las hibridaciones se llevan a cabo bajo condiciones idénticas, las condiciones de hibridación no pueden optimizarse separadamente para cada 60

sonda. La incorporación de desapareamientos en una sonda puede utilizarse para ajustar la estabilidad de los dúplex en el caso de que el formato de ensayo impide ajustar las condiciones de hibridación. El efecto de un desapareamiento introducido particular sobre la estabilidad de los dúplex es bien conocido y la estabilidad de los dúplex puede determinarse rutinariamente tanto mediante estimación como empíricamente, tal como se ha indicado anteriormente. Pueden seleccionarse condiciones de hibridación adecuadas, que dependen del tamaño exacto y la secuencia de la sonda, de manera empírica utilizando la guía proporcionada en la presente memoria y bien conocida de la técnica. La utilización de sondas oligonucleótidas para detectar diferencias de pares de bases únicas en la secuencia se describe en, por ejemplo, Conner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:278-282, 1983, y en las patentes US nº 5.468.613 y nº 5.604.099.

El cambio proporcional de estabilidad entre un dúplex de hibridación perfectamente apareado y con un desapareamiento de una única base depende de la longitud de los oligonucleótidos hibridados. Los dúplex formados con secuencias de sondas más cortas se desestabilizan proporcionalmente más por la presencia de un desapareamiento. En la práctica, resultan preferentes para la detección específica de secuencia los oligonucleótidos de una longitud comprendida entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos. Además, debido a que los extremos de un oligonucleótido hibridado experimentan una disociación aleatoria y rehibridación continuas debido a la energía térmica, un desapareamiento en cualquiera de los extremos desestabiliza el dúplex de hibridación en menor medida que un desapareamiento interno. Preferentemente, para la discriminación de un único cambio de par de bases en la secuencia diana, se selecciona la secuencia de la sonda que se hibrida con la secuencia diana de manera que el sitio de la mutación se produce en la región interior de la sonda.

Los criterios anteriormente indicados para seleccionar una secuencia de sonda que se hibrida con BRAF se aplican a la región hibridante de la sonda, es decir, aquella parte de la sonda que participa en la hibridación con la secuencia diana. Puede unirse una sonda a una secuencia de ácidos nucleicos adicional, tal como una cola poli-T utilizada para inmovilizar la sonda, sin alterar significativamente las características de hibridación de la sonda. El experto en la materia reconocerá que para la utilización en los presentes métodos, una sonda unida a una secuencia de ácidos nucleicos adicional que no sea complementaria a la secuencia diana y que, de esta manera, no participe en la hibridación, es esencialmente equivalente a una sonda no unida.

Ensayo de 5'-nucleasa

En algunas realizaciones, las muestras de ácidos nucleicos se evalúan para la presencia de una mutación V600E utilizando un ensayo "TaqMan[®]" o "ensayo de 5'-nucleasa", tal como se indica en las patentes US nº 5.210.015, nº 5.487.972 y nº 5.804.375, y en Holland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280, 1988. En el ensayo TaqMan[®], las sondas de detección marcadas que se hibridan dentro de la región amplificada se encuentran presentes durante la reacción de amplificación. Las sondas se modifican de manera que eviten que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de ADN. La amplificación se lleva a cabo utilizando una ADN polimerasa con actividad de exonucleasa 5' a 3'. Durante cada etapa de síntesis de la amplificación, cualquier sonda que se hibride con el ácido nucleico diana posteriormente al cebador que se está extendiendo resulta degradado por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa. De esta manera, la síntesis de una nueva cadena diana también resulta en la degradación de una sonda y la acumulación de producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de las secuencias diana.

La sonda de hibridación utilizada en el ensayo puede ser una sonda específica de alelo que discrimine entre los alelos mutantes y de tipo salvaje de BRAF en el sitio de mutación V600E. Alternativamente, el método puede llevarse a cabo utilizando un cebador específico de alelo y una sonda marcada que se una al producto amplificado.

Puede utilizarse cualquier método adecuado para la detección de producto de degradación en un ensayo de 5'-nucleasa. Con frecuencia, la sonda de detección se marca con dos pigmentos fluorescentes, uno de los cuales es capaz de inhibir la fluorescencia del otro pigmento. Los pigmentos se unen a la sonda, preferentemente uno unido al extremo 5'-terminal y el otro se une a un sitio interno, de manera que la inhibición se produce cuando la sonda se encuentra en un estado no hibridado y de manera que el corte de la sonda por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa se produce entre los dos pigmentos. La amplificación resulta en el corte de la sonda entre los pigmentos con una eliminación concomitante de la inhibición y un incremento de la fluorescencia observable a partir del pigmento inicialmente inhibido. Se realiza un seguimiento de la acumulación de producto de degradación mediante la medición del incremento de la fluorescencia de la reacción. Las patentes US nº 5.491.063 y nº 5.571.673 describen métodos alternativos para detectar la degradación de la sonda que se produce concomitantemente con la amplificación.

En una realización, un ensayo de 5'-nucleasa para evaluar las muestras de paciente para la presencia de la mutación V600E en BRAF puede llevarse a cabo utilizando los cebadores siguientes, o secuencias que son sustancialmente idénticas a los cebadores:

TTS068-BRAF_F1: 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTE 3' (E= t-butil-bencil-dA) (SEC ID nº 25)
 RL_BRAF_R5: 5'TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA 3' (SEC ID nº 4).

5 Entre las secuencias que son sustancialmente idénticas a las secuencias de cebador se incluyen aquéllas que se hibridan con la misma secuencia complementaria. De esta manera, en algunas realizaciones, las secuencias de cebador para la utilización en la invención comprenden por lo menos 15 nucleótidos contiguos, en ocasiones por lo menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ó 26 nucleótidos contiguos de TTS068-BRAF_F1 ó RL_BRAF_R5. En algunas realizaciones, un cebador presenta por lo menos 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos contiguos de TTS068-BRAF_F1. En otras realizaciones, los cebadores para la utilización en la invención presentan una identidad de por lo menos 80%; en algunas realizaciones, una identidad de por lo menos 85%, y en otras realizaciones, una identidad de por lo menos 90% o superior respecto a TTS068-BRAF_F1 ó RL_BRAF_R5. En algunas realizaciones, el cebador directo es TTS068-BRAF-F1 y el cebador inverso es un cebador que permite la discriminación del pseudogén del cromosoma X, pero que no se solapa con RL_BRAF_R5 ó que presenta un solapamiento de menos de 10 pares de bases con RL_BRAF_R5. En algunas realizaciones, el cebador inverso puede unirse a un sitio que incluye 20 nucleótidos o menos después del sitio de unión para RL_BRAF_R5. Por ejemplo, también pueden utilizarse cebadores inversos de las secuencias siguientes:

5' A AAT AGC CTC AAT TCT TAC CAT CCA CAA AA 3' (SEC ID nº 12)
 5' TAG CCT CAA TTC TTA CCA TCC ACA AAA 3' (SEC ID nº 13)
 20 5' TAG CCT CAA TTC TTA CCA TCC ACA AAE 3' (SEC ID nº 1) 5' AGG GCC AAA AAT TTA ATC AGT GGA AAA A 3' (SEC ID nº 15)
 5' CAG TGG AAA AAT AGC CTC AAT TCT TAC CA 3' (SEC ID nº 16)

25 En algunas realizaciones, el cebador directo puede unirse a un sitio que incluye 20 bases situadas antes del sitio de unión de BRAF-F1. En algunas realizaciones, el cebador directo puede ser:

5' TTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATE 3' (SEC ID nº 17), o
 5' ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAE 3' (SEC ID nº 18).

30 También puede detectarse una mutación V600E en el caso de que el molde inicial sea ARN. Dicho ensayo puede comprender un cebador inverso, por ejemplo un cebador que comprende una secuencia:

5' ATG ACT TCT GGT GCC ATC CAC AA 3' (SEC ID nº 19).

35 Entre otros cebadores inversos que pueden utilizarse se incluyen:

5' AAA AAT AGC CTC AAT TCT TAC CAT CCA CAA AA 3' (SEC ID nº 20),
 5' GCC ATC CAC AAA ATG GAT CCA GAC A3' (SEC ID nº 21), o
 5' CAA AAT GGA TCC AGA CAA CTG TTC AAA 3' (SEC ID nº 22).

40 En una realización de la invención, se lleva a cabo un ensayo de 5'-nucleasa utilizando una o las dos sondas específicas de alelo siguientes, que detectan una secuencia mutante (TTS 155-BRAF_MU) o de tipo salvaje (TTS148-BRAF_WTs):

45 TTS155-BRAF_MU 5' QCTACAIIFAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEC ID nº 23)
 TTS 148-BRAF_WT 5' QACAITGEEAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEC ID nº 24)
 (E = pigmento informador HEX, F= pigmento informador FAM, I = dexoxiinosina, Q = pigmento inhibidor BHQ2, P= 3'-fosfato). El pigmento (F o E) se inserta entre dl y dA (TTS155-BRAF_MU) o entre dG y dA (TTS148-BRAF_WT).

50 Tal como se entiende en la técnica, una sonda TTS155-BRAF_MU ó TTS148-BRAF_WT también puede incluir modificaciones, por ejemplo el pigmento fluorescente particular, el inhibidor y/o las posiciones del pigmento, que son diferentes de las ilustradas anteriormente.

55 En algunas realizaciones, la sonda que detecta V600E, por ejemplo TTS155-BRAF_MU, también detecta V600D (1799_1800TG>AT) y V600K (1798_1799GT>AA). En algunas realizaciones, una sonda que detecta una mutación V600E también detecta K601E (1801A>G) y V600R (1798_1799GT>AG).

60 En algunas realizaciones de la invención, puede utilizarse una secuencia sustancialmente idéntica a una secuencia de sonda. Entre las secuencias que son sustancialmente idénticas a las secuencias de sonda se incluyen aquéllas que se hibridan con la misma secuencia complementaria que la sonda. De esta manera, en algunas realizaciones, las secuencias de sonda para la utilización en la invención comprenden por lo menos 15 nucleótidos contiguos, en ocasiones por lo menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos contiguos de TTS 155-

BRAF_MU ó TTS 148-BRAF_WT. En algunas realizaciones, un cebador presenta por lo menos 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos contiguos de TTS 155-BRAF_MU ó TTS 148-BRAF_WT. En otras realizaciones, los cebadores para la utilización en la invención presentan una identidad de por lo menos 80%; en algunas realizaciones presentan una identidad de por lo menos 85% y en otras realizaciones, presentan una identidad de por lo menos 90% o superior a TTS155-BRAF_MU ó TTS 148-BRAF_WT.

Un ensayo de 5'-nucleasa para la detección de una mutación V600E en *BRAF* puede utilizar cualquier polimerasa que presente una actividad de exonucleasa 5' a 3'. De esta manera, en algunas realizaciones, las polimerasas con actividad de 5'-nucleasa son polimerasas de ácidos nucleicos termoestables y termoactivas. Entre dichas polimerasas termoestables se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, formas nativas y recombinantes de polimerasas de una diversidad de especies de los géneros eubacterianos *Thermus*, *Thermatoga* y *Thermosiphon*, así como formas quiméricas de los mismos. Por ejemplo, entre las polimerasas de especies de *Thermus* que pueden utilizarse en los métodos de la invención se incluyen la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), la ADN polimerasa de *Thermus* especie Z05 (Z05), *Thermus* especie sps17 (sps17) y *Thermus* especie Z05 (por ejemplo descrita en las patentes US nº 5.405.774, 5.352.600, 5.079.352, 4.889.818, 5.466.591, 5.618.711, 5.674.738 y 5.795.762). Entre las polimerasas de *Thermatoga* que pueden utilizarse en los métodos de la invención se incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa de *Thermatoga maritima* y la ADN polimerasa de *Thermatoga neapolitana*, mientras que un ejemplo de una polimerasa de *Thermosiphon* que puede utilizarse es la ADN polimerasa de *Thermosiphon africanus*. Las secuencias de las ADN polimerasas de *Thermatoga maritima* y de *Thermosiphon africanus* se encuentran publicadas en la solicitud de patente internacional nº WO 92/06200. La secuencia de *Thermatoga neapolitana* puede encontrarse en la publicación de patente internacional nº WO 97/09451.

En el ensayo de 5'-nucleasa, la detección de la amplificación típicamente es concurrente con la amplificación (es decir, "en tiempo real"). En algunas realizaciones, la detección de la amplificación es cuantitativa y la detección de la amplificación es en tiempo real. En algunas realizaciones, la detección de la amplificación es cualitativa (por ejemplo la detección final de la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana). En algunas realizaciones la detección de la amplificación es posterior a la amplificación. En algunas realizaciones, la detección de la amplificación es cualitativa y la detección de la amplificación es posterior a la amplificación.

La sonda puede marcarse con cualquier número de marcajes, aunque típicamente se utiliza un marcaje fluorescente. En algunas realizaciones, la fracción fluoróforo se selecciona de entre el grupo que consiste de pigmentos de la familia de la fluoresceína, pigmentos de la familia de la polihalofluoresceína, pigmentos de la familia de la hexaclorofluoresceína, pigmentos de la familia de la coumarina, pigmentos de la familia de la rodamina, pigmentos de la familia de la cianina, pigmentos de la familia de la oxazina, pigmentos de la familia de la tiazina, pigmentos de la familia de la escuaraina, pigmentos de la familia de los lantánidos quelados, pigmentos de la familia azo, pigmentos de la familia del trifenilmetano y pigmentos de la familia de BODIPY®.

El ensayo con frecuencia comprende una sonda marcada con un marcaje fluorescente y una fracción inhibidora. En algunas realizaciones, la fracción inhibidora se selecciona de entre el grupo que consiste de pigmentos de la familia de la fluoresceína, pigmentos de la familia de la polihalofluoresceína, pigmentos de la familia de la hexaclorofluoresceína, pigmentos de la familia de la coumarina, pigmentos de la familia de la rodamina, pigmentos de la familia de la cianina, pigmentos de la familia de la oxazina, pigmentos de la familia de la tiazina, pigmentos de la familia de la escuaraina, pigmentos de la familia de los lantánidos quelados, pigmentos de la familia de BODIPY®, pigmentos de la familia de azo, pigmentos de la familia del trifenilmetano, fracciones inhibidoras de baja fluorescencia (es decir, "donadores débiles") y fracciones inhibidoras no fluorescentes (por ejemplo los denominados "inhibidores oscuros", incluyendo los Black Hole Quenchers™ (BHQ)).

En una realización, la fracción fluoróforo es un pigmento de la familia de la fluoresceína y la fracción inhibidora es un pigmento de la familia de la cianina. En una realización, la fracción fluoróforo es un pigmento de la familia de la fluoresceína y la fracción inhibidora es un pigmento de la familia de la hexaclorofluoresceína. En una realización, la fracción fluoróforo es un pigmento de la familia de la hexaclorofluoresceína y la fracción inhibidora es un pigmento de la familia de la cianina. En una realización, el inhibidor es un inhibidor oscuro, por ejemplo un BHQ-1, un BHQ-2 ó un BHQ-3 (Biosearch Technologies, Novato, CA). En una realización, la fracción fluoróforo es un pigmento de la familia de la fluoresceína o un pigmento de la familia de la cianina y la fracción inhibidora es un inhibidor oscuro.

Soportes inmovilizados

En algunas realizaciones, la hibridación específica de alelo se lleva a cabo en un formato de ensayo que utiliza una diana inmovilizada o una sonda inmovilizada. Dichos formatos son conocidos de la técnica e incluyen, por ejemplo, formatos de transferencia por puntos y formatos de ensayo de transferencia por puntos inversa, los cuales se describen en las patentes US nº 5.310.893, nº 5.451.512, nº 5.468.613 y nº 5.604.099.

Cebadores específicos de alelo

5 La presencia o la ausencia de una mutación V600E puede detectarse utilizando la amplificación específica de alelo o los métodos de extensión de cebador. Estas reacciones típicamente implican la utilización de cebadores que están diseñados para que presenten como diana específica el sitio mutante (o de tipo salvaje) mediante un desapareamiento en el extremo 3' de un cebador, por ejemplo en el nucleótido 3' o en el penúltimo nucleótido 3'. La presencia de un desapareamiento afecta a la capacidad de una polimerasa de extender un cebador en el caso de que la polimerasa no presente actividad correctora de errores. Por ejemplo, para detectar una secuencia mutante V600E utilizando un método basado en la amplificación específica de alelo o basada en la extensión, un cebador complementario al alelo A mutante en la posición nucleotídica 1.799 en el codón 600 de *BRAF* está diseñado de manera que el nucleótido 3'-terminal se hibride en la posición mutante. La presencia del alelo mutante puede determinarse mediante la capacidad del cebador para iniciar la extensión. En el caso de que el extremo 3' terminal se encuentre desapareado queda impedida la extensión. De esta manera, por ejemplo en el caso de que un cebador sea complementario del nucleótido de alelo mutante en el extremo 3', el cebador resultará extendido eficientemente. 10 15 La amplificación también puede llevarse a cabo utilizando un cebador específico de alelo que sea específico de la secuencia de tipo salvaje de *BRAF* en la posición 1.799.

Típicamente, el cebador se utiliza conjuntamente con un segundo cebador en una reacción de amplificación. El segundo cebador se hibrida en un sitio no relacionado con la posición mutante. La amplificación se produce desde los dos cebadores, conduciendo a un producto detectable, lo que significa que se encuentra presente la forma alélica particular. Los métodos de amplificación específica de alelo o basados en la extensión se describen en, por ejemplo, el documento nº WO 93/22456 y patentes US nº 5.137.806, nº 5.595.890, nº 5.639.611 y nº 4.851.331. 20

Mediante la utilización del genotipado basado en la amplificación específica de alelo, la identificación de los alelos requiere únicamente la detección de la presencia o ausencia de las secuencias diana amplificadas. Los métodos para la detección de secuencias diana amplificadas son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, la electroforesis en gel y los ensayos de hibridación de sondas se utilizan con frecuencia para detectar la presencia de ácidos nucleicos. 25

En un método alternativo sin sondas, el ácido nucleico amplificado se detecta mediante el seguimiento del incremento de la cantidad total de ADN de doble cadena en la mezcla de reacción y se describe en, por ejemplo, la patente US nº 5.994.056 y en las publicaciones de patente europea nº 487.218 y nº 512.334. La detección del ADN diana de doble cadena se basa en la fluorescencia incrementada que diversos pigmentos de unión a ADN, por ejemplo SYBR Green, muestran cuando se encuentran unidos a ADN de doble cadena. 30 35

Tal como apreciará el experto en la materia, los métodos de amplificación específicos de alelo pueden llevarse a cabo en una reacción que utilice múltiples cebadores específicos de alelo con diana en alelos particulares. Los cebadores para dichas aplicaciones multiplex generalmente se marcan con marcajes distinguibles o se seleccionan de manera que los productos de amplificación producidos a partir de los alelos sean distinguibles según el tamaño. De esta manera, por ejemplo, pueden identificarse alelos tanto de tipo salvaje como mutantes V600E en una única muestra utilizando una única reacción de amplificación mediante análisis del gel del producto de amplificación. 40

Un cebador oligonucleotídico específico de alelo puede ser exactamente complementario a uno de los alelos en la región hibridante o puede presentar algunos desapareamientos en posiciones diferentes del extremo 3' del oligonucleotídico. Por ejemplo, el penúltimo nucleótido 3' puede presentar un desapareamiento en un oligonucleotídico específico de alelo. En otras realizaciones, pueden producirse desapareamientos en sitios (no mutantes) en ambas secuencias alélicas. 45

Métodos adicionales de detección de mutaciones de ácidos nucleicos V600E de *BRAF*

50 La presencia (o ausencia) de una mutación V600E también puede detectarse mediante secuenciación directa. Entre los métodos se incluyen los métodos basados en la secuenciación dideoxi y métodos tales como PyrosequencingTM de productos de longitud oligonucleotídica. Dichos métodos con frecuencia utilizan técnicas de amplificación tales como la PCR. Otro método similar para la secuenciación no requiere la utilización de una PCR completa, sino que típicamente utiliza únicamente la extensión de un cebador con una única molécula de ácido dideoxirribonucleico (ddNTP) marcado con fluorescencia que es complementaria al nucleótido que debe investigarse. El nucleótido en el sitio polimórfico puede identificarse mediante la detección de un cebador que ha sido extendido por una base y se encuentra marcado fluorescentemente (por ejemplo Kobayashi *et al.*, Mol. Cell. Probes 9:175-182, 1995). 55

Los productos de amplificación generados utilizando una reacción de amplificación también pueden analizarse mediante la utilización de la electroforesis en gel en gradiente desnaturante: pueden identificarse diferentes alelos basándose en las diferentes propiedades de fusión dependientes de la secuencia y en la migración 60

electroforética del ADN en solución (ver, por ejemplo, Erlich, ed., PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, W.H. Freeman y Co., New York, 1992, capítulo 7).

5 En otras realizaciones, los alelos de secuencias diana pueden diferenciarse utilizando el análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla, que identifica diferencias de bases a partir de la alteración de la migración electroforética de productos de PCR de cadena sencilla, tal como se indica en, por ejemplo, Orita *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 86:2766-2770, 1989. Pueden generarse productos de PCR amplificados tal como se ha indicado anteriormente, y calentarse o desnaturalizarse de otro modo, para formar productos de amplificación de cadena sencilla. Los ácidos nucleicos de cadena sencilla pueden plegarse nuevamente o formar estructuras secundarias que son parcialmente dependientes de la secuencia de bases. Las diferentes movilidades electroforéticas de los productos de amplificación de cadena sencilla pueden relacionarse con las diferencias de secuencia entre alelos de las regiones diana.

15 Los métodos utilizados para detectar la presencia de una mutación V600E en *BRAF* típicamente utilizan oligonucleótidos marcados, por ejemplo marcajes fluorescentes, tal como se ha indicado anteriormente. Los oligonucleótidos pueden marcarse mediante la incorporación de un marcaje detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Entre los marcajes útiles se incluyen pigmentos fluorescentes, marcajes radioactivos, por ejemplo ³²P, reactivos electrodensos, enzimas, tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina, biotina, o haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales. Las técnicas de marcaje son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*: Sambrook y Russell, *supra*).

Detección de variantes de proteínas

25 Una mutación V600E en B-Raf también puede detectarse mediante métodos que discriminan entre B-Raf de tipo salvaje y mutante. Con frecuencia estos métodos utilizan un anticuerpo específico para B-Raf mutante.

30 Puede encontrarse una vista general de la tecnología aplicable en Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) y Harlow & Lane, Using Antibodies (1999). Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con una variante alélica son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology, 1991; Harlow y Lane, *supra*; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2a ed. 1986), y Kohler y Milstein, Nature 256:495-497, 1975). Entre dichas técnicas se incluyen la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante la inmunización de conejos o ratones (ver, por ejemplo, Huse *et al.*, Science 246:1275-1281, 1989; Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989).

40 La proteína B-Raf mutante puede detectarse mediante una diversidad de métodos de inmunoensayo. Para una revisión de los procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo, ver Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr, editores, 7a ed., 1991). Además, los inmunoensayos de la presente invención pueden llevarse a cabo en cualquiera de entre varias configuraciones, las cuales se revisan extensamente en Enzyme Immunoassay (Maggio, ed., 1980) y en Harlow y Lane, *supra*. Para una revisión de los inmunoensayos generales, ver también Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volumen 37 (Asai, ed., 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr, eds., 7a ed., 1991).

45 Entre los ensayos utilizados comúnmente se incluyen ensayos no competitivos, por ejemplo ensayos de tipo sándwich y ensayos competitivos. Típicamente puede utilizarse un ensayo tal como un ensayo ELISA. La cantidad del polipéptido variante puede determinarse llevando a cabo análisis cuantitativos.

50 Pueden utilizarse otras técnicas de detección, por ejemplo MALDI, para detectar directamente la presencia de V600E en B-Raf.

Se obtiene una muestra para el análisis de las células de cáncer, por ejemplo de tejido tumoral, procedente del paciente.

55 Tratamiento

60 El método de detección de mutaciones dado a conocer en la presente memoria puede incluir la utilización de software de análisis de datos que informará al usuario de si el paciente debería ser tratado o no con un inhibidor de B-Raf, tal como un inhibidor de B-Raf específico de mutación, por ejemplo PLX4032, basándose en la presencia o ausencia, respectivamente, de la mutación V600E de B-Raf.

Un paciente que se ha determinado que es positivo para la presencia de una mutación en la posición aminoácida 600, por ejemplo una mutación V600E, es un candidato para el tratamiento con un inhibidor de B-Raf quinasa, por ejemplo un inhibidor de B-Raf quinasa específico de mutante tal como PLX4032. Se describen diversos inhibidores de B-Raf quinasa, incluyendo los inhibidores de B-Raf quinasa específicos de mutante, en, por ejemplo, los documentos n° WO 2007/002325 y n° WO 2007/002433. PLX4032 se denomina en los documentos n° WO 2007/002433 y n° WO 2007/002325, "P-0956".

Puede encontrarse una guía para la administración de los inhibidores de B-Raf quinasa, por ejemplo de un inhibidor de B-Raf quinasa específico de mutante, en, por ejemplo, los documentos n° WO 2007/002325 y n° WO 2007/002433. Las formas de dosificación adecuadas dependerán en parte de la utilización o vía de administración, por ejemplo oral, transdérmica, transmucosal, por inhalación o mediante inyección (parenteral). Dichas formas de dosificación deberían permitir que el compuesto alcance las células diana. Otros factores son bien conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen consideraciones tales como la toxicidad y formas de dosificación que retrasan que el compuesto o la composición ejerza sus efectos. Las técnicas y formulaciones generalmente pueden encontrarse en *The Science and Practice of Pharmacy*, 21a edición, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 2005.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores o excipientes. Los portadores o excipientes pueden seleccionarse para facilitar la administración del compuesto. Entre los ejemplos de portadores se incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, tales como lactosa, glucosa o sacarosa, o tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y solventes fisiológicamente compatibles. Entre los ejemplos de solventes fisiológicamente compatibles se incluyen soluciones estériles de agua para inyección (API), solución salina y dextrosa.

Los compuestos pueden administrarse por diferentes vías, incluyendo las vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, transmucosal, rectal, transdérmica o por inhalación. En algunas realizaciones, el inhibidor de B-Raf quinasa específico se administra por vía oral. Para la administración oral, por ejemplo, los compuestos pueden formularse en formas de dosificación oral convencionales, tales como cápsulas, tabletas y preparaciones líquidas, tales como jarabes, elixires y gotas concentradas.

Para los inhalantes, los inhibidores de B-Raf pueden formularse en forma de polvos secos o en una solución, suspensión o aerosol adecuado. Los polvos y soluciones pueden formularse con aditivos adecuados conocidos de la técnica. Por ejemplo, los polvos pueden incluir una base de polvos adecuada, tal como lactosa o almidón, y las soluciones pueden comprender propilenglicol, agua estéril, etanol, cloruro sódico y otros aditivos, tales como ácidos, álcalis y sales tamponadoras. Dichas soluciones o suspensiones pueden administrarse mediante la inhalación mediante spray, bomba, atomizador o nebulizador, y similar.

Alternativamente, los inhibidores de B-Raf pueden inyectarse (administración parenteral), por ejemplo por vía intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y/o subcutánea. Para la inyección, los inhibidores se formulan en soluciones líquidas estériles, preferentemente en tampones o soluciones fisiológicamente compatibles, tales como solución salina, solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de la utilización. También pueden producirse formas liofilizadas.

La administración también puede ser por medios transmucosales, tópicos o transdérmicos. Para la administración transmucosal, tópica o transdérmica, en la formulación se utilizan agentes penetrantes apropiados a la barrera. Dichos agentes penetrantes son generalmente conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo para la administración transmucosal, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Además, pueden utilizarse detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosal puede realizarse, por ejemplo, mediante sprays nasales o supositorios (rectales o vaginales). Las composiciones tópicas de la presente invención se formulan preferentemente como aceites, cremas, lociones, pomadas y similares mediante la selección de portadores apropiados conocidos de la técnica. Entre los portadores adecuados se incluyen aceites vegetales o minerales, petrolato blanco (parafina blanca), grasas o aceites de cadena ramificada, grasas animales y alcohol de alto peso molecular. Los portadores preferentes son aquellos en los que el ingrediente activo es soluble. Los emulsionantes, estabilizadores, humectantes y antioxidantes también pueden incluirse como agentes que proporcionen color o fragancia, si se desea. Las cremas para la aplicación tópica pueden formularse a partir de una mezcla de aceite mineral, cera de abeja autoemulsionante y agua en la que se mezcla el ingrediente activo, disuelto en una cantidad reducida de solvente (por ejemplo un aceite). Adicionalmente, la administración por vía transdérmica puede comprender un parche o vendaje transdérmico, tal como una venda impregnada con un ingrediente activo y opcionalmente uno o más portadores o diluyentes conocidos de la técnica. Para la administración en forma de un sistema de administración transdérmica, la administración de la dosis evidentemente será continua y no intermitente durante el régimen de dosificación.

Las cantidades de los diversos compuestos que deben administrarse pueden determinarse mediante procedimientos estándares, considerando factores tales como la IC₅₀ del compuesto, el tiempo de vida biológica medio del

compuesto, la edad, tamaño y peso del sujeto y diversos otros parámetros asociados al mismo. La importancia de estos factores y de otros factores es bien conocida por el experto ordinario en la materia. Generalmente una dosis será de entre aproximadamente 0,01 y 50 mg/kg, preferentemente de entre 0,1 y 20 mg/kg del sujeto bajo tratamiento. Pueden utilizarse dosis múltiples.

5

También pueden utilizarse inhibidores de B-Raf conjuntamente con otras terapias para el cáncer.

Kits

10 La invención proporciona además kits que comprenden componentes útiles para la puesta en práctica de los métodos, que comprenden una sonda específica de alelo que comprende SEC ID nº 1, en la que 'n' es desoxiinosina. En algunas realizaciones, el kit puede comprender una o más sondas oligonucleótidas que son específicas para el mutante o alelo V600E. Dicho kit puede contener además cebadores de amplificación para amplificar una región del locus *BRAF* que comprende el sitio de mutación V600E. De esta manera, en algunas realizaciones, un kit de comprende el juego de cebadores siguiente:

15

TTS068-BRAF_F1: 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTE 3' (E= t-butilbencil-dA) (SEC ID nº 25) y
RL_BRAF_R5: 5' TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAA 3' (SEC ID nº 4),

20

que amplifica una región diana de *BRAF*. El kit puede comprender además sondas, tales como sondas específicas de alelo. Son ejemplos de sondas específicas de alelo que pueden utilizarse en un kit de la invención los siguientes:

TTS155-BRAF_MU 5' QCTACAIAIFAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEC ID nº 23)
TTS 148-BRAF_WT 5' QACAITGEEAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEC ID nº 24).

25

Un kit puede comprender además cebadores y/o sondas que son sustancialmente idénticas a los oligonucleótidos indicados. En algunas realizaciones, un kit para la utilización en la invención comprende uno o más oligonucleótidos que comprenden por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 y/o SEC ID nº 4.

30

Entre otros componentes opcionales de los kits se incluyen reactivos adicionales para determinar la presencia de sustituciones de nucleótidos. Por ejemplo, un kit puede contener una polimerasa, sustratos nucleósidos trifosfato y tampones apropiados para las reacciones de amplificación, e instrucciones para llevar a cabo el presente método. Entre otros componentes de un kit pueden incluirse reactivos y protocolo de extracción de ADN y cofactor ión divalente. El tampón puede incluir, por ejemplo, UNG. En algunas realizaciones, el tampón puede incluir aptámero.

35

Un kit puede incluir además controles, tales como controles de ADN V600E.

Ejemplos

40

Detección de la mutación V600E de B-Raf

El presente ejemplo muestra un ensayo diagnóstico basado en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real para la medición de la mutación V600E de B-Raf (*BRAF* nucleótido 1.799 T>A) en ADN genómico extraído de tejidos tumorales de cáncer fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE). En el presente ejemplo, el ADN genómico extraído del tejido FFPE se sometió a ensayo mediante análisis de PCR TaqMan. Para la reacción de PCR, se preparó una mezcla maestra mediante la combinación de mezcla de reacción de ARN TaqMan, mezcla de cebadores-sondas y cofactor acetato de magnesio (Mg(OAc)₂). La amplificación se llevó a cabo utilizando 125 ng de ADN genómico. Se detectaron los productos de amplificación utilizando un analizador COBAS TaqMan 48.

50

Se amplificó la región genómica que contenía el sitio V600E de B-Raf (*BRAF* 1.799 T>A) en el exón 15, produciendo un ADN de doble cadena de 116 pares de bases (amplicón). La reacción de amplificación se llevó a cabo durante 55 ciclos. El sistema de amplificación y detección medía, en tiempo real, las cantidades de productos de PCR generadas en cada ciclo de amplificación mediante la medición de la señal fluorescente resultante del corte de las sondas específicas de diana. Las sondas específicas de diana de B-Raf de tipo salvaje (WT, V600) y de la mutación V600E de B-Raf se marcaron, cada una, con un pigmento informador diferente. La medición de la fluorescencia a longitudes de onda específicas emitida por dichos pigmentos informadores durante cada ciclo de amplificación permitió identificar los amplicones B-Raf WT y V600E en un único tubo de reacción. Tras alcanzar la señal fluorescente de cada pigmento informador un nivel umbral predefinido, se calcularon los valores de ciclo umbral (Ct) para el alelo WT y el alelo con mutación V600E en la reacción multiplex.

60

Se diseñaron cebadores de *BRAF* para amplificar una región del exón 15 de *BRAF* de 115 pares de bases (pb). Utilizando la herramienta BLAT de búsqueda en el genoma de UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi->

bin/hgBlat?command=start) en el genoma humano, ensamblaje de marzo de 2006, el exón 15 de *BRAF* presentaba una homología de 93,4% con la secuencia del cromosoma X (chrX) chrX:74721094-74721213, un pseudogén aparente. Se utilizó un cebador inverso que incluía una parte del intrón 15 de *BRAF* para amplificar específicamente la secuencia de *BRAF* deseada. Tal como se muestra en la figura 1, el cebador inverso presentaba una homología de únicamente 55,6% (15 de 27 nucleótidos) con la secuencia del cromosoma X. Las sondas en la mezcla de cebadores-sondas de *BRAF* eran complementarias a la cadena de amplicón resultante de la extensión de dicho cebador inverso, garantizando adicionalmente que el resultado de ensayo era específico de la secuencia de *BRAF*.

Se sintetizaron cebadores en un sintetizador de ADN ABI 394 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) utilizando fosforamiditas desoxinucleótido estándares, dicianoimidazol (DCI) como activador y ciclos de síntesis estándares (con modificaciones menores) en la orientación 3' a 5' convencional en una fase sólida de soporte de vidrio de poro controlado (VPC). Se introdujo el 3'-t-butil-bencil-dA como nucleósido modificado, como parte del VPC (Roche Applied Sciences, Penzberg, Alemania) utilizado como el soporte sólido para la síntesis de ADN. Tras la adición de la última base, se eliminó el grupo protector 5'-dimetoxitritilo (DMT) en el sintetizador y el oligonucleótido se desprotegió con hidróxido amónico a 55°C durante 16 horas. El oligonucleótido en bruto se evaporó para eliminar el amonio y se purificó utilizando una columna de cromatografía líquida a alta presión (HPLC) de intercambio aniónico fuerte Mono-Q HR 16/10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) con un gradiente lineal de cloruro sódico a pH elevado. Las fracciones se analizaron utilizando una columna de intercambio iónico DNAPac PA100 (Dionex Inc., Sunnyvale, CA) y se agruparon utilizando un criterio de pureza mínima de >90%. Las fracciones agrupadas se desalaron y se formularon en Tris 10 mM, pH 8,0. Se sintetizaron los cebadores siguientes para la reacción de PCR:

TTS068-BRAF_F1: 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTE 3' (E= t-butilbencil-dA) (SEC ID nº 25) y
RL_BRAF_R5: 5'TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA 3' (SEC ID nº 4).

Se sintetizaron sondas TaqMan en un sintetizador de ADN ABI 394 (Applied Biosystems Inc.) utilizando fosforamiditas desoxinucleótido ultrasuaves (Pierce Biotechnology, Milwaukee, WI), DCI como activador y ciclos de síntesis estándares (con modificaciones menores) en la orientación 3' a 5' convencional en una fase sólida de soporte de VPC. Se incorporó marcaje fluorescente, cx-FAM (6-carboxifluoresceína, Biogenex Inc.) o cx-HEX (6-carboxihexaclorofluoresceína (Biogenex Inc., San Ramon, CA) e inhibidor Black Hole (BHQ-2) (Biosearch Inc., Novato, CA) utilizando reactivos fosforamidita y ciclos de acoplamiento de 10 minutos. Se introdujo el 3'-fosfato mediante VPC bloqueante de la extensión de 3' (Clontech Inc., Mountain View, CA). Tras la síntesis, se eliminó el grupo protector DMT en el sintetizador y el oligonucleótido se desprotegió con hidróxido amónico a temperatura ambiente durante 16 horas. El oligonucleótido en bruto se purificó utilizando una columna HPLC de intercambio aniónico fuerte Mono-Q HR 16/10 (Amersham Biosciences) con un gradiente lineal de cloruro sódico. Las fracciones se analizaron utilizando una columna de intercambio iónico DNAPac PA100 (Dionex Inc., Sunnyvale, CA) y se agruparon utilizando un criterio de pureza mínima de >90%. Las fracciones agrupadas se desalaron y se formularon en tampón de almacenamiento de sondas que comprendía tricina 80 mM, pH 8,2, acetato potásico 240 mM, EDTA 0,1 mM y azida sódica al 0,09%. Las sondas Taqman[®] eran:

V600E (TTS155-BRAF_MU): 5'
QCTACAIAIFAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEC ID nº 23)
de tipo salvaje (TTS148-BRAF_WT): 5'
QACAITGEAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEC ID nº 24)
(E = pigmento informador HEX, F= pigmento informador FAM, I = deoxiinosina, Q = pigmento inhibidor BHQ2, P= 3'-fosfato).

La reacción de amplificación incluía además AmpErase (uracil-N-glucosilasa, UNG) y desoxiuridina trifosfato (dUTP). AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina pero no ADN que contiene timidina. La desoxiuridina no se encuentra presente en el ADN naturalmente, pero se encuentra presente siempre en el amplicón debido a la utilización de desoxiuridina fosfato en lugar de timidina fosfato como uno de los dNTP en la mezcla de reactivos de reacción de PCR. La incorporación de UNG en la mezcla de reacción minimiza la contaminación cruzada de los amplicones. AmpErase no degradará el amplicón diana, sondas y kits de ensayo.

DetECCIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La mezcla de cebador-sonda de *BRAF* utilizada en el presente análisis contenía dos sondas fluorescentes de marcaje dual que eran específicas para las secuencias de nucleótidos codificantes de B-Raf WT o V600E, respectivamente, permitiendo la detección en tiempo real de la acumulación de productos de PCR específicos mediante la liberación de señal fluorescente durante el procedimiento de amplificación. Las sondas B-Raf WT y V600E se marcaron con diferentes pigmentos informadores fluorescentes y el mismo pigmento inhibidor. En el caso de que las sondas se encuentren intactas, la fluorescencia del pigmento informador resulta suprimida por el pigmento inhibidor debido a la transferencia de energía de tipo Förster. Durante la PCR, cada sonda se hibrida de una manera dependiente de la secuencia con su secuencia diana y resulta cortada por la actividad de 5'-nucleasa de

la ADN polimerasa Z05, separando los dos pigmentos. Tras separar los pigmentos informador e inhibidor, resulta detectable la fluorescencia del pigmento informador. En cada ciclo de PCR se genera más amplicón, incrementándose efectivamente la señal acumulada del pigmento informador. Se realizó un seguimiento independiente de la amplificación de las secuencias de B-Raf WT y V600E mediante la medición de cada sonda en su intervalo de longitudes de onda de emisión específico correspondiente durante cada ciclo.

Cada muestra de ADN genómico se amplificó en una reacción de 100 µl que comprendía 50 µl de una mezcla maestra de trabajo que se preparó mediante la adición de 17 µl de mezcla de cebador-sonda y 13 µl de cofactor Mg(OAc)₂ 25 mM a 20 µl de mezcla de reacción de ARN TaqMan por cada muestra. Se añadió una muestra de ADN genómico (125 ng) a un volumen de 50 µl a la mezcla maestra de trabajo. Se amplificó cada muestra por duplicado. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo las condiciones mostradas en la Tabla 1. Cada operación incluía una reacción de control positivo para V600E y una reacción de control positivo de tipo salvaje, así como una reacción de control negativo.

Tabla 1: Perfil de ciclado térmico

Etapa	Descripción	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	Descontaminación de UNG	50°C	5 min.	1X
2	Desnaturalización preciclado	95°C	1 min.	1X
3	Desnaturalización 1	95°C	15 s	2X
	Hibridación/Extensión 1	61°C	30 s	
4	Desnaturalización 2	92°C	15 s	53X
	Hibridación/Extensión 2	61°C	30 s	
5	Mantenimiento post-ciclado	40°C	2 min.	1X

Análisis de los datos

Se calcularon los valores de Ct para B-Raf V600E (canal 1) y WT (canal 2) con el software AmpliLink 3.1 en la estación de trabajo analizador COBAS TaqMan 48. Los valores de Ct de las reacciones de control negativo y positivo se utilizaron para determinar si una operación era válida. La Tabla 2 lista los valores de Ct aceptables para cada reacción de control.

Tabla 2: Valores de Ct aceptables para las reacciones de control

a.	b. Canal 1 c. (sonda FAM, V600E)*	d. Canal 2 e. (sonda HEX, WT)*
f. Negativo	g. Ct = -1	h. Ct = -1
i. Control positivo nº 1 (plásmido V600E)	j. Ct entre 29 y 33	k. C = -1
1. Control positivo nº 2 (plásmido WT)	m. Ct = -1	n. Ct entre 28 y 32
* Un valor de Ct de -1 indica que no se detectaba amplificación significativa.		

Para las operaciones válidas, se evaluó el valor de Ct para cada muestra frente a los intervalos aceptables para cada canal que había sido definido mediante estudios de rendimiento analítico. La Tabla 3 proporciona un ejemplo de cómo cada pareja de valores de Ct se traduce en un resultado de estado de mutación V600E de B-Raf.

Tabla 3: Tabla de valores de Ct para asignar el estado de V600E.

o. Canal 1 p. (sonda FAM, V600E)*	q. condicional	r. Canal 2 s. (sonda HEX, WT)*	t. estado de V600E
u. Ct = -1	v. y	w. Ct	x. Negativo
y. 15 ≤ Ct ≤ 50	z. y	aa. 15 ≤ Ct ≤ 40	bb. Positivo
cc. Ct <15 or >50	dd. o	ee. Ct <15 or >40	ff. Indeterminado
* Un valor de Ct de -1 indica que no se detectaba amplificación significativa. Clave: E = pigmento informador HEX, F= pigmento informador FAM, I = dextroinosina, Q = pigmento inhibidor BHQ2, P= 3'-fosfato			

Se evaluaron las muestras siguientes. Los resultados de la PCR TaqMan[®] se validaron mediante secuenciación.

Tabla 4. Características de las muestras clínicas

ID de muestra	Diagnóstico	% tumores
M1	ETAPA DE CRECIMIENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMARIO	60
M2	MELANOMA	95

M3	ETAPA DE CRECIMIENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMARIO	75
M4	MELANOMA,	50
M5	ETAPA DE CRECIMIENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMARIO	85
M6	ETAPA DE CRECIMIENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMARIO	90
M7	MELANOMA	90
M8	ETAPA DE CRECIMIENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMARIO	90
M9	ETAPA DE CRECIMIENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMARIO	90
M10	ETAPA DE CRECIMIENTO RADIAL DE MELANOMA PRIMARIO	95
RM1	Melanoma metastásico (LN)	10
RM2	Melanoma metastásico (LN)	45
RM3	Melanoma metastásico (LN)	30
RM4	Melanoma metastásico (LN)	10
RM5	Melanoma metastásico (LN)	50
RM6	Melanoma metastásico (LN)	30
RM7	Melanoma metastásico (LN)	50
RM8	Melanoma metastásico (LN)	40
RM9	Melanoma metastásico (LN)	40
RM10	Melanoma metastásico (LN)?	10
RM11	Melanoma metastásico (LN)	75
RM12	Melanoma metastásico (LN)	55
RM13	Melanoma metastásico (LN)	30
RM14	Melanoma metastásico	50
RM15	Melanoma metastásico (LN)	80
RM16	Melanoma metastásico (LN)	45
RM17	Melanoma metastásico (LN)	50
RM18	Melanoma metastásico (LN)	50
RM19	Melanoma metastásico (LN)	50
RM20	Melanoma metastásico (LN)	35

Se extrajo ADN de treinta especímenes FFPE de melanoma (Tabla 4). Las muestras resultantes contenían una mezcla de ADN procedente tanto de células tumorales como células normales. Los resultados de detección de mutación del ensayo TaqMan® en comparación con la pirosecuenciación y la secuenciación GS20 se muestran en la Tabla 5.

5

Tabla 5 Estado de V600E determinando mediante tres métodos independientes

ID de muestra	TaqMan®	Pirosecuenciación	Secuenciación GS20
M1	negativo	negativo	negativo
M2	negativo	negativo	negativo
M3	negativo	fallo	negativo
M4	positivo	positivo	positivo
M5	positivo	positivo	positivo
M6	positivo	positivo	positivo
M7	positivo	positivo	positivo
M8	negativo	negativo	negativo
M9	negativo	negativo	negativo
M10	negativo	negativo	negativo
RM1	negativo	fallo	negativo
RM2	negativo	negativo	negativo
RM3	positivo	negativo	positivo
RM4	negativo	negativo	negativo
RM5	positivo	positivo	positivo
RM6	positivo	negativo	positivo
RM7	negativo	negativo	negativo
RM8	positivo	negativo	positivo
RM9	negativo	negativo	negativo
RM10	negativo	negativo	negativo
RM11	negativo	negativo	negativo
RM12	negativo	negativo*	negativo
RM13	negativo	negativo*	negativo

RM14	positivo	positivo*	positivo
RM15	positivo	positivo	positivo
RM16	positivo	positivo	positivo
RM17	positivo	negativo*	positivo
RM18	negativo	negativo	negativo
RM19	negativo	negativo	negativo
RM20	negativo	negativo	negativo
* Interpretación manual.			

5 Las muestras M3 y RM1 no consiguieron amplificarse mediante pirosecuenciación, ni siquiera tras una segunda extracción; ambas muestras se denominaron V600E-negativas (WT) según los métodos TaqMan® y GS20. Cuatro
 10 muestras requirieron una interpretación manual en la pirosecuenciación: para RM17, el resultado de la pirosecuenciación fue V600E-negativo, mientras que los resultados de tanto TaqMan® como GS20 indicaron que la muestra era V600E-positiva; en los tres casos restantes, los tres métodos proporcionaron resultados concordantes. Tres muestras adicionales (RM3, RM6 y RM8) resultaron V600E-negativas según la pirosecuenciación, mientras que resultaron V600E-positivas según los métodos TaqMan® y GS20. Estos resultados son consistentes con un rendimiento insuficiente de ADN que contiene mutación de RM3, RM6, RM8 y RM17 para la detección de mutación mediante pirosecuenciación. La muestra RM8 era V600E-positiva en 4% de las 4.300 lecturas de secuenciación GS20 (~2000 en cada dirección), el porcentaje más bajo de *BRAF* mutado observado entre todas las muestras V600E-positivas.

15 Debido a la mayor sensibilidad de la secuenciación GS20 en comparación con la pirosecuenciación, se utilizó el método GS20 como el método de referencia para el ensayo TaqMan®. El nivel de concordancia entre el ensayo COBAS TaqMan® de B-Raf V600E y la secuenciación GS20 fue de 12/12=100% para las muestras V600E-positivas y 18/18=100% para las muestras V600E-negativas (WT).

20 Secuencias ejemplares:

SEC ID nº 1 BRAF_MU (I = dexoxiinosina P= 3'-fosfato)
 5' CTACAIAIAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'

25 SEC ID nº 2 BRAF_WT (I = dexoxiinosina P= 3'-fosfato)
 5' ACAITGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'

SEC ID nº 3 BRAF_F1:
 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCT 3'

30 SEQ ID NO:4 BRAF_R5:
 5' TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA 3'

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
 F. Hoffmann-La Roche AG

40 <120> ENSAYO DIAGNÓSTICO DE SENSIBILIDAD A LOS INHIBIDORES DE B-RAF QUINASA
 <130> 24003 EP-HS

<140> Todavía no asignado
 <141> Todavía no asignado

45 <150> US 60/993,391
 <151> 2007-09-11

<160> 24

50 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 31
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sonda BRAF_MU sintética
 5
 <221> base modificada
 <222> (6)...(6)
 <223> n= desoxiinosina
 10
 <221> base modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> n= desoxiinosina
 15
 <221> base modificada
 <222> (31)...(31)
 <223> a = a con 3'-fosfato
 <400> 1
 ctacananaa atctcgatgg agtgggtccc a 31
 20
 <210> 2
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> sonda BRAF_WT sintética
 <221> base modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> n = desoxiinosina
 30
 <221> base modificada
 <222> (29)...(29)
 <223> a = a con 3'-fosfato
 35
 <400> 2
 acantgaaat ctcgatggag tgggtccca 29
 40
 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cebador BRAF_F1 sintético
 <400> 3
 cctcacagta aaaataggtg attttgtct 30
 50
 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> cebador BRAF_R5 sintético
 <400> 4
 tagcctcaat tcttaccatc cacaaaa 27
 60
 <210> 5
 <211> 116

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> secuencia de amplicón B-Raf V600E sintético

<400> 5

```

    cctcacagta aaaataggtg attttggctct agctacagtg aaatctcgat ggagtgggtc 60
    ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg gtaagaattg aggcta 116
    
```

<210> 6
 <211> 116
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> secuencia de cromosoma X de Homo sapiens correspondiente de B-Raf

<400> 6

```

    cctcacagtg gaaataggtg attttggctct agccacagtg aaatcttgat ggagtgggtc 60
    ccatcagttt gaacagttgt ctggatcttt tttgtgtatg gcaccagaag tcatca 116
    
```

<210> 7
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <223> región del exón 15 de B-Raf circundante al codón 600

<400> 7

```

    Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly
     1           5           10           15
    Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln
           20           25           30
    Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met
           35           40
    
```

35 <210> 8
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <223> región A-Raf

<400> 8

```

    Asn Ile Phe Leu His Glu Gly Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly
     1           5           10           15
    Leu Ala Thr Val Lys Thr Arg Trp Ser Gly Ala Gln Pro Leu Glu Gln
           20           25           30
    Pro Ser Gly Ser Val Leu Trp Met
           35           40
    
```

45 <210> 9
 <211> 40
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

ES 2 471 097 T3

<220>
 <223> región C-Raf

<400> 9

5 Asn Ile Phe Leu His Glu Gly Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser Gln Gln Val Glu Gln
 20 25 30
 Pro Thr Gly Ser Val Leu Trp Met
 35 40

<210> 10
 <211> 116
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> RAF1, codifica C-Raf

15 <400> 10

 cttaacagtg aaaattggag attttggtt ggcaacagta aagtcacgct ggagtggttc 60
 tcagcagggt gaacaâccta ctggctctgt cctctggatg gtgagaatct gggctc 116

20 <210> 11
 <211> 116
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <223> ARAF, codifica A-Raf

<400> 11

30 gctcacggtg aagatcggtg actttggctt ggccacagtg aagactcgat ggagcggggc 60
 ccagcccttg gagcagccct caggatctgt gctgtggatg gtgagttggg ccaggc 116

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

40 <400> 12
 aaatagcctc aattcttacc atccacaaaa 30

<210> 13
 <211> 27
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <220>
 50 <223> cebador inverso BRAF sintético

<400> 13
 tagcctcaat tcttaccatc cacaaaa 27

55 <210> 14

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

5 <220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

<221> base modificada
 <222> (26)...(26)
 10 <223> a = a con 6-carboxihexaclorofluoresceína (HEX)

<400> 14
 tagcctcaat tcttaccatc cacaaa 26

15 <210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

<400> 15
 agggccaaaa atttaacag tggaaaaa 28

25 <210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

<400> 16
 35 cagtggaaaa atagcctcaa ttctacca 29

<210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador directo BRAF sintético

45 <221> base modificada
 <222> (29)...(29)
 <223> t = t con 6-carboxihexaclorofluoresceína (HEX)

<400> 17
 50 tttctcatg aagacctcac agtaaaaat 29

<210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador directo BRAF sintético

60 <221> base modificada
 <222> (30)...(30)
 <223> a = a con 6-carboxihexaclorofluoresceína (HEX)

<400> 18
 atatattct tcatgaagac ctcacagtaa 30

5 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

<400> 19
 atgactctg gtgcatcca caa 23

15 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

<400> 20
 aaaaatagcc tcaattcta ccatccaca aa 32

25 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

<400> 21
 gccatccaca aatgatcc agaca 25

35 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador inverso BRAF sintético

45 <400> 22
 caaatggat ccagacaact gtcaaa 27

<210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> sonda TTS155-BRAF_MU sintética

55 <221> base modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> n = desoxiinosina unida a 3' del esqueleto desoxirribosa fosfato modificado con FAM unido al 3' del oligonucleótido 5'CTACAIA3', en el que 5' C es modificado por el inhibidor BHQ2 e l = desoxiinosina

60 <221> base modificada
 <222> (24)...(24)

<223> a = a con 3'-fosfato

<400> 23
naaatctcga tggagtgggt ccca 24

5

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

10

<220>
<223> sonda TTS148-BRAF_WT sintética

<221> base modificada

15 <222> (1)...(1)
<223> n = g unida a 3' del esqueleto desoxirribosa fosfato modificado con HEX unido al 3' del oligonucleótido 5'ACAIT3', en el que 5' A es modificado por el inhibidor BHQ2 e I = desoxiinosina

<221> base modificada

20 <222> (24)...(24)
<223> a = a con 3'-fosfato

<400> 24
naaatctcga tggagtgggt ccca 24

25

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

30

<220>
<223> cebador TTS068-BRAF_F1 sintético

<221> base modificada

35 <222> (30)...(30)
<223> t = t con t-butil-bencil-dA

<400> 30
cctcacagta aaaataggtg attttggct 30

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar la sensibilidad de las células de cáncer a un inhibidor de B-Raf quinasa, comprendiendo el método:
 - obtener una muestra de ácidos nucleicos a partir de células de cáncer de un paciente que presenta un cáncer,
 - amplificar una secuencia polinucleotídica diana en la muestra de ácidos nucleicos utilizando una pareja de cebadores que amplifica la secuencia polinucleotídica diana, en la que la secuencia polinucleotídica diana comprende un sitio de mutación V600E, V600E o V600K en *BRAF* y la amplificación se lleva a cabo en presencia de una sonda oligonucleotídica marcada que comprende SEC ID nº 1, en la que 'n' es desoxiinosina y detecta la presencia de una secuencia mutada en el sitio de mutación V600E, V600D o V600K en *BRAF*, y - detectar la presencia o ausencia de una mutación V600E, V600E o V600K en *BRAF*, determinando de esta manera la sensibilidad del cáncer al inhibidor de B-Raf.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la amplificación se lleva a cabo en presencia de una segunda sonda que detecta la presencia de una secuencia de tipo salvaje en el sitio de mutación V600E, V600D o V600K.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que la segunda sonda comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 2.
- 25 4. Método según la reivindicación 1, en el que uno de los cebadores en la pareja de cebadores comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3.
5. Método según la reivindicación 1, en el que uno de los cebadores en la pareja de cebadores comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 4.
- 30 6. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de amplificar la reacción comprende una RT-PCR.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de B-Raf quinasa es un inhibidor de B-Raf quinasa específico de mutante.
8. Método según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de B-Raf quinasa es PLX4032.
- 35 9. Kit para detectar un paciente que es un candidato para el tratamiento con un inhibidor de B-Raf, en el que el kit comprende una primera sonda específica de alelo, en el que la primera sonda resulta adecuada para detectar una mutación V600E, V600D o V600K en *BRAF* y que comprende la secuencia indicada en SEC ID nº 1, en la que 'n' es desoxiinosina.
- 40 10. Kit según la reivindicación 9, que comprende además una segunda sonda específica de alelo, en el que la segunda sonda detecta la secuencia de *BRAF* de tipo salvaje y comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 2.
- 45 11. Kit según la reivindicación 9, que comprende además una pareja de cebadores que amplifica una región diana de *BRAF* que comprende un sitio de mutación V600E, V600D o V600K.
- 50 12. Kit según la reivindicación 11, en el que la pareja de cebadores comprende un cebador que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3.
13. Kit según la reivindicación 11, en el que la pareja de cebadores comprende cebadores que presentan las secuencias indicadas en SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.
- 55 14. Kit según la reivindicación 9, en el que la primera sonda presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 1 y el kit comprende además una segunda sonda que presenta la secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 2 y una pareja de cebadores que presentan las secuencias de nucleótidos indicadas en SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.

Figura 1

Cebador BRAF_F1

```

amplicón BRAF CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGGAAATCTCGAT 00000050
>>>>>>>> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | >>>>>>>>
ChrX 74721113 CCTCACAGTGGAATAGGTGATTTTGGTCTAGCCACAGTGAAATCTTGAT 74721163

```

V600

Cebador BRAF_R5

```

BRAF 00000051 GGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 00000100
>>>>>>>> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | >>>>>>>>
ChrX 74721163 GGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCTTTTTGTGTATG 74721212

```

Cebador BRAF_R5

```

BRAF 00000101 gtaagaattgaggcta 00000116
>>>>>>>> | | | | | | | | | | >>>>>>>>
ChrX 74721213 gcaccagaagtcatca 74721228

```

Figura 2

```

↓
B-Raf : NIFLHEDLTVKIGDFGLATVKSRWSGSHQFEQLSGSILWM
      *              *      * * * *      *      *
A-Raf : NIFLHEGLTVKIGDFGLATVKTRWSGAQPLEQPSGSVLWM

↓
B-Raf : NIFLHEDLTVKIGDFGLATVKSRWSGSHQFEQLSGSILWM
      *              *      * *      * *      *
C-Raf : NIFLHEGLTVKIGDFGLATVKSRWSGSQQVEQPTGSVLWM

```

Figura 3

