

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 371**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

**C12Q 1/6858** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2013 PCT/US2013/042817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2013 E 13798093 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2855708**

54 Título: **Procedimiento de detección de polimorfismos de nucleótido único**

30 Prioridad:

**29.05.2012 US 201261652827 P**  
**15.03.2013 US 201313840142**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.03.2020**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)**  
**1300 East Touhy Avenue**  
**Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, SHIHAI, X.;**  
**SU, HONG y**  
**ERICKSON, BRIAN, J.**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 751 371 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

Procedimiento de detección de polimorfismos de nucleótido único

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se refiere a un procedimiento de diseño de cebadores, procedimientos de detección/diferenciación de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP), extensión con cebadores (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y extensión isotérmica), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), uso de PNA como bloqueadores ("clamps") de PCR, cebadores, oligonucleótidos detectables, y kits.

## ANTECEDENTES

Muchas variaciones genéticas (incluyendo mutaciones en la línea germinal y mutaciones somáticas) son marcadores importantes para anomalías hereditarias, progresión de la enfermedad y eficacia terapéutica. Los ensayos de diagnóstico molecular basados en varias tecnologías se han desarrollado o están siendo desarrollados para detectar polimorfismos de nucleótido único (SNP). Uno de los procedimientos ampliamente adoptados es la reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (AS-PCR) en la que se diseñan cebadores específicos de alelo para amplificar dianas específicas variantes basado en la extensión selectiva por la polimerasa de acuerdo con el emparejamiento de 3' entre el cebador y su plantilla. Específicamente, la amplificación por PCR sólo es suficientemente eficaz donde no hay o hay muy pocos desapareamientos entre el cebador y su plantilla en o cerca del extremo 3' del cebador, mientras que la amplificación por PCR no es detectable cuando el número de desapareamientos en o cerca del extremo 3' del cebador es suficiente para alterar la unión eficaz del cebador a la plantilla.

La sensibilidad y especificidad de tales procedimientos dependen significativamente de las eficiencias de PCR diferencial entre las plantillas que contienen los SNP de interés y plantillas no diana que contienen otras secuencias, incluyendo otros alelos en el caso de las mutaciones de la línea germinal y tipo salvaje (u otras mutaciones) en el caso de mutaciones somáticas. Cuando la diferencia en la eficiencia de PCR entre las plantillas diana y no diana es insuficiente, puede haber una amplificación detectable en la plantilla no diana (señales no específicas), y las señales de amplificación no específicas (por ejemplo, Ct o intensidad de la señal), aunque menos eficientes, pueden ser demasiado próximas a las señales específicas (por ejemplo, Ct o intensidad de la señal) para separar completamente el bajo nivel de las dianas específicas de las dianas no específicas. En tales casos, es difícil establecer un corte de ensayo para lograr tanto una sensibilidad como especificidad de alto nivel. El requisito técnico de eficiencias de PCR completamente diferenciadas es particularmente crítico en áreas donde contenidos muy bajos de mutante necesitan ser detectados a partir de las muestras, tales como muchas mutaciones somáticas asociadas a oncología.

El gen BRAF, un ejemplo de un gen que tiene una mutación somática asociada a oncología, codifica una proteína que pertenece a la familia raf/mil de las proteínas quinasas de serina/treonina (es decir, serina/treonina-proteína quinasa B-raf). B-raf desempeña un papel en la regulación del mecanismo de señalización de MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno), que afecta a la división celular, diferenciación celular y secreción celular. Las mutaciones de la línea germinal en el gen BRAF se asocian con el síndrome cardiofaciocutáneo, que se caracteriza por defectos del corazón, una apariencia facial distintiva y el retraso mental. Las mutaciones en el gen BRAF también están asociadas con diversos tipos de cáncer, incluyendo adenocarcinoma de pulmón, cáncer colorrectal, melanoma maligno, linfoma no Hodgkin, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de tiroides.

La mutación de timina en la posición nucleotídica 1796 a adenina se ha detectado en los cánceres de pulmón y cánceres de cabeza y cuello (Patente de Estados Unidos No. 7,378,233; véase la Patente de Estados Unidos N° 7.442.507 para T1799A). La detección de T1796A en el exón 15 del gen BRAF permite distinguir, según se ha descrito, una neoplasia papilar de tiroides maligno de una muestra tiroidea benigna (Patente de Estados Unidos No. 7,378,233) y también permite la distinción de tumores HNPCC de tumores colorrectales esporádicos (Publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2005/071109). La detección de T1799A indica, según sea ha descrito, la presencia de melanoma metastásico (solicitud de patente de Estados Unidos No. 2006/0246476, ahora patente de Estados Unidos No. 7.442.507).

La mayoría de las mutaciones en el gen BRAF asociadas con los cánceres se producen en la posición de aminoácido 600, que se encuentra en el dominio de activación. La posición del aminoácido 600 también se ha denominado como la posición de aminoácido 599 en la literatura. La mutación de valina (V) en la posición de aminoácido 600 a ácido glutámico (E) (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2007/0020657, Davies, et al., Nature 417: 949-954 (2002), en la que se designa V599E, y Kimura, et al, Cancer Res. 63: 1454-1457 (2003)), lisina (K) o ácido aspártico (D) representa más del 90% de todas las mutaciones en el gen BRAF. La presencia de una neoplasia colorrectal se ha descrito que se puede determinar mediante la detección de una mutación puntual en un marcador epitelial exfoliado, tal como BRAF, junto con uno o más marcadores de sangre oculta en las heces (ver publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos. No. 2011/0236916). Los análisis de las mutaciones de BRAF, junto con la estabilidad de microsatélites, se ha descrito

- que permite el pronóstico de las tasas de supervivencia en pacientes con cáncer, así como la clasificación de la gravedad de cáncer en los pacientes (ver publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 2007/009013 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0181371). Véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2011/0269124 y la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 2011/019704, para la detección de mutaciones de BRAF en general. La mutación en el codón 599 del exón 15 de BRAF se ha descrito que permite la detección de melanoma maligno (véase la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2007/0087350; véase también, las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales N° WO 2010/097020, WO 2005/027710, WO 2005/059171 y WO 2005/066346). El uso de la bloqueación de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) basado en ácido peptidonucleico (PNA) para detectar mutaciones en el codón 600 en BRAF se describe en la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 2011/093606, mientras que el uso de PCR cuantitativa en tiempo real específica de alelo (AS-QPCR) usando cebadores de ácidos nucleicos bloqueados y oligonucleótidos detectables baliza para detectar mutaciones V600E en BRAF se describe en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. WO 2011/104694 y el uso de PCR cuantitativa fluorescente para detectar mutaciones en el gen BRAF se describe en la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 2011/103770. Los chips líquidos para detectar una mutación V600E en el gen BRAF se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 2011/131146. Por lo tanto, la capacidad de detectar polimorfismos de nucleótido único (SNP) que conducen a mutaciones de V600/V599 proporcionaría información importante sobre el diagnóstico y pronóstico de cáncer.
- Además de proporcionar información sobre el diagnóstico y pronóstico del cáncer, la capacidad de detectar SNP que conducen a mutaciones de V600/V599 también proporcionaría información importante sobre la eficacia terapéutica de fármacos dirigidos a la vía de MAPK. La detección de una mutación en el codón 600 de BRAF, tal como V600E, por amplificación de una secuencia de polinucleótido que comprende V600E, se ha descrito que permite la determinación de la sensibilidad de las células cancerosas a un inhibidor de la quinasa B-Raf (véanse las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos. Nos. 2010/0173294 y 2011/0212991). La detección de genotipo homocigoto/heterocigoto V600E o V600D o cualquier genotipo caracterizado por el fenotipo de ganancia de función de BRAF se ha descrito que permite la evaluación de la sensibilidad de las células malignas/neoplásicas a inhibidores de ERK1/ERK2/MEK (véase la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2011/0158944; véase también la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 2009/073513). La detección de una mutación en BRAF, tal como V600E se ha descrito que permite la generación de un informe personalizado para el tratamiento de un paciente con cáncer de colon con cetuximab o panitumumab (véase la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2011/0230360). Shinozaki, et al., Clin. Cancer Res. 13: 2068-2074 (2007), da a conocer el análisis de mutaciones de ADN de B-RAF circulante en el suero para el seguimiento de pacientes con melanoma que recibieron bioquimioterapia. Procedimientos de optimizar el tratamiento de cáncer en base a las mutaciones de BRAF, así como otros procedimientos, se describen en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. WO 2011/106298.

Los procedimientos existentes para la detección de mutaciones de BRAF, tales como la secuenciación, pirosecuenciación, matriz ("array"), ensayo de terminación desplazada (STA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido de PCR con oligonucleótido de cebado dual (DPO) y PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos de alelo u oligonucleótidos detectables específicos de alelo, se acompañan de diversos inconvenientes (véase, por ejemplo, Benlloch, et al, J. Mol Diagn 8: 540-543 (2006), para la comparación de secuenciación automática y metodología química en tiempo real en la detección de la mutación V600E de BRAF en el cáncer colorrectal; véase, por ejemplo, Hay, et al, Arch Pathol Lab Med 131: 1361-1367 (2007), para análisis de curvas de fusión de productos PCR utilizados para identificar mutaciones de BRAF en lesiones melanocíticas y muestras de carcinoma papilar de tiroides; véase, por ejemplo, Jarry, et al, Mol Cell Detectable oligonucleotides 18: 349-352 (2004), para la amplificación específica de alelo en tiempo real en la detección de V600E de BRAF; véase, por ejemplo, Sapio, et al, Eur J. Endocrinol 154: 341-348 (2006), para uso de amplificación por PCR específica de alelo (MASA) para detectar la mutación de BRAF en el carcinoma papilar de tiroides; y, véase, por ejemplo, Turner, et al., J. Cutan. Pathol. 32: 334-339 (2005), para el uso de la reacción de detección de ligasa para detectar V600E de BRAF en lesiones melanocíticas). Los procedimientos de secuenciación y pirosecuenciación están limitados por su sensibilidad, con el contenido más bajo de mutante detectable alrededor de 10-20% (% mutante sobre la base total). Otros procedimientos, tales como PCR en tiempo real que utilizan oligonucleótidos detectables específicos de alelo, STA, matriz y PCR/DPO también están limitados por su sensibilidad. Idealmente, se desea una sensibilidad de 1% o mejor.

Los procedimientos existentes que carecen de suficiente especificidad, tales como PCR en tiempo real, no pueden diferenciar entre tipos específicos de mutaciones, tales como V600E y V600K. A pesar de que V600E representa el 90% de todas las mutaciones encontradas en esta posición de aminoácido, se han encontrado otras sustituciones de aminoácido con un peso significativo clínico en diversos tipos de cáncer, a veces con alta prevalencia, tal como V600K, en melanoma. Por lo tanto, la capacidad de diferenciar entre tipos específicos de mutaciones cada vez es más importante.

Kirby et al, (Int J. Cancer, vol 68 (3), pág. 21-25, 1996) da a conocer el análisis de PCR específico de alelo del codón 249 de p53; Hamfjord et al. (Diagnostic Molecular Pathology, vol. 20 (3), pág.158-165, 2011) da a conocer un sistema de mutaciones refractarias a la amplificación mejorado con titubeo para la detección de mutaciones en los

genes KRAS y BRAF; Ellison et al. (JECCR, 29: 132, 2010) compara ensayos de sistema de mutaciones refractarias a la amplificación en tiempo real con la secuenciación para la detección de mutaciones en muestras de biopsia; US 2011/269124 describe un procedimiento para la detección de secuencias de BRAF mutante en una muestra; US 2010/009355 describe un procedimiento de amplificar preferentemente un ácido nucleico mutante: US 2006/252041  
 5 da a conocer un procedimiento basado en PCR para la detección de una mutación en el gen BRAF.

La tasa de producción del ensayo y la automatización son aspectos críticos de cualquier procedimiento de diagnóstico. Para ciertas tecnologías, tales como la secuenciación, los procedimientos de ensayo existentes son largos y complicados. Otras tecnologías, tales como la PCR/DPO (oligo cebado dual) y procedimientos basados en  
 10 matrices "array", pueden requerir una extensa manipulación de muestra post-PCR, lo cual es propenso a la contaminación de amplicones. En ciertos casos, deben incluirse etapas adicionales con el fin de lograr la detección diferenciada de múltiples mutaciones.

La presente descripción busca superar algunas de las desventajas relacionadas con los procedimientos actualmente  
 15 disponibles de detección de mutaciones de la línea germinal y mutaciones somáticas, especialmente las asociadas con anomalías hereditarias, progresión de la enfermedad y eficacia terapéutica. Este y otros objetos y ventajas, así como características, serán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en este documento.

### CARACTERÍSTICAS

20 En el presente documento se proporciona un procedimiento para detectar al menos una mutación (X) de un codón en un gen en una muestra de ácido nucleico de un ser humano, cuyo procedimiento comprende: (a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, en el que los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' terminal del cebador codifica X y en el que el cuarto  
 25 nucleótido desde el extremo 3' terminal contiene una base no apareada, en el que, si X está presente, el cebador se hibrida a X, y en el que la reacción de amplificación comprende además: (i) al menos un bloqueador de ácido peptidonucleico (PNA), en el que al menos un bloqueador de PNA bloquea la amplificación desde la diana de tipo salvaje, y (ii) uno o más de otros bloqueadores de PNA, en el que uno o más de otros bloqueadores de PNA impiden la amplificación de un cebador a partir de una diana no deseada mediante la unión de la diana no deseada, en el  
 30 que, si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa (a) comprende además obtener ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm antes de realizar la reacción de amplificación, después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X, y (b) detectar el producto de amplificación que comprende X, en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada codón,  
 35 después de lo cual, se detecta la mutación en el codón del gen en la muestra de ácido nucleico de un ser humano; en el que la al menos una mutación (X) a detectar es el codón que codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF.

La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

40 La presente descripción es que los SNP se mantienen en el contexto de sustituciones de aminoácidos, ya que es la proteína mutada que está implicada directamente en la anomalía biológica. Otra idea es que los SNP en sí mismos están implicados directamente en el proceso de la regulación de genes, tal como la alteración de un evento de corte y empalme, también es posible que algunos de los SNP no tengan un impacto obvio o conocido en las  
 45 funciones biológicas, pero estén colocalizados con los SNP de interés en la secuencia de nucleótidos primaria.

Por lo tanto, la presente descripción se dirige a composiciones y procedimientos adecuados para la detección mejorada de SNP (es decir, SNP diana). La detección mejorada de SNP proporcionada por la presente descripción se basa en el descubrimiento novedoso y no obvio de un nuevo enfoque para el diseño de cebadores. Los diseños  
 50 de cebadores adecuados para la detección de SNP (tal como se ha descrito, *infra*) se resumen en las figuras 2 y 3. Se observa aquí que la característica común a todos los diseños es la introducción de una o más bases no apareadas 5' adicionales con respecto a desapareamientos de origen natural para permitir el cebado específico de alelo. La razón de esta característica del diseño es la siguiente: los desapareamientos de origen natural a veces pueden ser tolerados por la polimerasa dependiendo del contenido, el número y la posición o posiciones del  
 55 desapareamiento o desapareamientos. El desapareamiento o desapareamientos adicionales introducidos están diseñados para reducir aún más la eficiencia de PCR para las dianas no específicas sin impactar significativamente en las dianas específicas. Como resultado, se amplificarán las dianas con las mutaciones de interés de manera eficiente, mientras que las dianas no específicas no harán debido a la presencia de 2 o más desapareamientos en o cerca del extremo 3' de los cebadores. Esta característica del diseño se puede aplicar a cualquiera del cebador  
 60 directo o inverso para permitir el cebado específico del alelo. Tal como se describe en las figuras 2 y 3, dicho diseño ya puede ser suficiente para lograr la detección y/o identificación específica de alelo. Dependiendo del patrón de SNP real, por ejemplo, en casos en que dos SNP individuales están muy separados, puede ser factible detectar SNP específicos si los cebadores directo e inverso están diseñados para ser específicos de alelo (véase, Figura 5). Además de los SNP de interés, puede haber otros SNP existentes cercanos que no son clínicamente relevantes  
 65 y deben ser tolerados por el ensayo. Una solución es diseñar bases degeneradas en esas posiciones (véase, la figura 2, ejemplo 2) u otras bases de nucleótidos modificadas que permitan la unión indiscriminada.

Los principios y estrategias del diseño descritos anteriormente y ejemplificados más abajo se pueden adoptar para su uso con AS-PCR basado en codones para detectar mutaciones de aminoácidos individuales. En la tabla de codones genéticos, cada aminoácido que incluye el codón de parada (TGA/UGA) está codificado por un grupo diferente de tres nucleótidos. Con el fin de minimizar señales no específicas de otras mutaciones de aminoácidos y/o secuencias nominales que potencialmente pueden estar presentes en una muestra, la región de SNP para el codón completo necesita incluirse en el diseño del cebador. Con el fin de detectar múltiples codones correspondientes a una mutación de aminoácido de interés (dependiendo del aminoácido específico) o múltiples mutaciones de aminoácidos, se utilizan múltiples cebadores específicos de alelo (como un grupo o por separado), cada uno con una secuencia de extremo 3' que es específica a uno de los codones de interés. Estos cebadores específicos de alelo tienen un emparejamiento perfecto con sus dianas previstas en los últimos 3 nucleótidos del extremo 3', pero tendrán al menos un desapareamiento en la misma región cuando se comparan con cualquier otro codón. Como se discutió anteriormente, un desapareamiento entre los últimos 3 nucleótidos de un cebador a veces puede ser tolerado por la polimerasa; por lo tanto, un desapareamiento adicional es introducido en una posición de nucleótido 5' con respecto a los codones de interés para reducir aún más la eficiencia de PCR para la diana no específica sin afectar significativamente a las dianas específicas. Como resultado, las dianas con sólo las mutaciones de aminoácidos de interés se amplifican mientras que otra diana o dianas no específicas no lo harán debido a la presencia de 2 o más desapareamientos en o cerca del extremo 3' del cebador. Esta estrategia no sólo cubre todas las posibles variaciones genéticas que codifican el aminoácido de interés sino que también elimina las señales no específicas de todos los demás aminoácidos posibles (de secuencias mutadas o de tipo salvaje).

Un experto en la técnica, a partir de las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, sería capaz de diseñar cebadores para su uso en la detección de SNP para cualquier diana deseada. Una ejemplificación a continuación enseña un procedimiento para detectar al menos una mutación (X) del codón que codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano. El procedimiento comprende:

(a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, en el que los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' terminal del mismo codifica X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' terminal contiene una base distinta de adenina (A), en el que, si X está presente, el cebador se hibrida a X, en el que si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa (a) comprende además obtener ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm antes de realizar la reacción de amplificación,

después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X,

(b) detectar el producto de amplificación que comprende X, y en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada codón,

La reacción de amplificación puede comprender además al menos un bloqueador de ácido peptidonucleico (PNA), en la que al menos un bloqueador de PNA es de tipo salvaje y, si la reacción de amplificación comprende uno o más de otros bloqueadores de PNA, el PNA bloquea un oligonucleótido detectable y/o un cebador, el PNA bloquea un oligonucleótido detectable y/o un cebador mediante la unión de una diana no deseada y la prevención de la amplificación de un cebador a partir de una diana no deseada. La detección del producto de amplificación que comprende X puede comprender la detección de un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende X. La reacción de amplificación puede comprender además un cebador de control interno, en cuyo caso la reacción de amplificación también produce un producto de amplificación que comprende el control interno, en cuyo caso la etapa (b) incluye la detección del producto de amplificación que comprende el control interno. La detección del producto de amplificación que comprende el control interno puede comprender la detección de un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende el control interno. X es al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K, D, R, y N. Por ejemplo, X puede ser al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K, y D. X puede ser E, E y K, E y D, K y D, o E, K, y D. Cuando el procedimiento comprende detectar dos o más X, el procedimiento puede comprender realizar

una reacción de amplificación con la muestra de ADN para cada X juntas o por separado. En este sentido, el procedimiento también puede comprender además determinar qué X está presente en la muestra de ácido nucleico.

La presente descripción incluye un conjunto de cebadores para la amplificación de V600X en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano. El conjunto de cebadores comprende al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAA [SEQ ID NO: 44] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAG [SEQ ID NO: 45] en su extremo 3' terminal,

(b) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAA [SEQ ID NO: 46] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAG [SEQ ID NO: 47] en su extremo 3' terminal,

- (c) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAT [SEQ ID NO: 48] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAC [SEQ ID NO: 49] en su extremo 3' terminal,
- (d) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAT [SEQ ID NO: 50] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAC [SEQ ID NO: 51] en su extremo 3' terminal,
- (e) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGT [SEQ ID NO: 52] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGC [SEQ ID NO: 53] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGA [SEQ ID NO: 54] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGG [SEQ ID NO: 55] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGA [SEQ ID NO: 56] en su extremo 3' terminal y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGG [SEQ ID NO: 57] en su extremo 3' terminal,
- (d) y (e),
- (a) y (b),
- (a) y (c),
- (b) y (c),
- (a), (b), y (c),
- cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (d), cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (e), y cualquiera de (a), (b) y (c) en combinación adicional con (d) y (e), en las que N es un nucleótido que contiene una base distinta de adenina (A), y en las que el oligonucleótido comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos. El oligonucleótido puede comprender, además, contigua con la G en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos uno o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos 5' el 5 AATAGGTGATTTT 3' [SEQ ID NO: 58] empezando con T en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. El conjunto de cebadores puede comprender, además, un cebador, tal como un cebador inverso, que comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en el que, cuando el cebador comprende 15-27 nucleótidos, comprende 15-27 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10. El oligonucleótido detectable puede comprender de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en el que, cuando el oligonucleótido detectable comprende 15-20 nucleótidos, comprende 15-20 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 11.

También se describe un kit. El kit comprende:

- (i) un conjunto de cebadores para la detección de V600X en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano, en el que el conjunto de cebadores comprende al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAA [SEQ ID NO: 44] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAG [SEQ ID NO: 45] en su extremo 3' terminal,
- (b) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAA [SEQ ID NO: 46] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAG [SEQ ID NO: 47] en su extremo 3' terminal,
- (c) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAT [SEQ ID NO: 48] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAC [SEQ ID NO: 49] en su extremo 3' terminal,
- (d) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAT [SEQ ID NO: 50] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAC [SEQ ID NO: 51] en su extremo 3' terminal,
- (e) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGT [SEQ ID NO: 52] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGC [SEQ ID NO: 53] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGA [SEQ ID NO: 54] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGG [SEQ ID NO: 55] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGA [SEQ ID NO: 56] en su extremo 3' terminal y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGG [SEQ ID NO: 57] en su extremo 3' terminal,
- (d) y (e),
- (a) y (b),
- (a) y (c),
- (b) y (c),
- (a), (b), y (c),
- cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (d),
- cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (e), y
- cualquiera de (a), (b) y (c) en combinación adicional con (d) y (e),
- en las que N es un nucleótido que contiene una base distinta de adenina (A), y en las que el oligonucleótido comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, y

(ii) instrucciones para un procedimiento de detección de al menos una mutación (X) del codón que codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano, cuyo procedimiento comprende:

- (a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' terminal del cual codifican X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' terminal contiene una base distinta de la adenina (a), en el que, si X está presente, el cebador se hibrida a X, y al menos un bloqueador de ácido peptidonucleico (PNA), en el que al menos un bloqueador de PNA bloquea la amplificación desde la diana de tipo salvaje, en el que, si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa (a) comprende además la obtención de ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm antes de realizar la reacción de amplificación, después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X, y
- (b) detectar el producto de amplificación que comprende X,
- en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada codón, en el que, si el procedimiento comprende detectar dos o más X, el procedimiento puede comprender realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico para cada X juntas o por separado, y en el que el procedimiento también puede comprender además determinar qué X está presente en la muestra de ácido nucleico.

El oligonucleótido puede comprender, además, contiguo a la G en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos uno o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos 5' AATAGGTGATTTT 3' [SEQ ID NO: 58] empezando con T en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. El kit puede comprender además un cebador, tal como un cebador inverso, que comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en el que, cuando el cebador comprende 15-27 nucleótidos, comprende 15-27 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10. El kit puede comprender además un oligonucleótido detectable que comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en el que, cuando el oligonucleótido detectable comprende 15-20 nucleótidos, comprende 15-20 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 11. X puede ser al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K, D, R, y N. X puede ser al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K, y D, tal como E, E y K, E y D, K y D, o E, K y D.

La presente descripción no se limita a la detección de mutaciones de BRAF y un experto en la técnica, basado en las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, sería capaz de diseñar cebadores y ensayos para la detección de cualquier SNP diana deseado. Por lo tanto, la presente descripción incluye un procedimiento para detectar al menos una mutación (X) de un codón en un gen en una muestra de ácido nucleico. El procedimiento comprende:

- (a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del cual codifica X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' contiene una base distinta de adenina (A), en la que, si X está presente, el cebador hibrida con X, en el que, si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa (a) comprende además obtener ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm antes de realizar la reacción de amplificación, después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X,
- (b) detectar el producto de amplificación que comprende X, y en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada codón.

La reacción de amplificación puede comprender además al menos un bloqueador de ácido peptidonucleico (PNA), en el que al menos un bloqueador de PNA bloquee la amplificación a partir de la diana de tipo salvaje, y en el que, si la reacción de amplificación comprende uno o más de otros bloqueadores de PNA, el PNA preferiblemente bloquea un oligonucleótido detectable y/o un cebador. La detección del producto de amplificación que comprende X puede comprender la detección de un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende X. La reacción de amplificación puede comprender además un cebador de control interno, en cuyo caso la reacción de amplificación también produce un producto de amplificación que comprende el control interno, en cuyo caso la etapa (b) incluye la detección del producto de amplificación que comprende el control interno. La detección del producto de amplificación que comprende el control interno puede comprender la detección de un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende el control interno. Cuando el procedimiento comprende detectar dos o más X, el procedimiento puede comprender realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico para cada X juntas o por separado. En este sentido, el procedimiento también puede comprender además determinar qué X está presente en la muestra de ácido nucleico.

También se describe un procedimiento para diseñar un cebador para la detección de al menos una mutación (X) de un codón en un gen en una muestra de ácido nucleico. El procedimiento comprende sintetizar un cebador, los

últimos tres nucleótidos en el extremo 3' terminal del cual codifica X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' terminal contiene una base distinta de la que está presente en el gen de tipo salvaje, tras lo cual se diseña un cebador para detección de al menos una mutación (X) en un codón en un gen en una muestra de ácido nucleico.

5

La presente descripción también está dirigida hacia una estrategia de diseño de cebadores específicos de doble alelo. En situaciones en las que hay múltiples SNP de interés en múltiples posiciones, con un SNP por posición, por ejemplo, se detectará la presencia simultánea de múltiples SNP en una muestra dada. El SNP individual no debe detectarse. Un ejemplo de la estrategia de diseño de cebadores específicos de doble alelo se proporciona en la

10

Figura 5. A este respecto, el diseño de cebadores que se ejemplifica en la Figura 2 se puede aplicar al cebador directo o el cebador inverso en el procedimiento de diseño de cebadores específicos de doble alelo de la presente descripción.

La presente descripción también contempla un procedimiento para detectar una secuencia de ácido nucleico que comprende un polimorfismo de nucleótido único (SNP) de interés (el primer SNP de interés), comprendiendo dicho procedimiento a) proporcionar i) una secuencia de ácido nucleico sospechosa de contener el SNP diana, ii) un cebador que es complementario a la secuencia que comprende el SNP diana, en el que la base ubicada a tres bases 5' desde un nucleótido cebador que es complementario al SNP diana es una base que no es complementaria a la base correspondiente del ácido nucleico que comprende la secuencia de SNP diana, creando de este modo en

15

20

25

el cebador una base desapareada; b) poner en contacto la muestra sospechosa de contener el SNP diana con el cebador en condiciones que permitan la unión del cebador al SNP diana, si está presente, para crear un SNP diana unido; y c) detectar el SNP diana unido. La presente descripción también contempla que si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa b) comprende además la obtención de ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm.

La presente invención también contempla que cuando la secuencia de ácido nucleico comprende más de un SNP (el segundo SNP de interés), se utiliza un cebador separado para detectar el segundo SNP de interés.

30

La presente invención también contempla que cuando la secuencia de ácido nucleico que comprende el SNP diana de interés comprende una o más mutaciones no diana, el cebador contiene nucleótidos complementarios a dichas una o más mutaciones no diana.

La presente invención también contempla que cuando la secuencia de ácido nucleico que comprende el SNP diana de interés (el primer SNP de interés) contiene uno o más SNP diana de interés en la misma posición de secuencia

35

que el procedimiento comprende, además, un cebador que contiene una base complementaria a cada uno de uno o más SNP de interés adicionales.

La presente descripción también contempla que cuando la secuencia de ácido nucleico que comprende el SNP diana de interés (el primer SNP de interés) contiene uno o más SNP diana de interés adicionales en una localización

40

o localizaciones de secuencia que difieren de la localización de secuencia del primer SNP de interés, el cebador comprende, además, una base o bases complementaria al uno o más SNP adicionales de interés.

La presente descripción también contempla un procedimiento para detectar una secuencia de ácido nucleico que comprende una o más polimorfismos de nucleótido único (SNP) diana de interés, en el que los SNP se encuentran en una o más posiciones en la secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento; a) proporcionar, i) una secuencia de ácido nucleico que se sospecha que contiene el uno o más SNP diana de modo que la primera secuencia que contiene uno o más SNP es la primera secuencia y de manera que el SNP más 5' es el primera SNP diana, una segunda secuencia que contiene uno o más SNP, en la que al menos un SNP se diferencia de los uno o más SNP de la primera secuencia, es la segunda secuencia y de manera que el SNP más 5' es el primer SNP diana, etc., ii) un cebador complementario a cada secuencia que comprende el uno o más SNP diana en el que para cada cebador, la base ubicada a tres bases desde 5' de un nucleótido cebador que es complementaria al primer SNP diana es una base que no es complementaria a la base correspondiente del ácido nucleico que comprende la secuencia de SNP diana, creando de este modo en el cebador una primera base desapareada; b) poner en contacto la muestra sospechosa de contener las secuencias que contienen el uno o más SNP diana con el cebador o

45

50

55

cebadores en condiciones que permiten la unión del cebador o cebadores para al uno o más SNP diana, si están presentes, para crear un SNP diana unido; y c) detectar los SNP diana unidos. La presente descripción también contempla que si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa b) comprende además la obtención de ADNc inverso transcrito a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm.

La presente descripción también contempla una estrategia de cebadores específicos de doble alelo (véase, Figura 5) en la que se crean ambos cebadores directo e inverso para la detección de múltiples SNP diana en una secuencia de nucleótidos.

60

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

65

La Figura 1 ilustra el diseño de cebadores, en el que el codón V600 está subrayado.



La figura 2 muestra múltiples estrategias de diseño de cebadores de la presente descripción.

La Figura 3 muestra un diagrama esquemático que ilustra el principio de diseño para cebadores específicos de aminoácido usando V600E de BRAF como una diana modelo.

La Figura 4 muestra el diseño de cebadores específicos de aminoácidos para V600E de BRAF como una diana modelo.

La Figura 5 muestra la estrategia de diseño de cebadores específicos de doble alelo de la presente descripción.

Las figuras 6 A y B muestran una comparación de dos diseños de cebadores diferentes para la detección de V600E de BRAF. También se muestran el número de bases desapareadas en cada diseño de cebador.

Las figuras 7 A y B muestran una comparación de dos diseños de cebadores diferentes para la detección de V600E de BRAF presentada como curvas (A) CT y (B) PCR.

La Figura 8 muestra los resultados de la detección de SNP utilizando cebadores específicos para V600E o V600K.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 La presente descripción se basa, al menos en parte, en cebadores de oligonucleótidos y oligonucleótidos detectables para la amplificación en tiempo real y la detección de un polimorfismo de nucleótido único o múltiples polimorfismos de nucleótido (SNP). La detección del SNP en la posición de aminoácido 600 de BRAF es un ejemplo. Este SNP puede dar lugar a la sustitución de valina por ácido glutámico (designado aquí como V600E), lisina (designado aquí como V600K), ácido aspártico (V600D), arginina (V600R) o asparagina (V600N), por ejemplo. Dado que la mutación de valina en la posición de aminoácido 600 a ácido glutámico, lisina, y/o ácido aspártico representa más del 90% de todas las mutaciones de BRAF, los cebadores y oligonucleótidos detectables descritos en el presente documento permiten, entre otras cosas, el pronóstico del cáncer y la evaluación de la eficacia terapéutica de un fármaco que se dirige a la vía MAPK.

25 La amplificación específica de alelo y la bloqueación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se combinan para detectar el SNP. La combinación permite una sensibilidad más baja que o igual a aproximadamente el 0,5% de contenido de mutante con excelente especificidad.

Las siguientes definiciones son relevantes para la presente descripción:

30 (a) "Aproximadamente" se refiere a aproximadamente una variación de +/- 10% del valor indicado. Debe entenderse que tal variación se incluye siempre en cualquier valor dado a conocer en el presente documento, se haga o no referencia específica a la misma.

(b) "Cebador específico de alelo" en el contexto de la presente descripción se refiere a un cebador (véase "cebador") que se hibrida con una secuencia diana de tal manera que el extremo 3', por lo general el nucleótido 3', del cebador se alinea con un sitio de interés, por ejemplo, nucleótido 1800, que es el tercer nucleótido en el codón 600 de BRAF, y es exactamente complementario a cualquiera del alelo de tipo salvaje o un alelo mutante en el codón del SNP. El uso de un cebador específico de alelo permite la discriminación entre alelos en base a la formación diferencial de los productos de extensión durante la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, ADN.

(c) "Oligonucleótido detectable" se refiere a un oligonucleótido que hibrida selectivamente con un ácido nucleico diana en condiciones adecuadas y se puede detectar.

(d) "Análogo de ácido nucleico de alta afinidad" se refiere a un ácido nucleico modificado que se hibrida con un ácido nucleico complementario, tal como un ácido desoxirribonucleico (ADN), con mayor afinidad que un ácido nucleico no modificado que tiene la misma secuencia base. Los ácidos nucleicos de alta afinidad incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos peptidonucleicos (PNA), ácidos nucleicos de hexitol (HNAs), fosforamidatos, y similares.

(e) "Hibridación" se refiere a la formación de una estructura de doble cadena por apareamiento de bases complementarias entre dos ácidos nucleicos monocatenarios. La hibridación puede ocurrir entre cadenas de ácido nucleico exactamente complementarias o entre cadenas de ácido nucleico complementarias que contienen un bajo número de desapareamientos.

(f) "Ácido nucleico bloqueado (LNA)" se refiere a un análogo de ácido nucleico (un polímero de bases purina y/o pirimidina), caracterizado por la presencia de uno o más monómeros que son análogos de nucleótidos conformacionalmente restringidos con un puente 2H-O, 4H-C-metileno adicional añadido al anillo de ribosa. LNA se ha definido como un oligonucleótido que tiene uno o más monómeros de 2H-O, 4H-C-metilen-(D-ribofuranosil) nucleótido. Los LNA son resistentes a las exonucleasas y calor.

(g) "Ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a cebadores, oligonucleótidos detectables, y oligómeros, independientemente de la longitud, e incluyen polidesoxirribonucleótidos, polirribonucleótidos, y cualquier otro N-glicósido de una base de purina/pirimidina modificada o sin modificar. Los ejemplos incluyen ADN de cadena sencilla (ssDNA), ADN de doble cadena (dsDNA), ARN de cadena sencilla (ssRNA) y ARN de doble cadena (dsRNA). Dichas moléculas pueden comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados, incluyendo, pero no limitado a, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéster, puente de fosforamidato, puente de fosfonato de metileno, fosfortioato, metilfosfonato, fosforoditioato, puente fosfortioato o enlaces sulfona y combinaciones de los mismos. Dichas moléculas pueden comprender adenina, guanina, timina, citosina y/o uracilo, así como otras bases modificadas, no estándar o derivatizadas. Alternativa o adicionalmente, tales moléculas pueden comprender uno o más restos de azúcar modificados.

- (h) "Ácido peptidonucleico (PNA)" se refiere a un análogo de ADN sintético en el que el esqueleto de fosfodiéster normal se sustituye por una cadena de N-(2-aminoetil)glicina. Sus nucleobases complementan ADN o ARN de la misma manera A-T (U) y G-C (Nielsen, et al, Science 254: 1497-1500 (1991); Hanvey, et al, Science 258: 1481-1485 (1992); y Egholm, et al, Nature 365: 566-568 (1993)). El esqueleto artificial hace que PNA sea resistente a las nucleasas. El PNA se puede sintetizar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hyrup, et al, Bioorg Med Chem. 4: 5-23 (1996); la publicación de la solicitud de patente internacional N° WO. 92/20702 y 92/20703; y patente de Estados Unidos No. 5.539.082). Dos características importantes hacen de PNA un bloqueador de PCR superior para los alelos específicos. No puede servir como cebador para la polimerización. No puede servir como sustrato para la actividad exonucleasa por la Taq polimerasa. Además, la temperatura de fusión de un dúplex PNA-ADN perfectamente emparejado es superior a la de un dúplex de ADN-ADN de la misma longitud; por lo tanto, el dúplex PNA-ADN es más estable. Un solo despareamiento en un híbrido PNA-ADN causará una caída en la temperatura de fusión de aproximadamente 10-18 °C (Kyger, et al, Anal Biochem 260: 142-148 (1998)). Por lo tanto, sobre un intervalo de temperaturas apropiado, el PNA puede bloquear específicamente la hibridación de cebador/oligonucleótido detectable o el alargamiento de la cadena en una plantilla perfectamente emparejada sin interferir con las reacciones en las plantillas con la base o bases no apareadas (Sun, et al, Nat Biotechnol 20: 186 -189 (2002); Thiede, et al, Nucleic Acids Res. 24: 983-984 (1996); y Taback, et al, Int J. Cancer 111: 409-414 (2004)), que se conoce para bloqueo de PCR mediado por PNA (Orum, et al, Nucleic Acids Res. 21: 5332-5336 (1993)). La gran diferencia en la temperatura de fusión entre los híbridos perfectamente emparejados y desparejados hace que el PNA sea un buen sensor de mutaciones puntuales (véase, por ejemplo, Karadag, et al, Nucleic Acids Res. 32: e63 (2004); Taback, et al (2004), supra; Hancock, et al, Clin CHCM 48: 2155-2163 (2002); Takiya, et al, Biosci Biotechnol Biochem 68: 360-368 (2004); Kirishima, et al, J. Hepatol 37: 259-265 (2002); y Ohishi, et al, J. Med Virol. 72: 558-565 (2004)). La publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2004/0014105 describe procedimientos para el enriquecimiento selectivo de polinucleótidos que están presentes en una muestra en baja abundancia. El procedimiento utiliza oligómero nucleobases enzimáticamente no extensible (por ejemplo, PNA) como un bloqueador de PCR para bloquear selectivamente la actividad de la polimerasa en polinucleótidos que están presentes en la muestra en alta abundancia, lo que resulta en un enriquecimiento de especies menos abundantes en la muestra. "PNA" puede incluir un bloqueador de PNA. El bloqueo opera mediante la competencia física entre un PNA y un cebador de ADN o sonda para un sitio diana común, interfiriendo de este modo con el alargamiento del cebador.
- (i) "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)" es un procedimiento de realización de copias de una secuencia de ADN. El procedimiento emplea el ciclado térmico (es decir, los ciclos de calentamiento y enfriamiento para la desnaturalización (o de fusión) y la replicación del ADN, respectivamente). Los cebadores, que son fragmentos cortos de ADN que contienen secuencias complementarias a la secuencia de ADN para ser copiada, y una ADN polimerasa estable al calor, tal como la de *Thermus aquaticus*, que se conoce como la Taq polimerasa, se utilizan para seleccionar la secuencia de ADN y copiarla (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n° 4.683.195; 4.800.195, y 4.965.188). Con el ciclado repetido, las copias, que se hacen, se utilizan como plantillas para generar más copias (es decir, una reacción en cadena). Las técnicas de PCR incluyen, pero no se limitan a, PCR estándar, PCR específica de alelo, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, PCR digital, PCR Hot-start, PCR específica de intersecuencia, PCR inversa, PCR mediada por ligación, PCR específica de metilación, PCR de mini-cebadores, PCR anidada, PCR de superposición-extensión, PCR en tiempo real, PCR con transcripción inversa, PCR en fase sólida, PCR entrelazada asimétrica térmica y PCR Touchdown.
- (j) "Cebador" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un oligonucleótido que inicia la síntesis de ácido nucleico dependiente de plantilla. En presencia de una plantilla de ácido nucleico, os precursores de nucleósidos trifosfato, una polimerasa, y cofactores, en condiciones adecuadas de temperatura y pH, el cebador se puede extenderse en su extremo 3' por la adición de nucleótidos por la polimerasa para producir un producto de extensión del cebador. El cebador puede variar en longitud dependiendo de las condiciones particulares empleadas y el propósito de la amplificación. Por ejemplo, un cebador para la amplificación para un propósito de diagnóstico tiene típicamente de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. El cebador debe ser de complementariedad suficiente con la plantilla deseada para cebar la síntesis del producto de extensión deseado. En otras palabras, el cebador debe ser capaz de hibridarse con la cadena plantilla deseada de forma suficiente para proporcionar el resto hidroxilo 3' del cebador en yuxtaposición adecuada para su uso en la iniciación de la síntesis por una polimerasa. No es necesario que el cebador sea un complemento exacto de la plantilla deseada. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no complementaria puede estar presente en el extremo 5' de un cebador de otra manera complementario. Alternativamente, las bases no complementarias pueden estar intercaladas dentro del cebador de oligonucleótido, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena plantilla deseada para proporcionar un complejo plantilla-cebador para la síntesis del producto de extensión.
- (k) "Se hibrida o hibridan específicamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un ácido nucleico dado, tal como un cebador u oligonucleótido detectable, para unirse específicamente a otro ácido nucleico.
- (l) Condiciones de hibridación "específicas de secuencia" o "rigurosas" se refiere a condiciones en las que la cadena de ácido nucleico exactamente complementaria se hibridará preferencialmente. Las condiciones de hibridación rigurosas son bien conocidas en la técnica. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5 °C más baja que el punto de fusión térmico (T<sub>f</sub>) para la secuencia específica en condiciones definidas de pH y la fuerza iónica a la que se disocian el 50% de los pares de bases.

- (m) "Sustancialmente complementaria" se refiere a secuencias que son complementarias excepto en regiones menores de desapareamientos. Típicamente, el número total de los desapareamientos en un ácido nucleico que tiene de aproximadamente 15 nucleótidos de longitud es de aproximadamente 3 nucleótidos o menos.
- (n) "Secuencia diana" y "región diana" se refieren a una región de un ácido nucleico que se va a detectar, o se detecta y analiza, y comprende el sitio polimórfico de interés, es decir, V600D, V600E, V600K, V600N o V600R en el contexto de la presente descripción.
- (o) "V600D" se refiere a una mutación TG → AT o TG → AC que empieza en la posición de nucleótido 1799 de BRAF que da lugar a la sustitución de ácido aspártico por valina.
- (p) "V600E" se refiere a una mutación T → A o TG → AA que empieza en la posición de nucleótido 1799 de BRAF que da lugar a la sustitución de ácido glutámico por valina. V600E también se conoce como V599E (mutación T → A en la posición nucleotídica 1796 de BRAF) bajo un sistema de numeración anterior (Kumar, et al, Clin Cancer Res 9: 3.362-3.368 (2003)).
- (q) "V600K" se refiere a una mutación GT → AA o GTG → AAA que empieza en la posición de nucleótido 1798 de BRAF que da lugar a la sustitución de lisina por valina.
- (r) "V600N" se refiere a una mutación GTG → AAT o GTG → AAC que empieza en la posición de nucleótido 1798 de BRAF que da lugar a la sustitución de la asparagina por valina.
- (s) "V600R" se refiere a una mutación GT → AG, GT → CG, GTG → AGA, GTG → CGT, GTG → CGC o GTG → CGA que empieza en la posición de nucleótido 1798 de BRAF que da lugar a la sustitución de arginina por valina.
- 20 La terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no se pretende de otro modo que sea limitante.

### **Procedimiento de Detección**

- 25 Se proporciona un procedimiento para detectar al menos una mutación (X) del codón que codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF, en una muestra de ácido nucleico de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano). El procedimiento comprende:
- (a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, en el que los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' terminal del mismo codifica X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' terminal contiene una base distinta de adenina (A), en el que, si X está presente, el cebador se hibrida a X, en el que si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa (a) comprende además obtener ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm antes de realizar la reacción de amplificación,
- 30 después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X,
- (b) detectar el producto de amplificación que comprende X, y en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada codón.
- 40 Con respecto a un cebador, se hace referencia en el presente documento a los nucleótidos (nt) en el extremo 3' terminal de la siguiente manera:  
nt - nt - nt - nt 3'  
Posición: cuarto tercero segundo primero.
- 45 La reacción de amplificación puede comprender además al menos un bloqueador de ácido peptidonucleico (PNA), en la que al menos un bloqueador de PNA bloquea la amplificación a partir de la diana de tipo salvaje, y en la que, si la reacción de amplificación comprende uno o más de otros bloqueadores de PNA, en la que el PNA bloquea un oligonucleótido detectable mediante la unión de una diana no deseada y la prevención de la amplificación de un cebador a partir de una diana no deseada. La detección del producto de amplificación que comprende X puede comprender la detección de un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende X. La reacción de amplificación puede comprender además un cebador de control interno, en cuyo caso la reacción de amplificación también produce un producto de amplificación que comprende el control interno, en cuyo caso la etapa (b) incluye la detección del producto de amplificación que comprende el control interno. La detección del producto de amplificación que comprende el control interno puede comprender la detección de un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende el control interno. X es al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K, D, R, y N. Por ejemplo, X puede ser al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K, y D. X puede ser E, E y K, E y D, K y D, o E, K, y D. X también puede ser otro aminoácido además de E, K, D, R, o N, incluyendo V codificado por un codón distinto del que se encuentra en tipo salvaje (es decir, una mutación silenciosa), o un codón de parada prematuro. Preferiblemente, sin embargo, X es al menos uno de E, K, D, R, o N como se indica.
- 60 Cuando el procedimiento comprende detectar dos o más X, el procedimiento puede comprender realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico para cada X juntas o por separado. En este sentido, el procedimiento también puede comprender además determinar qué X está presente en la muestra de ácido nucleico.
- 65

La reacción de amplificación puede comprender, y preferiblemente, comprende un ácido nucleico de control interno (IC) y un par de cebadores para amplificar el ácido nucleico IC. Cuando la reacción de amplificación comprende un ácido nucleico IC, las condiciones que promueven la amplificación también promueven la amplificación del ácido nucleico IC.

Por lo tanto, la selección de cebadores permite la detección de al menos una mutación de acuerdo con la presente descripción. Esto está en claro contraste con los procedimientos de la técnica anterior en los que la selección de oligonucleótidos detectable permite la detección de una mutación. El presente procedimiento también es específico para la mutación a nivel de aminoácidos (es decir, los cebadores se seleccionan para amplificar todos los codones que codifican un aminoácido particular, pero ningún otro aminoácido). Esto está en claro contraste con los procedimientos de la técnica anterior, que son específicos para los ácidos nucleicos y detectan múltiples aminoácidos codificados por codones en los que los nucleótidos en las primera y segunda posiciones del codón son los mismos. Además, el presente procedimiento se puede realizar en ADN o ARN, es inherentemente cuantitativo, y se puede adaptar para la detección de SNP en otros lugares en el mismo gen, así como SNP en otros genes.

Cualquier muestra adecuada de un tejido o un fluido corporal puede ser utilizado como la fuente de la muestra de ácido nucleico, es decir, ADN o ARN. Típicamente, la fuente es un tumor o las células/tejidos de un sitio metastásico o sangre (o componente de la misma). Se pueden utilizar sangre, plasma, suero, linfa, y biopsias de tumores, por ejemplo. Otras muestras incluyen orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, esputo, fluido peritoneal, lavados vesicales, secreciones (por ejemplo, mama), lavados orales, preparaciones de impronta y aspirados con aguja fina. Se puede conservar el plasma o la sangre entera, tal como mediante la adición de un agente quelante, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o una sal del mismo, tal como una sal de sodio o una sal de calcio y disodio. Una proteinasa, tal como proteinasa K, se puede añadir a la muestra para digerir las proteínas no deseadas.

Las muestras de tejido generalmente se pueden conservar como bloques bloqueados con formalina, embebidos en parafina (FFPE). Secciones de tejido de grosor variable, tales como 5 µm, se cortan a partir de tales bloques de tejido y se dejan sin montar o se montan sobre un soporte sólido, tal como un portaobjetos, mediante medios estándar. La morfología celular de la muestra de tejido se revela usando una variedad de agentes de bloqueación y/o tinción y se visualizó al microscopio. Si la densidad de las células, tales como células de cáncer, por ejemplo, células de melanoma, en una muestra de tejido es suficiente (más de aproximadamente el 1%), la sección se raspa del portaobjetos y el ADN se puede extraer directamente de la muestra de tejido total sin purificación adicional. Alternativamente, si la densidad de células, tales como células de cáncer, por ejemplo, células de melanoma, en una muestra de tejido es baja (menos de aproximadamente el 1%), se pueden realizar procedimientos adicionales para enriquecer la muestra de tejido para células de melanoma. El ADN también se puede aislar de tejido fresco/congelado, un aspirado con aguja fina o sangre periférica.

La muestra se puede preparar para el ensayo usando cualquier procedimiento adecuado, tal como se conoce en la técnica. Deseablemente, el procedimiento extrae y concentra ácidos nucleicos. El procedimiento deseablemente también hace que la secuencia diana sea accesible para la amplificación, y elimina inhibidores potenciales de la amplificación del extracto.

El ADN puede aislarse a partir de sangre periférica usando, por ejemplo, un kit de aislamiento de ADN DNeasy, un kit de ADN de sangre QIAamp o un kit de ADN de sangre PAXgene de Qiagen Inc. (Valencia, CA), u otros procedimientos conocidos por un experto en la técnica. El ADN de otras muestras de tejido también se puede obtener usando un kit de aislamiento de ADN DNeasy. También puede utilizarse cualquier otra técnica de extracción y purificación de ADN, incluyendo técnicas líquido-líquido y de fase sólida que van desde la extracción con fenol-cloroformo a sistemas de captura automatizados de ácido nucleico con perlas magnéticas. El ARN se puede aislar y transcribir de forma inversa y el ADNc resultante puede amplificarse (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), tal como se describe en las patentes US No. 5.310.652; 5.322.770; 5.561.058; 5.641.864; y 5.693.517, por ejemplo).

Una vez se ha obtenido el ácido nucleico, se puede poner en contacto con cebadores que dan lugar a la amplificación específica de una secuencia mutante, si la secuencia mutante está presente en la muestra. "Amplificación específica" significa que los cebadores amplifican una secuencia mutante específica y no otras secuencias mutantes o la secuencia de tipo salvaje. Véase, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erich, Editor, Freeman Press, NY (1992)); PCR Protocols: A guide to Methods and Applications (Innis, et al, editores, Academic Press, San Diego, CA (1990).); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1994 a 1999, incluyendo las actualizaciones suplementarias hasta abril de 2004); y Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook y Russell, tercera ed, 2001). Los procedimientos basados en la amplificación específica de alelo o los procedimientos basados en la extensión se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 93/22456 y las patentes de los Estados Unidos. Nos. 4.851.331; 5.137.806; 5.595.890; y 5.639.611. Aunque los procedimientos, tales como la reacción en cadena de la ligasa, ensayo de desplazamiento de cadena, y diversos procedimientos de amplificación basados en la transcripción pueden ser utilizados en los procedimientos como se han descrito (véase, por ejemplo, la revisión por

Abramson y Myers, *Current Opinion in Biotechnology* 4: 41-47 (1993)), se prefiere la PCR, en particular, las PCR que emplean bloqueadores ("clamps"), tales como bloqueadores de PNA.

Los cebadores específicos de alelos múltiples, tales como múltiples alelos mutantes o diversas combinaciones de alelos tipo salvaje y los alelos mutantes, pueden emplearse simultáneamente en una sola reacción de amplificación. Los productos de amplificación se pueden distinguir por diferentes marcadores o tamaño (por ejemplo, usando electroforesis en gel).

Un cebador puede ser detectablemente marcado con un marcador que puede detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos, por ejemplo (véase, por ejemplo, Sambrook, et al.). Los marcadores útiles incluyen un colorante, tal como un colorante fluorescente, un marcador radioactivo, tal como <sup>32</sup>P, un reactivo denso en electrones, una enzima, tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina, biotina, o haptenos y proteínas para las que se disponen antisueros o anticuerpos monoclonales.

Un oligonucleótido detectable puede marcarse de manera similar, tal como con fluoresceína. En este sentido, si el cebador se marca con un colorante y el oligonucleótido detectable está marcado con fluoresceína, y está diseñado para unirse a la cadena naciente opuesta del colorante, puede tener lugar la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) a través de la hélice del ADN. Otros oligonucleótidos detectables incluyen una sonda molecular, una sonda TAQMAN®, una sonda de ADN monocatenario, una sonda de ADN de doble cadena, y similares.

Cualquier secuencia adecuada se puede utilizar como IC. Los ejemplos de secuencias diana de IC incluyen las utilizadas en los ejemplos del presente documento.

Los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen una enzima que tiene actividad de polimerasa (por ejemplo, AmpliTaq Gold®), una o más cofactores de enzimas (por ejemplo, MgCl<sub>2</sub>), y desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs; por ejemplo, dATP, dGTP, dCTP, y dTTP).

Las condiciones que promueven la amplificación son las que promueven la hibridación de los cebadores y extensión de secuencias de ácidos nucleicos. La hibridación es dependiente de varios parámetros, como la temperatura, fuerza iónica, longitud de las secuencias que se está amplificando, complementariedad y contenido G:C de las secuencias que se amplifican. Por ejemplo, la reducción de la temperatura promueve la hibridación de secuencias de ácido nucleico complementarias. Un alto contenido en G:C y una longitud más larga estabilizan la formación de dúplex (dobles cadenas). Generalmente, los cebadores y oligonucleótidos detectables de aproximadamente 30 pb o menos y que con un alto contenido en G:C funcionan bien. Las condiciones de amplificación, cebadores y oligonucleótidos detectables preferidos se ejemplifican en este documento.

La amplificación se puede repetir cualquier número adecuado de veces mediante ciclado térmico de la mezcla de reacción entre alrededor de 10 y alrededor de 100 veces, tal como entre aproximadamente 20 y aproximadamente 75 veces, tal como entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 veces.

Una vez se han completado las reacciones de amplificación, la presencia de un producto amplificado puede detectarse usando cualquier procedimiento adecuado. Tales procedimientos incluyen, sin limitación, los conocidos en la técnica, tal como electroforesis en gel con o sin un colorante fluorescente (dependiendo de si el producto se amplificó con un cebador marcado con colorante), un perfil de fusión con un colorante intercalante (véase, por ejemplo, *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification*, Erlich, Ed., WH Freeman and Co., Nueva York, 1992, Capítulo 7), y la hibridación con un oligonucleótido detectable interno. También se puede utilizar otros ejemplos de procedimientos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), electroquimioluminiscencia, transferencias de puntos inversas, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (véase, por ejemplo, Lazar, *Genome Res.* 4: S1-S14 (1994)), y análisis de polimorfismo de conformación de cadena simple de los productos PCR de una sola cadena (véase, por ejemplo, Orita, et al, *PNAS EE.UU.* 86: 2766-2770 (1989)).

El ácido nucleico amplificado se puede detectar mediante el control de un aumento en la cantidad total de ADN de doble cadena (dsDNA) en la mezcla de reacción (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.994.056 y las publicaciones de Patente Europea. Nos. 487.218 y 512334). Se utiliza un colorante de unión al ADN, tal como SYBR Green. El colorante emite fluorescencia cuando se une a ADN de doble cadena y el aumento de la fluorescencia se utiliza para determinar el aumento de dsDNA.

Los procedimientos basados en secuenciación didesoxi y pirosecuenciación™ de productos de longitud de oligonucleótidos también pueden utilizarse para detectar el ácido nucleico amplificado. Otro procedimiento de secuenciación es descrito por Kobayashi, et al., *Mol. Cell. Detectable oligonucleotides* 9: 175-182 (1995)).

Cuando se realiza PCR, se pueden utilizar las condiciones, tales como los ejemplificados en los ejemplos del presente documento. Cuando se utiliza la PCR estándar, la detección puede ocurrir después de que la amplificación sea completa, tal como después de usar un cebador marcado durante la amplificación, mediante el uso de un cebador marcado como un oligonucleótido detectable después de la amplificación, o mediante el uso de un

oligonucleótido detectable, que difiere en la secuencia de los cebadores, después de la amplificación para hibridar con la secuencia diana amplificada. Los productos de amplificación marcados se pueden separar y detectar entonces mediante otros medios.

- 5 Alternativamente, la amplificación y detección se pueden combinar en un ensayo de PCR en tiempo real. Cuando se usa PCR en tiempo real, la mezcla puede comprender además reactivos de detección de ácidos nucleicos, tales como un colorante fluorescente no específico que se intercala con cualquier ADN de doble cadena, por ejemplo, o un oligonucleótido detectable de ADN específico de secuencia, que permite la detección sólo después de que el oligonucleótido detectable se hibride con su diana de DNA complementaria, lo que permite la amplificación y
- 10 detección simultáneas. Cuando un oligonucleótido detectable está presente en la mezcla durante la amplificación, el oligonucleótido detectable debe ser estable en las condiciones que promueven la amplificación, no debería interferir con la amplificación, debe unirse a su secuencia diana bajo condiciones de amplificación, y emiten una señal sólo tras la unión a su secuencia diana. Ejemplos de oligonucleótidos detectables que están particularmente bien adaptados a este respecto incluyen oligonucleótidos detectables de baliza molecular, oligonucleótidos detectables
- 15 TaqMan®, y oligonucleótidos detectables lineales, tales como los descritos por Abravaya, et al. (publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos. No. 2005/0227257). Los oligonucleótidos detectables pueden formar la región del bucle, solos o en combinación adicional con parte de la región del tallo, de una baliza molecular. Los oligonucleótidos detectables también pueden usarse como oligonucleótidos detectables lineales con un fluoróforo (por ejemplo, FAM) en un extremo y un inhibidor de alta eficiencia, tal como el Black Hole Quencher (BHQ®;
- 20 Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA), en el otro extremo.

La detección de un producto amplificado indica, por ejemplo, que las células que contienen un gen o genes BRAF mutantes específicos (dependiendo de si se detectan simultáneamente o no dos o más genes BRAF mutantes) estaban presentes en la muestra, mientras que la falta de detección de un producto amplificado indica que las

25 células que contienen un gen BRAF mutante específico no estaban presentes en la muestra, tal como cuando el cáncer está presente pero no ha hecho metástasis. En este sentido, si dos o más genes BRAF mutantes específicos se amplifican al mismo tiempo (o uno o más genes BRAF mutantes específicos y BRAF de tipo salvaje), un cebador para cada BRAF mutante específico se puede marcar con un marcador detectable distinto, permitiendo de este modo la detección de dos o más BRAF mutantes específicos (o uno o más genes BRAF mutantes específicos y

30 BRAF de tipo salvaje) a distinguir. Los niveles relativos de los productos mutantes y de tipo salvaje pueden indicar la fracción de células en la muestra que contienen un gen BRAF mutante específico. Las fracciones más bajas de células que contienen la secuencia de BRAF mutante pueden indicar niveles más bajos de metástasis, mientras que mayores fracciones de células que contienen la secuencia mutante pueden indicar niveles más altos de metástasis.

35 Si se desea, el procedimiento puede comprender además una etapa de amplificación universal inicial. Por ejemplo, la muestra puede ponerse en contacto con cebadores degenerados y amplificarse antes de la amplificación específica de uno o más genes BRAF mutantes, solos o en combinación adicional con BRAF tipo salvaje o una secuencia de control interno.

40 El procedimiento emplea un bloqueador de PNA (véase, por ejemplo, Demers, et al, *Nucleic Acids Res.* 23: 3060-3065 (1995)). El bloqueador de PNA inhibe o evita la amplificación de BRAF de tipo salvaje o cualquier gen BRAF mutante es más frecuente en relación con el gen BRAF mutante específico a amplificar.

Si se desea, la muestra de ácido nucleico o el oligonucleótido detectable pueden inmovilizarse sobre un soporte

45 sólido. Ejemplos de formatos de ensayo que utilizan soportes sólidos incluyen formatos de transferencia de puntos y formatos inversos de transferencia de puntos (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.310.893; 5.451.512; 5.468.613; y 5.604.099).

Después de la amplificación, puede ser deseable separar el producto de amplificación de la plantilla y el exceso de

50 cebador para determinar si se ha producido la amplificación específica. La separación puede efectuarse mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poliacrilamida utilizando metodología estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, et al., *Molecular Cloning*, Fritsch y Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Alternativamente, se puede utilizar la cromatografía para efectuar la separación. Los ejemplos de tipo de cromatografía incluyen adsorción, partición, intercambio iónico y tamiz molecular, y ejemplos de tipos de

55 técnicas cromatográficas incluyen cromatografía en columna, papel, capa fina y gases (véase, por ejemplo, Freifelder, *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2ª ed., Wm. Freeman & Co., Nueva York, NY (1982)).

La amplificación se confirmó mediante visualización. Por ejemplo, un gel teñido con bromuro de etidio puede ser

60 visualizado con luz UV. Los productos de amplificación marcados con un radioisótopo pueden ser visualizados mediante la exposición y el desarrollo de una película de rayos x, mientras que los productos de amplificación marcados con una etiqueta fluorométrica se pueden visualizar sometiendo los productos de amplificación a espectros de estimulación. Un procedimiento preferido de la visualización de la amplificación es el uso de un oligonucleótido marcado detectable que se hibrida con los productos amplificados. Una columna manual, tal como

65 una disponible de Qiagen, también se puede utilizar.

Se puede preferir el uso de un sistema de preparación de muestras automatizado, tal como un sistema de preparación de muestras automatizado diseñado para utilizar procesos de micropartículas magnéticas para la purificación de ácidos nucleicos. Un ejemplo de un sistema de preparación de muestras automatizado es *m2000sp*, que está disponible de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL. Alternativamente, las muestras se pueden preparar usando el sistema de preparación de muestras automatizado *m24sp* (Abbott) o se pueden preparar manualmente. La preparación de muestras automatizada se prefiere sobre la preparación manual debido a que es más consistente. Otro ejemplo de un kit de preparación de muestras es el kit de tejido QIAamp DNA FFPE, que está disponible de Qiagen.

- 10 Los reactivos del sistema de preparación Abbott *mSample* DNA (4 x 24 preps; Abbott) capturan los ácidos nucleicos y eliminan componentes de la muestra no unidos. La proteinasa K se incluye en la etapa de lisis para digerir las proteínas asociadas con las muestras. Los ácidos nucleicos unidos se eluyen y se transfieren a una placa profunda de 96 pocillos. Los ácidos nucleicos están entonces listos para la amplificación. Una secuencia de ADN no relacionada, que sirve como un control interno (IC) para demostrar que el proceso ha procedido correctamente para cada muestra, se introduce en el procedimiento de preparación de la muestra y se procesa junto con los calibradores, controles y muestras.

La amplificación/detección puede llevarse a cabo como se conoce en la técnica, tal como mediante el uso del instrumento *m2000rt* (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL). El ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN, ARN o ambos) se amplifica por la ADN polimerasa transcriptasa inversa en presencia de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) y un agente de activación, por ejemplo, magnesio o manganeso. El reactivo de amplificación contiene conjuntos específicos de cebadores de amplificación para el mutante específico (BRAF mutante) y, preferiblemente, un IC. Durante la amplificación por PCR, se usa alta temperatura para separar las hebras del ADN de doble cadena. Cuando la reacción se enfría a una temperatura a la que se puede producir la hibridación de ADN, los cebadores de oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla específicos de analito se unen al ADN analito. Los cebadores se extienden por la ADN polimerasa, haciendo así una copia exacta de un tramo corto diana del ADN analito. La ADN polimerasa puede ser, pero no necesita ser, una enzima termófila que ha sido modificada en su sitio activo por una molécula que lo hace inactivo. Cuando la enzima se calienta antes de la iniciación de la PCR, la molécula inhibidora se escinde de la enzima, permitiendo de ese modo que recupere su actividad. De esta manera, la enzima sólo se activa a temperaturas donde se producen interacciones específicas de ADN-ADN. Esto reduce considerablemente los artefactos de la PCR no específicos, tales como dímeros de cebadores. Durante cada ronda de ciclado térmico, los productos de amplificación se disocian a cadenas simples a alta temperatura, lo que permite la hibridación y extensión del cebador a medida que baja la temperatura. La amplificación exponencial de la diana se logra a través de ciclados repetidos entre altas y bajas temperaturas. La amplificación del mutante específico (BRAF mutante) y, si está presente, las dianas de IC tiene lugar simultáneamente en la misma reacción.

El procedimiento se puede utilizar para, por ejemplo, determinar el estado de mutación BRAF para el propósito de evaluar las opciones de tratamiento con inhibidores de BRAF, anticuerpos monoclonales anti-EGFR, inhibidores de MEK, y similares. Por ejemplo, se ha descrito que se ha demostrado que Zelboraf™ (vemurafenib; Roche) mejora la supervivencia en personas con melanoma metastásico con mutación positiva V600E de BRAF.

El procedimiento también se puede utilizar para predecir el resultado para un paciente diagnosticado con cáncer, tal como melanoma, para evaluar el riesgo de metástasis, tal como en pacientes con etapas tempranas de la enfermedad (estadio I/II), tal como melanoma, y para controlar los pacientes con cáncer avanzado, metastásico, tal como melanoma metastásico (etapa III/IV). Dado que la diseminación metastásica de cáncer a menudo se produce de forma hematogena, el procedimiento también se puede utilizar para analizar la sangre periférica para evaluar la recurrencia. Otros tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, tiroides (por ejemplo, carcinomas papilares de tiroides (PTC), ovario, colorrectal, de estómago, de páncreas, adenocarcinoma de Barrett, mesotelioma pleural, linfoma no Hodgkin, leucemia aguda, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, próstata, mama, ovario (por ejemplo, carcinoma seroso de bajo grado), carcinoma hepatocelular, sarcoma, pituitaria, intestino grueso, tracto biliar, ojo, sistema nervioso central, tejido hematopoyético, tejido linfoide, rabdomiosarcoma, sarcoma, glioma, colangiocarcinoma, y el adenocarcinoma de pulmón.

En vista de lo anterior, se proporciona también un procedimiento para detectar al menos una mutación (X) de un codón en un gen en una muestra de ADN en la que (x) es el codón que codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF. El procedimiento comprende:

- (a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ADN, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del cual codifican X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' contiene una base distinta de adenina (A), en la que, si X está presente, el cebador hibrida con X, después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X,
- (b) detectar el producto de amplificación que comprende X, y en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada codón. La reacción de amplificación comprende además (iii) al menos un bloqueador de ácido peptidonucleico (PNA), en la que al menos un bloqueador de PNA bloquea la amplificación desde la diana de tipo salvaje, y uno o más de otros bloqueadores de PNA, en el que el bloqueador bloquea de PNA bloquea un oligonucleótido detectable

y/o un cebador. La detección del producto de amplificación que comprende X puede comprender la detección de un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende X. La reacción de amplificación puede comprender además un cebador de control interno, en cuyo caso la reacción de amplificación también produce un producto de amplificación que comprende el control interno, en cuyo caso la etapa (b) incluye la detección del producto de amplificación que comprende el control interno. La detección del producto de amplificación que comprende el control interno puede comprender detectar un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende el control interno. Cuando el procedimiento comprende detectar dos o más X, el procedimiento puede comprender realizar una reacción de amplificación con la muestra de ADN para cada X juntas o por separado. En este sentido, el procedimiento también puede comprender además determinar qué X está presente en la muestra de ADN.

**Cebadores, oligonucleótidos detectables y procedimiento de diseño de un cebador**

15 La presente descripción también proporciona un conjunto de cebadores para la amplificación de V600X en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano. El conjunto de cebadores comprende cebadores, tales como cebadores directos, cada uno de los cuales es un oligonucleótido, que tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud y comprende una secuencia de nucleótidos que codifica X en su extremo 3'. El conjunto de cebadores que comprende cebadores para la amplificación de V600E comprende un cebador que codifica GAA en su extremo 3' terminal y otro cebador que codifica GAG en su extremo 3' terminal. El conjunto de cebadores para la amplificación de V600K comprende un cebador que codifica AAA en su extremo 3' terminal y otro cebador que codifica AAG en su extremo 3' terminal. El conjunto de cebadores que comprende cebadores para la amplificación de V600D comprende un cebador que codifica GAT en su extremo 3' terminal y otro cebador que codifica GAC en su extremo 3' terminal. El conjunto de cebadores para la amplificación de V600N comprende un cebador que codifica AAT en su extremo 3' terminal y otro cebador que comprende AAC en su extremo 3' terminal. El conjunto de cebadores que comprende cebadores para la amplificación de V600R comprende un cebador que codifica CGT en su extremo 3' terminal, un cebador que codifica CGC en su extremo 3' terminal, un cebador que codifica CGA en su extremo 3' terminal, un cebador que codifica CGG en su extremo 3' terminal, un cebador que codifica AGA en su extremo 3' terminal y un cebador que codifica AGG en su extremo 3' terminal. Con respecto a todos los cebadores anteriormente mencionados, el resto de la secuencia de nucleótidos (es decir, la secuencia de nucleótidos hasta el codón 3' terminal) debe ser tal que se formará preferentemente una doble cadena estable entre el cebador y la secuencia alélica exactamente complementaria que codifica V600X. En otras palabras, los cebadores para la amplificación de V600E amplificarán preferentemente V600E pero no otros, tales como V600, V600K, V600D, V600N, y V600R. Los cebadores para la amplificación de V600K amplificarán preferentemente V600K, pero no V600E, V600D, V600N y V600R. Los cebadores para la amplificación de V600D amplificarán preferentemente V600D, pero no V600E, V600K, V600N, y V600R. Los cebadores para la amplificación de V600N amplificarán preferentemente V600N, pero no V600E, V600K, V600D, y V600R. Preferiblemente, un cebador para la amplificación de V600E en el que E está codificado por GAA no amplificará preferentemente V600E en el que E es codificado por GAG y viceversa, un cebador para la amplificación de V600K en el que K está codificado por AAA no amplificará preferentemente V600K en el que K es codificado por AAG y viceversa, un cebador para la amplificación de V600D en el que D es codificado por GAT no amplificará preferentemente V600D en el que D es codificado por GAC y viceversa, y un cebador para la amplificación de V600N en el que N es codificado por AAT no amplificará preferentemente V600N en el que N es codificado por AAC y viceversa. Del mismo modo, un cebador para la amplificación de V600R en el que R es codificado por CGT no amplificará preferentemente V600R en el que R es codificado por CGC, CGA, CGG, AGA, y AGG, un cebador para la amplificación de V600R en el que R es codificado por CGC no amplificará preferentemente V600R en el que R es codificado por CGT, CGA, CGG, AGA, y AGG, un cebador para la amplificación de V600R en el que R es codificado por CGA no amplificará preferentemente V600R en el que R es codificado por CGT, CGC, CGG, AGA, y AGG, un cebador para la amplificación de V600R en el que R es codificado por CGG no amplificará preferentemente V600R en el que R es codificado por CGT, CGC, CGA, AGA, y AGG, un cebador para la amplificación de V600R en el que R es codificado por AGA no amplificará preferentemente V600R, en el que R es codificado por CGT, CGC, CGA, CGG y AGG, y un cebador para la amplificación de V600R en el que R es codificado por AGG no amplificará preferentemente V600R en el que R es codificado por CGT, CGC, CGA, CGG y AGA. Preferiblemente, el conjunto de cebadores comprende al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAA [SEQ ID NO: 44] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAG [SEQ ID NO: 45] en su extremo 3' terminal,

(b) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAA [SEQ ID NO: 46] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAG [SEQ ID NO: 47] en su extremo 3' terminal,

(c) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAT [SEQ ID NO: 48] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAC [SEQ ID NO: 49] en su extremo 3' terminal,



- (d) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAT [SEQ ID NO: 50] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAC [SEQ ID NO: 51] en su extremo 3' terminal,
- (e) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGT [SEQ ID NO: 52] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGC [SEQ ID NO: 53] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGA [SEQ ID NO: 54] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGG [SEQ ID NO: 55] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGA [SEQ ID NO: 56] en su extremo 3' terminal y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGG [SEQ ID NO: 57] en su extremo 3' terminal,
- (d) y (e),  
 (a) y (b),  
 (a) y (c),  
 (b) y (c),  
 (a), (b), y (c),  
 cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (d),  
 cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (e), y  
 cualquiera de (a), (b) y (c) en combinación adicional con (d) y (e),
- en las que N es un nucleótido que contiene una base distinta de adenina (A), y en las que el oligonucleótido comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos. Por "cualquiera de (a), (b), y (c)" se entiende (a), (b), (c), (a) y (b), (a) y (c), (b) y (c), y (a), (b), y (c). El oligonucleótido puede comprender, además, contiguos con G en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos uno o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos 5' AATAGGTGATTTT 3' [SEQ ID NO: 58] empezando con T en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. El conjunto de cebadores puede comprender, además, un cebador, tal como un cebador inverso, que comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en donde, cuando el cebador comprende 15-27 nucleótidos, comprende 15-27 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10. El oligonucleótido detectable puede comprender de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en el que, cuando el oligonucleótido detectable comprende 15-20 nucleótidos, comprende 15-20 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 11.

Los oligonucleótidos se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado, normalmente síntesis química (por ejemplo, síntesis en fase sólida) empleando reactivos e instrumentos disponibles comercialmente (ver, por ejemplo, Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA), DuPont (Wilmington, DE), y Milligen (Bedford, MA)). Alternativamente, se pueden comprar a través de fuentes comerciales. Los procedimientos de síntesis de oligonucleótidos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, et al, Meth Enzymol 68: 90-99 (1979); Brown, et al, Meth Enzymol 68: 109-151 (1979); Beaucag, et al, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 (1981); y patente de Estados Unidos No. 4.458.066).

- Se utilizan cebadores específicos de múltiples alelos, basados en el codón genético para la identificación de cada aminoácido mutado. Se diseña un cebador para cada codón genético correspondiente que codifica la mutación de interés en el extremo 3' más una mutación pretendida en el cuarto nucleótido desde el extremo 3'. Los cebadores directos específicos de alelo amplifican dianas específicas variantes basado en la amplificación por PCR de selección por una polimerasa de ADN, tal como Taq polimerasa, de acuerdo con los emparejamientos de 3' entre los cebadores y la plantilla. También se utilizar una transcriptasa inversa-ADN polimerasa, tal como rTth, en el contexto de los presentes procedimientos. En este sentido, se puede utilizar una mezcla de ARN polimerasas, ADN polimerasas, o ARN y ADN polimerasas. El cebador inverso y el oligonucleótido detectable se basan en secuencias de consenso compartidas entre las reacciones.
- Por lo tanto, en vista de lo anterior, también se describe un procedimiento para diseñar un cebador para la detección de al menos una mutación (X) de un codón en un gen en una muestra de ácido nucleico. El procedimiento comprende sintetizar un cebador, los últimos tres nucleótidos en el extremo terminal 3' del cual codifica X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo terminal 3' contiene una base distinta de la que está presente en el gen de tipo salvaje, después de lo cual, se diseña un cebador para detección de al menos una mutación (X) en un codón en un gen en una muestra de ácido nucleico. El procedimiento de diseño de cebadores basado en las enseñanzas de la presente memoria descriptiva también incluye diseñar cebadores para la detección de más de un SNP y para la detección de genes con SNP diana que también contienen otros mutantes no diana. Las estrategias para tal diseño de cebadores se proporcionan en la Tabla 1.
- Los ácidos peptidonucleicos (PNA) se utilizan como reactivos de bloqueador de la PCR que se unen a secuencias de ácido nucleico complementarias con mayor especificidad y estabilidad que sus homólogos de ADN (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2010/0009355 para la discusión de bloqueador de PCR basado en PNA). Los PNA se solapan con los cebadores directos y se emparejan perfectamente con las secuencias no específicas a bloquear. Como resultado, los PNA se unen a las dianas no específicas e inhiben la unión de los cebadores a las mismas dianas, suprimiendo de este modo la amplificación no específica (ver Figura 1).

Los cebadores correspondientes a una posición de aminoácido determinada se pueden mezclar para su uso en un ensayo para detectar todas las posibles variantes de una mutación específica en esa posición, por ejemplo, cebadores específicos de alelo que contienen GAG y GAA en su extremo terminal 3', respectivamente, pueden  
 5 detectar todas las variantes posibles para el ácido glutámico en la posición de aminoácido 600, de manera que se detectan todas las mutaciones V600E (véase, las figuras 1 y 2).

La capacidad de llevar a cabo el procedimiento en un formato homogéneo de tubo cerrado minimiza el riesgo de contaminación (véase, por ejemplo, Kreuzer, et al, Ann Hematol 82: 284-289 (2003)). La muestra puede ponerse en  
 10 contacto con un par de cebadores mediante cualquier medio aplicado rutinariamente para poner en contacto una muestra con un par de cebadores de PCR. Por ejemplo, la muestra y los cebadores se pueden poner en contacto en una placa de micropocillos o en un microvial adaptado para la mezcla de pequeños volúmenes.

En vista de lo anterior, se dan a conocer cebadores, tales como cebadores directos, que amplifican todas las  
 15 posibles mutaciones V600E en el exón 15 del gen BRAF humano de una manera específica de mutación, cebadores, tales como cebadores directos, que amplifican todas las posibles mutaciones V600K en el exón 15 del gen BRAF humano de una manera específica de mutación, cebadores, tales como cebadores directos, que amplifican todas las posibles mutaciones de V600D de una manera específica de mutación, cebadores, tales como  
 20 cebadores directos, que amplifican todas las posibles mutaciones de V600R de una manera específica de mutación, los cebadores, tales como cebadores directos, que amplifican todas las posibles mutaciones de V600N de una manera específica de mutación, oligonucleótidos detectables y PNAs para bloquear la amplificación no específica de secuencias de BRAF no diana con el fin de aumentar la especificidad y sensibilidad, y cebadores y oligonucleótidos detectables para detectar secuencias genómicas de BRAF cerca del exón 15 para servir como controles internos (por ejemplo, la adecuación de ADN, la extracción de la muestra, la eficiencia de amplificación y estandarización de  
 25 la cuantificación relativa de mutaciones (por ejemplo, como un porcentaje de alelos de tipo salvaje y mutantes)). También se describen procedimientos de diagnóstico con PCR en tiempo real (rtPCR) que utilizan los cebadores mencionados anteriormente y oligonucleótidos detectables para amplificar y detectar mutaciones V600 en el exón 15 del gen BRAF humano en reacciones separadas o una reacción combinada.

Los cebadores que son al menos aproximadamente un 80% idénticos con los cebadores descritos en este documento también se pueden utilizar. Si se desea, se pueden etiquetar o marcar uno o ambos cebadores (es decir, cebadores directo e inverso). El uso de cebadores marcados da como resultado productos de amplificación  
 30 marcados. Los productos de amplificación marcados fluorescentemente se pueden detectar usando cualquier equipo adecuado diseñado para detectar la fluorescencia, tales como el software ABI 3100 Genetic Analyzer y Genescan  
 35 3.1.2 (Applied Biosystems), por ejemplo.

Aunque los procedimientos descritos en este documento se basan en la detección de ADN genómico, se pueden utilizar ensayos basados en ARN. Sin embargo, tales ensayos se basan en la transcripción inversa y la posterior amplificación de ARNm de la sangre entera. Aunque la sensibilidad de los procedimientos basados en ARNm en  
 40 general es buena, la degradación del ARN y la baja eficiencia de la transcriptasa inversa pueden limitar, incluso limitar severamente, la viabilidad de tales ensayos. Además, debido a que la cantidad de ARNm de interés puede variar ampliamente, por ejemplo, dependiendo del estado metabólico de las células circulantes, los resultados de los ensayos pueden ser difíciles de reproducir.

Si se desea, los cebadores descritos anteriormente se pueden modificar de modo que ya no actúan como cebadores para la síntesis de ADN y se pueden marcar y usar como oligonucleótidos detectables. Los oligonucleótidos detectables se pueden utilizar en diferentes formatos de ensayo para detectar una mutación (X) del codón que  
 45 codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico, tal como ADN. Por ejemplo, los oligonucleótidos detectables se pueden utilizar en un ensayo de 5'-  
 50 nucleasa (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.210.015; 5.487.972; y 5.804.375; y Holland, et al, PNAS USA. 88: 7.276-7280 (1988)).

Aunque los cebadores y oligonucleótidos detectables se han descrito en el presente documento en el contexto de su uso en procedimientos de amplificación basados en ácidos nucleicos, tales como PCR, en particular PCR en tiempo  
 55 real, tales cebadores y oligonucleótidos detectables pueden ser útiles como oligonucleótidos detectables en otros procedimientos basados en ácidos nucleicos, tales como técnicas de hibridación (por ejemplo, técnicas de hibridación basadas en membranas (transferencias Southern y transferencias Northern), técnicas de hibridación de ácidos nucleicos modificados (véase, por ejemplo, Pandian, et al., patente de Estados Unidos No. 5,627,030), y técnicas similares al ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), que se utilizan para detectar secuencias  
 60 de polinucleótidos idénticas, similares y complementarias.

Los oligonucleótidos detectables, que son, oligonucleótidos de ADN lineal de cadena sencilla, se marcan de forma detectable de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, los cebadores pueden ser marcados de manera similar, si se desea. Se puede utilizar cualquier marcador adecuado, tal como un fluoróforo, un  
 65 luminóforo, un quimioluminóforo, un fotoluminóforo, o un radioisótopo. Por ejemplo, un resto fluorescente puede unirse unido covalentemente a un extremo del oligonucleótido detectable y un resto inhibidor puede unirse

covalentemente al otro extremo. Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero no se limitan a, FAM (por ejemplo, 6'-FAM), fluoresceína y sus derivados, rodamina, cumarina y sus derivados, TET, HEX, JOE, TAMA, TAMRA, NTB, ROX, VIC, NED, 4,7-dicloro-fluoresceína, 4,7-dicloro-rodamina, DABCYL, DABSYL, verde malaquita, LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, Lucifer amarillo, Texas RED®, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxi-rodamina, y colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3 y Cy5) y derivados de los mismos. FAM es un marcador preferido. Ejemplos de inhibidores incluyen DABCYL, DABSYL, DABMI, tetrametilrodamina, TAMRA, y colorantes BHQ®. Como se indicó anteriormente, durante cada ronda de amplificación por PCR en tiempo real, los oligonucleótidos detectables marcados de forma detectable hibridan al ADN diana amplificado, si está presente. En ausencia de una secuencia diana, cada uno de los oligonucleótidos detectables adopta una conformación que lleva al inhibidor lo suficientemente cerca del fluoróforo excitado para absorber su energía antes de que pueda ser emitida por fluorescencia. En presencia de una secuencia diana, cada oligonucleótido detectable se une a su secuencia complementaria en la diana y el fluoróforo y el inhibidor se mantienen separados, lo que permite la emisión fluorescente y detección. Preferiblemente, los oligonucleótidos detectables específicos de la diana y los oligonucleótidos detectables específicos de IC están marcados de forma diferente de manera que el ADN diana y el ADN de IC pueden diferenciarse. En este sentido, el oligonucleótido u oligonucleótidos detectables específicos de la diana están preferiblemente marcados con FAM e inactivados con BHQ-1.

### **Kit**

20

[0083] También se describe un kit. El kit comprende:

- (i) un conjunto de cebadores para la detección de V600X en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano, en el que el conjunto de cebadores comprende al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:
- 25 (a) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAA [SEQ ID NO: 44] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAG [SEQ ID NO: 45] en su extremo 3' terminal,
- (b) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAA [SEQ ID NO: 46] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAG [SEQ ID NO: 47] en su extremo 3' terminal,
- 30 (c) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAT [SEQ ID NO: 48] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNGAC [SEQ ID NO: 49] en su extremo 3' terminal,
- (d) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAT [SEQ ID NO: 50] en su extremo 3' terminal y/o un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAAC [SEQ ID NO: 51] en su extremo 3' terminal,
- (e) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGT [SEQ ID NO: 52] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGC [SEQ ID NO: 53] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGA [SEQ ID NO: 54] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNCGG [SEQ ID NO: 55] en su extremo 3' terminal, un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGA [SEQ ID NO: 56] en su extremo 3' terminal y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos GGTCTAGCTACNAGG [SEQ ID NO: 57] en su extremo 3' terminal,
- 40 (d) y (e),  
(a) y (b),  
(a) y (c),  
(b) y (c),  
(a), (b), y (c),
- 50 cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (d),  
cualquiera de (a), (b) y (c), en combinación adicional con (e), y  
cualquiera de (a), (b) y (c) en combinación adicional con (d) y (e),  
en las que N es un nucleótido que contiene una base distinta de adenina (A), y  
en las que el oligonucleótido comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, y
- 55 (ii) instrucciones para un procedimiento de detección de al menos una mutación (X) del codón que codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano, cuyo procedimiento comprende:
- (a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' terminal del cual codifican X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' terminal contiene una base distinta de la adenina (A), en el que, si X está presente, el cebador se hibrida a X, y al menos un bloqueador de ácido peptidonucleico (PNA), en el que al menos un bloqueador de PNA bloquea la amplificación desde la diana de tipo salvaje,
- 60 en el que, si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa (a) comprende además la obtención de ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm antes de realizar la reacción de amplificación,
- 65

después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X, y

(b) detectar el producto de amplificación que comprende X,

en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada codón,

5 en el que, si el procedimiento comprende detectar dos o más X, el procedimiento puede comprender realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico para cada X juntas o por separado, y en el que el procedimiento también puede comprender además determinar qué X está presente en la muestra de ácido nucleico.

10 El oligonucleótido puede comprender, además, contiguos con G en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos uno o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos 5' AATAGGTGATTTT 3' [SEQ ID NO: 58] empezando con T en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos. El kit puede comprender además un cebador, tal como un cebador inverso, que comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en donde, cuando el cebador comprende 15-27 nucleótidos, comprende 15-27 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10.

15 El kit puede comprender además un oligonucleótido detectable que comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, en el que, cuando el oligonucleótido detectable comprende 15-20 nucleótidos, comprende 15-20 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 11. X puede ser al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K, D, R, y N. X puede ser al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en

20 E, K, y D, tal como E, E y K, E y D, K y D, o E, K, y D. En ejemplo de un marcador es FAM. En este sentido, el marcador FAM se utiliza preferiblemente en combinación con el inhibidor BHQ-1.

Un kit puede contener un recipiente o un vial de muestra para el almacenamiento de una muestra de un tejido o un fluido corporal. Los cebadores, tales como un par de cebadores, específicamente un cebador directo y un cebador

25 inverso, pueden estar en una composición en cantidades eficaces para permitir la detección de secuencias mutantes. La detección de secuencias mutantes se realiza usando cualquiera de los procedimientos descritos en este documento o conocidos en la técnica para detectar una molécula de ácido nucleico específica en una muestra. Un kit también puede comprender tampones, bases de nucleótidos, y otras composiciones para ser utilizadas en las reacciones de hibridación y/o amplificación.

30 El kit puede comprender además dNTP. Preferiblemente, los dNTP se suministran en una solución tamponada con un colorante de referencia.

Los cebadores, oligonucleótidos detectables y dNTP se pueden empaquetar en varias

35 configuraciones. Preferiblemente, los cebadores, oligonucleótidos detectables y dNTPs está en un solo recipiente. El recipiente, preferiblemente, también contiene un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

El kit puede comprender además una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una transcriptasa inversa, y una mezcla de dos o más de las anteriores. Se puede utilizar cualquier ADN polimerasa adecuada. Un ejemplo de una

40 ADN polimerasa preferida es AmpliTaq Gold® (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). Del mismo modo, puede utilizarse cualquier ARN polimerasa adecuada. Un ejemplo de una transcriptasa inversa-ADN polimerasa preferida es rTth. La polimerasa puede ser suministrada en una solución tamponada, que contiene opcionalmente, y preferiblemente contiene estabilizadores.

45 El kit puede comprender además un reactivo de activación, tal como cloruro de magnesio, en una solución tamponada. La solución tamponada incluye preferiblemente un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

El kit puede comprender además opcionalmente un IC. El IC es una secuencia de ADN no relacionada que

50 demuestra que el proceso ha procedido correctamente para cada muestra. Cualquier secuencia adecuada se puede utilizar como IC. Los ejemplos de secuencias diana IC incluyen las expuestas en los ejemplos en el presente documento. Los oligonucleótidos detectables específicos de diana y los oligonucleótidos detectables específicos de IC están marcados de forma diferente de manera que el ADN diana y el ADN IC pueden diferenciarse. Un ejemplo de un marcador para el oligonucleótido detectable específico de IC es Cy5. Preferiblemente, el marcador Cy5 se

55 utiliza en combinación con el inhibidor BHQ-2.

Todas las patentes, publicaciones de solicitud de patente, artículos de revistas, libros de texto, y otras publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

60 La invención ilustrativamente descrita en este documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos o limitación o limitaciones, que no se describen específicamente en este documento. Así, por ejemplo, cada caso en el presente documento de cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser reemplazado con cualquiera de los otros dos

65 términos. Del mismo modo, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más

procedimientos y/o etapas del tipo que se describen en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción.

Los términos y expresiones, que se han empleado, se utilizan como términos de descripción y no de limitación. En este sentido, cuando ciertos términos se definen bajo "Definiciones" y se definen, describen o discuten de otra manera en otra parte de la "Descripción detallada", todas estas definiciones, descripciones y discusiones pretenden atribuirse a tales términos.

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente descripción. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada de ninguna manera.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo describe las reacciones para la detección de SNP individuales en V600 en el exón 15 del gen BRAF en el ADN.

Son posibles dos alelos (es decir, codones) para la mutación V600E, V600K y V600D (es decir, GAG y GAA para ácido glutámico (E), AAG y AAA para lisina (K), y GAT y GAC para ácido aspártico (D)). Cada cebador directo fue diseñado para amplificar preferentemente un codón específico. Así, dos cebadores directos se incluyen en cada reacción para garantizar la detección completa de cada mutación de aminoácido.

El cebador inverso de BRAF y, cuando se utiliza, oligonucleótido detectable reconoce secuencias de consenso. Por lo tanto, el cebador inverso y, cuando se utiliza, el oligonucleótido detectable pueden ser los mismos para todas las reacciones.

Los cebadores de control interno y oligonucleótido detectable reconocen una secuencia en el exón 13 del gen BRAF. Fueron los mismos para todas las reacciones.

Los PNA, que son oligonucleótidos muy cortos, no extensibles, se incluyen para bloquear la potencial amplificación no específica. Se unen a sus secuencias diana complementarias de una manera altamente específica de secuencia. Como las secuencias de PNA están en la misma cadena que el cebador directo, compiten con el cebador directo y evitan la amplificación no específica. A pesar de que hay múltiples SNP no específicos para cualquier PCR específico de mutación determinado, sólo los más prevalentes, que pueden generar amplificación no específica, necesitan ser bloqueados por el PNA, tal como de tipo salvaje y V600K en el caso de la detección de V600E, de tipo salvaje y V600E en el caso de la detección de V600K, y de tipo salvaje en el caso de detección V600D.

El procedimiento comprendía formar una mezcla que contenía los oligonucleótidos y otros componentes esenciales para la amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, mezcla de dNTP, tampón, enzima e ión divalente como agente de activación), combinar la mezcla con ácidos nucleicos purificados, y someter la mezcla de reacción a condiciones específicas para amplificar y detectar las secuencias diana. Los procesos se llevaron a cabo en un formato de tubo cerrado por un instrumento capaz de un ciclo térmico concurrente y detección de señales. Se sometió a ensayo ADN genómico extraído de líneas celulares, líneas celulares bloqueadas con formalina y embebidas en parafina (FFPE) y muestras tumorales FFPE clínicas. La especificidad del ensayo se evaluó utilizando ADN genómico extraído de líneas celulares que llevan tipo salvaje o varias mutaciones de BRAF. La sensibilidad fue evaluada utilizando una mezcla de células BRAF de tipo salvaje y células mutantes de BRAF V600E en proporciones definidas.

Tabla 1: Reacción de V600E

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5' -> 3' para ADN y N->C para PNA)	Concentración**
Cebador directo 1 con V600E de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAC <b>CGAG</b> [SEQ ID NO: 8]	0,2 µM
Cebador directo 2 con V600E de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAC <b>CGAA</b> [SEQ ID NO: 9]	0,2 µM
Cebador inverso de BRAF	TAATCAGTGGAAAAATAGCCTCAATTC [SEQ ID NO: 10]	0,2 µM
Oligonucleótido detectable de BRAF	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT * [SEQ ID NO: 11]	0,2 µM
PNA de tipo salvaje de BRAF	AGCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]	1 µM
PNA con V600K de BRAF	GCTACAAAGAAATCTCG [SEQ ID NO: 13]	1 µM
Cebador directo de exón 13 de control interno	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [SEQ ID NO: 14]	0,2 µM
Cebador inverso de exón 13 de control interno	ACAAGACATTTAACGAATGGAACCTACTC [SEQ ID NO: 15]	0,2 µM

## ES 2 751 371 T3

Oligonucleótido detectable de exón 13 de control interno	Quasar-GFAFGAFAGAFAGG-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 16]	0,2 µM
Tampón de oligos de PCR		0,632 X
dNTP		0,4 mM
ROX		0,0147 µM
TaqGold		11 unidades
MgCl <sub>2</sub>		4 mM
*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU		
**Concentración en 50 µl de reacción que consiste en 25 µl de diana y 25 µl de reactivos de la PCR		

Tabla 2: Reacción de V600K

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5'-> 3' para ADN y N->C para PNA)	Concentración**
Cebador directo 1 con V600K de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAAG [SEQ ID NO: 17]	0,2 µM
Cebador directo 2 con V600K de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAAA [SEQ ID NO: 18]	0,2 µM
Cebador inverso de BRAF	TAATCAGTGAAAAATAGCCTCAATTC [SEQ ID NO: 10]	0,2 µM
Oligonucleótido detectable de BRAF	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [SEQ ID NO: 11]	0,2 µM
PNA de tipo salvaje de BRAF	AGCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]	1 µM
PNA con V600E de BRAF	GCTACAGAGAAATCTCG [SEQ ID NO : 19]	1 µM
Cebador directo de exón 13 de control interno	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [SEQ ID NO: 14]	0,2 µM
Cebador inverso de exón 13 de control interno	ACAAGACATTTAACGAATGGAACCTACTC [SEQ ID NO: 15]	0,2 µM
Oligonucleótido detectable de exón 13 de control interno	Quasar-GFAFGAFAGAFAGG-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 16]	0,2 µM
Tampón de oligos de PCR		0,632 X
dNTP		0,4 mM
ROX		0,0147 µM
TaqGold		11 unidades
MgCl <sub>2</sub>		4 mM
*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU		
**Concentración en 50 µl de reacción que consiste en 25 µl de diana y 25 µl de reactivos de la PCR		

5

Tabla 3: Reacción de V600D

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5'-> 3' para ADN y N->C para PNA)	Concentración**
Cebador directo 1 con V600D de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAT [SEQ ID NO: 20]	0,2 µM
Cebador directo 2 con V600D de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAC [SEQ ID NO: 21]	0,2 µM
Cebador inverso de BRAF	TAATCAGTGAAAAATAGCCTCAATTC [SEQ ID NO: 10]	0,2 µM
Oligonucleótido detectable de BRAF	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [SEQ ID NO: 11]	0,2 µM
PNA de tipo salvaje de BRAF	AGCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]	1 µM
Cebador directo de exón 13 de control interno	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [SEQ ID NO: 14]	0,2 µM
Cebador inverso de exón 13 de control interno	ACAAGACATTTAACGAATGGAACCTACTC [SEQ ID NO: 15]	0,2 µM
Oligonucleótido detectable de exón 13 de control interno	Quasar-GFAFGAFAGAFAGG-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 16]	0,2 µM
Tampón de oligos de PCR		0,632 X
dNTP		0,4 mM
ROX		0,0147 µM
TaqGold		11 unidades
MgCl <sub>2</sub>		4 mM
*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU		
**Concentración en reacción de 25 µl de diana y 25 µl de reactivos de la PCR		

El ciclado de PCR incluyó un ciclo a 92 °C durante 10 minutos (activación por TaqGold) y 55 ciclos (el número de ciclos se puede modificar) de 88 °C/5 segundos, 92 °C/15 segundos, 67 °C/5 segundos, y 63 °C/35 segundos

(amplificación de ADN y lecturas de fluorescencia). Alternativamente, el ciclado de PCR puede incluir un ciclo a 92 °C durante 10 minutos (activación por TaqGold) y 55 ciclos de 92 °C durante 15 segundos, y 65 °C durante 35 segundos (amplificación de ADN y lecturas de fluorescencia).

5 Un estudio de linealidad en 10 ng de ADN genómico utilizando el ensayo de V600E y el ensayo de V600K reveló una buena relación lineal. Un estudio de linealidad en 2,5 ng de ADN genómico extraído de muestras de líneas celulares FFPE usando el ensayo V600E también reveló una buena relación lineal.

Otras mutaciones pueden ser detectadas en la misma manera. Se pueden diseñar cebadores específicos de alelo para otras mutaciones de la misma manera que la descrita anteriormente para SNP de V600E/K/D.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe una reacción combinada para la detección de múltiples SNP en V600 en el exón 15 del gen BRAF.

Dos o más de las mutaciones V600E, V600K y V600D de BRAF también se pueden detectar en una reacción combinada.

20

Tabla 4: Reacción combinada de V600E/K/D

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5'-> 3' para ADN y N->C para PNA)	Concentración**
Cebador directo 1 con V600E de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGAG [SEQ ID NO: 8]	0,2 µM
Cebador directo 2 con V600E de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGAA [SEQ ID NO: 9]	0,2 µM
Cebador directo 1 con V600K de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAAG [SEQ ID NO: 17]	0,2 µM
Cebador directo 2 con V600K de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAAA [SEQ ID NO: 18]	0,2 µM
Cebador directo 1 con V600D de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAT [SEQ ID NO: 20]	0,2 µM
Cebador directo 2 con V600D de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAC [SEQ ID NO: 21]	0,2 µM
Cebador inverso de BRAF	TAATCAGTGAAAAATAGCCTCAATTC [SEQ ID NO: 10]	0,2 µM
Oligonucleótido detectable de BRAF	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [SEQ ID NO: 11]	0,2 µM
PNA de tipo salvaje de BRAF	AGCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]	1 µM
Cebador directo de exón 13 de control interno	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [SEQ ID NO: 14]	0,2 µM
Cebador inverso de exón 13 de control interno	ACAAGACATTTAACGAATGGAACCTACTC [SEQ ID NO: 15]	0,2 µM
Oligonucleótido detectable de exón 13 de control interno	Quasar-GFAFGAFAGAFAGG-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 16]	0,2 µM
PNA de tipo salvaje de BRAF	AGCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]	1 µM
Tampón de oligos de PCR		0,632 X
dNTP		0,4 mM
ROX		0,0147 µM
TaqGold		11 unidades
MgCl <sub>2</sub>		4 mM
*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU		
**Concentración en reacción de 25 µl de diana y 25 µl de reactivos de la PCR		

El ciclado de PCR incluyó un ciclo a 92 °C durante 10 minutos (activación por TaqGold) y 55 ciclos (el número de ciclos puede ser modificado sin afectar el rendimiento del ensayo) de 88 °C/5 segundos, 92 °C/15 segundos, 67 °C/5 segundos, y 63 °C/35 segundos (amplificación de ADN y lecturas de fluorescencia). Alternativamente, el ciclado de PCR puede incluir un ciclo a 92 °C durante 10 minutos (activación por TaqGold) y 55 ciclos de 92 °C durante 15 segundos, y 65 °C durante 35 segundos (amplificación de ADN y lecturas de fluorescencia).

Otras mutaciones pueden detectarse en la misma manera. Se pueden diseñar cebadores específicos de alelo para otras mutaciones de la misma manera que la descrita anteriormente para SNP de V600E/K/D. En este sentido, la reacción combinada puede detectar uno o más de V600E, V600K y/o V600D en combinación con una o más otras mutaciones.

30

Ejemplo 3

Este ejemplo describe cebadores directos alternativos y oligonucleótidos detectables para su uso en los procedimientos.

5

Tabla 5: Cebadores alternativos y oligonucleótidos detectables

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5'→ 3' y N→C para PNA)	Mutación detectada a V600 de BRAF
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU2</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAA [SEQ ID NO: 22]	E, K, D, R, N
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU3</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGA [SEQ ID NO: 23]	E, D
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU4</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGGA [SEQ ID NO: 24]	E, D
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f1a</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAG [SEQ ID NO: 25]	E
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f1c</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGGAG [SEQ ID NO: 26]	E
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f2a</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAA [SEQ ID NO: 27]	E
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f2c</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGGAA [SEQ ID NO: 28]	E
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f3b</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCAAG [SEQ ID NO: 29]	K
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f3c</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGAAG [SEQ ID NO: 30]	K
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f4b</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCAA [SEQ ID NO: 31]	K
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>MU-f4c</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGAAA [SEQ ID NO: 32]	K
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU9</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAC [SEQ ID NO: 33]	K, N
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU10</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAT [SEQ ID NO: 34]	K, D, N
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU11</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAC [SEQ ID NO: 35]	K, R, N
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU12</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGAA [SEQ ID NO: 36]	K, N
<b>Cebador directo</b> de BRAF <b>Fpd MU13</b>	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCAA [SEQ ID NO: 37]	K, N
Cebador directo del exón 17 de control interno	GATCTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGTC [SEQ ID NO: 38]	
Cebador inverso del exón 17 de control interno	TAGTCTGTTCTTTTGGATAGCATGAAGCT [SEQ ID NO: 39]	
Oligonucleótido detectable del exón 17 de control interno	Quasar-GALGAGAGAFFAFLFF-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 40]	
Cebador directo del exón 14 de control interno	CTAATAAGTCTTTACACCCCAAGTATGTTT [SEQ ID NO: 41]	
Cebador inverso del exón 14 de control interno	CTGTGGATGATTGACTTGGCGTGTAAG [SEQ ID NO: 42]	
Oligonucleótido detectable del exón 14 de control interno	Quasar-AGALLLFGAGFFAGLFF-BHQ2 - dT* [SEQ ID NO: 43]	

\*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU

Ejemplo 4

10

Este ejemplo describe las reacciones para la detección de SNP individuales en V600 en el exón 15 del gen BRAF en ARNm.

15

Los ácidos nucleicos totales o ARN de tejidos tumorales FFPE humanos se utilizan como plantilla para la transcripción inversa/reacción de amplificación por PCR. Los ácidos nucleicos totales se aíslan y purifican a partir de muestras de FFPE utilizando un kit de purificación, tal como kit de tejido de ADN de FFPE QIAmp (Qiagen) sin tratamiento con ARNasa. El ARN puede aislarse y purificarse a partir de muestras FFPE usando un kit de purificación de ARN, tal como kit RNeasy (Qiagen), a veces junto con tratamiento con ADNasa. Para la detección de



ARN, la transcripción inversa se inicia a partir de un cebador inverso (BRAF-R3) que hibrida con una secuencia en el exón 15 del gen BRAF. Este elemento de secuencia de BRAF es común a todo el exón 15 de BRAF que contiene transcripciones; por lo tanto, el cebador inverso individual puede promover la transcripción inversa de todas las variantes diana de ARN. La amplificación por PCR del ADNc resultante es dirigida por el cebador inverso antes mencionado en combinación con múltiples cebadores directos que hibridan específicamente a las secuencias con V600E, V600K o V600D de BRAF en los sitios de SNP. Los mismos cebadores también se pueden utilizar para amplificar el ADN genómico que contiene las variantes diana.

Además del conjunto de cebadores/oligonucleótido detectable que detecta V600E, V600K o V600D del ácido nucleico total o ARN, se diseña un conjunto de cebadores/oligonucleótido detectable para detectar una secuencia dentro del exón 13 de BRAF como control interno. Los niveles de amplificación del exón 13 de BRAF se utilizan para normalizar el proceso de detección de variantes BRAF frente a las variaciones en la adecuación de la muestra, proceso de extracción de la muestra, nivel de expresión de ARN de BRAF total y eficiencia de amplificación. Para amplificar tanto el ARN como el ADN genómico, el cebador de control interno 2 de BRAF se diseña dentro del exón 13.

La formulación de reacción y las condiciones de ciclado para la detección a partir de ARN y/o ácidos nucleicos totales pueden ser iguales o similares a las de la reacción de V600E, V600K o V600D en el ensayo de SNP de ADN (véase, por ejemplo, Ejemplo 1), con las excepciones de que la condición de ciclado contenga una etapa de transcripción inversa antes del programa de ciclado térmico normal y pueda contener una enzima diferente. La reacción de PCR se establece conteniendo los oligonucleótidos, tal como se muestran en las Tablas 6, 7 y 8.

A veces se desea que sólo el ARN, no el ADN genómico, se detecte para las mutaciones de V600 de BRAF y el control interno. Para lograr esto, además de la preparación de la muestra específica de ARN, el cebador inverso puede diseñarse para estar situado en el exón adyacente, es decir, el exón 16 para las mutaciones V600 y el exón 14 para el control interno, tal como dentro del exón o abarcando una unión exón-exón. Debido a las secuencias largas de intrones entre los exones 15 y 16 y entre los exones 13 y 14, tales diseños de oligo de PCR sólo pueden amplificar ARN (sin intrones), y no ADN genómico (con intrones), para mutaciones V600 de BRAF y el control interno.

Tabla 6: Reacción de V600E

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5'→ 3' para ADN y N→C para PNA)
Cebador directo 1 de V600E de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAC <b>CGAG</b> [SEQ ID NO: 8]
Cebador directo 2 de V600E de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAC <b>CGAA</b> [SEQ ID NO: 9]
Cebador inverso 2 de BRAF	CACAAAATGGATCCAGACA <b>ACTGTT</b> C [SEQ ID NO: 44]
Oligonucleótido detectable de BRAF	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [SEQ ID NO: 11]
PNA de tipo salvaje de BRAF	GCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]
PNA con V600K de BRAF	GCTACAAAGAAATCTCG [SEQ ID NO: 13]
Cebador directo de control interno	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [SEQ ID NO: 14]
Cebador inverso de control interno	TCCATGCCCTGTGCAGTCTGTCTGTG [SEQ ID NO: 45]
Oligonucleótido detectable de control interno	Quasar-GFAFGAFAGAFGLGFAFAGG-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 16]

\*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU

Tabla 7: Reacción de V600K

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5'→ 3' para ADN y N→C para PNA)
Cebador directo 1 de V600K de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACT <b>TAAG</b> [SEQ ID NO: 17]
Cebador directo 2 de V600K de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACT <b>TA</b> AA [SEQ ID NO: 18]
Cebador inverso 2 de BRAF	CACAAAATGGATCCAGACA <b>ACTGTT</b> C [SEQ ID NO: 44]
Oligonucleótido detectable de BRAF	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [SEQ ID NO: 11]
PNA de tipo salvaje de BRAF	GCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]
PNA con V600E de BRAF	GCTACAGAGAAATCTCG [SEQ ID NO: 19]
Cebador directo de control interno	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [SEQ ID NO: 14]
Cebador inverso de control interno	TCCATGCCCTGTGCAGTCTGTCTGTG [SEQ ID NO: 45]
Oligonucleótido detectable de control interno	Quasar-GFAFGAFAGAFGLGFAFAGG-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 16]

\*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU

Tabla 8: Reacción de V600D

Oligonucleótido	Secuencia y marcador (5'→ 3' para ADN y N→C para PNA)
Cebador directo 1 de V600D de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAT [SEQ ID NO: 20]
Cebador directo 2 de V600D de BRAF	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAC [SEQ ID NO: 21]

Cebador inverso 2 de BRAF	CACAAAATGGATCCAGACAACACTGTTC [SEQ ID NO: 44]
Oligonucleótido detectable de BRAF	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [SEQ ID NO: 11]
PNA de tipo salvaje de BRAF	GCTACAGTGAAATCTCG [SEQ ID NO: 12]
Cebador directo de control interno	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [SEQ ID NO: 14]
Cebador inverso de control interno	TCCATGCCCTGTGCAGTCTGTCTGTG [SEQ ID NO: 45]
Oligonucleótido detectable de control interno	Quasar-GFAFGAFAGAFGLGFAFAGG-BHQ2-dT* [SEQ ID NO: 16]

\*F = 5-propinil dC, L = 5-propinil dU

Ejemplo 5

Las secuencias utilizadas en este experimento se proporcionan anteriormente y en la Figura 1. La Figura 8 muestra los datos de experimentos en donde se produjeron cebadores (los cebadores de la Figura 1) para distinguir entre BRAF de tipo salvaje, BRAF con la mutación V600E y BRAF con la mutación V600K. En la primera fila (las filas van de izquierda a derecha; columnas van de arriba a abajo) se indica la designación del tipo salvaje o mutante para la secuencia diana. Por debajo de la designación de la secuencia diana está la secuencia de nucleótidos para el extremo 3' de la secuencia diana. La secuencia está subrayada y los nucleótidos mutantes están en rojo. Por debajo de la secuencia está el aminoácido codificada por la secuencia dada.

Por ejemplo, en el primer bloque de la primera fila, la secuencia diana se denomina "WT1799a", la secuencia de nucleótidos es "GTG" y la secuencia codifica valina "Val (V)".

La primera columna de la figura proporciona 1) Nombre del cebador y la secuencia codificada por el extremo 3' del cebador, 2) el número de desapareamientos en comparación con la secuencia diana, 3) la posición de los desapareamientos desde el extremo 3' de la secuencia en cuestión y, 4) el resultado de la PCR proporcionado en dCt (delta Concentración de diana).

Por lo tanto, la caja situada en la columna 2, fila 2, se puede interpretar como una indicación de que el cebador (MUf1b) para BRAF-T1799A, tiene dos desapareamientos, los desapareamientos se encuentran en el segundo en adelante nucleótidos y el resultado de dCt fue de 9,35 cuando se comparó con el resultado para el uso del mismo cebador para su diana prevista, T1799A. El valor de dCt para el uso de un cebador para su diana prevista se bloquea arbitrariamente a cero, por lo tanto todos los resultados son en relación a este valor.

Cuando las cajas en la fila 2, las columnas 2 y 3, se comparan, se puede ver que cuando un segundo desapareamiento se incorpora en el cebador, el cebador no detecta la diana de tipo salvaje tan eficientemente como lo hace la diana prevista, el BRAF mutante, en el que sólo hay un nucleótido desapareado.

El código genético es redundante permitiendo un aminoácido a codificar por más de un trímero de nucleótidos. En este sentido, los cambios en un aminoácido específico pueden ser codificados por dos o más mutaciones de nucleótidos diferentes. La Figura 6 muestra que los cebadores diseñados para detectar mutaciones de nucleótidos que dan como resultado el mismo cambio de aminoácido (por ejemplo, V600E) no detectan estas mutaciones tan eficientemente si los cebadores tienen más de una mutación con respecto a la secuencia diana específica en comparación con cebadores que tienen un único desapareamiento de nucleótidos. Por lo tanto, estos datos muestran que el concepto de la invención descrito en la memoria con respecto a la mejora de la detección de SNP no se limita a ninguna secuencia particular o diana pretendida, sino, más bien, es un concepto que es ampliamente aplicable a la detección mejorada de SNP.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para detectar al menos una mutación (X) de un codón que codifica valina en la posición de aminoácido 600 (V600X) en el exón 15 del gen BRAF en una muestra de ácido nucleico de un ser humano, cuyo  
5 procedimiento comprende:  
(a) realizar una reacción de amplificación con la muestra de ácido nucleico, en el que la reacción de amplificación comprende un cebador, en el que los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' terminal del cebador codifica X y en el que el cuarto nucleótido desde el extremo 3' terminal contiene una base desapareada, en el que, si X está presente, el cebador se hibrida a X, y en el que la reacción de amplificación comprende además (i) al menos un bloqueador de  
10 ácido peptidonucleico (PNA), en el que al menos un bloqueador de PNA bloquea la amplificación desde la diana de tipo salvaje, y (ii) uno o más de otros bloqueadores de PNA, en el que uno o más de otros bloqueadores de PNA impiden la amplificación de un cebador a partir de una diana no deseada mediante la unión de la diana no deseada, en el que, si la muestra de ácido nucleico es ARNm, la etapa (a) comprende además obtener ADNc transcrito de forma inversa a partir del ARNm o transcribir de forma inversa ADNc a partir del ARNm antes de realizar la reacción  
15 de amplificación,  
después de lo cual, si X está presente, la reacción de amplificación produce un producto de amplificación que comprende X, y  
(b) detectar el producto de amplificación que comprende X,  
en el que, si X es codificado por más de un codón, la reacción de amplificación comprende un cebador para cada  
20 codón,  
después de lo cual, se detecta la mutación en el codón del gen en la muestra de ácido nucleico de un ser humano.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la detección del producto de amplificación que comprende X comprende detectar un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido  
25 detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que comprende X.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la reacción de amplificación comprende, además, un cebador de control interno, en el que la reacción de amplificación también produce un producto de amplificación que comprende el control interno, y en el que la etapa (b) de la reivindicación 1 incluye detectar el  
30 producto de amplificación que comprende el control interno.
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la detección del producto de amplificación que comprende el control interno comprende detectar un cebador marcado o poner en contacto el producto de amplificación con un oligonucleótido detectable y detectar la hibridación del oligonucleótido detectable al producto de amplificación que  
35 comprende el control interno.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuando el procedimiento comprende detectar dos o más X, el procedimiento comprende realizar una reacción de amplificación con la muestra de ADN para cada X juntas o por separado.  
40
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además determinar qué X está presente en la muestra de ADN.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que V600X es al menos un aminoácido  
45 seleccionado del grupo que consiste en E, K, D, R y N.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que V600X es al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, K y D.
- 50 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que V600X es E.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que V600X es E y K, E y D, o K y D.
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que V600X es E, K, y D.  
55

# ES 2 751 371 T3

Diana de tipo salvaje ---AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGG----- [SEQ ID NO: 1]

---

Detección de V600E:

Diana con V600E -----AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGATGG----- [SEQ ID NO: 2]

O

-----AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAAAAATCTCGATGG----- [SEQ ID NO: 3]

Cebador directo 1 5' AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGAG 3' [SEQ ID NO: 8]

Cebador inverso 2 3' AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCAA 3' [SEQ ID NO: 9]

PNA de tipo salvaje N- GCTACAGTGAAATCTCG -C [SEQ ID NO: 12]

PNA con V600K N- GCTACAAAGAAATCTCG -C [SEQ ID NO: 13]

---

Detección de V600K:

Diana con V600K -----AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAGAAATCTCGATGG----- [SEQ ID NO: 4]

O

-----AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAAAAATCTCGATGG----- [SEQ ID NO: 5]

Cebador directo 1 5' AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAAG 3' [SEQ ID NO: 17]

Cebador inverso 2 3' AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAAAA 3' [SEQ ID NO: 18]

PNA de tipo salvaje N- GCTACAGTGAAATCTCG -C [SEQ ID NO: 12]

PNA con V600E N- GCTACAGAGAAATCTCG -C [SEQ ID NO: 19]

---

Detección de V600D:

Diana con V600D -----AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGATAAATCTCGATGG----- [SEQ ID NO: 6]

O

-----AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGACAAAATCTCGATGG----- [SEQ ID NO: 7]

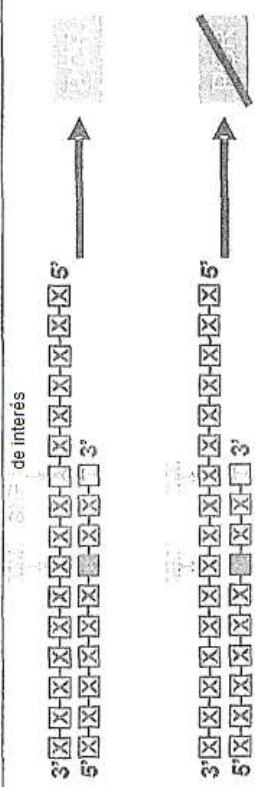
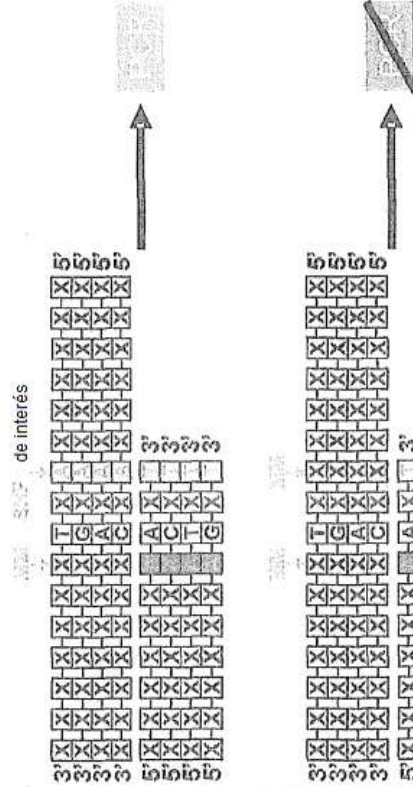
Cebador directo 1 5' AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAT 3' [SEQ ID NO: 20]

Cebador inverso 2 3' AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGAC 3' [SEQ ID NO: 21]

PNA de tipo salvaje N- GCTACAGTGAAATCTCG -C [SEQ ID NO: 12]

**Figura 1**

Figura 2

Estrategias de diseño de cebadores específicos de alelo	
<p><b>Ejemplo</b></p> <p>1. Hay un SNP de interés. No hay otras mutaciones (somáticas o alélicas) adyacentes al SNP de interés.</p>	<p>Diseño de cebadores directo o inverso (tal como se muestra por el oligonucleótido 5'-&gt;3')</p> 
<p>2. Hay un SNP de interés. Hay otras mutaciones adyacentes al SNP de interés. Estas mutaciones adyacentes no deben afectar al resultado del SNP de interés</p>	<p>Se necesita el diseño de múltiples cebadores</p> 

Claves para el gráfico de diseño de cebadores

- Las secuencias de plantillas se muestran de 3'->5'.
  - Las secuencias de cebadores se muestran de 5'->3'
  - "X" designa bases nominales en cada cadena. La base nominal se define como las bases naturales con apariciones nulas o insignificantes de variaciones o mutaciones de alelo
  - La letra en rojo indica bases que son diferentes de la plantilla nominal. El tipo y posición de bases reales pueden variar.
  - La base sombreada en azul indica el desapareamiento intencionado como parte del diseño del cebador. La posición real con respecto al extremo 3' puede variar entre 2 y 6
  - "MM" indica los desapareamientos entre un cebador y una plantilla
  - Las secuencias de plantillas se muestran de 3'->5'.
  - Las secuencias de cebadores se muestran de 5'->3'
  - "X" designa bases nominales en cada cadena. La base nominal se define como las bases naturales con apariciones nulas o insignificantes de variaciones o mutaciones de alelo
  - La letra en rojo indica bases que son diferentes de la plantilla nominal. El tipo y posición de bases reales pueden variar.
  - La base sombreada en azul indica el desapareamiento intencionado como parte del diseño del cebador. La posición real con respecto al extremo 3' puede variar entre 2 y 6
  - "MM" indica los desapareamientos entre un cebador y una plantilla
- NOTA: puede haber un escenario en el que hay SNP "neutros" adyacentes a los SNP de interés. Estos SNP "neutros" pueden tener 4 posibles alelos A, C, T, G y no deben tener impacto en el resultado del ensayo. Este ejemplo tiene el SNP neutro en la segunda base 5' a SNP de interés.
- NOTA: La posición de los SNP "neutros" puede ser en cualquier posición adyacente al SNP de interés 5' o 3' al SNP de interés. La posición mostrada solo representa una posible posición.
- NOTA: Los posibles SNP "neutros" adyacentes al SNP de interés no cubren necesariamente las 4 posibles bases. El número y secuencias de los cebadores diseñados deben corresponder al número e identidades de las mutaciones.

Figura 2 (cont)

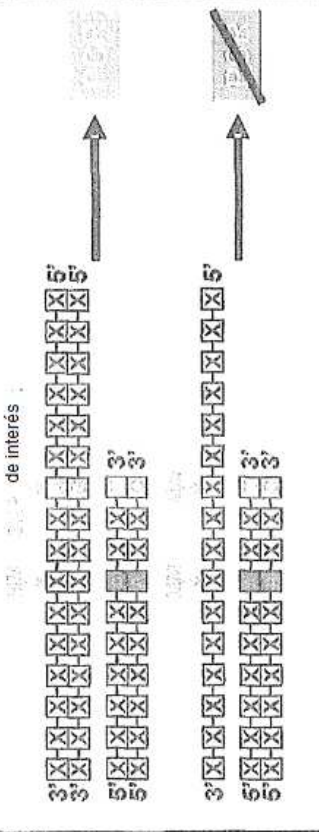
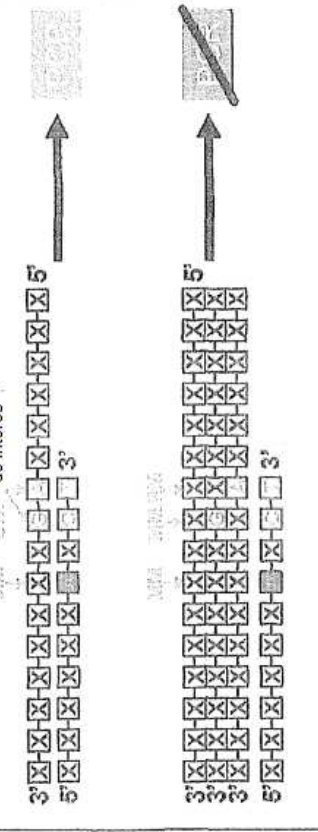
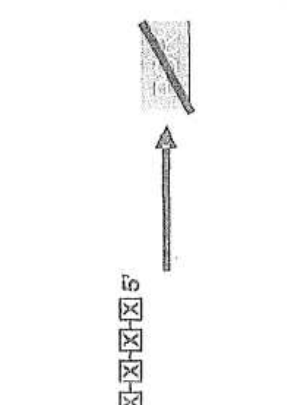
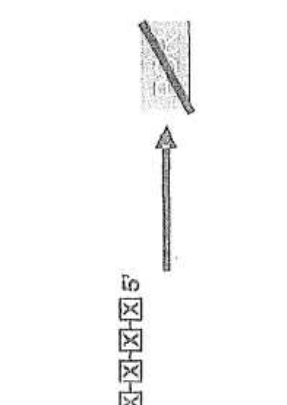
Estrategias de diseño de cebadores específicos de alelo (continuación)		
<p>Escenario</p> <p>3. Existen múltiples SNP de interés en la misma posición. Todos los posibles SNP deben detectarse.</p>	<p>Diseño de cebadores directo o inverso (tal como se muestra por el oligonucleótido 5'-&gt;3')</p> <p>Se necesita el diseño de múltiples cebadores</p> 	<p>Claves para el gráfico de diseño de cebadores</p> <p>Las secuencias de plantillas se muestran de 3'-&gt;5'.</p> <p>Las secuencias de cebadores se muestran de 5'-&gt;3'.</p> <p>"X" designa bases nominales en cada cadena. La base nominal se define como las bases naturales con apariciones nulas o insignificantes de variaciones o mutaciones de alelo</p> <p>La letra en rojo indica bases que son diferentes de la plantilla nominal. El tipo y posición de bases reales pueden variar.</p> <p>La base sombreada en azul indica el desapareamiento intencionado como parte del diseño del cebador. La posición real con respecto al extremo 3' puede variar entre 2 y 6</p> <p>"MM" indica los desapareamientos entre un cebador y una plantilla</p> <p>NOTA: Se muestran dos posibilidades de SNP en la posición de interés como ejemplo. Las situaciones reales pueden tener 4 posibilidades de SNP</p> <p>NOTA: Puede haber un escenario en el que hay SNP "neutros" adyacentes a los SNP de interés. Estos SNP "neutros" no deben tener impacto en el resultado del ensayo. Una posible solución sería el concepto de diseño en el escenario 2.</p>
<p>4. Existen múltiples SNP de interés en múltiples posiciones, con un SNP por posición. Debe detectarse la presencia simultánea de múltiples SNP en una muestra determinada. El SNP único no debe detectarse.</p>		<p>Las secuencias de plantillas se muestran de 3'-&gt;5'.</p> <p>Las secuencias de cebadores se muestran de 5'-&gt;3'.</p> <p>"X" designa bases nominales en cada cadena. La base nominal se define como las bases naturales con apariciones nulas o insignificantes de variaciones o mutaciones de alelo</p> <p>La letra en rojo indica bases que son diferentes de la plantilla nominal. El tipo y posición de bases reales pueden variar.</p> <p>La base sombreada en azul indica el desapareamiento intencionado como parte del diseño del cebador. La posición real con respecto al extremo 3' puede variar entre 2 y 6</p> <p>"MM" indica los desapareamientos entre un cebador y una plantilla</p> <p>NOTA: El número de SNP de interés es dos en este ejemplo. EL número real de SNP puede variar.</p> <p>NOTA: Se muestran los SNP en la posición de interés como ejemplo. Las posiciones reales pueden variar.</p>

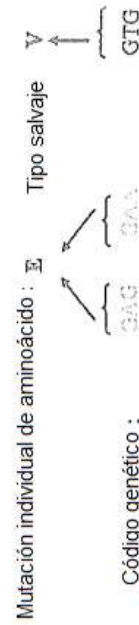
Figura 2 (cont)

Estrategias de diseño de cebadores específicos de alelo (continuación)	Claves para el gráfico de diseño de cebadores
<p>5. Existen múltiples SNP de interés en múltiples posiciones, con un SNP por posición. Deben detectarse los SNP en cualquier posición o ambas.</p>	<p>Las secuencias de plantillas se muestran de 3' -&gt; 5'. Las secuencias de cebadores se muestran de 5' -&gt; 3'. "X" designa bases nominales en cada cadena. La base nominal se define como las bases naturales con apariciones nulas o insignificantes de variaciones o mutaciones de alelo. La letra en rojo indica bases que son diferentes de la plantilla nominal. El tipo y posición de bases reales pueden variar. La base sombreada en azul indica el desapareamiento intencionado como parte del diseño del cebador. La posición real con respecto al extremo 3' puede variar entre 2 y 6 "MMI" indica los desapareamientos entre un cebador y una plantilla NOTA: El número de SNP de interés es dos en este ejemplo. EL número real de SNP puede variar. NOTA: Se muestran los SNP en la posición de interés como ejemplo. Las posiciones reales pueden variar.</p>
<p>Diseño de cebadores <u>directo</u> o <u>inverso</u> (tal como se muestra por el oligonucleótido 5' -&gt; 3')</p> <p>Se necesita el diseño de múltiples cebadores</p> <p>Múltiples SNP de interés:</p> 	

NOTA:

1. La longitud del cebador y plantilla mostrada aquí es un ejemplo y puede variar con el diseño real
2. Cualquier diseño que implique más de un cebador se puede utilizar en un formato "multiplex", o en un formato "single-plex". Para el formato "multiplex" el ensayo se puede diseñar para proporcionar un resultado combinado para la detección o resultado específico de SNP para detección o identificación. Para el formato "single-plex", el ensayo se puede diseñar para proporcionar un resultado combinado para la detección o resultado específico de SNP para detección o identificación. Para el formato "multiplex", si no se utiliza la detección específica de SNP, el ensayo solo puede proporcionar un resultado combinado para la detección (sin identificación).

Figura 3. Ilustración esquemática del principio de diseño específico de aminoácido utilizando V600E de BRAF como un modelo diana



Cebadores : 5'..G GAG 3'  
5'..G GAA 3'

Nota: n puede ser cualquier base distinta de la de la región diana

**Figura 4**

Diseño específico de aminoácido para V600E de BRAF como diana modelo: número y posición de desapareamientos entre cebadores y dianas específicas/no específicas

Reacción	Cebador	Sequencia 3'		V600E		V600K		V600D		V600R					
		-CGAG	-AGTG-	-AGAG-	-AGAA-	-AAG-	-AAA-	-AGAT-	-AGAC-	-AAG-	-ACGT-	-ACGC-			
1	Cebador 1 de V600E	2	(2,4)	1	(4)	2	(3,4)	2	(1,4)	4	(1,2,3,4)	4	(1,2,3,4)	3	(2,3,4)
	Cebador 2 de V600E	3	(1,2,4)	2	(4)	3	(1,3,4)	3	(1,3,4)	3	(2,3,4)	4	(1,2,3,4)	3	(2,3,4)
	Cebador 1 de V600K	3	(2,3,4)	2	(3,4)	3	(1,3,4)	3	(1,3,4)	3	(1,2,4)	4	(1,2,3,4)	4	(2,3,4)
2	Cebador 2 de V600K	4	(1,2,3,4)	3	(1,3,4)	2	(3,4)	3	(1,3,4)	2	(2,4)	4	(1,2,3,4)	3	(2,3,4)
	Cebador 1 de V600R	4	(1,2,3,4)	3	(1,3,4)	2	(3,4)	3	(1,3,4)	3	(2,4)	4	(1,2,3,4)	4	(2,3,4)

NOTA: El número fuera del paréntesis indica el número total de desapareamientos de bases entre un cebador y una diana. Los números dentro de los paréntesis indican las localizaciones de los desapareamientos expresadas como el número de bases desde el extremo 3' terminal. Las células destacadas en gris indican las combinaciones de cebador/diana que generan el producto de amplificación por PCR

**Figura 5**

Estrategia de diseño de cebadores específicos de alelos duales

Escenario	Diseño de cebadores directo o inverso (tal como se muestra por el oligonucleótido 5'->3')	Claves para el gráfico de diseño de cebadores
Existen múltiples SNP de interés en múltiples posiciones, con un SNP por posición. Debe detectarse la presencia simultánea de múltiples SNP en una muestra determinada. El SNP único no debe detectarse.		<p>Las secuencias de plantillas se muestran de 3'-&gt;5'.</p> <p>Las secuencias de cebadores se muestran de 5'-&gt;3'</p> <p>"X" designa bases nominales en cada cadena. La base nominal se define como las bases naturales con apariciones nulas o insignificantes de variaciones o mutaciones de alelo</p> <p>La letra en rojo indica bases que son diferentes de la plantilla nominal. El tipo y posición de bases reales pueden variar.</p> <p>La base sombreada en azul indica el desapareamiento intencionado como parte del diseño del cebador. La posición real con respecto al extremo 3' puede variar entre 2 y 6</p> <p>"MM" indica los desapareamientos entre un cebador y una plantilla</p> <p>NOTA: El número de SNP de interés es dos en este ejemplo. EL número real de SNP puede variar.</p> <p>NOTA: Se muestran los SNP en la posición de interés como ejemplo. Las posiciones reales pueden variar.</p>

NOTA: Las estrategias de diseño de cebadores descritas en la tabla 1 se pueden aplicar al cebador directo o inverso en este diseño de cebadores específicos de alelos duales



**Figura 6**

A Comparación de dos diseños de cebadores diferentes para la detección de V600E de BRAF: secuencias y número de desapareamientos

Diana de tipo salvaje **AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGA**AAATCTCGATGG-

Diana de V600 E **AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGA**AAATCTCGATGG-

BRAF FPd MU1 5' **AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAG** 3'

BRAF FPd MU2 5' **AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAG** 3'

Nota: Las secuencias diana están en **negrita** y las secuencias de cebadores están en tipo normal. Las bases desapareadas comparadas con la secuencia de BRAF de tipo salvaje están marcadas en rojo

Cebador	No. de desapareamientos con V600 de tipo salvaje de BRAF	No. de desapareamientos con V600 de BRAF
BRAF FPd MU1	1	0
BRAF FPd MU2	2	1

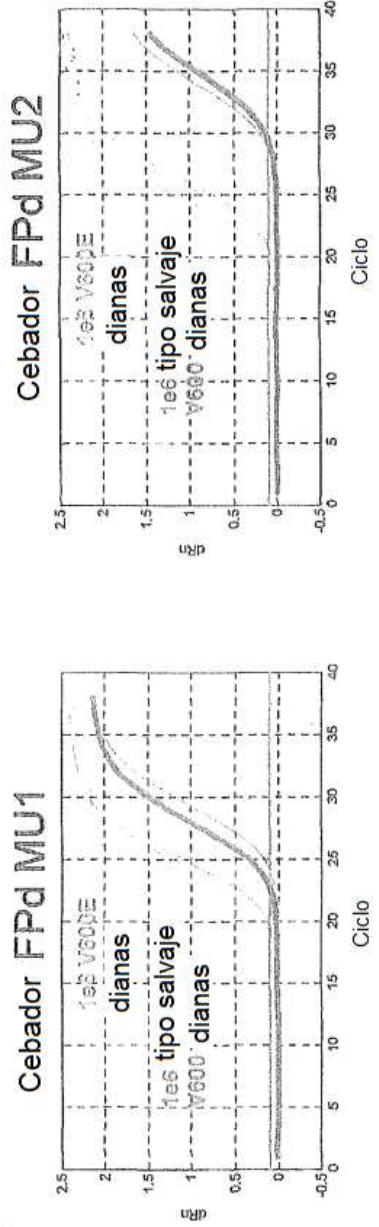
**Figura 7**

A Comparación de dos diseños de cebadores diferentes para la detección de V600E de BRAF: Ct

Cebador	Diana tipo salvaje	Diana V600E	Diferencia Ct*
BRAF FPd MU1	19.31	16.25	3.06
BRAF FPd MU2	26.06	17.05	9.01

\*Diferencia Ct = Ct tipo salvaje - Ct V600E, ambas a 1E6 copias/reacción

B Comparación de dos diseños de cebadores diferentes para la detección de V600E de BRAF: curva PCR



		dCT @62c							
		WT1799a GTG Val (V)	T1799Aa GAG Glu(E)	V600Ea GAA Glu(E)	V600Ka1 AAG Lys(K)	V600Ka2 AAA Lys(K)	V600Ra AGG Arg (R)	WM115 GAT Asp (D)	V600Na AAC Asn (N)
MUF1b... ACC <u>GAG</u>	no. de desapareamientos posición (desde 3')	2	3	2	2	3	3	2	3
	BCI	4.5	4	4.1	4.8	4.5,1	4.5,2	4.1	4.5,1
MUF2b... ACC <u>GAA</u>	no. de desapareamientos posición (desde 3')	3	2	1	3	2	4	2	3
	BCI	11.76	7.61	0	7.20	6.5	10.1	18.73	7.62
MUF3c... ACG <u>AAG</u>	no. de desapareamientos posición (desde 3')	3	2	3	1	2	2	3	2
	BCI	4.5,2	4.3	4.3,1	4	4.1	4.2	4.3,1	4.1
MUF4a... ACT <u>AAA</u>	no. de desapareamientos posición (desde 3')	4	3	2	2	1	3	3	2
	BCI	4.5,2,1	4.3,1	4.5	4.1	4	4.2,1	4.3,1	4.1
	BCI	13.13	13.21	8.55	1.7	0	9.47	19.00	7.09

E

K

Figura 8