

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 941**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2013 PCT/EP2013/069634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14044828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2013 E 13766279 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2898093**

54 Título: **Método para la detección de mutaciones en BRAF y PI3K**

30 Prioridad:

21.09.2012 EP 12382370

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

16.05.2019

73 Titular/es:

**GENOMICA S.A.U. (100.0%)
C/ Alcarria 7 Poligono Industrial de Coslada
28823 Coslada, Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**VILLAHERMOSA, MARIA LUISA y
MOSCO DEL PRADO, JUAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 712 941 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

Método para la detección de mutaciones en BRAF y PI3K

5 **Antecedentes de la invención**

10 B-raf (o BRAF) es una parte de la ruta de transducción de la señal Ras/Raf/MEK/MAP y tiene un papel en la regulación de la ruta de señalización de la ruta de señalización MAPcinasa/ERK. Las mutaciones en este género se han asociado con distintos cánceres tales como el cáncer colorrectal (CRC), cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), melanomas malignos y adenocarcinomas.

15 Las mutaciones oncogénicas en BRAF, casi todas de las cuales son la mutación V600E, se han expuesto en el cáncer de colon (Davies H, et al, 2002, Nature 417:949-54; Rajagopalan H, et al., 2002, Nature 418:934). La mutación V600E se localiza en el exón 15 del gen de BRAF: en la posición 1799 de la secuencia codificante de BRAF se cambia una T por una A, que da como resultado el cambio de una valina presente en el tipo silvestre de la proteína BRAF, en una glutamina € en la proteína correspondiente con el gen mutado. La mutación V600K (1798-1799 GT>AA), menos abundante, también se ha detectado, y constituye la segunda mutación más abundante en patologías tales como el melanoma (Rubinstein et al, 2010, Journal of Translational Medicine 8, No se dan las pp.). Otras mutaciones genéticas de BRAF identificadas son V600D, V600M y V600A.

20 La ruta de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) tiene un importante papel en muchos procesos celulares incluyendo la proliferación, adhesión, supervivencia y motilidad celular. La mala regulación de esta ruta se ha observado en muchos tipos de enfermedades malignas humanas y se ha asociado comúnmente con alteraciones genéticas en los componentes de la ruta. Dichas alteraciones genéticas incluyen las mutaciones activadoras en la subunidad p110a de la PI3K, PI3KCA (Hurst et al, 2009, BMC Research Notes 2:66). La mayoría de las mutaciones de PI3K se producen tanto en el exón 9 de PI3KCA, que codifica el dominio helicoidal, o exón 20 del PI3KCA, que codifica el dominio cinasa (Engelman, 2009, Nat. Rev. Cancer 9: 550-562). Cuatro mutaciones de PI3K frecuentes en los exones mencionados anteriormente son E542K, E545D, E545K (los tres localizados en el exón 9) y H1047R (exón 20).

30 Recientes publicaciones sugieren que las mutaciones en BRAF y PI3K pueden conferir una resistencia a la terapia con anti-EGFR (Lurkin et al, 2010, PLoS ONE, 5, (1); De Roock et al, 2010, Lancet Oncol. 11: 753-62; De Roock et al, 2011, Lancet Oncol. 12: 594-603; Bardelli & Sienna, 2010, J Clin Oncol; 28(7): 1254-1261).

35 Hay una alta demanda de métodos de detección de mutaciones de los genes PI3K y BRAF. Recientemente, se ha desvelado un método para la detección simultánea de mutaciones genéticas que son relevantes para la respuesta al tratamiento anti-EGFR (Lurkin et al., 2010, PLoS ONE, 5, (1)). El método incluye el análisis de las mutaciones de PI3K en los exones 9 y 20, así como el análisis de las mutaciones BRAF en el exón 15. Básicamente, se diseñaron dos PCR múltiples; una primera que comprende un par de cebadores de amplificación del exón 15 de BRAF; y la segunda que comprende dos pares de cebadores para la amplificación de los exones PI3K 9 y 20. Posteriormente, los productos de las PCR obtenidos se someten a purificación, desnaturalización e incubación con las sondas que se hibridan con una de las cadenas de su producto de amplificación correspondiente, en una posición adyacente al sitio de mutación. Entonces se llevan a cabo reacciones de extensión en un ciclador térmico, en el que solo se incorpora el ddNTP complementario de la mutación que está presente en la muestra en el producto de extensión, y se detecta con un secuenciador automático.

45 Otros métodos de detección en estos genes incluyen los métodos ARMS en tiempo real (sistema de amplificación de mutación refractaria), tal como los escritos en Ellison et al., 2010, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 29: 132. Ellison et al. Compara los análisis de mutación por secuenciación de ADN y ARMS en cuanto a su capacidad para detectar mutaciones en especímenes de biopsias clínicas e incluye los análisis de una mutación en BRAF.

50 ARMS es un método para la detección de mutaciones puntuales, basado en el principio del cebado de amplificación por PCR específica de alelo (documento, EP0332435; Newton et al., 1989, Nucleic Acid Research 17, 2503-2516). Este sistema se basa en una estrategia en la que cada oligonucleótido cebador o cebador se diseña de manera que solo funciona como un cebador para la PCR cuando se hibrida con su correspondiente secuencia de ADN diana específica. La técnica necesita que el extremo 3' del nucleótido del cebador de PCR sea específico de alelo. Esto implica que el nucleótido del extremo 3' se corresponda con el de la mutación puntual. Por lo tanto, el cebador se diseña de dos maneras: La manera "normal", es refractaria a la amplificación por PCR de la matriz de ADN "mutante", y la forma mutante, que es refractaria a la amplificación por PCR del ADN normal.

60 En algunos casos, una única base no coincidente 3' no evita completamente la extensión no específica del oligonucleótido cebador cuando se tiene como diana el ADN correspondiente a otra mutación puntual, y la amplificación progresa. En dichos casos, una introducción deliberada de una falta de coincidencia cerca del extremo 3' del cebador apropiado específico de alelo (en el segundo, tercero, incluso cuarto nucleótido desde el extremo 3' del cebador) permite aumentar la especificidad del cebador.

La técnica ARMS implica que tengan lugar al menos dos PCR en una mezcla de reacción que se corresponde cada una con la amplificación con uno de los cebadores de ARMS. Cada uno de los cebadores de ARMS necesita un segundo cebador (habitualmente llamado “cebador común”, y que se llamará de aquí en adelante “cebador de amplificación”) para generar el producto específico de alelo.

5 La presencia de la secuencia diana específica en la muestra se revela por visualización del producto después de la electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. De manera alternativa, los resultados se pueden analizar en un formato de tubo cerrado en tiempo real incorporando sondas fluorescentes tales como Taqman, Scorpions, balizas moleculares o colorantes fluorescentes intercaladores tales como Yo-Pro o Sybr verde.

10 El estado de la técnica a menudo se enfrenta con el problema de detectar las mutaciones V600E y V600K de BRAF y las mutaciones de PI3K E542K, E545D, E545K y H1047R. Sin embargo, hasta donde se sabe, ninguno de los métodos de detección existentes en la técnica, permite la detección de ninguno de los productos de amplificación obtenidos de estas mutaciones, por medio de su hibridación con sondas específicas. Esto es debido al hecho de que cualquier sonda que se pudiera diseñar para la hibridación con cualquiera de los productos de amplificación correspondientes con una de las mutaciones de estos genes, se uniría también inespecíficamente a los productos de amplificación de mutaciones similares como mutaciones próximas en el mismo gen, debido a la similitud de secuencia entre ellas. Por eso, los métodos de detección de las mutaciones en BRAF o PI3K del estado de la técnica tienen el inconveniente de la detección de que cualquiera de los productos de amplificación obtenidos no se puede llevar a cabo mediante la hibridación de las sondas específicas de mutación anteriores, y, en particular, con las micromatrices que contienen dichas sondas.

25 Este inconveniente se aplica tanto a la estrategia de amplificación ARMS múltiple, así como la estrategia de amplificación ARMS individual, en la que los productos de amplificación de cada mutación se obtienen en vasos de reacción independiente.

Otro problema asociado es que las mutaciones de BRAF y PI3K que pueden estar presentes como factores de pronóstico para la estadificación del tumor, metástasis, evolución, heterogeneidad celular, o heterogeneidad alélica, a menudo se encuentran en muestras con baja abundancia con respecto a la forma de tipo silvestre. Y, aunque hay disponibles muchos métodos diagnósticos para la detección de mutaciones, la mayoría no pueden detectar con precisión mutaciones con baja abundancia. La secuenciación de Sanger es la mejor convencionalmente para la identificación de la mutación ya que solo puede detectar mutaciones con abundancias por encima de aproximadamente un 20 % (Ogino et al., 2005, J. Mol. Diagn. 7: 413-421; Li et al., 2008, Nat. Med. 14: 579-584).

35 El documento WO2011/019704 desvela un método dirigido a detectar la presencia de mutaciones BRAF en una muestra, comprendiendo el método: (a) aislar el ácido nucleico de la muestra; (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de las secuencias de ácido nucleico de la muestra, en el que dicha reacción de amplificación comprende un cebador capaz de hibridarse específicamente a una secuencia BRAF mutante en una primera posición de una secuencia BRAF en el que dicho primer cebador tiene las SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8 o SEQ ID N° 9, y un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con una segunda posición de una secuencia de BRAF en el que dicho segundo cebador tiene la SEQ ID N° 10, en el que la reacción de amplificación es capaz de producir un producto de amplificación específico BRAF mutante cuando las secuencias de la muestra comprende una secuencia BRAF mutante y (c) visualizar los productos de la amplificación producidos por dicha reacción de amplificación, en el que la detección de un producto de la amplificación específico del BRAF mutante es un indicador positivo de la presencia de una mutación de BRAF en dicha muestra.

50 Las SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9 y SEQ ID N° 10 se definen como pares de cebadores específicos de BRAF mutante V600E a modo de ejemplo; las SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 10 se definen como pares de cebadores específicos de BRAF mutante V600D a modo de ejemplo; SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6 y SEQ ID N° 10 se definen como pares de cebadores específicos de BRAF mutante V600K a modo de ejemplo; SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8 y SEQ ID N° 10 se definen como pares de cebadores específicos de BRAF mutante V600M a modo de ejemplo; SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 10 se definen como pares de cebadores específicos de BRAF mutante V600A a modo de ejemplo. Todas las secuencias descritas en el documento WO2011/019704 son 100 % específicas de la diana BRAF. El método descrito en el documento WO2011/019704 no permite distinguir el mutante de BRAF exacto que está presente en la muestra.

60 El documento EP2236627 desvela polinucleótidos cebadores que se pueden utilizar en los ensayos para la detección de las mutaciones H1047R, H1047L, E542K, y E545K del gen PIK3CA. Las SEQ ID N° 3 a 9, y en particular la SEQ ID N° 5 se proporcionan como secuencias de cebador directo para detectar la mutación E542K; las SEQ ID N° 10 a 16, y en particular la SEQ ID N° 14 se proporcionan como secuencias de cebador directo para detectar la mutación E545K; las SEQ ID N° 20 a 26, y en particular la SEQ ID N° 21 se proporcionan como secuencias de cebador directo para detectar la mutación H1047R; y las SEQ ID N° 27 a 33, y en particular la SEQ ID N° 28 se proporcionan como secuencias de cebador directo para detectar la mutación H1047L. Todos estos cebadores son cebadores ARMS y cumplen el patrón complementario de los cebadores ARMS respecto a sus regiones diana. Los cebadores inversos son cebadores Scorpions marcados, que presentan una complementariedad

perfecta con sus regiones diana. Los amplicones que pueden generarse se detectan por medio del fluoróforo presente en el cebador Scorpions.

Hamfjord et al (Diagnostic molecular pathology, vol. 20, nº 3, 2011, páginas 158-165) presenta un “ensayo ARMS aumentado oscilante” para detectar 7 mutaciones en el gen KRAS y 1 mutación, 1799T>A (V600E), en el gen BRAF. El método consiste en el aislamiento del ADN de un bloque FFPE, y se somete a amplificación de PCR en tiempo real con cebadores de ARMS que comprenden algunas búsquedas adicionales (oscilante) para aumentar la sensibilidad y la especificidad junto con un cebador inverso universal. Se llevaron a cabo varios experimentos para determinar las condiciones más ventajosas de la amplificación por PCR en tiempo real.

Por lo tanto, es altamente deseable proporcionar un método que, a diferencia de los métodos del estado de la técnica, permita detectar específicamente cualquier producto de amplificación, obtenido a partir de cualquiera de las mutaciones de BRAF V600E y V600K, y mutaciones de PI3K E542K, E545D, E545K y H1047R presentes en la muestra, por hibridación de los productos de amplificación correspondientes con sondas específicas de la diana. también es deseable que el método permita la detección de mutaciones presentes en bajos porcentajes en la muestra. La invención descrita en el presente documento tiene por tanto el objetivo de proporcionar un método robusto y fiable para la detección de mutaciones BRAF y PI3K, y mitigar de esta manera los inconvenientes de la técnica anterior.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método de detección de las 2 mutaciones de BRAF V600E y V600K, y opcionalmente una cualquiera de las 4 mutaciones de PI3K E542K, E545D, E545K y H1047R presentes en una muestra, mediante la hibridación de cualquier producto de amplificación obtenida a partir de un ácido nucleico que tenga cualquiera de estas mutaciones, con sondas específicas de la diana.

La invención se basa en la amplificación de 2 mutaciones BRAF V600E y V600K y opcionalmente una o más de las 4 mutaciones de PI3K E542K, E545D, E545K y H1047R presentes en una muestra, con los cebadores ARMS de la presente invención.

Cada uno de los cebadores ARMS tiene una longitud total de 36 a 50 nucleótidos, estando su extremo 3' diseñado de acuerdo con el método de amplificación ARMS (sistema de mutación refractaria a la amplificación, método para la detección de mutaciones puntuales basado en el principio del cebado específico de alelo de amplificación por PCR), y constituyendo este extremo 3' una secuencia diana específica seleccionada de entre las SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2, respectivamente, en el caso de las mutaciones V600E y V600K de BRAF y las SEC ID Nº 12, SEC ID Nº 13, SEC ID Nº 14 y SEC ID Nº 15, respectivamente, en el caso de las mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R de PI3K, comprendiendo adicionalmente cada cebador una secuencia marcadora 5' específica no de la diana diferente de desde 15 a 20 nucleótidos.

Por lo tanto, el cebador ARMS que se utiliza en el método de la presente invención comprende una secuencia específica de la diana en el extremo 3', que es capaz de hibridarse con el ácido nucleico diana que comprende una mutación como se ha descrito anteriormente de una manera específica de alelo. Este cebador también comprende una secuencia 5' que no es específica de la diana y por lo tanto no complementaria con el ácido nucleico diana. Esta secuencia es una secuencia marcadora que es útil para la detección del producto de amplificación a lo largo de la hibridación posterior con una sonda diseñada específicamente para hibridarse a la región del producto de amplificación complementaria a la secuencia marcadora. Esto permite la detección específica del producto de amplificación mediante los métodos descritos en el presente documento.

El método de la presente invención permite detectar específicamente cualquier producto de amplificación obtenido de las 2 mutaciones V600E y V600K de BRAF y opcionalmente las mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R de PI3K presentes en una muestra, mediante la hibridación de dicho producto con dos o más sondas que se hibridan específicamente en la región correspondiente al marcador proporcionado por el cebador específico.

Las secuencias marcadoras en 5' de los diferentes cebadores son diferentes entre ellas. Esta diferencia es lo que hace posible la unión específica de diferentes productos de amplificación a sus sondas correspondientes, por cada sonda específica de uno de los productos de amplificación tiene que haber una secuencia de nucleótido capaz de hibridarse con este en la región correspondiente al marcador proporcionado por el cebador específico.

A lo largo de la presente memoria descriptiva de patente estos cebadores específicos de mutación en su extremo 3' de acuerdo con el método de amplificación ARMS se denominarán “cebadores ARMS”. Adicionalmente, también se hace referencia al cebador o cebadores que se combinan con los cebadores ARMS para la amplificación de un ADN diana, como cebadores comunes, que se llamarán de aquí en adelante “cebadores de amplificación”. Los cebadores ARMS específicos para las mutaciones de BRAF y PI3K de la presente invención, se puede representar como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1:	
BRAF V600E	5' marcador 1-GGTGATTTTGGTCMARCADOR CTTCAGA 3',
BRAF V600K	5' marcador 2-GGTGATTTTGGTCMARCADOR CTAATAA 3',
PI3K E542K	5' marcador 3-AAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTGTCTA 3',
PI3K E545D	5' marcador 4-CCTCTCTCTGAAATCAGTGAT 3',
PI3K E545K	5' marcador 5-GATCCTCTCTCTGAAATCAGTA 3',
PI3KH1047R	5' marcador 6-GAAACAAATGAATGATGCTCGT 3',

5 El marcador1, marcador2, marcador3, marcador4, marcador5 y marcador 6, son secuencias de nucleótido de 15 a 20 nucleótidos y más preferentemente, de 17 a 19 nucleótidos de longitud, siendo todos diferentes entre ellos. En otras palabras, no hay una homología sustancial entre las secuencias marcadoras. Sin homología sustancial significa menos del 50 % (es decir, dos secuencias marcadoras no deben compartir más del 50 % de sus nucleótidos).

10 El contenido de G-C del marcador puede ser del 11-71 %, más preferentemente del 40-60 %. La Tm del marcador puede ser de 39-70 °C. Preferentemente, la longitud total del cebador ARMS está entre 39 y 47 nucleótidos.

Los cebadores ARMS particularmente preferidos son los de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19, que se corresponden con las mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R de PI3K, respectivamente.

15 Además de los cebadores ARMS, la mezcla de amplificación comprende un cebador de amplificación, que se combina con los cebadores ARMS para generar los productos de amplificación. El cebador de amplificación comprende o consiste en la SEQ ID N° 5.

20 El método de la presente invención comprende por lo tanto poner en contacto una muestra de ensayo que comprende ácidos nucleicos con uno o más cebadores ARMS diagnósticos específicos para las mutaciones de BRAF y, opcionalmente de PI3K anteriores, en presencia de uno o más cebadores de amplificación, nucleótido trifosfatos apropiados, y un agente de polimerización, y en las condiciones apropiadas de manera que cada cebador ARMS diagnóstico se extiende solamente cuando su mutación correspondiente está presente en la muestra; la presencia o ausencia de cada mutación se detecta en referencia a la presencia o ausencia del correspondiente producto de extensión del cebador diagnóstico. La presencia o ausencia de cualquiera de dichos productos se determinará mediante hibridación de cualquier producto de amplificación obtenido, con sondas específicas del marcador.

30 Los métodos de amplificación y detección de mutaciones de BRAF y PI3K de la presente invención se diferencian de las del estado de la técnica en el uso de cebadores ARMS descritos en el presente documento. La amplificación con estos cebadores permite la hibridación específica posterior de los productos de amplificación con sondas específicas de secuencia.

35 En particular, la amplificación de las 2 mutaciones V600E y V600K de BRAF, y opcionalmente una o más de las 4 mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R de PI3K, con uno o más de los cebadores ARMS de la presente invención que se presentan en la Tabla 1 permite, al contrario que con los métodos de detección de BRAF y PI3K del estado de la técnica, para detectar cualquier producto de amplificación resultante mediante hibridación con las sondas específicas de secuencia. Preferentemente, sondas específicas de secuencia que se pueden proporcionar en una micromatriz.

40 El hecho clave que permite que la unión específica entre los productos de amplificación y sus sondas correspondientes es que las sondas de detección se hibridan específicamente con su producto de amplificación correspondiente en la región correspondiente con el marcador1, marcador2, marcador3, marcador4, marcador5 o marcador 6 proporcionados por el correspondiente cebador ARMS. Esta región de marcadores no tiene una homología sustancial entre los diferentes cebadores. De esta manera, se consigue la especificidad entre cualquier producto de amplificación y su sonda correspondiente.

50 Para un entendimiento más fácil del método de la presente invención, la Figura 12 representa un esquema de este. Como ejemplo se ha seleccionado la mutación V600E de BRAF.

El método de la presente invención constituye una ventaja relevante frente a los métodos del estado de la técnica, siendo la razón que la hibridación específica de los productos de amplificación con sondas específicas da como

resultado un método de detección de una etapa mucho más simple que los métodos del estado de la técnica para la detección de las mutaciones de BRAF y PI3K.

5 El presente método de detección presenta valores de sensibilidad de manera que puede detectarse el 1 % de mutantes en BRAF o PI3K en un escenario de ts.

10 Lurkin et al., 2010, PLoS ONE, 5, (1), desvela un método de detección basado en amplificación de ADN seguido por hibridación con sondas. En particular, se diseñaron dos PCR múltiples, la primera permitía la detección del exón 15 de BRAF, y la segunda que permitía la detección de los exones 9 y 20 de PI3K. Los productos de amplificación
15 obtenidos de cada gen se hibridan inespecíficamente a una sonda, hibridándose la sonda con los correspondientes productos en una posición adyacente al sitio de la mutación de interés. La detección específica solo se consigue con la extensión del híbrido formado por la sonda y el producto de amplificación. Los productos obtenidos se procesan y analizan posteriormente en un secuenciador automático, con el marcador fluorescente en el ddNTP incorporado
20 indicando al presencia o ausencia de la mutación. Por lo tanto, en Lurkin et al., los productos de amplificación obtenidos inespecíficamente se unen a la sonda proporcionada, y solo con la extensión del híbrido formado por la sonda y el producto de amplificación se conseguirá la detección específica. Esto significa que se necesita al menos una reacción adicional a la de amplificación para conseguir la detección. Al contrario que Lurkin et al., de acuerdo con el método de la presente invención, la detección tiene lugar mediante una hibridación directa de cualquier producto de amplificación obtenido con su sonda específica.

20 El método de la presente invención también permite una amplificación por PCR múltiple, con dos o más cebadores ARMS de la presente invención. Adicionalmente, el método de la presente invención permite la detección de mutaciones que están presentes en la muestra con un porcentaje bajo.

25 Uno de los aspectos de la presente invención se corresponde con un método para la detección de las mutaciones V600E y V600K de BRAF, en el que el método comprende las etapas de:

30 – someter una muestra de ensayo que comprende los ácidos nucleicos a una amplificación con una mezcla de amplificación que comprende dos cebadores ARMS, en el que los dos cebadores ARMS tienen la SEQ ID N° 3 y la SEQ ID N° 4,

comprendiendo la mezcla de amplificación adicionalmente un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5; y

35 – detectar cualquier producto de amplificación obtenido, mediante la hibridación de cualquiera de dichos productos con dos o más sondas, en el que cada sonda se hibrida específicamente con la región del producto de amplificación correspondiente a la secuencia marcadora 5' del correspondiente cebador ARMS.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para detectar las mutaciones V600E y V600K de BRAF en una muestra de ensayo que comprende un ácido nucleico, en el que dicho kit comprende una muestra de reactivos para la amplificación del ácido nucleico, que comprende:

45 - dos cebadores ARMS de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, y
- un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5,

Comprendiendo además el kit una micromatriz en la que se inmovilizan dos o más sondas, hibridándose cada sonda específicamente a la región del producto ARMS correspondiente de manera complementaria a una secuencia marcadora 5' del cebador ARMS correspondiente.

50 Un aspecto relacionado de la presente invención se corresponde con un método de amplificación de un ácido nucleico que tiene una o más mutaciones de BRAF seleccionadas de entre V600E y V600K, y/o una o más mutaciones de PI3K seleccionadas de entre E542K, E545D, E545K y H1047R, en el que el método comprende poner en contacto una muestra que comprende ácidos nucleicos con una mezcla de amplificación que comprende uno o más cebadores ARMS, caracterizada porque cada cebador ARMS tiene una longitud total de desde 36 a 50
55 nucleótidos, y comprende una secuencia específica de diana 3' seleccionada de entre las SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, respectivamente, comprendiendo además cada cebador ARMS una secuencia 5' diferente no específica de la diana de desde 15 a 20 nucleótidos, comprendiendo además la mezcla de amplificación uno o más cebadores de amplificación.

60 Además de los cebadores ARMS y de amplificación, la mezcla de amplificación puede comprender también reactivos adicionales para la amplificación de ácido nucleico, tales como una ADN polimerasa y dNTP.

65 El marcador 5' se puede seleccionar de entre una de las siguientes secuencias SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25.

Las sondas de la presente invención pueden comprender una secuencia seleccionada de entre SEQ ID N° 6, SEQ

ID N° 7, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25, y pueden contener nucleótidos adicionales a los específicos de la región marcadora.

5 Preferentemente, una o más sondas con las que se ponen en contacto los productos de amplificación tienen una longitud de 15 a 45 nucleótidos, la región de la sonda que se hibrida específicamente con la región del producto correspondiente con la secuencia 5' del cebador ARMS, tiene una longitud de 15 a 20 nucleótidos. Más preferentemente aun, una o más sondas comprenden secuencias seleccionadas de entre SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25.

10 Preferentemente, las sondas de la presente invención se seleccionan de entre SEQ ID N° 8 (BRAF V600E), SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11 (BRAF V600K), SEQ ID N° 26 (PI3K E542K), SEQ ID N° 27 (PI3K E545D), SEQ ID N° 28 (PI3K E545K), SEQ ID N° 29 y SEQ ID N° 30 (PI3K H1047R).

15 Las sondas pueden estar inmovilizadas en un soporte sólido. El conjunto de sondas de la micromatriz y el soporte sólido pueden comprender adicionalmente una o más sondas de control.

20 Otro aspecto de la presente invención se corresponde con un método de amplificación de ácidos nucleicos que se corresponden con las mutaciones V600E y V600K de BRAF, en el que el método comprende poner en contacto una muestra que contiene ácidos nucleicos con una mezcla de amplificación que comprende dos cebadores ARMS de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, comprendiendo además la mezcla de amplificación un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5.

25 Un aspecto relacionado de la presente invención se corresponde con un cebador ARMS de 36 a 50 nucleótidos, que se caracteriza en que dicho cebador comprende una secuencia 3' específica de la diana BRAF seleccionada de entre las SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, o una secuencia específica de la diana 3' PI3K seleccionada de entre las SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, así como una secuencia marcadora 5' no específica de diana de entre 15 a 20 nucleótidos. Preferentemente, secuencia marcadora 5' tiene 17 a 19 nucleótidos de longitud. El uno o más cebadores ARMS se puede seleccionar de entre el grupo que comprende las SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19.

30 Otro aspecto más de la presente invención se corresponde con el uso de los métodos de detección y amplificación, o el kit, como se describe en el presente documento, para el diagnóstico y/o pronóstico de una afección patológica en una paciente, o para prever la respuesta de una paciente a la terapia con anticuerpo anti-EGFR. Preferentemente la afección patológica es un cáncer. Más preferentemente, el cáncer es un cáncer colorrectal.

35 Un aspecto relacionado se refiere a un método para la detección/diagnóstico del cáncer en un paciente que comprende un método de detección o amplificación como se describe en el presente documento. Adicionalmente, un aspecto relacionado de la presente invención se corresponde con la predicción de la respuesta de un paciente a la terapia con anticuerpos anti-EGFR mediante la ejecución de los métodos y el kit de la presente invención.

40 Las realizaciones se proporcionan mediante las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de los dibujos

45 Figura 1.

La Figura 1 es un esquema que muestra la hibridación específica del producto de amplificación obtenido con un cebador ARMS de la presente invención que se corresponde con una mutación V600E, y la sonda específica correspondiente. Como se indica en la figura, solo el producto ARMS de la mutación V600E de BRAF se une específicamente a la sonda correspondiente a V600E, mientras que el producto ARMS de V600K no lo hace. De manera similar, solo el producto de amplificación de V600K se une específicamente a la sonda correspondiente a V600K, mientras que el producto ARMS de V600E no lo hace (no mostrado).

Figura 2.

55 La Figura 2 representa una visualización en un gel de agarosa al 2 %, de los productos de la amplificación múltiple ARMS de las mutaciones V600E y V600K de BRAF, que se llevan a cabo con los cebadores ARMS y de amplificación de la presente invención, de acuerdo con el Ejemplo 1 (Múltiple 1), y las muestras/líneas celulares/clones indicados que se corresponden con las mutaciones V600E o V600K de BRAF indicadas.

Figura 3.

60 La Figura 3 representa la visualización de la hibridación con una micromatriz que comprende las sondas como se describe en el presente documento, de los productos que resultan de la amplificación por ARMS múltiple de acuerdo con el Ejemplo 1 de la presente invención,

65 (a) Muestra que comprende la mutación V600E de BRAF. P: Marcador de posición; Círculos: productos de amplificación IC/EC; Cuadrados: puntos correspondientes a la hibridación del producto de amplificación por ARMS múltiple correspondientes a la mutación V600E de BRAF, y su sonda específica.

(b) Clon de 10e3 copias/5 µl de la mutación V600K de BRAF. P: Marcador de posición; Círculos: productos de amplificación IC/EC; Rectángulos: puntos correspondientes a la hibridación del producto de amplificación por ARMS múltiple correspondientes a la mutación V600K de BRAF, y su sonda específica. Los puntos denominados "P" se corresponden con el Marcador de Posición; Los puntos rodeados por Círculos, se corresponden con los productos de amplificación IC o EC; los puntos rodeados por cuadrados (en (a)), se corresponden con la unión específica del producto de amplificación con ARMS V600E BRAF con sus sondas específicas; los puntos rodeados por rectángulos (en (b)), se corresponden con la unión específica del producto de amplificación con ARMS V600K BRAF con sus sondas específicas. IC: Control interno; EC: Control de extracción.

Figura 4.

La Figura 4 representa la visualización de la hibridación con una microsonda que comprende las sondas como se describen en el presente documento, de los productos que resultan de la amplificación con ARMS múltiple de acuerdo con el Ejemplo 2 de la presente invención.

(a) Línea celular HTC 116 que contienen la mutación H1047R de PI3K; (b) Muestra clínica que comprende la mutación E542K de PI3K. Los puntos denominados "P" se corresponden con el Marcador de Posición; los puntos rodeados por Círculos se corresponden con los productos de amplificación IC o EC; los puntos rodeados por Cuadrados se corresponden con la unión específica del producto de amplificación con ARMS H1047R PI3K con sus sondas específicas (en (a)) o a la unión específica del producto de amplificación con ARMS E542K PI3K con sus sondas específicas (en (b)).

Descripción detallada de la invención

En los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos de la presente invención. Cada aspecto definido de esta manera se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos a menos de que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como que es preferida o especialmente ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características preferidas o ventajosas.

Un primer aspecto de la presente invención proporciona un método para la detección de mutaciones V600E y V600K de BRAF, en el que el método comprende las etapas de:

- someter una muestra de ensayo que comprende ácidos nucleicos a la amplificación con una mezcla de amplificación que comprende dos cebadores ARMS, en el que los dos cebadores ARMS tienen la SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4,

comprendiendo adicionalmente la mezcla de amplificación un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5; y

- detectar cualquier producto de la amplificación obtenido, mediante hibridación de cualquiera de dichos productos con dos o más sondas, en el que cada sonda se hibrida específicamente con la región del producto de amplificación correspondiente a la secuencia marcadora 5' del correspondiente cebador ARMS.

Un aspecto relacionado de la presente invención es un método para la detección de una o más mutaciones de BRAF seleccionadas de entre V600E y V600K, y/o una o más de las mutaciones de PI3K seleccionadas de entre E542K, E545D, E545K y H1047R, en una muestra de ensayo que comprende ácidos nucleicos en el que dicho método comprende:

- someter la muestra a una amplificación con una mezcla de amplificación que comprende uno o más cebadores ARMS, caracterizados por que cada cebador tiene una longitud total de 36 a 50 nucleótidos, y comprende una secuencia específica de la diana en 3' seleccionada de entre las SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, o SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, respectivamente, comprendiendo cada cebador adicionalmente una secuencia marcadora 5' no específica de diana diferente de desde 15 a 20' nucleótidos.

comprendiendo adicionalmente la mezcla de amplificación uno o más cebadores de amplificación, y

- detectar cualquier producto de amplificación obtenido, mediante hibridación de cualquiera de dichos productos con una o más sondas específicas, en el que la sonda específica de cualquier mutación de BRAF o PI3K se hibrida específicamente con el producto al menos en la región de producto que se corresponde con la secuencia marcadora 5' proporcionada por el cebador ARMS específico correspondiente.

Un segundo aspecto de la presente invención corresponde con un kit para detectar las mutaciones V600E y V600K de BRAF en una muestra de ensayo que comprende ácido nucleico, y en el que dicho kit comprende una mezcla de reactivos para la amplificación de ácido nucleico, que comprende:

- dos cebadores ARMS de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, y

- un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5,

comprendiendo adicionalmente el kit una micromatriz en la que se inmovilizan dos o más sondas, hibridándose cada sonda específicamente a la región en el producto ARMS correspondiente complementaria a una secuencia marcadora 5' del cebador ARMS correspondiente.

Otro aspecto de la presente invención se corresponde con un método de amplificación de ácidos nucleicos correspondientes con las mutaciones V600E y V600K de BRAF, en el que el método comprende poner en contacto una muestra que contiene ácidos nucleicos con una mezcla de amplificación que comprende dos cebadores ARMS de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, comprendiendo adicionalmente la mezcla de amplificación un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5.

Un aspecto relacionado de la presente invención es un kit para la detección de una o más mutaciones de BRAF seleccionadas de entre V600E y V600K, y/o una o más mutaciones de PI3K seleccionadas de entre E542K, E545D, E545K y H1047R presentes en la muestra. Específicamente la invención se refiere a un kit para la detección de cualquiera de dichas mutaciones en la muestra de ensayo que comprende el ácido nucleico, en el que dicho kit comprende una o más mezclas de reactivos para la amplificación de ácido nucleico, comprendiendo cada mezcla:

- uno o más cebadores ARMS caracterizados porque cada cebador tiene una longitud de 36 a 50 nucleótidos que comprende una secuencia específica de diana 3' seleccionada de entre la SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, respectivamente, comprendiendo adicionalmente cada cebador una secuencia marcadora no específica de la diana 5' de desde 15 a 20 nucleótidos, y
- uno o más cebadores de amplificación.

Comprendiendo adicionalmente el kit una micromatriz en la que están inmovilizadas una o más sondas. Cada sonda específica se hibrida específicamente con la región en el correspondiente producto ARMS complementario a la secuencia marcadora 5' del correspondiente cebador ARMS.

Un aspecto relacionado de la presente invención se refiere a un método para la amplificación de un ácido nucleico en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho ácido nucleico una o más mutaciones de BRAF seleccionadas de entre V600E y V600K, y/o una o más mutaciones de PI3K seleccionada de entre E542K, E545D, E545K y H1047R, en el que dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con uno o más cebadores ARMS caracterizados porque cada cebador tiene una longitud total de 36 a 50 nucleótidos y comprende una secuencia 3' específica de la diana seleccionada de entre SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, respectivamente, comprendiendo cada cebador una secuencia marcadora no específica de la diana 5' de desde 15 a 20 nucleótidos, comprendiendo adicionalmente la mezcla de amplificación uno o más cebadores de amplificación.

Más preferentemente, cada cebador ARMS tiene una longitud total de 39 a 47 nucleótidos; la secuencia específica de la diana 3' tiene una longitud de 212 a 30 nucleótidos; la secuencia marcadora 5' tiene una longitud de desde 17 a 19 nucleótidos; la sonda de detección tiene una longitud de 28 a 38 nucleótidos.

En una realización, el método o kit se refiere a la detección o amplificación de una o más mutaciones de PI3K seleccionadas de entre E542K, E545D, E545K y H1047R. Por ejemplo, se puede detectar o amplificar una única mutación seleccionada de entre E542K, E545D, E545K y H1047R, se puede detectar o amplificar cualquier combinación de dos o tres mutaciones seleccionadas de entre E542K, E545D, E545K y H1047R o se pueden detectar o amplificar todas de E542K, E545D, E545K y H1047R. En una realización, se detectaban o amplificaban todas de V600E, V600K, E542K, E545D, E545K y H1047R.

De acuerdo con los métodos y el kit de la presente invención, además de los cebadores ARMS y de amplificación, también pueden estar presentes cualquiera de entre otros componentes adicionales conocidos por el experto que sean necesario para la amplificación de un ácido nucleico, y en particular, para la amplificación por PCR en la mezcla de amplificación. De esta manera, una ADN polimerasa y dNTP, también pueden estar presentes en la mezcla de amplificación.

Preferentemente, el producto de amplificación se transforma en un ADN de cadena sencilla antes de la hibridación con la sonda correspondiente. Más preferentemente, se obtiene un ADN de cadena sencilla mediante desnaturalización del producto de amplificación, más preferentemente, mediante desnaturalización por calor. La sonda se hibrida específicamente a la región en el producto complementario a la secuencia marcadora 5' del cebador ARMS específico. Preferentemente, las sondas están comprendidas en una micromatriz, y más preferentemente, las sondas están inmovilizadas en un soporte sólido.

Definiciones

Lo siguiente puede ser útil en el entendimiento de la invención.

“Cebador” significa “cebador de una reacción de amplificación de ácido nucleico”.

A lo largo de la presente divulgación, a menos de que se establezca otra cosa, la expresión “cebadores ARMS” se refiere a cebadores específicos de la mutación de BRAF y PI3K diseñados en su extremo 3’ de acuerdo con el método de amplificación ARMS, y que comprenden una secuencia marcadora 5’ no específica de la diana; y la expresión “cebadores de amplificación” se refiere a los cebadores que se combinan con los cebadores ARMS para la amplificación de un ADN diana.

Los cebadores ARMS utilizados en los diferentes aspectos de la invención se pueden representar como se representan en la Tabla 1 anteriormente, en la que las características de la secuencia marcadora 5’ o el marcador también se indican.

El marcador hace que la sonda sea específica del producto de amplificación. Preferentemente, el marcador 5’ puede seleccionarse de entre una de las siguientes secuencias: SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25.

Se ha descrito una amplificación de una o más mutaciones en BRAF y/o PI3K con uno o más cebadores ARMS seleccionados de entre el grupo de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19:

GATTAGCGCAGTGCACTACGGTGATTTTGGTCTAGCTTCAGA (SEQ ID N° 3) (BRAF V600E)
AGATCGTTATCAATCGCATGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAA (SEQ ID N° 4) (BRAF V600K)
AGACCTTAGCATAGCTTAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTGTCTA (SEQ ID N° 16) (PI3K E542K)
ACTATAGCCGAGTACGGCCCTCTCTGAAATCAGTGAT (SEQ ID N° 17) (PI3K E545D)
TAAGTGGCTATCCGGAGGATCCTCTCTGAAATCAGTA (SEQ ID N° 18) (PI3K E545K)
CGATATGATATGCTAGTTGAAACAAATGAATGATGCTCGT (SEQ ID N° 19) (PI3K H1047R).

Los nucleótidos en negrita se corresponden con el marcador 5’.

Como cebador de amplificación, se puede utilizar cualquier cebador posible que, cuando se utiliza en combinación con uno o más de los cebadores ARMS anteriores para la amplificación, se producen productos de amplificación de 10 pb o más cortas.

En una realización preferida, el cebador de amplificación combinado con los cebadores ARMS anteriores producen productos de amplificación de 500 pb o más cortas, en otra realización preferida de alrededor de 200 pb, en una realización más preferida, de entre 200 pb y 100 pb. Preferentemente el cebador de amplificación tiene una longitud de desde 18 a 24 nucleótidos, y más preferentemente de entre 21 y 22 nucleótidos.

Preferentemente, un cebador de amplificación comprende la SEQ ID N° 5, y más preferentemente, un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID N° 5, se utiliza en combinación con uno o más de los siguientes cebadores ARMS:

- Un cebador de desde 36 a 50 nucleótidos que comprende una secuencia 3’ específica de secuencia seleccionada de entre la SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2,

comprendiendo adicionalmente el cebador una secuencia marcadora 5’ no específica de diana de entre 15 a 20 nucleótidos, así como

- Cebadores de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4.

También, preferentemente, un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID N° 20, y más preferentemente un cebador de amplificación que consiste en la secuencia de SEQ ID N° 20, se utiliza en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS:

- Un cebador de desde 36 a 50 nucleótidos que comprende en su posición 3’ una secuencia específica de la diana seleccionada de entre las SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 y SEQ ID N° 14, comprendiendo adicionalmente el cebador en su extremo 5’ una secuencia marcadora no específica de la diana de desde 15 a 20 nucleótidos; así como

- Cebadores de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18.

También, preferentemente, un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID N° 21, y más preferentemente un cebador de amplificación que consiste en la secuencia de SEQ ID N° 21, se utiliza en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS:

- Un cebador de desde 36 a 50 nucleótidos que comprende en su posición 3’ una secuencia específica de la diana seleccionada de entre las SEQ ID N° 15, comprendiendo adicionalmente el cebador en su extremo 5’ una secuencia marcadora no específica de la diana de desde 15 a 20 nucleótidos; así como

- Un cebador de SEQ ID N° 19.

En un aspecto preferido, cualquier sonda de detección específica tiene una longitud de desde 15 a 45 nucleótidos, la región que se hibrida específicamente con el correspondiente producto ARMS en la región correspondiente a la secuencia marcadora 5' tiene entre 15 y 20 nucleótidos. Cada sonda puede comprender nucleótidos adicionales, sea en el extremo 5' y/o 3', hasta una longitud total de entre 15 a 45 nucleótidos.

5 Preferentemente, las sondas específicas para la detección de las mutaciones V600E y V600K de BRAF, o de cualquiera de las mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R de PI3K, comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25, respetivamente.

10 Se pueden utilizar una o más sondas diferentes para la detección de cada mutación de BRAF o PI3K.

Las sondas más preferidas para cada una de las mutaciones se presentan en la Tabla 2.

Mutación	Secuencia de sonda	SEQ ID N°
BRAF V600E	CGGGTTACCCGGGAGTCTCGATTAGCGCAGTGCACTAC	8
BRAF V600K	AGATCGTTATCAATCGCATGGTGAT	9
BRAF V600K	CGGGTTACCCGGGAGATCGTTATCAATCGCAT	10
BRAF V600K	CGGGTTACCCGGGAGTCTCAGATCGTTATCAATCGCAT	11
PI3K E542K	CGGGTTACCCGGGAGTCTCAGACCTTAGCATAGCTT	26
PI3KE545D	CGGGTTACCCGGGACTATAGCCGAGTACGGC	27
PI3KE545K	CGGGTTACCCGGGAGTCTCTAACTGGCTATCCGGAG	28
PI3KH1047R	CGATATGATATGCTAGTT	29
PI3KH1047R	CGGGTTACCCGGGCGATATGATATGCTAGTT	30

15 En particular, las sondas se pueden inmovilizar en una micromatriz. Una micromatriz es una colección de puntos de oligonucleótido microscópicos. Una micromatriz de ADN (también conocida comúnmente como un chip, chip de ADN, o biochip) es una colección de puntos de ADN microscópicos unidos a una superficie sólida. Las sondas se sintetizan y entonces se unen mediante modificación de superficie a una superficie sólida por un enlace covalente a una matriz química (mediante epoxi-silano, amino-silano, lisina, poliácridamida u otros). Las superficies sólidas se conocen en la técnica e incluyen perlas microscópicas, así como soportes sólidos.

En particular, las sondas de la presente invención se pueden inmovilizar en un soporte sólido.

25 De esta manera, además de la mezcla para la amplificación, el kit de la presente invención comprende una micromatriz en la que se inmovilizan dos o más sondas, hibridándose cada sonda específicamente a la región en el producto ARMS correspondiente complementario de una secuencia marcadora 5' del cebador ARMS correspondiente.

30 Se pueden incluir uno o más controles en los métodos y el kit de la presente invención. Preferentemente, un par de cebadores de amplificación que se corresponden con cualquier gen humano constitutivo y ubicuo conocido por el experto en la técnica, se pueden incluir en la mezcla de amplificación. Más preferentemente, se utilizan los cebadores correspondientes al gen de β -actina. La amplificación con dicho par de cebadores permite confirmar la extracción del ácido nucleico presente en la muestra de ensayo, y constituye el "control endógeno" o "control de extracción". Adicionalmente, se incluyen preferentemente un ADN plasmídico y un par de cebadores con la capacidad de amplificarlo, en la mezcla de amplificación, y constituyen el "control de amplificación" o "control interno". Preferentemente, la micromatriz puede comprender uno o más sondas de control con la capacidad de hibridarse con las secuencias de ADN de control correspondientes, en particular, a los productos de los controles de la extracción y amplificación. Preferentemente, el kit de la presente invención comprende adicionalmente reactivos para la visualización de la hibridación entre cualquier producto de amplificación y la micromatriz de sondas.

40 Un aspecto relacionado de la presente invención se corresponde con uno o más cebadores ARMS de una longitud de 36 a 50 nucleótidos, caracterizados porque cada cebador comprende en su extremo 3' una secuencia específica de la diana BRAF seleccionada de entre la SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, o una secuencia específica de diana PI3K seleccionada de entre SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, cada cebador comprende adicionalmente una secuencia marcadora no específica de la diana en su extremo 5', de desde 15 a 20 nucleótidos. Preferentemente, los marcadores en la posición 5' de los cebadores ARMS contienen 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. Los cebadores ARMS especialmente preferidos son los seleccionados de entre el grupo que comprende las SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19.

Otro aspecto más de la presente invención se corresponde con el uso de los métodos descritos en el presente documento, o del kit descrito en el presente documento, para el diagnóstico y/o pronóstico de una afección patológica en un paciente, en particularmente, de cáncer, así como para la predicción de la respuesta de un paciente a la terapia con anticuerpos anti-EGFR.

5 También se describe un método *in vitro* para diagnosticar un sujeto o evaluar un sujeto en cuanto a una quimioterapia apropiada, que comprende:

- 10 (i) proporcionar una muestra tumoral del sujeto;
 (ii) determinar si está presente una mutación en BRAF y/o PI3K en la muestra utilizando los métodos descritos en el presente documento.

15 La etapa (ii) anterior comprende por lo tanto la detección de una o más mutaciones de BRAF seleccionadas de entre V600E y V600K, o una o más mutaciones de PI3K seleccionadas de entre E542K, E545D, E545K y H1047R, en el que el método comprende las etapas de:

- 20 - someter dicha muestra tumoral que comprende los ácidos nucleicos a una amplificación con una mezcla de amplificación que comprende uno o más cebadores ARMS, caracterizada porque cada cebador ARMS tiene una longitud total de desde 36 a 50 nucleótidos, y comprende una secuencia específica de diana 3' seleccionada de entre las SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, respectivamente,

25 comprendiendo cada cebador ARMS una secuencia marcadora 5' no específica de diana de desde 15 a 20 nucleótidos, comprendiendo la mezcla de amplificación adicionalmente uno o más cebadores de amplificación; y

- detectar cualquier producto de amplificación obtenido, mediante la hibridación de cualquiera de dichos productos con dos o más sondas, en el que cada sonda se hibrida específicamente con la región del producto de amplificación correspondiente a la secuencia marcadora 5' del correspondiente cebador ARMS.

30 Realizaciones preferidas de los cebadores que se van a utilizar se exponen en otra parte del presente documento.

Una etapa adicional puede incluir la selección de un tratamiento apropiado correlativo a la presencia o ausencia de una mutación de BRAF o PI3K.

35 Los tipos de muestras de ensayo que use pueden procesar con la presente invención pueden ser un frotis, biopsias embebidas en parafina, sangre, esputo, lavado colónico, lavado bronquial, así como saliva, plasma y líquido cefalorraquídeo, y cualquier otro fluido corporal, o tejido obtenido de un individuo. El individuo es un ser humano.

40 La muestra de ensayo puede ser igualmente una secuencia de ácido nucleico que se corresponde con la secuencia presente en la muestra de ensayo. Todo o parte de la región de interés presente en la muestra de ácido nucleico se puede amplificar utilizando cualquier técnica conveniente tal como PCR, antes de su uso en el método de la invención.

45 La extracción de material genético puede llevarse a cabo mediante técnicas de extracción automáticas, así como manuales del estado de la técnica.

50 Un método de extracción de ADN especialmente preferido de los tejidos y otras muestras en el Kit EZ1® DNA Tissue de QIAGEN. También se prefiere el producto AHPrep® DNA/RNA FFPE de QIAGEN, que pretende la purificación simultánea de ADN genómico y ARN total de secciones de tejidos fijadas en formalina, embebidas en parafina. también se puede utilizar cualquier otra técnica y métodos para el procesamiento manual o automático de muestras para extraer ADN y otros ácidos nucleicos, de los que sea consciente el experto, en la presente invención.

55 En una realización preferida de la presente invención, el vaso en el que tiene lugar el método de la presente invención comprende, además de uno o más cebadores ARMS y el uno o más cebadores de amplificación, también se incluyen otros componentes para la amplificación del ADN presente en la muestra, en particular, nucleótidos trifosfatos apropiados, tales como dATP, dCTP, dGTP, dTTP, una enzima adecuada para la polimerización en la mezcla de reactivos de amplificación.

60 Se puede utilizar cualquier enzima conveniente para la polimerización. En particular, cualquier ADN polimerasa con capacidad para discriminar entre secuencias matriz normales y mutantes respecto a cualquier extensión significativa. Ejemplos de enzimas convenientes incluyen enzimas termoestables que no tienen actividad exonucleasa significativa 3'-5', con velocidades de polimerización de alrededor de 10 nucleótidos/segundo, dando lugar de esta manera a fragmentos de amplificación de 600-1000 pb en etapas de extensión convencionales. Preferentemente, se puede utilizar la ADN polimerasa HotStarTaq de QIAGEN. También se puede utilizar cualquier otra enzima con estas características conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, la ADN polimerasa "AmpliTaq Gold" de PE Applied Biosystems.

La amplificación ARMS de las diferentes mutaciones de la presente invención se pueden llevar a cabo sea individualmente, o en una reacción de amplificación múltiple de dos o más de las mutaciones. En ambos casos, el kit PCR múltiple de QIAGEN se utiliza más preferentemente para la amplificación por ARMS, con los métodos y kits de la presente invención.

5 El método de la presente invención se puede llevar a cabo en uno o más vasos, comprendiendo cada vaso al menos un cebador ARMS, y al menos un cebador de amplificación, junto con otros agentes para la amplificación.

10 El agente para la polimerización y las condiciones apropiadas se pueden seleccionar por el experto. Las condiciones de ciclado térmico convencional se pueden utilizar para la amplificación de las mutaciones de acuerdo con la presente invención.

15 Las condiciones de ciclado térmico que han demostrado que funcionan particularmente bien con las muestras y que se pueden utilizar de acuerdo con las distintas realizaciones de la invención son las siguientes:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 ° C	15'
40 ciclos	94 ° C	15"
	62 ° C	60"
1 ciclo	72 ° C	10'
1 ciclo	4 ° C	Para siempre

20 Se pueden utilizar las combinaciones de cebadores ARMS de la presente invención para la detección múltiple de una o más de las mutaciones de BRAF o PI3K presentes en una muestra. Por lo tanto, el vaso de reacción en el que tiene lugar el método, puede comprender 2, 3, 4, 5 o 6 de los cebadores ARMS de la Tabla 1, o de los cebadores seleccionados de entre las SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19, así como uno o más cebadores de amplificación que se pueden combinar con los cebadores anteriores para la amplificación de una o más mutaciones de BRAF y/o PI3K presentes en una muestra. Los pares de cebador adicionales, preferentemente los que se corresponden con los controles de extracción y/o internos y/o pares de cebadores para la amplificación de otras mutaciones, también pueden incluirse en la mezcla de amplificación.

25 Las posibles combinaciones de cebadores ARMS son mezclas de cebadores que comprenden:

- Cebadores ARMS of SEQ ID N° 3 (BRAF V600E) y SEQ ID N° 4 (BRAF V600K) (Componentes de la mezcla de amplificación 1);
- 30 - Cebadores ARMS of SEQ ID N° 16 (PI3K E542K) y SEQ ID N° 19 (PI3K H1047R) (Componentes de la mezcla de amplificación 2);
- Cebadores ARMS of SEQ ID N° 17 (PI3K E545D) y SEQ ID N° 18 (PI3K E545K) (Componentes de la mezcla de amplificación 3);
- 35 - Cebadores ARMS of SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19 (PI3K E542K, PI3K E545D, PI3K E545K y PI3K H1047R, respectivamente) (Componentes de la mezcla de amplificación 4).

Las posibles combinaciones de ARMS y cebadores de amplificación son mezclas de cebadores que comprenden:

- 40 - Cebador ARMS de SEQ ID N° 3 (BRAF V600E), Cebador ARMS de SEQ ID N° 4 (BRAF V600K), Cebador de amplificación de SEQ ID N° 5 ("Cebador" de Amplificación Común para Cebadores ARMS de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4) (Componentes de la mezcla de amplificación 1);
- Cebadores ARMS de SEQ ID N° 16 (PI3K E542K) y SEQ ID N° 19 (PI3K H1047R), Cebadores de amplificación de SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 21 ("Cebadores" de Amplificación correspondientes con Cebadores ARMS de SEQ ID N° 16 y SEQ ID N° 19, respectivamente) (Componentes de la mezcla de amplificación 2);
- 45 - Cebadores ARMS de SEQ ID N° 17 (PI3K E545D) y SEQ ID N° 18 (PI3K E545K) y Cebador de amplificación de SEQ ID N° 20 ("Cebador" de Amplificación Común para Cebadores ARMS de SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18) (Componentes de la mezcla de amplificación 3);
- Cebadores ARMS de SEQ ID N° 16 (PI3K E542K), SEQ ID N° 17 (PI3K E545D), SEQ ID N° 18 (PI3K E545K) y SEQ ID N° 19 (PI3K H1047R), Cebador de amplificación de SEQ ID N° 20 ("Cebador" de Amplificación Común para Cebadores ARMS de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18) y SEQ ID N° 21 ("Cebador" de Amplificación correspondientes con Cebador ARMS de SEQ ID N° 19) (Componentes de la mezcla de amplificación 4).
- 50

Los componentes restantes de las diferentes mezclas de amplificación incluyen una ADN polimerasa, dNTP y cualquier otro componente necesario para que tenga lugar la amplificación. Además, las diferentes mezclas de amplificación pueden contener adicionalmente cebadores directos o inversos para la amplificación de los controles interno y extracción, así como pares de cebadores para la amplificación de otras mutaciones.

5 El método de la presente invención ha demostrado que detecta fácilmente cantidades de ADN mutado de BRAF y PI3K de desde 1 ng a 1 µg. En particular, el método de la presente invención ha demostrado detectar sin problemas, 5 µl de una línea celular con 200 ng/µl de ADN mutado de BRAF o PI3K, así como diluciones en serie del primero hasta 0,2 ng/µl. El límite de detección del kit de la presente invención es de 1.000 copias de BRAF o PI3K mutantes
10 en una muestra de 5 µl. La sensibilidad del valor de detección del kit de la presente invención para las diferentes mutaciones de BRAF o PI3K es del 1 %. Con respecto a los parámetros diagnósticos, el valor de la sensibilidad diagnóstica del kit de la presente invención para las mutaciones de BRAF y PI3K es mayor del 98 %.

15 Se puede introducir un marcador en el producto de amplificación de ADN durante la amplificación ARMS para permitir una detección adicional; en particular, se puede detectar un marcador que proporciona una señal por métodos colorimétricos, por métodos fluorescentes, o por cualquier método de marcado conocido en la técnica. El marcador pueden ser agentes radioactivos, quimioluminiscentes, luminiscentes y fluorescentes. En un aspecto preferido, el marcador que se utiliza es biotina. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro tipo de marcador conocido en la técnica (por ejemplo, digoxigenina). En un aspecto preferido, al menos uno de los cebadores que se
20 utiliza está marcado en el extremo 5' con biotina. Preferentemente el cebador de amplificación está marcado. Además, el marcado de ADN amplificado puede conseguirse alternativamente añadiendo nucleótidos modificados que albergan un marcador (por ejemplo, derivados dUTP biotinilados o digoxigenina) a la mezcla de PCR. En ciertas realizaciones, se pueden utilizar marcadores radioactivos, así como fluoróforos.

25 Se pueden utilizar métodos alternativos conocidos por el experto, que pueden hacer posible la detección de la interacción entre cualquier producto de amplificación y su sonda correspondiente, incluyendo métodos que emplean el marcado de la sonda.

30 En una realización preferida de la presente invención, los productos de amplificación, desnaturizado previamente se incubaron con las sondas específicas de diana que se hibridan con los productos de amplificación al menos en la región correspondiente al marcador 5' de nucleótidos proporcionados por el cebador específico.

35 Preferentemente, la desnaturalización del ADN amplificado se puede llevar a cabo por calor. También se pueden utilizar otras maneras para preparar un ADN de cadena sencilla después de la amplificación; por ejemplo, por medios químicos.

En un aspecto preferido, la muestra de ensayo que comprende los ácidos nucleicos que se van a analizar se divide en dos o más alícuotas, en las que:

- 40 - una de las alícuotas se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5 (Mezcla de Amplificación 1);
- otra de las alícuotas se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 21 (Mezcla de Amplificación 2); y
45 - otra de las alícuotas se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 20 (Mezcla de Amplificación 3) o cualquiera,
- una de las alícuotas se somete a amplificación con la Mezcla 1 anterior
- otra de las alícuotas se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 21 (Mezcla de Amplificación 4).

50 El método comprende adicionalmente la desnaturalización de cualquier producto de amplificación obtenido, y su hibridación posterior con una micromatriz que comprende una o más de las sondas seleccionadas de entre las SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29 y SEQ ID N° 30.

55 En una realización preferida de la presente invención, las sondas para la detección de los productos de la amplificación se proporcionan en una micromatriz. La tecnología de micromatriz hace posible la detección simultánea de productos de amplificación diferentes, que se corresponde con una o más mutaciones presentes en una muestra, en presencia de cualquier control necesario para asegurar la fiabilidad de los resultados.

60 Por lo tanto, la invención también se refiere a una micromatriz que comprende una o más de las sondas seleccionadas de entre SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29 y SEQ ID N° 30.

65 En una realización preferida de la presente invención, un ADN de cadena sencilla obtenido de uno o más de los productos de amplificación se incuban con una pluralidad de sondas específicas de la diana proporcionada en una micromatriz. Al menos una, pero preferentemente más que una sonda con capacidad para hibridarse con cada

secuencia diana, se proporcionan en una micromatriz. En ciertas realizaciones de la invención, el ADN de cadena sencilla puede incubarse con sondas específicas de la diana proporcionadas en solución; sin embargo, se prefiere que las sondas se disponen en una micromatriz.

5 Se describen en el presente documento sondas contenidas en una micromatriz, que se pueden colocar en un portaobjetos o contenidas en un vaso de reacción, que entonces se llama vaso de matriz. Los vasos de matrices tienen diferentes formatos de presentación, que incluyen vasos de matriz individuales, tales como pocillos o tubos, o conjuntos de vasos de matriz dispuestos en tiras de pocillos o tubos, o placas planas. Habitualmente, las placas consisten en conjuntos de tiras de vasos de matriz. Por lo tanto, una matriz de la presente invención puede estar
10 contenida en un vaso de matriz individual. De manera alternativa, dos o más micromatrices pueden estar contenidas en una tira de vasos. En una realización preferida la tira de vasos está constituida por 8 vasos. Además, tres o más vasos de matriz pueden estar dispuestos en un conjunto de tiras de vasos. En otra realización preferida la tira de vasos es una placa de microtitulación. En otra realización preferida, la placa de microtitulación está constituidas por
15 95 vasos de matriz.

En realizaciones preferidas, las sondas de la micromatriz se pueden inmovilizar en un soporte sólido en el que el soporte sólido puede ser el fondo de un vaso de matriz o un soporte sólido diferente unido al fondo del vaso de matriz. Esto significa que la superficie de la micromatriz puede ser el fondo plano de un vaso de matriz. De manera
20 alternativa, la superficie de la micromatriz puede ser un soporte sólido unido al fondo del vaso de matriz.

En una realización de la presente invención, el vaso de reacción tiene un tamaño típico de un vaso de reacción de laboratorio. Los volúmenes de capacidad típicos están en el intervalo de 100 µl a 2,5 ml, pero también pueden ser menores o mayores en realizaciones especiales. El vaso de reacción puede tener un volumen de capacidad normal para un tubo de Eppendorf convencional de hasta 1,5 ml. Volúmenes de capacidad preferidos adicionales son de
25 hasta 0,4 ml, hasta 0,5 ml, hasta 0,7 ml, hasta 1,0 ml o hasta 2,0 ml. Debido al marcado del ADN amplificado, cualquiera de las moléculas de la muestra interactúan con las moléculas de sonda de la superficie de la micromatriz, un relativo indicador se une al marcador y produce señales visibles que se pueden detectar en un dispositivo de detección.

30 La interacción de la sonda y las moléculas de la muestra se identifican por la localización de la señal en la superficie de la micromatriz. En el caso particular en el que los productos de amplificación están marcados con biotina, el agente indicador puede ser peroxidasa de rábano rústico unido covalentemente a estreptavidina. Esta última se une específicamente a la biotina, y la peroxidasa desencadena la precipitación de sustratos tales como el de tetrametilbencidina (TMB).

35 Cualquier otra reacción que dé como resultado un precipitado sobre los elementos de la matriz, y que se puedan utilizar para detectar la interacción entre la diana y las moléculas de la sonda de acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar igualmente. Cualquier otro método conocido en el estado de la técnica, tal como la fluorescencia, se puede utilizar para la detección de la interacción entre los productos de amplificación y las sondas correspondientes. El método dependerá del marcado exacto de los productos de amplificación.
40

Las sondas de la presente invención se pueden obtener por diferentes métodos, tales como la síntesis química (por ejemplo, por el método fosfotriéster convencional) o técnicas de modificación genética, por ejemplo, por clonación molecular de los plásmidos recombinantes en los que las secuencias de nucleótido correspondientes se han
45 insertado y se puede obtener más tarde por digestión con nucleasas.

Las sondas individuales o mezclas de sondas de cada mutación se pueden inmovilizar en una única localización del soporte sólido, en dos localizaciones distintas del soporte sólido y en tres o más localizaciones distintas del soporte
50 sólido.

De manera adicional, una o más sondas de control también se proporcionan en distintas localizaciones.

En una realización preferida, la visualización de las interacciones entre los productos de amplificación y sus correspondientes sondas específicas o de control, consiste en las siguientes etapas:
55

- Primero, la imagen de la matriz se captura utilizando un dispositivo óptico;
- Luego, la imagen se analiza;
- Finalmente, se proporciona un informe que contiene una interpretación del resultado.

60 Preferentemente, la imagen se analiza por medio de un software apropiado. Se puede utilizar cualquier dispositivo adecuado para este procesamiento.

La detección de las mutaciones de BRAF y PI3K con el método de la presente invención es compatible con la detección de otras mutaciones en estos mismos genes, así como de mutaciones en otros genes relevantes en el
65 cáncer.

El método de la presente invención se puede combinar con otros métodos de detección de mutaciones, sea en genes BRAF y PI3K y/o en cualquier otro gen relevante en el cáncer, llevando a cabo un diagnóstico y/o pronóstico completo del cáncer.

- 5 El método de detección de las 2 mutaciones V600E y V600K de BRAF, y opcionalmente una o más de las 4 mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R de PI3K de la presente invención se pueden aplicar a cualquier patología y a cualquier muestra sospechosa de correlacionarse con mutaciones BRAF o PI3K.

Los ejemplos proporcionados posteriormente simplemente ilustran la invención.

10

Ejemplos

Ejemplo 1

- 15 Se preparó la siguiente mezcla de reactivos para la amplificación por ARMS múltiple de las mutaciones V600E y V600K de BRAF en muestras/líneas celulares/clones:

Reactivos para la ARMS múltiple de BRAF (Mezcla de Amplificación 1)	Concentración de reserva (µM)	µl/tubo
2X de Mezcla maestra QIAGEN para PCR Múltiple		25
Cebador ARMS, SEQ ID Nº 3	40	0,25
Cebador ARMS, SEQ ID Nº 4	40	0,25
Cebador de Amplificación, SEQ ID Nº 5 (marcado con biotina)	40	1,25
Reactivos H ₂ O/ IC y/o EC		Hasta 45 µl

- 20 A continuación, 5 µl de un eluido total de 30 µl obtenido de secciones de tejido embebido en parafina (muestra) de diferentes líneas celulares o clones, se añadieron hasta un volumen de reacción final de 50 µl.

Las condiciones de ciclado térmico de la PCR eran:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 ° C	15'
40 ciclos	94 ° C	15"
	62 ° C	60"
1 ciclo	72 ° C	10'
1 ciclo	4 ° C	Para siempre

- 25 Los resultados de la amplificación por ARMS múltiple de BRAF se representan en la Figura 2 y la Figura 3.

Los diferentes productos ARMS de las muestras/clones o líneas celulares indicados en la Tabla 3 o la Figura 2, se visualizaron en un gel de agarosa al 2 %, en el que los productos de las diferentes reacciones de amplificación se analizaron.

30

La longitud de los diferentes productos de amplificación era las siguientes:

- 35
- Longitud de la banda específica de mutación correspondiente a las mutaciones V600E y V600K: 144 pb;
 - Longitud de la banda de IC: 101 pb (el producto de amplificación del gen de beta-actina);
 - Longitud de la banda de EC: 112 pb (producto de amplificación del plásmido ppg25).

40 A pesar del hecho de que la longitud de los diferentes productos de amplificación es similar, se pueden apreciar diferencias entre los pocillos que contienen alguna banda específica de mutación junto con las bandas de control, y los pocillos que solo contienen bandas de control. Esta diferencia se corresponde con el producto de amplificación específico de mutación.

En estos experimentos se ha comprobado que la amplificación ARMS solo tiene lugar cuando la muestra sometida a amplificación es la de una muestra /clon / línea celular, que se corresponde con una de las mutaciones para la que los cebadores ARMS se habían incluido en la mezcla de reactivos utilizada para la amplificación múltiple.

45

Se ha confirmado por secuenciación de ADN que los productos ARMS obtenidos en cada pocillo resultaban realmente de la amplificación específica de la muestra /clon/línea celular, con el correspondiente cebador ARMS. La amplificación por ARMS en cada múltiple es específica.

- 5 Se ha confirmado que pequeñas variaciones en el número de ciclos de amplificación (2-3 ciclos de amplificación extras o menos) no modifican los resultados obtenidos.

Los diferentes productos de amplificación por ARMS múltiple se desnaturalizaron e hibridaron con micromatrices de sondas. La visualización de los resultados correspondientes se representa en la Figura 3.

10

Ejemplo 2

La composición de las mezclas de amplificación 2 y 3 correspondientes al PI3K se presentan a continuación. Las condiciones de reacción restantes son las mismas que las que se presentan en el Ejemplo 1 para BRAF.

15

Reactivos para la ARMS múltiple de PI3K (Mezcla de Amplificación 1)	Concentración de reserva (μM)	μl /tubo
2X de Mezcla maestra QIAGEN para PCR Múltiple		25
Cebador ARMS, SEQ ID N° 16	40	0,25
Cebador de amplificación, SEQ ID N° 20, (Marcado con biotina)	40	0,50
Cebador ARMS, SEQ ID N° 19	40	0,25
Cebador de amplificación, SEQ ID N° 21, (Marcado con biotina)	40	0,50
Reactivos H ₂ O/ IC y/o EC		Hasta 45 μl de volumen

Reactivos para la ARMS múltiple de PI3K (Mezcla de Amplificación 1)	Concentración de reserva (μM)	μl /tubo
2X de Mezcla maestra QIAGEN para PCR Múltiple		25
Cebador ARMS, SEQ ID N° 17	40	0,25
Cebador ARMS, SEQ ID N° 18	40	0,25
Cebador de amplificación, SEQ ID N° 20, (Marcado con biotina)	40	0,50
Reactivos H ₂ O/ IC y/o EC		Hasta 45 μl de volumen

20

Los resultados correspondientes con 5 μl de la línea celular HTC 116 (0,2 ng/ μl) que contiene la mutación H1047R de PI3K (a), o de 5 μl de una muestra clínica que contenía ADN a una concentración de 20 ng/ μl (b), después de su respectiva amplificación con los reactivos de la mezcla de amplificación 2, y la hibridación posterior de los productos obtenidos con una micromatriz de sonda, y la posterior visualización, se representan en las Figuras 4 a) y 4 b), respectivamente.

Ejemplo 3

25

La inclusión en las mezclas de amplificación, de los cebadores directo e inverso que son necesarios para la amplificación del control interno y el control de extracción, así como de un plásmido tal como pBSK con una inserción, también necesaria para la amplificación del control interno, a las concentraciones presentadas posteriormente, no alteraban los resultados obtenidos:

30

Reactivos de ARMS Múltiple	Concentración de reserva (μM)	μl /tubo
Cebador directo EC	40	0,13-0,25
Cebador inverso EC (Marcado con biotina)	40	0,13-0,25
Cebador directo IC	40	0,13-0,25
Cebador inverso IC (Marcado con biotina)	40	0,13-0,25

Plásmido pBSK con una inserción	10e4 copias	0,25-0,5
IC: Control Interno; EC: Control de Extracción.		

Listado de secuencias

- 5 SEQ ID Nº 1
Secuencia 3' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación V600E de BRAF, siendo la secuencia específica de la diana ggtgattttggtctagctcaga
- 10 SEQ ID Nº 2
Secuencia 3' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación V600K de BRAF, siendo la secuencia específica de la diana ggtgattttggtctagctactaa
- 15 SEQ ID Nº 3
Cebador ARMS para la amplificación de la mutación V600E de BRAF
gattagcgcagtgactacggtgattttggtctagctcaga
- 20 SEQ ID Nº 4
Cebador ARMS para la amplificación de la mutación V600K de BRAF
agatcggttat caatcgcgatg gtgattttgg tctagctact aa
- 25 SEQ ID Nº 5
Cebador de amplificación para utilizarse en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS que comprenden la SEQ ID Nº 1 y 2, o los cebadores ARMS que consisten en SEQ ID Nº 3 y 4.
ggccaaaaatattaatcagtgg
- 30 SEQ ID Nº 6
Secuencia 5' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación V600E de BRAF, siendo la secuencia no específica de la diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación V600E de BRAF.
gattagcgcagtgactac
- 35 SEQ ID Nº 7
Secuencia 5' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación V600K de BRAF, siendo la secuencia no específica de la diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación V600K de BRAF.
agatcggttatcaatcgcgat
- 40 SEQ ID Nº 8
Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación V600E de BRAF
cgggttaccgggagtgctcagattagcgcagtgactac
- 45 SEQ ID Nº 9
Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación V600K de BRAF
agatcggttatcaatcgcgatggtgat
- 50 SEQ ID Nº 10
Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación V600K de BRAF
cgggttaccgggagatcggttatcaatcgcgat
- 55 SEQ ID Nº 11
Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación V600K de BRAF
cgggttaccgggagtgctcagatcggttatcaatcgcgat
- 60 SEQ ID Nº 12
Secuencia 3' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación E542K PIK3CA, siendo la secuencia específica de la diana
aagcaatttctacacgagatcctctgtcta
- 65 SEQ ID Nº 13
Secuencia 3' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación E545D de PIK3CA, siendo la secuencia específica de la diana
cctctctgaaatcagtgat
- 70 SEQ ID Nº 14
Secuencia 3' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación E545K de PIK3CA, siendo la secuencia específica de la diana
gatcctctctgaaatcagta
- 75 SEQ ID Nº 15
Secuencia 3' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación H1047R de PIK3CA, siendo la secuencia específica de la diana
gaaacaaatgaatgatgctcgt
- 80 SEQ ID Nº 16
Cebador ARMS para la amplificación de la mutación E542K de PIK3CA
agaccttagcatagcttaagcaatttctacacgagatcctctgtcta
- 85 SEQ ID Nº 17

ES 2 712 941 T3

- Cebador ARMS para la amplificación de la mutación E545D de PIK3CA
actatagccgagtagcggccctctctgaaatcagtgat
SEQ ID N° 18
- 5 Cebador ARMS para la amplificación de la mutación E545K de PIK3CA
taactggctatccggaggatcctctctgaaatcagta
SEQ ID N° 19
- Cebador ARMS para la amplificación de la mutación H1047R de PIK3CA
cgatatgatgctagttgaaacaaatgaatgatgctcgt
SEQ ID N° 20
- 10 Cebador de amplificación para utilizarse en combinación con cualquier cebador ARMS que comprende la SEQ ID N° 12, 13 y 14, o cebadores ARMS que consisten en las SEQ ID N° 16, 17 y 18.
acatgctgagatcagccaaat
SEQ ID N° 21
- 15 Cebador de amplificación para utilizarse en combinación con cualquier cebador ARMS que comprende la SEQ ID N° 15, o cebador ARMS que consiste en la SEQ ID N° 19.
tggatccagagtgccttc
SEQ ID N° 22
- 20 Secuencia 5' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación E542K de PIK3CA; siendo la secuencia no específica de la diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación E542K de PIK3CA
agacctagcatagctt
SEQ ID N° 23
- 25 Secuencia 5' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación E545D de PIK3CA; siendo la secuencia no específica de la diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación E545D de PIK3CA
actatagccgagtagcggc
SEQ ID N° 24
- 30 Secuencia 5' del cebador ARMS para la amplificación de la mutación E545K de PIK3CA; siendo la secuencia no específica de la diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación E545K de PIK3CA
taactggctatccggag
SEQ ID N° 25
- 35 Secuencia 5' del cebador ARMS para la amplificación of PIK3CA mutación H1047R, siendo la secuencia no específica de la diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación H1047R de PIK3CA.
cgatatgatgctagtt
SEQ ID N° 26
- 40 Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación E542K de PIK3CA
cgggttaccgggagtagctcagaccttagcatagctt
SEQ ID N° 27
- Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación E545D de PIK3CA
cgggttaccgggactatagccgagtagcggc
SEQ ID N° 28
- 45 Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación E545K de PIK3CA
cgggttaccgggagtagctcactggctatccggag
SEQ ID N° 29
- Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación H1047R de PIK3CA
cgatatgatgctagtt
SEQ ID N° 30
- 50 Sonda para la detección del producto de amplificación ARMS de la mutación PIK3CA
H1047RCGGGTTACCCGGGCGATATGATGCTAGTT

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de mutaciones V600E y V600K de BRAF, en donde el método comprende las etapas de:
- 5 - someter una muestra de ensayo que comprende ácidos nucleicos a una amplificación con una mezcla de amplificación que comprende dos cebadores ARMS, en donde los dos cebadores ARMS tienen la SEQ ID N° 3 y la SEQ ID N° 4,
- 10 comprendiendo adicionalmente la mezcla de amplificación un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5; y
- 15 - detectar cualquier producto de amplificación obtenido, mediante la hibridación de cualquiera de dichos productos con dos o más sondas, en donde cada sonda se hibrida específicamente con la región del producto de amplificación correspondiente a la secuencia marcadora 5' del correspondiente cebador ARMS.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la mezcla de amplificación comprende una ADN polimerasa y dNTP.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los productos de amplificación se hibridan con al menos dos sondas de una longitud de entre 15 y 45 nucleótidos, comprendiendo una la secuencia SEQ ID N° 6 y comprendiendo la otra la secuencia SEQ ID N° 7.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que una de las sondas tiene la SEQ ID N° 8, y la otra sonda se selecciona de entre las SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 y SEQ ID N° 11.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que permite además detectar una o más mutaciones de PI3K seleccionadas de entre E542K, E545D, E545K y H1047R, comprendiendo además el método:
- 30 - someter la muestra de ensayo a una amplificación con uno o más cebadores ARMS, teniendo cada cebador ARMS una longitud total de entre 36 y 50 nucleótidos, y comprendiendo una secuencia específica de diana 3' seleccionada de entre las SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, respectivamente,
- 35 comprendiendo además cada cebador ARMS una secuencia marcadora 5' no específica de diana diferente de entre 15 y 20 nucleótidos, comprendiendo además la mezcla de amplificación uno o más cebadores de amplificación; y
- 40 - detectar cualquier producto de amplificación obtenido, mediante la hibridación de cualquiera de tales productos con una o más sondas, en donde cada sonda se hibrida específicamente con la región del producto de amplificación correspondiente a la secuencia marcadora 5' del cebador ARMS correspondiente.
- 45 6. Un kit para detectar las mutaciones V600E y V600K de BRAF en una muestra de ensayo que comprende un ácido nucleico, en donde dicho kit comprende una mezcla de reactivos para la amplificación de ácido nucleico, que comprende:
- 50 - dos cebadores ARMS de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, y
- un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5,
- comprendiendo además el kit una micromatriz en la que están inmovilizadas dos o más sondas, hibridándose cada sonda específicamente a la región del correspondiente producto ARMS complementaria a la secuencia marcadora 5' del cebador ARMS correspondiente.
- 55 7. El kit de la reivindicación 6, en el que la micromatriz comprende dos o más sondas, teniendo una sonda la SEQ ID N° 8 y al menos otra sonda que se selecciona de entre las SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 y SEQ ID N° 11.
8. El kit de las reivindicaciones 6 o 7 que comprende además una o más de las siguientes mezclas de amplificación:
- 60 - una mezcla de amplificación que comprende los cebadores de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 21;
- una mezcla de amplificación que comprende los cebadores de SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 20; y
- una mezcla de amplificación que comprende los cebadores de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 21;
- comprendiendo además la micromatriz una o más sondas seleccionadas de entre las SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29 y SEQ ID N° 30.
- 65 9. Un método de amplificación de ácidos nucleicos correspondientes con las mutaciones V600E y V600K de BRAF, en donde el método comprende poner en contacto una muestra que contiene ácidos nucleicos con una mezcla de

amplificación que comprende dos cebadores ARMS de SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, comprendiendo además la mezcla de amplificación un cebador de amplificación que comprende o consiste en la SEQ ID N° 5.

- 5 10. Uso del método de detección de mutaciones de BRAF de las reivindicaciones 1 a 6, o del kit de las reivindicaciones 6 a 8, o del método de amplificación de la reivindicación 9 para el diagnóstico y/o el pronóstico de una afección patológica en un paciente, o para predecir la respuesta de un paciente a una terapia con anticuerpos anti-EGFR.

Figura 1.

Unión específica de los productos de amplificación por ARMS de la presente invención que se corresponden con BRAF V600E y V600K, con la sonda específica correspondiente con la mutación BRAF V600E

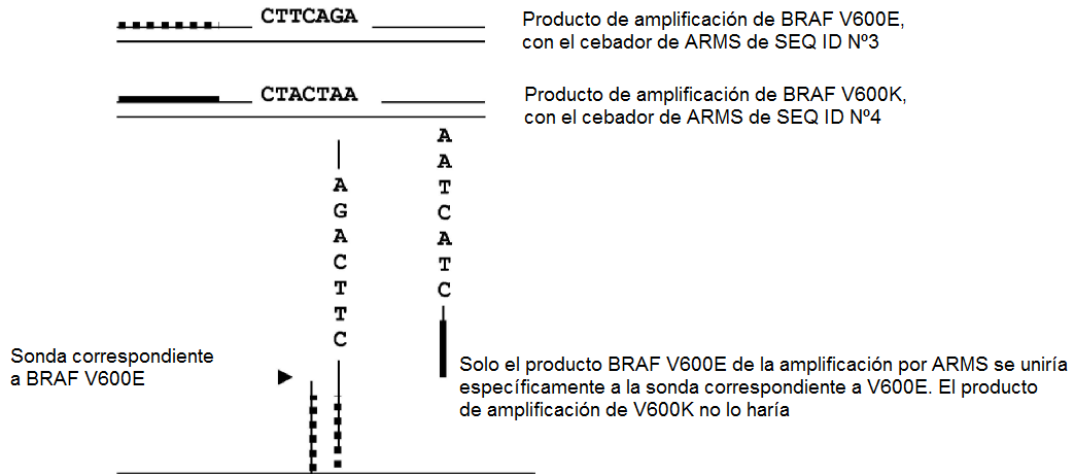
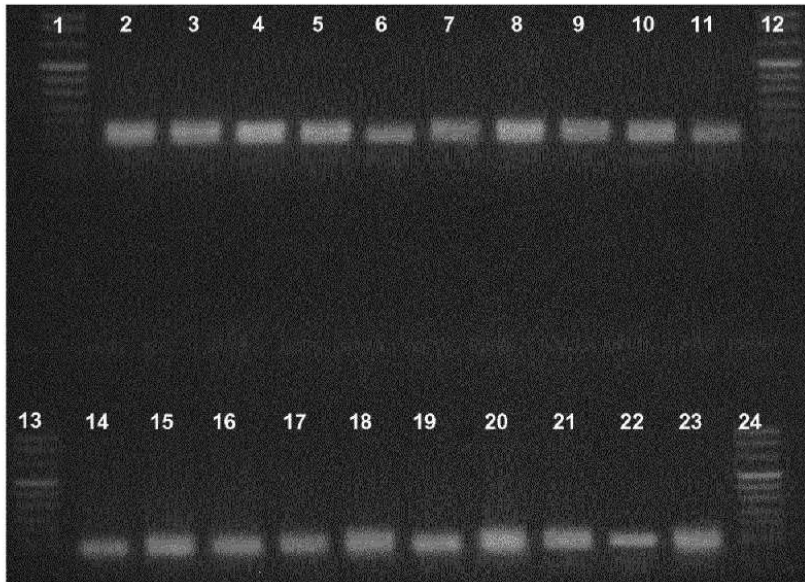


Figura 2.



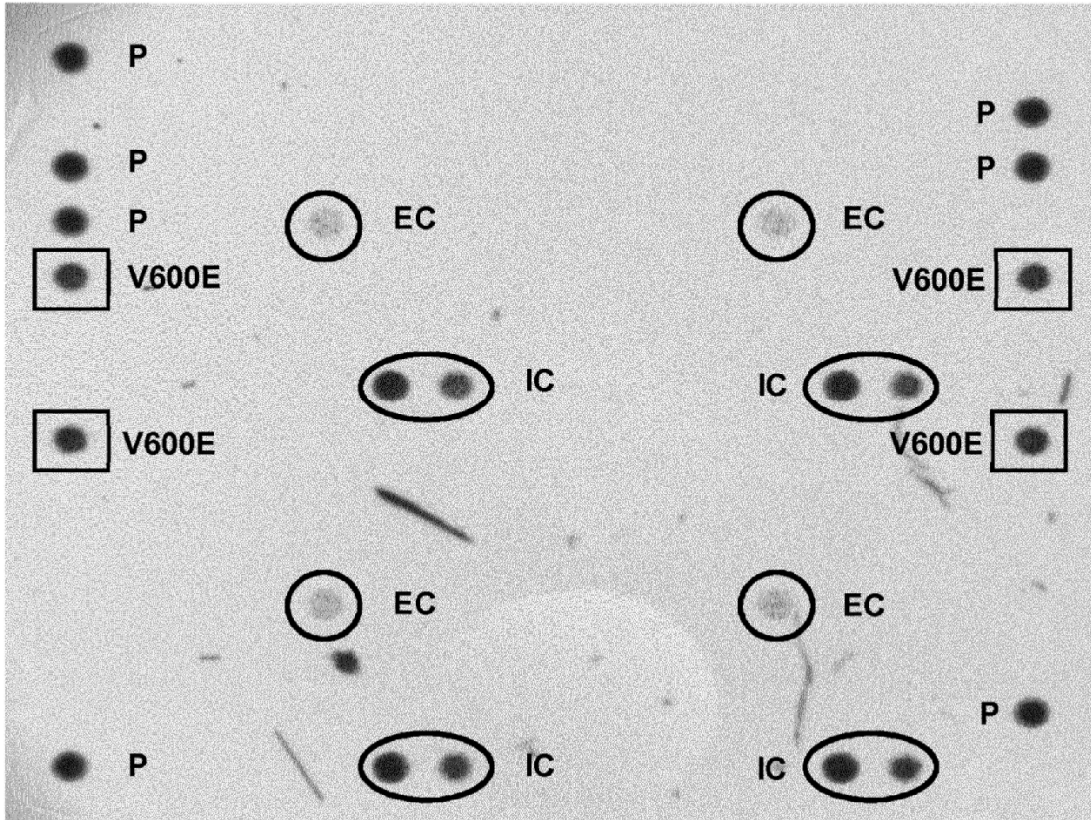
a

b Table 3:

Pocillo	Muestra/Clon/Línea celular	Resultado
1, 12, 13,24	Marcador de peso molecular	Bandas bien definidas. Marcador de peso molecular VIII de Roche
2	Clon de 10e6 copias de V600E	Banda específica de VE600E + IC
3	Clon de 10e5 copias de V600E	Banda específica de VE600E + IC
4	Clon de 10e4 copias de V600E	Banda específica de VE600E + IC
5	Clon de 10e3 copias de V600E	Banda específica de VE600E + IC
6	Clon de 10e2 copias de V600E	Banda específica de VE600E + IC
7	Clon de 10e6 copias de V600K	Banda específica de VE600K + IC
8	Clon de 10e5 copias de V600K	Banda específica de VE600K + IC
9	Clon de 10e4 copias de V600K	Banda específica de VE600K + IC
10	Clon de 10e3 copias de V600K	Banda específica de VE600K + IC
11	Clon de 10e2 copias de V600K	Banda específica de VE600K + IC
14	Muestra 1 V600E	Banda específica de VE600E + IC + EC
15	Muestra 2 V600E	Banda específica de VE600E + IC + EC
16	Muestra 3 V600E	Banda específica de VE600E + IC + EC
17	Muestra 4 V600E	Banda específica de VE600E + IC + EC
18	Muestra 5 V600E	Banda específica de VE600E + IC + EC
19	Muestra 37 (BRAF ts, mutante KRAS)	IC + EC
20	Línea celular HT-29 (V600E)	Banda específica de VE600E + IC + EC
21	Línea celular A673 (V600E)	Banda específica de VE600E + IC + EC
22	Control negativo (H ₂ O)	IC + EC
23	Línea celular HT-29 Diluida 1/10 (V600E)	Banda específica de VE600E + IC + EC

Figura 3.

a



b

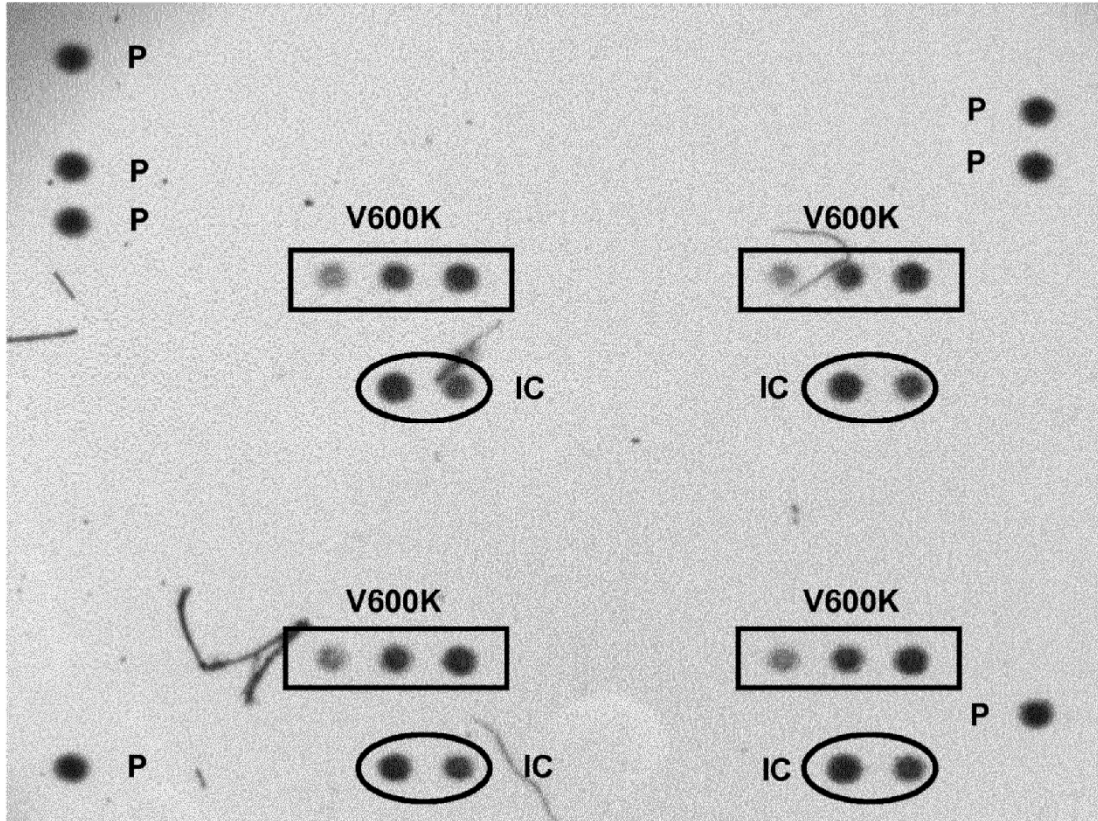
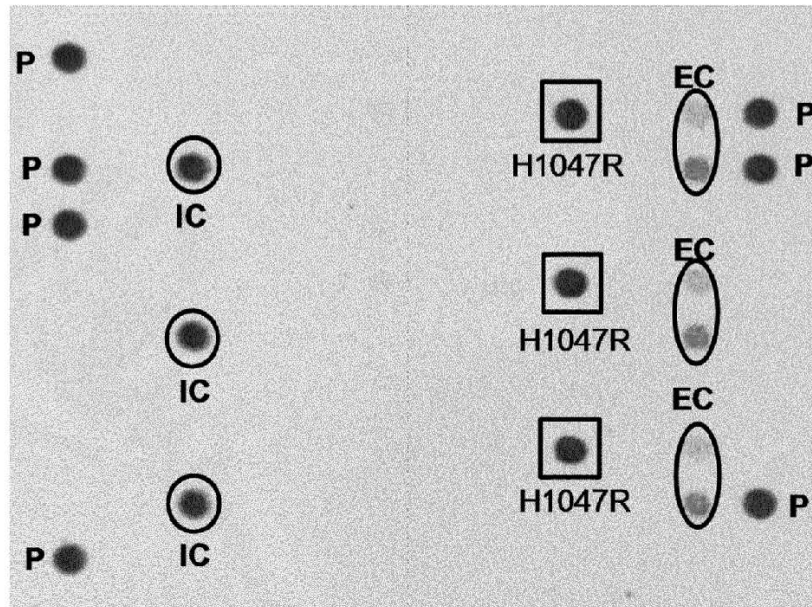


Figura 4

a) H1047R PI3K, línea celular



b) E542K PI3K, muestra clínica

