

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 678**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11767970 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2622348**

54 Título: **Medios y métodos para diagnosticar cáncer mediante el empleo de un anticuerpo que se une específicamente a BRAF V600E**

30 Prioridad:

**01.07.2011 US 201161503950 P**

**30.09.2010 US 388158 P**

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

**22.12.2015**

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM  
(50.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280**

**69120 Heidelberg, DE y**

**RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VON DEIMLING, ANDREAS;**

**CAPPER, DAVID y**

**ZENTGRAF, HANSWALTER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 554 678 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**

Medios y métodos para diagnosticar cáncer mediante el empleo de un anticuerpo que se une específicamente a BRAF V600E

5 La presente invención se refiere al campo de las pruebas y técnicas de diagnóstico. Se contempla específicamente un método para diagnosticar cáncer en una muestra de un sujeto posiblemente afectado de esta enfermedad, que consiste en poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 de un polipéptido BRAF en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo al epítipo y su determinación, mediante la cual se diagnostica el cáncer. Asimismo se contempla un anticuerpo que se une específicamente al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 de un polipéptido BRAF y un dispositivo o kit que lleva dicho anticuerpo. Dicho anticuerpo es producido por el clon de hibridoma depositado con el número de acceso DSM ACC 3091.

15 **Antecedentes**

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos tras las enfermedades cardiovasculares. Uno de cada tres americanos padecerá cáncer en su vida y uno de cada cuatro americanos morirá de cáncer. A pesar de la gran experiencia con los métodos terapéuticos tradicionales - resección, radiación y quimioterapia - la mayoría de los tumores humanos malignos siguen un curso clínico fatal. Un nuevo desarrollo en la terapia tumoral es la denominada terapia dirigida. Este método está basado en el tratamiento de alteraciones moleculares iniciadoras o promotoras de tumores, que son características del tumor de cada paciente. El conocimiento de estas alteraciones podría ser decisiva para seleccionar el tipo preferible de terapia prolongadora de la vida o incluso curativa.

25 Las mutaciones en el HOMÓLOGO B1 DEL ONCOGÉN VIRAL DEL SARCOMA MURINO V-RAF (BRAF) han sido descritas en varias series tumorales, incluyendo melanoma (Davies y otros, 2002 Nature 417: 949-54), carcinoma papilar tiroideo (Basolo y otros, 201. J Clin Endocrinol Metab epub antes de la edición impresa), cáncer de colon (French y otros, 2008 Clin Cancer Res 14: 3408-15), cáncer ovárico (Davies y otros, 2002 Nature 417: 949-54) y otras entidades. El BRAF forma parte de la vía señalizadora RAS/RAF/MEK/ERK, la cual está involucrada en la proliferación celular. La activación de esta vía promueve la transformación maligna.

Una de las dianas moleculares del método de la terapia dirigida para el cáncer es un cambio del aminoácido valina por ácido glutámico en el codón 600 del gen BRAF humano (V600E). Aproximadamente el 8% de todos los tumores humanos llevan esta mutación particular. La mutación V600E en BRAF hace la proteína constitutivamente activa. Es especialmente frecuente en el melanoma y en los tumores tiroideos. Los análisis preclínicos mostraron la actividad selectiva de inhibidores de RAF en los tumores con la mutación V600E en BRAF, sin afectar a la señalización ERK en las células normales Poulidakos 2010, Nature 464: 427-30). Las terapias con inhibidores específicos dirigidas a esta mutación V600E son de actualidad en los ensayos clínicos (Chapman 2009, European Journal of Cancer Supplements 7: 5).

40 La patente WO 2007/002811 revela péptidos BRAF V600E útiles para tratar, retrasar o prevenir el desarrollo del melanoma y para diagnosticar su progresión. Se mencionan anticuerpos. Según [0010] el BRAF V600E se conocía anteriormente como V599E y fue redenominado por el NCBI basándose en datos de secuencia recién disponibles.

45 La patente WO 2005/047542 se refiere al tratamiento de un paciente que tiene nevus, detectando la presencia o ausencia de una mutación activadora del BRAF en el nevus y tratándolo, si la mutación activadora del BRAF está presente. Se cultivan anticuerpos anti-BRAF V599E.

50 El método actual de referencia para el análisis de una mutación BRAF V600E es la secuenciación del ADN. Este método tiene sin embargo algunas limitaciones: el porcentaje de células tumorales en el tejido tomado para extraer el ADN tiene que ser bastante elevado. La contaminación demasiado alta con células no tumorales da un resultado de secuenciación falsamente negativo. El procedimiento analítico del ADN cuesta tiempo porque en primer lugar el material adecuado para la extracción del ADN debe ser programado por un patólogo, luego hay que realizar la extracción del ADN y entonces se puede secuenciar el ADN. La presente invención permite identificar incluso pequeños grupos de tumores con mutaciones del BRAF dentro de grandes áreas de tejido normal sin la mutación. El análisis de la mutación BRAF V600E conforme a la presente invención se puede efectuar en pocas horas, usando el equipo disponible en los laboratorios de análisis patológicos rutinarios

60 **Resumen de la presente invención**

Por consiguiente la presente invención se refiere a un método para diagnosticar cáncer en una muestra de un sujeto posiblemente afectado de esta enfermedad, que consiste en:

65 a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se una específicamente al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 de un polipéptido BRAF en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo al epítipo; y

b) determinar la unión del anticuerpo al epítipo, por la cual se diagnostica el cáncer, siendo dicho anticuerpo el depositado con el número de acceso DSM ACC 3091.

5 En una forma de ejecución preferida del método de la presente invención dicho diagnóstico del cáncer comprende la determinación de la presencia o ausencia de células cancerosas.

En una forma de ejecución preferida del método arriba citado de la presente invención, dichas células cancerosas se hallan dentro de una muestra de tejido.

10 En una forma de ejecución preferida del método arriba citado de la presente invención, dicha muestra de tejido es una muestra de un corte de tejido.

En una forma de ejecución preferida del método de la presente invención, dicho método incluye adicionalmente el paso de recomendar una terapia anticancerosa basada en el diagnóstico obtenido en la etapa b).

15 En una forma de ejecución preferida del método arriba citado de la presente invención, dicha terapia anticancerosa se elige entre: ARN antisentido anti-BRAF, fármacos de ARNip o micro-ARN, anticuerpos anti-BRAF, sorafenib, cetuximab, RAF-265, PLX-4032 y GDC-0879.

20 La presente invención se refiere además al anticuerpo producido por el clon de hibridoma depositado con el número de acceso DSM ACC 3091 en el "DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" [Banco alemán de microorganismos y cultivos celulares], 38124 Braunschweig, Alemania, el 8 de septiembre de 2010 por el "Deutsches Krebsforschungszentrum" [Centro alemán de investigación del cáncer], de Heidelberg, Alemania, conforme al tratado de Budapest.

25 La presente invención se refiere a un dispositivo para diagnosticar el cáncer, que comprende

a) una unidad analizadora que incluye el anticuerpo de la presente invención, la cual permite determinar la unión específica del anticuerpo al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 de un polipéptido BRAF en una muestra aplicada a la unidad analizadora; y

30 b) una unidad de evaluación que comprende reglas implementadas para valorar la unión determinada por la unidad analizadora y establecer un diagnóstico.

En una forma de ejecución preferida del dispositivo de la presente invención dicha muestra es una muestra de tejido.

35 En una forma de ejecución preferida del dispositivo arriba citado de la presente invención dicha muestra de tejido es una muestra de un corte de tejido.

La presente invención también se refiere a un kit para diagnosticar el cáncer, que incluye el anticuerpo de la presente invención.

#### Figuras

45 La figura 1 muestra un análisis Western Blot de diferentes anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de la inmunización con el péptido inmunógeno ligado a KLH que tiene la SEQ ID NO: 1, tal como se describe en los ejemplos adjuntos. La mayoría de los clones de hibridoma generados también mostraron una unión inespecífica además de unirse a una supuesta banda de BRAF V600E de 95 kDa, tal como está ejemplificado por los clones 53, 62 y 449. El clon 263 mostró una unión específica a la banda de BRAF V600E de 95 kDa. El anticuerpo producido por este clon de hibridoma se siguió ensayando en cortes de tejido. El propio clon de hibridoma fue depositado con el número de acceso DSM ACC 3091 en el "DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" [Banco alemán de microorganismos y cultivos celulares], 38124 Braunschweig, Alemania, el 8 de septiembre de 2010 por el "Deutsches Krebsforschungszentrum" [Centro alemán de investigación del cáncer] de Heidelberg, Alemania, conforme al tratado de Budapest.

50 La figura 2 muestra las inmunotinciones de cortes tisulares de tumores BRAF V600E positivos (melanomas fijados en formalina y embebidos en parafina) y de controles procedentes de melanomas que tienen el BRAF de tipo natural confirmado por análisis de la secuencia genómica. Solo se examinó la inmunotinción entre todos los clones ensayados con los anticuerpos producidos por el clon de hibridoma 263.

55 La figura 3 muestra una ampliación de un área del corte tisular ilustrado en la figura 2, que ha sido teñido con el anticuerpo del clon de hibridoma 263. La figura demuestra que el anticuerpo tiñe el citoplasma de las células tumorales y por tanto el sitio de localización subcelular del polipéptido BRAF V600E.

60 La figura 4 muestra la detección de BRAF-V600E mediante inmunohistoquímica y secuenciación directa: (A) núcleos de TMA representativos de LCP (a la izquierda) y de linfoma esplénico de la zona marginal (a la derecha) marcados con VE1. Cortes representativos de biopsias de médula ósea (400x aumentos del original) con diferente carga tumoral (100% en el caso B, 10% en el caso C) inmunomarcados con VE1 (columna la izquierda) y las correspondientes secuencias de ADN que llevan el codón 600 de BRAF. La infiltración detectable por inmunohistoquímica con VE1 es mínima en el caso C, cuando la secuenciación del ADN no revela la mutación. Las

65

imágenes microscópicas se tomaron con un microscopio óptico Olympus BX-51 equipado con una cámara DP50-CCD y se procesaron con el programa Cell-A (todo de Olympus, Hamburgo, Alemania).

Descripción detallada de la presente invención

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar cáncer en una muestra de un sujeto posiblemente afectado de esta enfermedad, que consiste en:

- 10 a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 de un polipéptido B-Raf en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo al epítipo; y  
 b) determinar la unión del anticuerpo al epítipo, por la cual se diagnostica el cáncer,  
 siendo dicho anticuerpo el producido por el clon de hibridoma depositado con el número de acceso DSM ACC 3091.

15 Tal como se usa aquí, el término “diagnosticar” significa valorar si un sujeto padece cáncer o no. Como advertirán los especialistas en la materia esta valoración no pretende normalmente ser correcta para todos (es decir al 100%) los sujetos que deben ser examinados. No obstante el término requiere que una porción estadísticamente significativa de sujetos pueda ser detectada (p.ej. una cohorte en un estudio de poblaciones). El especialista en la materia puede determinar sin dificultad si una porción es estadísticamente significativa utilizando varias herramientas estadísticas bien conocidas, p.ej. mediante el cálculo de intervalos de confianza, el valor p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Para mayor detalle véase el manual de Dowdy y Wearden, Statistics for Research [Estadísticas para la investigación], John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99 %. Los valores p son sobre todo de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Con mayor preferencia al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los sujetos de una población se pueden identificar correctamente con el método de la presente invención. La diagnosis según la presente invención incluye aplicaciones del método para controlar, confirmar y subclasificar el cáncer en cuestión.

20 La diagnosis incluye asimismo el establecimiento de un pronóstico para un sujeto. Un sujeto diagnosticado de cáncer conforme al método de la presente invención tendrá células cancerosas que expresen el polipéptido BRAF V600E. La presencia del BRAF V600E es un indicador predictivo de un resultado probablemente malo para los sujetos. Por tanto el método de la presente invención también se puede aplicar a los estudios de estratificación de riesgos y, como resultado, para determinar el grado de cuidado intensivo y hospitalización que necesita un paciente de cáncer.

25 Tal como se usa aquí, el término “cáncer” se refiere a cualquier neoplasia maligna. Neoplasia maligna se refiere a las enfermedades resultantes del crecimiento no deseado, la invasión y en ciertas condiciones la metástasis de células deficientes en un organismo. Las células que originan el cáncer están genéticamente deterioradas y han perdido normalmente su capacidad de controlar la división celular, el comportamiento de migración celular, el estado de diferenciación y/o la maquinaria de muerte celular. La mayoría de los cánceres forman un tumor, pero algunos cánceres hematopoyéticos como la leucemia no. Según la presente invención el cáncer comprende células que expresan un polipéptido mutante BRAF V600E, tal como se especifica aquí en otra parte. Los tipos preferidos de cáncer están seleccionados del grupo constituido por: melanomas, carcinomas papilares tiroideos, carcinomas de colon, cáncer ovárico y cáncer de mama. Con mayor preferencia el cáncer es un melanoma o un carcinoma papilar tiroideo debido al porcentaje muy alto - 50% o más - de mutaciones BRAF V600E en estas entidades cancerosas. También preferentemente, el cáncer según la presente invención es un cáncer hematopoyético, preferentemente leucemia, incluyendo la neoplasia de células B maduras. Con mayor preferencia dicho cáncer es una leucemia de células pilosas. Los síntomas y los sistemas de estadiaje de los distintos cánceres son bien conocidos en el estado técnico y están descritos en libros de texto estándar de patología. Tal como se usa aquí, cáncer engloba cualquier estadio, grado, característica morfológica, invasividad, agresividad o malignidad del cáncer o del tejido u órgano afectado por él.

30 El término “muestra” se refiere a una muestra de células separadas o una muestra de un tejido o de un órgano. Las muestras de tejidos u órganos se pueden obtener de cualquier tejido u órgano, p.ej. mediante biopsia. Las células separadas se pueden obtener de fluidos corporales tales como linfa, sangre, plasma, suero, licor y similares, o de los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación celular. Las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen preferiblemente de las células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos aquí citados. La muestra puede obtenerse del sujeto por técnicas rutinarias bien conocidas de la persona experimentada en la materia, como p.ej. la biopsia abierta, incluyendo la aspiración de material celular o tisular del sujeto. Para las zonas de difícil acceso mediante una biopsia abierta se puede realizar una cirugía, preferiblemente una cirugía mínima invasiva.

35 Tal como se usa aquí, el término “sujeto” se refiere a animales, preferentemente mamíferos y sobre todo humanos. El método de la presente invención se aplicará preferiblemente a sujetos que puedan padecer cáncer teniendo en cuenta síntomas clínicamente evidentes o debido a una mayor predisposición.

65

Tal como se ha revelado, el término “anticuerpo” se refiere a todos los tipos de anticuerpo que se unen de manera específica al polipéptido BRAF V600E. El anticuerpo de la presente invención se unirá específicamente al epítipo caracterizado por la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1. El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o cualquier fragmento o derivado de tales anticuerpos que todavía tenga la capacidad de unirse específicamente al polipéptido BRAF V600E y en particular al epítipo representado por SEQ ID NO: 1. Estos fragmentos y derivados incluidos en el término anticuerpo, tal como se emplea aquí, comprenden un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo sintético, un fragmento Fab, F(ab)2 Fv o scFv, o un derivado químicamente modificado de estos anticuerpos. Las modificaciones químicas contempladas preferiblemente en la presente revelación incluyen aquellas cuyo objetivo es acoplar el anticuerpo a un marcador detectable, tal como se especifica en otra parte de esta descripción. Tal como se usa en referencia al anticuerpo de la presente invención, unión específica significa que el anticuerpo no da reacciones cruzadas con otros polipéptidos, incluyendo el BRAF de tipo natural o mutantes del BRAF distintos del polipéptido mutante BRAF V600E o, con mayor preferencia, que no tiene reacciones cruzadas con cualquier otro epítipo que no sea el representado por SEQ ID NO: 1. La unión específica se puede comprobar mediante varias técnicas bien conocidas. Preferentemente se puede analizar tal como se describe en los ejemplos adjuntos. En general los anticuerpos o sus fragmentos se pueden obtener empleando los métodos descritos p.ej. en Harlow y Lane “Antibodies, A Laboratory Manual” [Anticuerpos, manual de laboratorio], CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante técnicas que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células esplénicas procedentes de mamíferos inmunizados, preferentemente de ratones inmunizados (Köhler 1975, Nature 256, 495, y Galfré 1981, Meth. Enzymol. 73, 3). Preferiblemente se aplica a un mamífero un péptido inmunógeno que tiene el epítipo representado por SEQ ID NO: 1. Un péptido con la secuencia SEQ ID NO: 1 se conjuga preferiblemente con una proteína soporte tal como albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de lapa (KLH). Dependiendo de la especie huésped se pueden utilizar varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes comprenden preferiblemente el adyuvante de Freund, geles minerales, p.ej. de hidróxido de aluminio, y sustancias surfactantes, p.ej. lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa y dinitrofenol. Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al epítipo de SEQ ID NO: 1 en BRAF V600E pueden prepararse luego empleando la bien conocida técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas y la técnica del hibridoma de EBV. El anticuerpo de la presente invención se obtuvo mediante el método descrito en los siguientes ejemplos adjuntos. El anticuerpo es preferiblemente monoclonal o un derivado del mismo, tal como se ha descrito anteriormente, y es el depositado con el número de acceso DSM ACC 3091 en el “DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” [Banco alemán de microorganismos y cultivos celulares], 38124 Braunschweig, Alemania, el 8 de septiembre de 2010 por el “Deutsches Krebsforschungszentrum” [Centro alemán de investigación del cáncer] de Heidelberg, Alemania, conforme al tratado de Budapest.

Tal como se usa aquí, el término “polipéptido BRAF” se refiere al polipéptido codificado por el oncogén homólogo B1 del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf. El polipéptido BRAF es una serina/treonina cinasa que actúa en la vía señalizadora RAS/RAF/MEK/ERK, involucrada en la proliferación celular. La activación de esta vía promueve la transformación malignizante. Las estructuras del oncogén BRAF y del polipéptido BRAF son bien conocidas en el estado técnico. Polipéptido BRAF se refiere preferiblemente al polipéptido BRAF humano revelado por Sithanandam 1990, Oncogene 5 (12): 1775-80 y a variantes de dicho polipéptido BRAF específico, que incluyen las variantes alélicas, ortólogas y homólogas. Los ortólogos del BRAF humano en otros organismos, p.ej. en roedores, también son bien conocidos en el estado técnico. El polipéptido BRAF aludido respecto al método de la presente invención comprende un epítipo como el representado por la SEQ ID NO: 1 y por tanto tiene un cambio de valina (V) por ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 600 o en una posición de aminoácido correspondiente a este cambio.

Tal como indica aquí, poner la muestra en contacto significa hacer que el anticuerpo y la muestra entren en contacto físico para permitir la unión específica del anticuerpo al epítipo representado por la SEQ ID NO: 1 en el polipéptido BRAF V600E, si éste está contenido en la muestra. Tal como se expone aquí, se entiende que la puesta en contacto tiene lugar en tiempo y condiciones suficientes para permitir que el anticuerpo se una específicamente al polipéptido BRAF V600E. Dependiendo de la naturaleza de la muestra se pueden necesitar unas etapas de tratamiento previo para liberar el BRAF V600E o para desenmascarar el epítipo en el polipéptido BRAF V600E, con el fin de que el anticuerpo pueda acceder y unirse específicamente a él. Además el tratamiento puede ser distinto dependiendo del tipo de muestra. Por ejemplo, una muestra de tejido que deba analizarse para determinar la presencia o ausencia de un polipéptido BRAF V600E es preferible homogeneizarla y aislar y separar las proteínas contenidas en el tejido, p.ej. mediante SDS PAGE u otros métodos de separación de proteínas. Las proteínas separadas se analizan para determinar la presencia o ausencia del polipéptido BRAF V600E, utilizando métodos inmunológicos tales como un análisis Western Blot con el anticuerpo arriba definido. Estos métodos también incluyen etapas de incubación que permiten la unión específica del anticuerpo al polipéptido BRAF V600E. Con el fin de aumentar la especificidad deben efectuarse etapas de lavado. El modo de llevar a cabo estas operaciones es bien conocido del especialista en la materia. Si como muestra se usa un corte tisular (es decir, una muestra de un corte de tejido), debe entenderse que no solo está previsto analizar la presencia o ausencia del polipéptido BRAF V600E, sino también su localización celular o subcelular. Por consiguiente el tejido debe mantenerse intacto y también se puede teñir mediante técnicas de tinción histoquímica antes o después de la unión del anticuerpo. Las técnicas adecuadas para la inmunotinción

de cortes tisulares son bien conocidas del especialista en la materia. Si la muestra de corte tisular se ha embebido en un medio tal como parafina puede ser necesario eliminar dicho medio. Las correspondientes técnicas también son bien conocidas en el estado técnico.

5 Tal como se usa aquí, la determinación de la unión del anticuerpo se refiere a la detección del anticuerpo que está unido específicamente al polipéptido BRAF V600E contenido en la muestra, en caso de haberlo. Los métodos de detección de anticuerpos unidos específicamente a un antígeno también son bien conocidos en el estado técnico. Es preferible que el propio anticuerpo que debe aplicarse en el método de la presente invención se pueda acoplar a un marcador detectable tal como un isótopo radiactivo (p.ej. isótopos radiactivos de yoduro de tecnecio), a agentes fluorescentes o quimioluminiscentes (p.ej. FITC, rodamina), a un enzima capaz de generar una señal por conversión de un substrato (p.ej. peroxidasa de rábano picante, luciferasa de luciérnaga o beta galactosidasa), a una proteína fluorescente (p.ej. de fluorescencia verde, azul o roja). Los marcadores detectables son bien conocidos en el estado técnico. También es preferible que el anticuerpo que debe aplicarse en el método de la presente invención se pueda acoplar a un agente capaz de atraer un agente detector. Este tipo de agente puede ser biotina. En tal caso se puede usar un agente detector acoplado a avidina o a estreptavidina, que tras la fijación de la biotina del anticuerpo unido sirva como marcador detectable. En este caso son adecuados como marcadores detectables todos los mencionados arriba y con mayor preferencia se usará un enzima. Asimismo se puede usar un anticuerpo secundario para detectar el primer anticuerpo, es decir el anticuerpo que debe aplicarse en el método de la presente invención y que se une al polipéptido BRAF V600E de la muestra. Este anticuerpo secundario debe estar acoplado a un marcador detectable como el descrito arriba. Así, en el último caso el anticuerpo secundario generará una señal detectable al unirse al primer anticuerpo, permitiendo la detección del primer anticuerpo unido. El principio de detección de anticuerpos con un anticuerpo secundario es bien conocido en el estado técnico y se aplica rutinariamente, p.ej. para determinar la unión de anticuerpos en cortes de tejido. En función del tipo de marcador detectable se pueden aplicar distintos métodos de detección, utilizando un sistema lector de la señal generada por el marcador detectable. Estos sistemas incluyen un aparato automático de lectura de señales tal como un lector ELISA o RIA, pero también un dispositivo microscópico de detección manual o automática de la señal. Además el sistema lector puede determinar información adicional de la muestra; p.ej. un sistema microscópico puede mostrar ópticamente las células de un corte de tejido o un lector automático de señales puede determinar otros biomarcadores adicionales comprendidos en la muestra.

30 En general se halló de modo sorprendente que el anticuerpo descrito conforme al método de la presente invención es útil para diagnosticar cáncer, tal como se detalla aquí, en muestras de un sujeto posiblemente afectado de dicho cáncer. El método de la presente invención permite un análisis rápido, simple y fiable del estado del BRAF en un sujeto y por tanto el diagnóstico del cáncer. Los resultados del diagnóstico - que son una base importante para que el facultativo clínico o patólogo decida las posibles terapias, para el pronóstico y la atención clínica sanitaria y/o para clasificar debidamente el cáncer - se pueden generar con mayor rapidez y su fiabilidad es mayor porque al contrario que el análisis genético secuencial también se pueden detectar células tumorales individuales en el tejido, que de otra forma pasarían inadvertidas, incluso en aquellos casos en que la calidad de la muestra del cáncer es mala.

40 En una forma de ejecución preferida del método de la presente invención dicho diagnóstico del cáncer consiste en determinar la presencia o ausencia de células cancerosas. Preferiblemente dichas células cancerosas se hallan dentro de una muestra de tejido y con mayor preferencia dicha muestra de tejido es de un corte tisular.

45 El cáncer se puede diagnosticar preferiblemente determinando la presencia de células cancerosas en una muestra. Cuando se identifica una célula cancerosa en una muestra se puede confirmar la sospecha de que el sujeto padece verdaderamente cáncer. De igual modo, la ausencia de células cancerosas en una muestra indica preferentemente que el sujeto del cual procede la muestra no padecerá cáncer. En este aspecto se trata preferiblemente de una muestra que es representativa del cáncer en un sujeto supuestamente afectado de la enfermedad. Por ejemplo, se debe tomar una muestra de aquellos tejidos que parecen estar afectados por el cáncer y en los cuales está basada la sospecha de que el sujeto los padezca. Según este aspecto de la presente invención se entenderá que la muestra no debe tomarse de aquellos tejidos de los cuales se sabe que no están afectados por el cáncer o no se sospecha que lo estén, pues una muestra de este tipo puede dar lugar a diagnósticos falsos.

55 En particular, cuando en el método de la presente invención se usan muestras tisulares y preferiblemente muestras de cortes tisulares, el diagnóstico también comprende la identificación de las células cancerosas individuales. Por tanto el método de la presente invención se puede usar para captar imágenes de células cancerosas en un tejido o corte tisular, a fin de determinar la extensión y/o la homogeneidad del cáncer. La determinación de la extensión de un cáncer en un tejido afectado es crucial para las terapias basadas en fármacos y en particular para la cirugía, ya que es necesario confirmar por biopsia tisular que todas las partes del cáncer hayan sido realmente eliminadas del tejido u órgano afectado. En ciertos aspectos podría haber células cancerosas no identificadas por el método de la presente invención, pero que debido p.ej. a su morfología son evidentemente células cancerosas. Un cáncer que además de células cancerosas identificadas por el método de la presente invención comprenda células cancerosas que no pueden ser identificadas por el método de la presente invención se puede tratar con una combinación de fármacos antes que con uno solo.

65 En una forma de ejecución preferida, el método de la presente invención comprende además la recomendación de una terapia anticáncer basada en el diagnóstico obtenido en la etapa b).

Tal como se emplea aquí, el término “recomendación” se refiere a la sugerencia de una terapia anticáncer o a la exclusión (es decir, no recomendación) de una determinada terapia anticáncer para un sujeto. Esta recomendación debe servir - opcionalmente con otra información, p.ej. sobre investigaciones histopatológicas – como base para que un facultativo clínico aplique o no una determinada terapia anticáncer para un sujeto individual. Basándose en el diagnóstico comprobado en la etapa b) del método de la presente invención, es decir en el diagnóstico de “cáncer” o “no cáncer” se recomendará una terapia anticáncer. Se entiende que la recomendación de la terapia anticáncer se hará solo en los casos en que el diagnóstico de “cáncer” haya sido establecido mediante el método de la presente invención. En aquellos casos en que el diagnóstico basado en el método de la presente invención haya sido de “no cáncer” la recomendación sería descartar una terapia anticáncer. Como se ha indicado anteriormente también puede usarse información adicional del sujeto del cual procede la muestra con el fin de mejorar la recomendación. En un aspecto se puede recomendar una terapia anticáncer combinada, p.ej. con distintos fármacos antitumorales, cuando el método de la presente invención identifica células cancerosas y hay otras células cancerosas no identificadas por el método de la presente invención que sin embargo son detectadas en el cáncer investigado, p.ej. mediante análisis histopatológicos.

Tal como se emplea aquí, el término “terapia anticáncer” incluye las terapias basadas en cirugía, en radiación, en fármacos o en combinaciones de las mismas. Dicha terapia anticáncer basada en fármacos es preferiblemente un tratamiento que afecte al polipéptido B-Raf y con mayor preferencia al polipéptido B-Raf que tiene el epítipo definido por la SEQ ID NO: 1. Los fármacos adecuados pueden interferir en la actividad proteica del polipéptido B-Raf o en la transcripción o traducción del oncogén B-Raf o de su transcrito. Dicho fármaco anticáncer se elige preferiblemente del grupo formado por: ARN antisentido anti-Raf, fármacos de ARNip o micro-ARN, anticuerpos anti-Raf y pequeñas moléculas. Los fármacos especialmente preferidos son sorafenib, RAF-265, PLX-4032 o GDC-0879.

Además una recomendación de acuerdo con el método de la presente invención también incluye en algunos casos una recomendación negativa de una determinada terapia. Por ejemplo, si la diana terapéutica de un fármaco actúa en la parte anterior de la cascada de señalización del BRAF V600E (que es constitutivamente activo y por lo tanto independiente de una activación de la señal), se puede asumir razonablemente que un fármaco pensado para inhibir la diana terapéutica en dicha parte no es una base apropiada para una terapia única destinada al tratamiento de un cáncer positivo por BRAF V600E. Se ha referido que el receptor de EGF (EGFR) es un activador de BRAF en la parte anterior de la secuencia. Asimismo los inhibidores de EGFR se usan en la terapia del cáncer. Son de especial interés los anticuerpos anti-EGFR tales como el cetuximab. Según una forma de ejecución preferida del método de la presente invención se prevé que la recomendación también excluya una determinada terapia para un sujeto que haya sido diagnosticado de cáncer mediante el método de la presente invención, es decir un sujeto que exprese el polipéptido BRAF V600E en las células cancerosas. Dicha terapia está pensada preferiblemente para inhibir la actividad de los componentes situados en la parte anterior de la vía señalizadora que activan el polipéptido BRAF. Con mayor preferencia un componente de este tipo es el EGFR y los fármacos adecuados son anticuerpos anti-EGFR tales como el cetuximab.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO: 1 en el polipéptido BRAF, siendo el anticuerpo producido por el clon de hibridoma depositado con el número de acceso DSM ACC 3091 en el “DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” [Banco alemán de microorganismos y cultivos celulares], 38124 Braunschweig, Alemania, el 8 de septiembre de 2010 por el “Deutsches Krebsforschungszentrum” [Centro alemán de investigación del cáncer], de Heidelberg, Alemania, conforme al tratado de Budapest.

El anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en ensayos inmunoquímicos tales como análisis Western blots, ELISAs, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otro tipo de ensayos inmunoquímicos conocidos en el estado técnico. El anticuerpo sirve en particular para llevar a cabo el método de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también se refiere a un dispositivo para diagnosticar el cáncer, que comprende

- a) una unidad analizadora que incluye el anticuerpo de la presente invención, la cual permite determinar la unión específica del anticuerpo al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 del polipéptido BRAF en una muestra aplicada a la unidad analizadora; y
- b) una unidad de evaluación que comprende reglas implementadas para valorar la unión determinada por la unidad analizadora y establecer un diagnóstico.

Tal como se usa aquí, el término “dispositivo” se refiere a un sistema que comprende al menos la unidad analizadora arriba citada y la unidad de evaluación conectadas operativamente entre sí. El modo de conectar las unidades del dispositivo de forma operativa dependerá del tipo de unidades incluidas en el dispositivo. Por ejemplo, en caso de usar unidades automáticas de análisis de muestras los datos obtenidos por dicha unidad analítica de funcionamiento automático pueden ser procesados, p.ej. mediante un programa informático, a fin de que la unidad de evaluación proporcione los resultados deseados. En tal caso las unidades están contenidas en un solo aparato. La unidad analizadora puede comprender el anticuerpo en forma inmovilizada sobre un soporte sólido. Una unidad analizadora de este tipo es particularmente útil para muestras líquidas. La muestra analizada con el dispositivo de la presente

invención es preferiblemente una muestra de tejido y con mayor preferencia una muestra de un corte tisular. Por tanto, en otro aspecto, el anticuerpo puede estar contenido en una solución detectora que se aplicará a muestras de tejido tales cortes tisulares en la unidad analítica. La solución detectora se puede almacenar en la unidad analítica o en un vial aparte, incluso fuera del dispositivo. La unidad de evaluación, preferentemente un ordenador o un equipo de procesamiento de datos, comprende reglas implementadas, es decir un algoritmo, para valorar si la unión hallada por la unidad analítica es significativa o no, basándose en el tipo e intensidad de la señal y, en caso de muestras de tejido, en la posición de la señal respecto al tejido. Si las muestras evaluadas no presentan una unión significativa, el resultado del diagnóstico es "no cáncer". Si como resultado de la evaluación se obtiene una unión significativa, el diagnóstico es de cáncer.

Por último la presente invención se refiere a un kit para diagnosticar el cáncer, que comprende el anticuerpo de la presente invención anteriormente especificado.

Tal como se usa aquí, el término "kit" se refiere a un conjunto que consta del anticuerpo arriba citado e instrucciones del tipo listo para usar, y que sirve para diagnosticar el cáncer en una muestra. El anticuerpo y las instrucciones van preferiblemente en un único recipiente. El kit también comprende preferiblemente otros componentes necesarios para realizar el diagnóstico. Estos componentes pueden ser agentes auxiliares necesarios para detectar la unión del anticuerpo, agentes para el tratamiento previo de la muestra que debe analizarse o patrones de calibración.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos solo son ilustrativos de la presente invención. De ningún modo deben interpretarse como una limitación del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: generación de un anticuerpo dirigido específicamente al polipéptido mutante BRAF V600E

El péptido sintético GLATEKSRWSG (SEQ ID NO: 1) que coincide con la secuencia de aminoácidos de la posición 596 a 606 e incluye el cambio V→E se produjo comercialmente. Para seleccionar la región idónea de la secuencia se usó el programa Husar (DKFZ, Heidelberg, Alemania). El péptido se conjugó con KLH (hemocianina de lapa) para formar el péptido inmunógeno. Se utilizaron ratones negros C57 hembra de seis semanas de edad (Charles River, Sulzfeld, Alemania). En todos los casos se inyectó un volumen de 100 µl en los cuartos traseros de los ratones según el siguiente plan:

Día 1: se inyectaron a los ratones 20 µg del péptido inmunógeno disuelto en PBS emulsionado 1:1 con adyuvante de Freund completo.

Día 5: se inyectaron a los ratones 20 µg del péptido inmunógeno disuelto en PBS emulsionado 1:1 con adyuvante de Freund incompleto.

Día 11: se inyectaron a los ratones 20 µg del péptido inmunógeno disuelto en PBS.

Día 18: se inyectaron a los ratones 20 µg del péptido inmunógeno disuelto en PBS.

Al 19º día se extrajo sangre de los ratones, se separó el suero, se realizaron análisis Western blot contra proteínas tumorales que contenían el BRAF V600E o la proteína BRAF de tipo natural. Al 46º día se inyectaron a los ratones 20 µg del péptido inmunógeno disuelto en PBS. Al 47º día se extrajo sangre de los ratones, se separó el suero, se realizaron análisis Western blot contra proteínas tumorales que contenían el BRAF V600E o la proteína BRAF de tipo natural. Al 48º día se sacrificaron los ratones. Se extrajeron los ganglios linfáticos poplíteos, se separaron las células y se fusionaron con células tumorales de la línea SP2/0 para generar células de hibridoma. Por último se cultivaron las células de hibridoma, se recogieron células individuales y se separaron para generar clones puros. Los sobrenadantes de los clones se analizaron por Western blot para detectar los clones que producían anticuerpos específicos de BRAF V600E.

El análisis por Western blot con extractos proteicos de líneas celulares que expresan el BRAF mutante (V600E) y el de tipo natural (tn) demuestra la unión de los clones de hibridoma 53, 62, 449 y 263 al BRAF V600E. Por tanto estos anticuerpos son muy útiles para detectar la mutación BRAF V600E por Western blot. El clon 263 fue depositado con el número de acceso DSM ACC 3091 en el "DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" [Banco alemán de microorganismos y cultivos celulares], 38124 Braunschweig, Alemania, el 8 de septiembre de 2010 por el "Deutsches Krebsforschungszentrum" [Centro alemán de investigación del cáncer], de Heidelberg, Alemania, conforme al tratado de Budapest.

Ejemplo 2: el anticuerpo del clon 263 se dirige específicamente a las células tumorales que expresan el polipéptido mutante BRAF V600E en cortes de tejido

Unas secciones fijadas en formalina y embebidas en parafina se cortaron a 4 µm de espesor con un microtomo Microm HM 355 S<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) provisto de una abrazadera de objetos enfriada eléctricamente (Cool-Cut<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific). Después los cortes se secaron a 80°C durante 15 minutos y se marcaron con anticuerpo anti-BRAF V600E (clon 263) en un inmunomarcador Ventana BenchMark XT<sup>®</sup> (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). El procedimiento de marcaje de Ventana consistió en un tratamiento previo con

acondicionador celular 1 (pH 8) durante 60 minutos, seguido de 32 minutos de incubación a 37°C con sobrenadante no diluido del hibridoma de BRAF V600E. Tras la incubación del anticuerpo tuvo lugar la amplificación de señal estándar de Ventana, incluyendo el kit amplificador Ventana, lavado UltraWash, tinción de contraste con una gota de hematoxilina durante 4 minutos y una gota de reactivo blanqueador durante 4 minutos. Para la detección cromógena se usó el kit ultraView® Universal Red v3 Detection (Ventana Medical Systems). Luego los portaobjetos se sacaron del inmunomarcador, se lavaron en agua con una gota de detergente de lavavajillas y se montaron. No se detectó ningún cromógeno al omitir el anticuerpo principal de BRAF V600E (clon 263). La reacción inmunológica se valoró como positiva cuando las células tumorales revelaron una fuerte tinción citoplasmática con BRAF V600E. La tinción débil difusa y la tinción de macrófagos no se valoraron como positivas.

El análisis inmunohistoquímico de las mutaciones BRAF V600E en cortes de tejido fijados en formalina y embebidos en parafina que proceden de tumores con estatus secuencial predeterminado demuestra la unión exclusiva del clon de hibridoma 263 (véase figura 2) al melanoma con la mutación BRAF V600E, pero no al melanoma con BRAF de tipo natural. De manera significativa los clones 53, 62 y 449 representados en la figura 1 también se unen al BRAF V600E, pero por análisis Western blot no se reconoce esta mutación en los cortes de tejido fijados en formalina y embebidos en parafina. La unión selectiva solo se observó para el clon específico murino 263 (véase la figura 2 y de forma ampliada en la figura 3).

El clon 263 fue depositado con el número de acceso DSM ACC 3091 en el “DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” [Banco alemán de microorganismos y cultivos celulares], 38124 Braunschweig, Alemania, el 8 de septiembre de 2010 por el “Deutsches Krebsforschungszentrum” [Centro alemán de investigación del cáncer], de Heidelberg, Alemania, conforme al tratado de Budapest.

Ejemplo 3: el anticuerpo del clon 263 se dirige específicamente a la identificación de la leucemia de células pilosas que expresan el polipéptido mutante BRAF V600E

Todos los materiales humanos se obtuvieron del banco de tejidos del Centro nacional de enfermedades tumorales (NCT) y del departamento de patología general del instituto de patología de Heidelberg. Se analizaron micromatrices de tejido (TMA) montadas a partir de tejidos embebidos en parafina que llevaban en total 208 casos de neoplasias de células B maduras, incluyendo plasmocitomas (n = 26), el linfoma folicular (n = 34), el linfoma difuso de células B (n = 41), el linfoma mediastínico primario de células B (n = 25), el linfoma de células del manto (n = 17), el linfoma de la zona marginal extranodal (n = 16), la leucemia de células pilosas (n = 3) y el linfoma de Hodgkin (n = 46). Para ampliar el examen se evaluaron además cortes enteros de médula ósea (n = 34) o de bazo (n = 1) con leucemia de células pilosas (n = 35 en total) y de médula ósea con linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) (n = 4).

El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo de la manera siguiente: las secciones de TMA y de médula ósea o de bazo se cortaron a 4 micras, se secaron a 80°C durante 15 minutos y se expusieron al anticuerpo monoclonal murino específico de BRAFV600E (clon VE1) en un inmunomarcador automático (Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA), utilizando reactivos estándar suministrados por Ventana. Después del tratamiento previo con acondicionador celular 1 se incubó con sobrenadante de hibridoma de VE1 a 37°C durante 32 minutos y luego se intensificó la señal con el kit de amplificación, se realizó el lavado ultra-Wash, la detección cromógena con el kit de detección ultraView Universal DAB y la tinción de contraste con hematoxilina y reactivo blanqueador durante 4 minutos. Los portaobjetos inmunomarcados fueron evaluados por tres patólogos (DC, AvD, MA) que no conocían el estado de la mutación.

El BRAF V600E también fue detectado por secuenciación directa de ADN. El ADN se extrajo de muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE) de pacientes con LCP y LEZM (n = 39). Las secuencias de los cebadores y el procedimiento de secuenciación directa se han descrito con anterioridad (Schindler 2011, Acta Neuropathol 121: 397-405).

El examen de los 208 linfomas de células B maduras de adulto para activar las mutaciones *BRAF-V600E* con un anticuerpo específico de BRAF<sub>V600E</sub> dio como resultado la identificación de dos muestras positivas entre tres casos de LCP. Todos los demás casos de linfoma fueron negativos. El análisis de otras 34 biopsias de médula ósea de LCP y de una biopsia de bazo no incluidas en la micromatriz inicial de tejidos demostró una expresión citoplasmática fuerte de la proteína con la mutación BRAF<sub>V600E</sub> en 31 de los 35 casos (87%). La secuenciación directa del ADN genómico confirmó la presencia del cambio BRAF-V600E en 24 de 31 (77%) casos inmunohistoquímicamente positivos de LCP. En siete biopsias de médula ósea que expresaban el BRAF-V600E, la mutación del *BRAF* no fue detectable por secuenciación directa. En dos de estos 7 casos el contenido de células tumorales fue inferior al 15%. En la figura 4 se ilustra un caso representativo. No obstante en los 5 casos restantes más del 50% de las células eran de LCP. Los problemas relacionados con el procesado de ADN del material FFPE podrían ser responsables de los resultados falsamente negativos de la secuenciación directa. Cabe destacar que no se detectaron mutaciones BRAF-V600E en los 4 casos inmunonegativos. Además, tampoco se identificó ninguna otra mutación del codón 600 del BRAF. Estos datos demuestran que la activación de la mutación BRAF-V600E es un suceso muy frecuente en la LCP, lo cual sugiere claramente que el BRAF mutado es un mecanismo molecular clave que conduce a la activación constitutiva de ERK y puede representar un incidente molecular esencial en la transformación oncogénica de LCP. Asimismo, los hallazgos indican que el análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo específico de la mutación

5 BRAF<sub>V600E</sub> es probablemente más sensible que la secuenciación directa de ADN, para detectar la mutación BRAF-V600E en linfomas con baja carga de células tumorales. Por lo tanto el anticuerpo específico de BRAF<sub>V600E</sub> puede constituir un nuevo marcador importante para confirmar el diagnóstico de la LCP y controlar la enfermedad mínima residual. Estos resultados también permiten suponer que la LCP podría responder a una nueva generación de compuestos moleculares que inhiban la actividad de BRAF<sub>V600E</sub>. Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que la mutación BRAF-V600E es un episodio molecular, crucial en la patogénesis de la LCP, fácilmente detectable por análisis inmunohistoquímico con VE1.

Listado de secuencias

10 <110> DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG  
 [Centro alemán de investigación del cáncer de la universidad Ruprecht-Karl de Heidelberg]  
 <120> Medios y métodos para diagnosticar cáncer empleando un anticuerpo que se une específicamente a  
 BRAF V600E  
 15 <130> DK10239PC  
 <150> US 61/388,158  
 <151> 2010-09-30  
 <150> US 61/503,950  
 <151> 2011-07-01  
 20 <160> 3  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

<b>Gly</b>	<b>Leu</b>	<b>Ala</b>	<b>Thr</b>	<b>Glu</b>	<b>Lys</b>	<b>Ser</b>	<b>Arg</b>	<b>Trp</b>	<b>Ser</b>	<b>Gly</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>	

<210> 2  
 <211> 9  
 30 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 acagtgaaa 9  
 <210> 3  
 35 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 acagagaaa 9  
 40

**REIVINDICACIONES**

1. Método para diagnosticar cáncer en una muestra de un sujeto posiblemente afectado de esta enfermedad, que consiste en:
  - 5 a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 de un polipéptido BRAF en condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo al epítipo; y
  - b) determinar la unión del anticuerpo al epítipo, por la cual se diagnostica el cáncer, siendo dicho anticuerpo el depositado con el número de acceso DSM ACC 3091.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en que dicho diagnóstico del cáncer consiste en determinar la presencia o ausencia de células cancerosas.
3. Método según la reivindicación 2, en que dichas células cancerosas están en una muestra de tejido.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, en que dicha muestra de tejido es una muestra de un corte tisular.
5. Método según la reivindicación 1, en que dicho método incluye adicionalmente el paso de recomendar o no una terapia anticancerosa basada en el diagnóstico obtenido en la etapa b).
- 20 6. Método según la reivindicación 1, en que dicha terapia anticancerosa se elige del grupo formado por: ARN antisentido anti-BRAF, fármacos de ARNip o micro-ARN, anticuerpos anti-BRAF, sorafenib, RAF-265, PLX-4032, cetuximab y GDC-0879.
- 25 7. Anticuerpo producido por el clon de hibridoma depositado con el número de acceso DSM ACC 3091.
8. Clon de hibridoma depositado con el número de acceso DSM ACC 3091.
9. Dispositivo para diagnosticar el cáncer, que comprende
  - 30 a) una unidad analizadora que incluye el anticuerpo de la reivindicación 7, la cual permite determinar la unión específica del anticuerpo al epítipo caracterizado por la SEQ ID NO 1 del polipéptido BRAF en una muestra aplicada a la unidad analizadora; y
  - b) una unidad de evaluación que comprende reglas implementadas para valorar la unión determinada por la unidad analizadora y establecer un diagnóstico.
- 35 10. Dispositivo según la reivindicación 9, en que dicha muestra es una muestra de tejido, preferiblemente una muestra de un corte tisular.
11. Kit para diagnosticar cáncer, que incluye el anticuerpo de la reivindicación 7.
- 40 12. Utilización del anticuerpo de la reivindicación 7 para detectar células cancerosas en una muestra y/o para diagnosticar cáncer.

Fig. 1

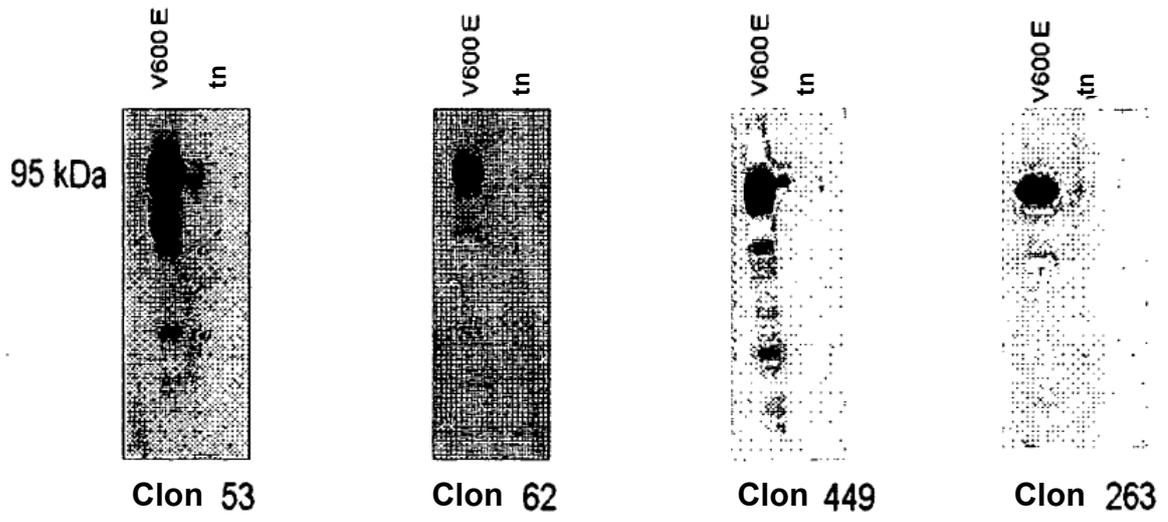


Fig. 2

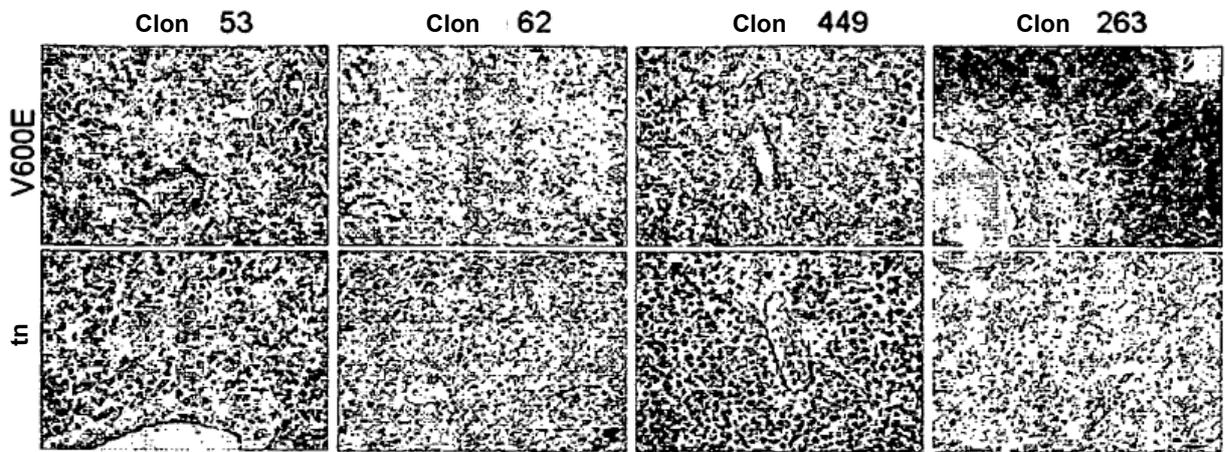


Fig. 3

# Clon 263

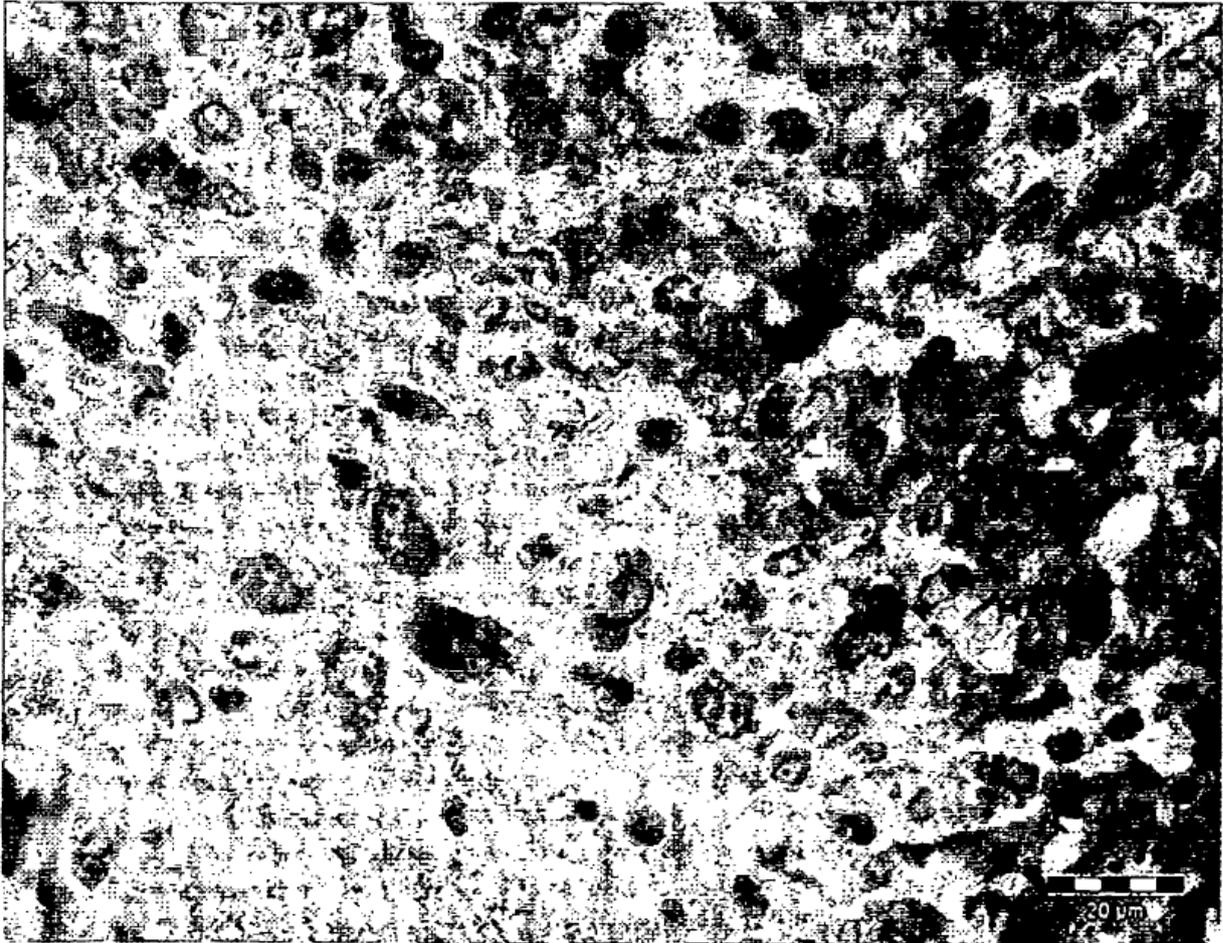


Fig. 4

