

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 925**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2015 PCT/EP2015/065986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16008853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2015 E 15734713 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3169797**

54 Título: **Medios y procedimientos para identificar a un paciente que tiene un cáncer positivo para BRAF como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y como un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK**

30 Prioridad:

**14.07.2014 EP 14176944**

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

**02.04.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH PROREKTORAT MNW  
(100.0%)  
Rämistrasse 71  
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**LEVESQUE, MITCHELL PAUL;  
DUMMER, REINHARD;  
WIDMER, DANIEL y  
RAAIJMAKERS, MARIEKE INEKE GEERTJE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 751 925 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Medios y procedimientos para identificar a un paciente que tiene un cáncer positivo para BRAF como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y como un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico, en particular, diagnóstico del cáncer. Más específicamente, se refiere a un procedimiento para identificar si un sujeto que padece un cáncer positivo para BRAF es o no un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF, y/o es un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK, un procedimiento para diagnosticar cáncer, un procedimiento para evaluar la reactividad al tratamiento dirigido en un sujeto y un procedimiento para evaluar el cáncer en un sujeto. Además, se contempla por la invención un kit y un dispositivo para diagnosticar cáncer. Además, la invención se refiere a un inhibidor de MAPK/ERK para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer positivo para BRAF.

Los tratamientos de melanoma para la enfermedad avanzada han progresado mucho en los últimos años <sup>1-3</sup>, pero la resistencia intrínseca primaria de algunos pacientes al tratamiento dirigido, así como el inicio de resistencia adquirida tardía en la mayoría de los otros pacientes, siguen planteando un desafío importante para la gestión clínica del melanoma metastásico <sup>4</sup>.

Sin embargo, la aparición de tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) permite abordar la cuestión de cómo los tratamientos convencionales influyen en el panorama heterogéneo de las variaciones genéticas dentro de los pacientes e identificar la fuente de resistencia terapéutica. Aparte de dilucidar nuevos mecanismos de progresión del cáncer, las aplicaciones de NGS también proporcionan grandes conjuntos de datos para la cuantificación y el modelado de cambios en la diversidad clonal con el tiempo. En algunos cánceres, se ha demostrado que las métricas de diversidad genética global predicen la progresión neoplásica <sup>5</sup>.

El melanoma metastásico, en particular, tiene una de las mayores tasas de mutación de cualquier cáncer <sup>6</sup>. Algunos estudios han identificado caracteres genómicos tales como la pérdida de heterocigosidad que varía entre tumores primarios y metástasis <sup>7</sup>, y otros han demostrado que esta heterogeneidad genética también está presente en tumores individuales <sup>8</sup>.

En el contexto de resistencia terapéutica, recientemente se han demostrado muchos mecanismos genéticos y transcripcionales de respuesta al tratamiento dirigido en grandes cohortes de pacientes, pero la evolución de los genomas de cáncer individuales con el tratamiento sistémico sigue siendo poco conocida <sup>9,10</sup>. Se ha demostrado que los subclones menores presentan una disminución en la sensibilidad al tratamiento <sup>7</sup>, y estudios más recientes han revelado que los pacientes que reciben inhibidores de BRAF dirigidos tienen diversos mecanismos de resistencia que surgen de esta heterogeneidad molecular intratumoral subyacente <sup>11</sup>.

En general, se pueden distinguir dos mecanismos de resistencia al tratamiento diferentes: intrínseco (primario) y adquirido (secundario). Los tumores intrínsecamente resistentes no responden inicialmente o bien incluyen un subclón resistente, que se selecciona rápidamente durante el tratamiento, dando como resultado no poder reducir la carga tumoral y una rápida recidiva. Los mecanismos de resistencia adquirida surgen durante el tratamiento y pueden incluir la selección o aparición de mutaciones activadoras adicionales en genes de la ruta MAPK <sup>10,24,25</sup> o mutaciones inactivadoras en inhibidores de MAPK <sup>26</sup>. Además, se ha informado de que el empalme alternativo del transcrito de BRAF y otros mecanismos no genéticos desempeñan un papel en la resistencia terapéutica <sup>27</sup>. A pesar de la gran cantidad de estudios que tratan este problema, la lista de mecanismos de resistencia conocidos está lejos de completarse y, en muchos casos individuales, el mecanismo de resistencia sigue siendo desconocido.

Las mutaciones de BRAF o NRAS activadoras se encuentran con frecuencia en melanomas humanos <sup>10, 45-55</sup>. Típicamente, las células de melanoma analizadas tienen una mutación en BRAF o bien en NRAS, pero no una mutación doble de BRAF y NRAS. Como ejemplos, se podrían mencionar aquí las líneas celulares YUSAC (mutante de BRAF V600E, NRAS wt), YUGEN (mutante de BRAF V600E, NRAS wt) y YUDOSO (mutante de NRAS Q61K, BRAF wt) divulgadas en <sup>46</sup>. Aunque las mutaciones activadoras de NRAS y BRAF pueden coexistir en el mismo melanoma, se cree que son mutuamente excluyentes a nivel unicelular <sup>45</sup>. Además, la presencia de una mutación de NRAS, por ejemplo NRASQ61R, o de una mutación de BRAF, por ejemplo, BRAFV600E, se asocia con distintas propiedades de crecimiento *in vitro* e *in vivo* y puede afectar directamente a la gestión clínica del melanoma mutante <sup>45</sup>.

En vista de los mecanismos de resistencia tumoral mencionados anteriormente, sería altamente deseable caracterizar los cánceres para intervenciones terapéuticas adecuadas y, en particular, con respecto a su capacidad para responder al tratamiento con inhibidor de BRAF.

El problema técnico subyacente a la presente invención se puede ver como la provisión de medios y procedimientos para cumplir con las necesidades mencionadas anteriormente. El problema técnico se resuelve por los modos de realización caracterizados en las reivindicaciones y en el presente documento a continuación.

La presente invención, por tanto, se refiere a un procedimiento para identificar si un sujeto que padece un cáncer positivo para BRAF, en el que dicho cáncer positivo para BRAF está compuesto de una población celular derivada de un clon de célula individual, es o no un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF, y/o es un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK que comprende las etapas de:

- (a) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos el gen NRAS en una muestra del sujeto;
- (b) identificar al sujeto como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK si se ha determinado la al menos una mutación en el gen NRAS.

El procedimiento de la presente invención, preferentemente, es un procedimiento *ex vivo*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita anteriormente. Por ejemplo, otras etapas se pueden referir a pretratamientos de muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el procedimiento. El procedimiento se puede llevar a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, la etapa (a) y/o (b) puede estar asistida totalmente o en parte por automatización, por ejemplo, por un equipo robótico y sensitivo adecuado para la determinación en la etapa (a) y/o un algoritmo de cálculo implementado por ordenador en un dispositivo de procesamiento de datos para la identificación en la etapa (b).

El término "identificar" como se usa en el presente documento quiere decir evaluar si el sujeto es o no un paciente que no responde al tratamiento, o si es o no un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF. En consecuencia, identificar puede tener como objetivo admitir a un sujeto en los grupos de pacientes que no responden al tratamiento o descartarlo de dicho grupo. Asimismo, identificar puede tener como objetivo admitir a un sujeto en el grupo de pacientes que responden al tratamiento, descartarlo de dicho grupo. Además, identificar también engloba evaluar que el sujeto sea un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK. Como se entenderá por los expertos en la técnica, una evaluación de este tipo, normalmente, no pretende ser correcta para un 100 % de los sujetos que se van a investigar. Sin embargo, el término requiere que la evaluación sea correcta para una determinada parte de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohorte). Se puede determinar sin más si una parte es estadísticamente significativa por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a animales, típicamente mamíferos, y más típicamente, seres humanos. El sujeto de acuerdo con la presente invención padecerá un cáncer positivo para BRAF.

Un "cáncer positivo para BRAF", como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer que comprende células cancerosas, típicamente, derivadas de un clon de célula individual, que tiene un deterioro de la actividad de BRAF.

Típicamente, la actividad de BRAF se incrementa dando como resultado una activación de, entre otros, la ruta MAPK en dichas células. Más típicamente, la activación de BRAF se provoca por al menos una mutación en el gen BRAF dando como resultado, por ejemplo, una proteína BRAF activa constitutiva o una proteína BRAF que ya no se puede controlar dentro de una célula. Las mutaciones de BRAF particulares que dan como resultado una proteína BRAF activada se especifican en otra parte en el presente documento. En un aspecto, el sujeto puede o no haber recibido un tratamiento con inhibidor de BRAF. Los cánceres positivos para BRAF típicos de acuerdo con la presente invención son cáncer de melanoma, cáncer de linfoma no hodgkiniano, cáncer colorrectal, cáncer de carcinoma papilar tiroideo, cáncer de carcinoma de pulmón no microcítico, tricocoleucemia o adenocarcinoma del pulmón. Más típicamente, es cáncer de melanoma.

El término "inhibidor de BRAF" se refiere a una molécula que puede interferir con la actividad de BRAF. Un inhibidor de BRAF puede ser un anticuerpo anti-BRAF que se une específicamente a la proteína BRAF e inhibe su actividad. Además, un inhibidor de BRAF puede ser un ácido nucleico inhibidor. Los ácidos nucleicos inhibidores pueden ser aptámeros que se unen específicamente a la proteína BRAF e inhiben su actividad. Otros ácidos nucleicos inhibidores se pueden unir a los transcritos de BRAF e inhibir la traducción de los mismos o degradarlos. Típicamente, dichos ácidos nucleicos inhibidores pueden ser ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos de morfolino, moléculas de ARN inhibidoras tales como ARNip o microARN o ribozimas.

Las moléculas de ácido nucleico antisentido son, típicamente, ARN y comprenden una secuencia de ácido nucleico que es esencial o perfectamente complementaria al transcrito diana. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico antisentido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos 100 nucleótidos contiguos, más preferentemente, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500 nucleótidos contiguos del transcrito diana. Cómo generar y usar las moléculas de ácido nucleico antisentido es bien conocido en

la técnica (véase, por ejemplo, Weiss, B. (ed.): *Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997). Los oligonucleótidos de morfolino son moléculas de ácido nucleico sintéticas que tienen una longitud de 20 a 30 nucleótidos y, típicamente, 25 nucleótidos.

5 Los morfolidos se unen a secuencias complementarias de transcritos diana por emparejamiento de bases de ácido nucleico estándar. Tienen bases de ácido nucleico estándar que se unen a anillos de morfolina en lugar de anillos de desoxirribosa y se enlazan a través de grupos fosforodiamidato en lugar de fosfatos (véase, por ejemplo, Summerton 1997, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 7\* (3): 187-95). Debido al reemplazo de fosfatos aniónicos con los grupos de fosforodiamidato no cargados, se elimina la ionización en el intervalo de pH fisiológico habitual, por lo que los morfolidos en los organismos o células son moléculas no cargadas. Toda la cadena principal de un morfolino está hecha de estas subunidades modificadas. A diferencia de las moléculas de ARN pequeñas inhibitorias, los morfolidos no degradan sus moléculas de ARN diana. Más bien, bloquean estéricamente la unión a una secuencia diana dentro de un ARN y simplemente se interponen en el camino de moléculas que de otro modo podrían interactuar con el ARN (véase, por ejemplo, Summerton 1999, *Biochimica et Biophysica Acta* 1489 (1): 141-58).

15 Los ARN interferentes pequeños (ARNip) son complementarios a los ARN diana que codifican un gen de interés y disminuyen o eliminan la expresión génica por interferencia de ARN (ARNi). De forma similar, los microARN comprenden secuencias dirigidas de ARN complementarias y también actúan por medio de mecanismos de ARNi. Sin comprometerse con ninguna teoría, el ARNi se usa en general para silenciar la expresión de un gen de interés dirigiendo ARNm. En resumen, el proceso de ARNi en la célula se inicia por ARN bicatenarios (ARNds) que se escinden por una ribonucleasa, produciendo así dúplex de ARNip. El ARNip se une a otro complejo enzimático intracelular que se activa de este modo para dirigir cualquier molécula de ARNm que sea homóloga (o complementaria) a la secuencia de ARNip. La función del complejo es dirigir la molécula de ARNm homóloga a través de interacciones de emparejamiento de bases entre una de las hebras de ARNip y el ARNm diana. A continuación, el ARNm se escinde aproximadamente 12 nucleótidos del extremo 3' del ARNip y se degrada. De esta manera, se pueden dirigir y degradar ARNm específicos, dando como resultado de este modo una pérdida de la expresión de proteína del ARNm dirigido. Una secuencia de nucleótidos complementaria como se usa en el presente documento se refiere a la región en la hebra de ARN que es complementaria a un transcrito de ARN de una porción del gen diana. ARNds se refiere a ARN que tiene una estructura dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico complementarias y antiparalelas. No todos los nucleótidos de un ARNds presentan necesariamente pares de bases de Watson-Crick completas; las dos hebras de ARN pueden ser sustancialmente complementarias. Las hebras de ARN que forman el ARNds pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos, siendo el número máximo de pares de bases el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNds. Preferentemente, el ARNds no tiene más de 49, más preferentemente menos de 25, y lo más preferentemente entre 19 y 23, nucleótidos de longitud. Los ARNds de esta longitud son en particular eficaces para inhibir la expresión del gen diana usando técnicas de ARNi. Los ARNds se degradan posteriormente por una enzima ribonucleasa en ARN interferentes cortos (ARNip). Las regiones complementarias del ARNip permiten hibridación suficiente del ARNip al ARN diana y por tanto median el ARNi. En células de mamífero, los ARNip tienen aproximadamente 21-25 nucleótidos de longitud. La secuencia de ARNip debe ser de longitud suficiente para unir el ARNip y el ARN diana conjuntamente a través de interacciones de emparejamiento de bases complementarias. El ARNip usado con el sistema de expresión de Tet de la invención puede ser de longitudes variables. La longitud del ARNip es preferentemente mayor que o igual a diez nucleótidos y de longitud suficiente para interactuar de forma estable con el ARN diana; específicamente de 15-30 nucleótidos; más específicamente cualquier número entero entre 15 y 30 nucleótidos, más preferentemente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30. Por longitud suficiente se quiere decir un oligonucleótido mayor que o igual a 15 nucleótidos que es de una longitud suficientemente grande para proporcionar la función prevista en la condición esperada. Por interacción de forma estable se quiere decir interacción del ARN interferente pequeño con el ácido nucleico diana (por ejemplo, formando enlaces de hidrógeno con nucleótidos complementarios en la diana en condiciones fisiológicas). En general, dicha complementariedad es de un 100 % entre el ARNip y la diana de ARN, pero puede ser menor si se desea, preferentemente de un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Por ejemplo, 19 bases de 21 bases pueden estar emparejadas. En algunos casos, cuando se desea la selección entre diversas variantes alélicas, se requiere un 100 % complementario al gen diana para distinguir eficazmente la secuencia diana de la otra secuencia alélica. Al seleccionar entre dianas alélicas, la elección de la longitud también es un factor importante porque es el otro factor implicado en el porcentaje complementario y la capacidad de diferenciar entre diferencias alélicas. Los procedimientos relacionados con el uso de ARNi para silenciar genes en organismos, incluyendo *C. elegans*, *Drosophila*, plantas y mamíferos, son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Fire 1998, *Nature* 391:806-811; Fire 1999, *Trends Genet.* 15, 358-363; Sharp 2001, *Genes Dev.* 15,485-490; Hammond 2001, *Nature Rev. Genet.* 2, 1110-1119; Tuschl 2001, *Chem. Biochem.* 2, 239-245; Hamilton 1999, *Science* 286, 950-952; Hammond 2000, *Nature* 404, 293-296; Zamore 2000, *Cell* 101, 25-33; Bernstein 2001, *Nature* 409, 363-366; Elbashir 2001, *Genes Dev.* 15, 188-200; documento WO 0129058; documento WO 09932619; y Elbashir 2001, *Nature* 411: 494-498).

60 Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas que poseen una estructura terciaria bien definida que permite catalizar la hidrólisis de uno de sus propios enlaces fosfodiéster (ribozimas autoescindibles) o bien la hidrólisis de enlaces en otros ARN, pero también se ha descubierto que catalizan la actividad aminotransferasa del ribosoma. Las ribozimas previstas de acuerdo con la presente invención son, preferentemente, las que hidrolizan específicamente los transcritos diana. En particular, son preferentes las ribozimas de cabeza de martillo de acuerdo con la presente invención. Cómo generar y usar dichas ribozimas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Hean J,

Weinberg MS (2008). "The Hammerhead Ribozyme Revisited: New Biological Insights for the Development of Therapeutic Agents and for Reverse Genomics Applications". En Morris KL. RNA and the Regulation of Gene Expression: A Hidden Layer of Complexity. Norfolk, Inglaterra: Caister Academic Press).

5 Además, los inhibidores de BRAF pueden ser moléculas pequeñas que se unen a BRAF e inhiben su actividad. Dichos inhibidores de molécula pequeña de BRAF se pueden obtener por procedimientos de cribado o enfoques de modelado molecular bien conocidos con el objetivo de identificar compuestos que se unen al sitio activo del dominio cinasa de BRAF. BAY43-9006, también conocido como Sorafenib o Nexavar, es un compuesto de molécula pequeña que inhibe la actividad de BRAF por medio de la unión a la forma inactiva del dominio cinasa y bloquea la activación del mismo. 10 PLX4032, también conocido como Vemurafenib, es un inhibidor de BRAF que se ancla por sí mismo en el bolsillo de unión a ATP del dominio cinasa y, de este modo, bloquea la actividad de la enzima activa. En un aspecto, el inhibidor de BRAF al que se hace referencia en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en: LGX818 (Encorafenib), PLX4032 (Vemurafenib), GSK2118436 (Dabrafenib), GDC-0879 y BAY43-9006 (Sorafenib). Más típicamente, el inhibidor de BRAF es LGX818 (Encorafenib), PLX4032 (Vemurafenib) o GSK2118436 (Dabrafenib).

15 El término "paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF" se refiere a un sujeto que presenta un cáncer positivo para BRAF que tras la administración de un inhibidor de BRAF muestra progresión o una mejoría o cura insignificante o nula del cáncer o después de un período de respuesta al tratamiento desarrolla resistencia adquirida al tratamiento.

20 El término "inhibidor de MAPK/ERK" se refiere a una molécula que puede interferir con la actividad de MAPK y, en particular, actividad de ERK. Un inhibidor de MAPK/ERK puede ser un anticuerpo anti-MAPK/ERK que se une específicamente a las proteínas MAPK/ERK e inhibe su actividad. Además, un inhibidor de MAPK/ERK puede ser un ácido nucleico inhibidor. Los ácidos nucleicos inhibidores pueden ser aptámeros que se unen específicamente a la proteína MAPK/ERK e inhiben su actividad. Otros ácidos nucleicos inhibidores se pueden unir a los transcritos de MAPK/ERK e inhibir la traducción de los mismos o degradarlos. Típicamente, dichos ácidos nucleicos inhibidores pueden ser ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos de morfolino, moléculas de ARN inhibitoras tales como ARNip o microARN o ribozimas. Además, los inhibidores de MAPK/ERK pueden ser moléculas pequeñas que se unen a MAPK/ERK e inhiben su actividad. Dichos inhibidores de molécula pequeña de MAPK/ERK se pueden obtener por procedimientos de cribado o enfoques de modelado molecular bien conocidos con el objetivo de identificar compuestos que se unen al sitio activo del dominio cinasa de MAPK/ERK. En un aspecto, el inhibidor de MAPK/ERK al que se hace referencia en el presente documento es un inhibidor de MEK seleccionado del grupo que consiste en: U0126, GSK1120212 (Trametinib), MEK162 y SCH772984. Más típicamente, el inhibidor de MAPK/ERK es GSK1120212 (Trametinib), MEK162 o SCH772984. Lo más típicamente, el inhibidor de MAPK/ERK es un inhibidor de ERK y, en particular, SCH772984.

35 El término "paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK" se refiere a un sujeto que presenta un cáncer positivo para BRAF que tras la administración de un inhibidor de MAPK/ERK muestra menos progresión, mejoría significativa o cura del cáncer.

40 El término "muestra" se refiere a muestras que comprenden células cancerosas o proteínas y/o ácidos nucleicos de células cancerosas. Típicamente, dichas células cancerosas se derivan de un clon de célula individual. Dichas muestras se pueden derivar de material de biopsia de tejidos tumorales o líquidos corporales así como de tejidos obtenidos de autopsia. Se pueden obtener líquidos corporales por técnicas bien conocidas e incluyen, típicamente, 45 muestras de sangre, líquidos linfáticos, lavado alveolar, bronquial o faríngeo, líquido u orina. Se pueden obtener tejidos por procedimientos de biopsia que también son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los tejidos se obtienen típicamente del tejido que contiene el tumor y comprenden células cancerosas o proteínas y/o ácidos nucleicos del mismo.

50 El término "clon de célula individual" se refiere a una subpoblación y, preferentemente, una subpoblación clonal de células cancerosas que comprende una mutación de BRAF y de NRAS en su genoma. Se pueden obtener clones de células individuales por técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica. Dichas técnicas incluyen típicamente aislamiento de células de tejidos o líquidos corporales, separación de células y crecimiento de nuevos cultivos de cada una de estas células individuales.

55 El término "BRAF", también llamado "homólogo B del oncogén vírico del sarcoma murino v-raf" como se usa en el presente documento se refiere a un gen que codifica la proteína BRAF. La proteína BRAF es miembro de la familia de cinasas Raf y está implicada en la ruta de señalización MAPK/ERK que afecta al crecimiento y la diferenciación celular. La proteína BRAF, también llamada B-Raf, es una serina/treonina cinasa que consiste en 766 aminoácidos de longitud en seres humanos. Contiene los dominios típicos de la familia de cinasas Raf, la región conservada 1 (CR1), un dominio autorregulador de unión a Ras-GTP, la región conservada 2 (CR2), una región bisagra rica en serina, y la región conservada 3 (CR3), un dominio de proteína cinasa catalítico que fosforila una secuencia consenso en sustratos de proteína. En su conformación activa, B-Raf forma dímeros por medio de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas de sus dominios cinasa. BRAF como se hace referencia en el contexto de la presente 60 invención es típicamente BRAF humano. La secuencia de proteína de la proteína BRAF humana se ha depositado en la base de datos de NCBI con el número de acceso NP\_004324.2, las secuencias de ARNm/ADNc se muestran como

NM\_004333.4 (véase también la SEQ ID NO: 13). También es conocido un ortólogo de proteína BRAF de ratón y se ha depositado en la base de datos de NCBI con el número de acceso NP\_647455.3, las secuencias de ARNm/ADNc se muestran como NM\_139294.5. El término también engloba variantes de las proteínas BRAF específicas mencionadas anteriormente. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que las proteínas BRAF específicas. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, por ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichas proteínas BRAF. Un ensayo preferente se describe en los ejemplos adjuntos. Además, se debe entender que una variante como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, delección y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo, preferentemente, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia amino de las proteínas BRAF específicas. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el grado de identidad se va a determinar comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para la alineación óptima. La ventana de comparación, preferentemente, es la longitud completa de la secuencia de consulta o al menos un 50 % de su longitud. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo aminoacídico idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo por el algoritmo de homología local de Smith 1981, Add. APL. Math. 2:482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman 1970, J. Mol. Biol. 48:443, por la búsqueda para el procedimiento de similitud de Pearson 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para su comparación, se emplean preferentemente GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, por tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para peso de hueco y 0,30 para la longitud de peso de hueco. Las variantes a las que se hace referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de las proteínas BRAF específicas o los tipos de variantes mencionados anteriormente siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se hace referencia anteriormente. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de las proteínas BRAF. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación. Además, las proteínas BRAF mencionadas anteriormente pueden estar presentes como monómero y/o en forma dimerizada.

Las mutaciones típicas en el gen BRAF de células cancerosas positivas para BRAF son las que provocan una o más sustituciones aminoacídicas en la proteína BRAF. En un aspecto, dicha al menos una mutación en la proteína BRAF es una mutación que da como resultado una proteína BRAF activada. Aún en un aspecto, la célula cancerosa positiva para BRAF de acuerdo con la presente invención tiene un gen BRAF mutado que codifica una proteína BRAF que tiene una sustitución aminoacídica en una posición correspondiente al aminoácido 600 en la proteína BRAF humana. Se entenderá que la posición de un aminoácido dado puede variar debido a delecciones de aminoácidos o aminoácidos adicionales en otras partes de la proteína que se producen como resultado de acontecimientos mutagenizantes o en parálogos u ortólogos de otras especies. Por tanto, una posición que corresponde, por ejemplo, a la posición 600 en la proteína BRAF humana, es decir, V600, como se hace referencia en el presente documento, también engloba mutaciones en una valina que no está en la posición 600 debido a dichos acontecimientos siempre que dicha valina esté flanqueada por los mismos aminoácidos que V600 en la proteína BRAF humana. Lo mismo se aplica *mutatis mutandis* a todos los otros números de posición a los que se hace referencia de acuerdo con la presente invención como posiciones que corresponden a determinadas posiciones en una proteína específica. El aminoácido 600 se localiza en el exón 15 y se codifica por el par de bases 1799 en el gen BRAF humano. Las siguientes sustituciones aminoacídicas ya se han identificado en dicha posición en cánceres humanos: una sustitución de valina a glutamato (V600E), una sustitución de valina a lisina (V600K), una sustitución de valina a arginina (V600R) o una sustitución de valina a ácido aspártico (V600D). En un aspecto, el gen BRAF en células positivas para BRAF, por lo tanto, comprende una mutación del gen BRAF que da como resultado una sustitución aminoacídica en la posición correspondiente al aminoácido 600 del exón 15 de la proteína BRAF humana. Típicamente, dicha sustitución aminoacídica es una de las sustituciones mencionadas anteriormente. El gen BRAF de acuerdo con la presente invención puede tener al menos una mutación, es decir, puede tener una o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, etc., mutaciones incluyendo una de las sustituciones mencionadas anteriormente.

El término "NRAS", como se usa en el presente documento, se refiere al también llamado "homólogo del oncogén vírico del neuroblastoma RAS", como se usa en el presente documento se refiere a un gen que codifica la proteína NRAS. La proteína NRAS es un miembro de la familia de proteínas Ras y está implicada también en la ruta de señalización MAPK/ERK que afecta al crecimiento y la diferenciación celular. La proteína NRAS es una proteína de unión a GTP/GDP que tiene una actividad GTPasa intrínseca. En la fase unida a GTP, puede interactuar y activar las

cinastas Raf tales como la proteína BRAF. La proteína NRAS consiste en 189 aminoácidos de longitud en seres humanos. NRAS como se hace referencia en el contexto de la presente invención es típicamente NRAS humana. La secuencia de proteína de la proteína NRAS humana se ha depositado en la base de datos de NCBI con el número de acceso NP\_002515.1, las secuencias de ARNm/ADNc se muestran como NM\_002524.4 (véase también la SEQ ID NO: 14). También es conocido un ortólogo de proteína NRAS de ratón y se ha depositado en la base de datos de NCBI con el número de acceso NP\_035067.2, las secuencias de ARNm/ADNc se muestran como NM\_010937.2. El término también engloba variantes de las proteínas NRAS específicas mencionadas anteriormente. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que las NRAS. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, por ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichas proteínas NRAS. Además, se debe entender que una variante como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, delección y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo, preferentemente, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia amino de las proteínas NRAS específicas. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por algoritmos bien conocidos en la técnica y descritos en otra parte en el presente documento. Las variantes a las que se hace referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de las proteínas NRAS específicas o los tipos de variantes mencionados anteriormente siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se hace referencia anteriormente. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de las proteínas NRAS. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales.

De acuerdo con la presente invención, el gen NRAS puede comprender al menos una mutación, es decir, una o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, etc., mutaciones. En un aspecto, dicha al menos una mutación es una mutación que da como resultado la activación de la proteína NRAS. Aún en un aspecto, la mutación del gen NRAS da como resultado una sustitución aminoacídica en una posición correspondiente al aminoácido 61 del exón 2 de la proteína NRAS humana. Típicamente, dicha sustitución aminoacídica es una sustitución de glutamina a lisina (Q61K), una sustitución de glutamina a arginina (Q61R) o una glutamina a leucina (Q61L). El aminoácido 61 se localiza en el exón 2 y se codifica por el par de bases 181 en el gen NRAS humano.

La determinación de la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos el gen NRAS en una muestra del sujeto se puede llevar a cabo por diversas técnicas a nivel de proteína o bien ácido nucleico.

A nivel de proteína, la mutación se puede determinar en base al intercambio de aminoácidos provocado de este modo. Para este fin, se pueden aplicar agentes de detección específicos tales como anticuerpos o aptámeros que se unen específicamente a la forma natural (es decir, no mutada) o mutada de la proteína. Si se aplican agentes de detección específicos de mutación, la unión específica de dichos agentes indica la presencia de la mutación, mientras que la ausencia de unión específica indicará la ausencia de la misma.

En un aspecto, la determinación comprende (i) poner en contacto la muestra con un agente de detección específico durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la unión específica del agente a la proteína NRAS mutada, y (ii) detectar el agente de detección específicamente unido.

Los anticuerpos específicos como se hace referencia en el presente documento, preferentemente, engloban todos los tipos de anticuerpos que, preferentemente, se unen específicamente a NRAS. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimérico o cualquier fragmento o derivado de dichos anticuerpos que todavía se puede unir a NRAS. Dichos fragmentos y derivados comprendidos por el término anticuerpo como se usa en el presente documento engloban un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo sintético, un fragmento Fab, F(ab)<sub>2</sub> Fv o scFv, o un derivado modificado químicamente de cualquiera de estos anticuerpos. La unión específica como se usa en el contexto del anticuerpo de la presente invención quiere decir que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada con otras proteínas o péptidos. La unión específica se puede someter a prueba por diversas técnicas bien conocidas. Se pueden obtener anticuerpos o fragmentos de los mismos, en general, usando procedimientos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales por las técnicas que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón a células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados y, preferentemente, ratones inmunizados (Köhler 1975, Nature 256, 495, y Galfré 1981, Meth. Enzymol. 73,3). Preferentemente, se aplica un péptido inmunógeno que tiene la porción mutada de NRAS a un mamífero. Dicho péptido se conjuga, preferentemente, a una proteína transportadora, tal como seroalbúmina bovina, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana (KLH). Dependiendo de la especie huésped, se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes engloban, preferentemente, adyuvante de Freund, geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas, por ejemplo, lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al dominio extracelular de la plexina de tipo B se pueden preparar posteriormente usando la técnica de hibridoma bien conocida, la técnica de hibridoma de linfocitos B

humanos y la técnica de hibridoma EBV.

Los aptámeros específicos como se usa en el presente documento son, preferentemente, moléculas de ácido oligonucleico o peptídicas que se unen a una molécula diana específica (Ellington 1990, Nature 346 (6287): 818-22). Bock 1992, Nature 355 (6360): 564-6). Los aptámeros de ácido oligonucleico se diseñan a través de rondas repetidas de selección o la llamada evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (tecnología SELEX). Los aptámeros peptídicos están diseñados para interferir con las interacciones de proteínas dentro de las células. Normalmente comprenden un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un andamio de proteínas. Esta restricción estructural doble incrementará la afinidad de unión del aptámero peptídico en el intervalo nanomolar. Dicha longitud de bucle peptídico variable se compone, preferentemente, de diez a veinte aminoácidos, y el andamio puede ser cualquier proteína que tenga propiedades de solubilidad y compacidad mejoradas, tales como tiorredoxina-A. La selección del aptámero peptídico se puede realizar usando diferentes sistemas incluyendo, por ejemplo, el sistema de dos híbridos de levadura (véase, por ejemplo, Hoppe-Seyler 2000, J Mol Med. 78 (8): 426-30).

Los anticuerpos y aptámeros específicos pueden estar unidos a un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos ("por ejemplo, perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de las mismas. Los sustratos adecuados para detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato), disponible como solución madre preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que se puede medir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados BFP, RFP y otras), marcas peptídicas, tales como marca His, marca FLAG, marca Myc y otras, Cy3, Cy5, Texas Red, fluoresceína y los tintes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes están disponibles, por ejemplo, en Molecular Probes (Oregón). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares.

La presencia o ausencia de los marcadores mencionados anteriormente se puede someter a prueba por procedimientos y dispositivos bien conocidos en la técnica incluyendo biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, los procedimientos incluyen procedimientos basados en ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos completamente automatizados o robóticos, por ejemplo, disponibles en el analizador Elecsys™, CBA, que es un ensayo enzimático de unión a cobalto, disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi™, y ensayos de aglutinación de látex, por ejemplo, disponibles en los analizadores Roche-Hitachi™. Los procedimientos de medición adecuados de acuerdo con la presente invención también incluyen precipitación, en particular inmunoprecipitación, electroquimioluminiscencia, RIA (radioinmunoensayo), inmunoensayos enzimáticos de tipo *sandwich*, inmunoensayos de tipo *sandwich* de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado con disociación (DELFI), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada con látex, o inmunoensayos en fase sólida. Otros procedimientos conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) e inmunoelectrotransferencia, se pueden usar solos o en combinación con marcaje u otros procedimientos de detección como se describe anteriormente.

Aún en un aspecto, la proteína NRAS mutada se puede detectar directamente. Para este fin, se pueden medir diferencias en las propiedades físicas o químicas por espectroscopía de masas o técnicas basadas en RMN. De forma alternativa, se pueden medir diferencias en la actividad biológica tales como el incremento en la actividad biológica en un sistema de prueba sin células o basado en células (prueba de actividad).

A nivel de ácido nucleico, se puede determinar la mutación determinando la secuencia de ácido nucleico del gen o sus transcritos que codifican la proteína. Para este fin, se pueden aplicar ácidos nucleicos u oligonucleótidos que se unen específicamente a la forma natural (es decir, no mutada) o bien mutada del gen o su transcrito. Si se aplican ácidos nucleicos u oligonucleótidos específicos de mutación, la unión específica de dichos agentes al gen o su transcrito o un amplicón del mismo indica la presencia de la mutación, mientras que la ausencia de unión específica indicará la ausencia de la misma.

En un aspecto, la determinación comprende (i) poner en contacto la muestra con un ácido nucleico u oligonucleótido específico durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la unión específica del dicho agente al gen NRAS mutado o su transcrito, y (ii) detectar el ácido nucleico u oligonucleótido específicamente unido. Típicamente, las técnicas de hibridación se aplican de acuerdo con este aspecto de la invención. Dichas técnicas de hibridación incluyen hibridación con transferencia de Southern o hibridación con transferencia Northern.

Aún en un aspecto, la determinación comprende (i) poner en contacto la muestra con oligonucleótidos cebadores



específicos que permiten la amplificación del gen NRAS mutado solo durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la amplificación específica de una porción del dicho gen NRAS mutado, y (ii) detectar el producto de amplificación. En un aspecto de este tipo, la presencia de un producto de amplificación es indicativa de la presencia del gen NRAS mutado, mientras que la ausencia de un producto de amplificación indica su ausencia. Típicamente, las técnicas basadas en PCR se aplican de acuerdo con este aspecto de la invención. Dichas técnicas basadas en PCR incluyen PCR, RT-PCR, PCR con cebadores internos, qPCR, PCR de ciclo de luz, PCR ultrarrápida, irt-PCR, PCR con temperatura decreciente ("*touchdown*"), PCR múltiple, PCR digital y otras.

En otro aspecto, la determinación comprende realizar la secuenciación del gen NRAS mutado o sus transcritos, en particular, del/de los par(es) de bases mutado(s). Típicamente, se puede aplicar secuenciación convencional de acuerdo con Sanger o Maxam-Gilbert. De forma alternativa, se pueden aplicar técnicas de secuenciación avanzadas tales como secuenciación aleatoria, PCR puente, secuenciación masiva en paralelo (MPSS), secuenciación *polony*, pirosecuenciación 454, secuenciación Illumina (Solexa), secuenciación SOLiD, secuenciación de semiconductores Ion Torrent, secuenciación de nanoesferas de ADN, secuenciación de moléculas individuales HeliScope, secuenciación ultrarrápida de moléculas individuales (SMRT), secuenciación de ADN de nanoporos, secuenciación de ADN con corrientes de tunelización, secuenciación por hibridación, secuenciación con espectrometría de masas, secuenciación de Sanger microfluídica, técnicas basadas en microscopía y secuenciación de ARNP.

Más típicamente, la presencia de la al menos una mutación en el exón 2 de la subunidad catalítica del ácido nucleico NRAS se determina por una tecnología basada en hibridación y, en particular,

a) poniendo en contacto ácidos nucleicos en la muestra del sujeto con uno o más de los oligonucleótidos específicos de locus seleccionados del grupo que consiste en: GGTGAAACCTGTTTGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10);

b) incubando la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica del oligonucleótido a su secuencia diana dentro de un ácido nucleico NRAS;

c) detectando dicha hibridación; y

d) determinando la al menos una mutación basada en dicha hibridación detectada en la etapa c).

Poner en contacto se realiza de modo que el uno o más oligonucleótidos específicos de locus pueden estar en proximidad física al ácido nucleico que se va a detectar, es decir, el ácido nucleico que codifica la proteína NRAS que tiene la al menos una mutación (el ácido nucleico NRAS).

Las condiciones de hibridación específicas que solo permiten la hibridación del uno o más oligonucleótidos específicos de locus a la secuencia diana de NRAS en el ácido nucleico NRAS si la mutación está presente se pueden determinar por el experto en la técnica sin más. Las condiciones pueden variar dependiendo del/de los oligonucleótido(s) específico(s) de locus aplicado(s). Las condiciones previstas particulares son a las que se hace referencia en los ejemplos adjuntos, a continuación.

La detección de la hibridación específica se puede llevar a cabo por cualquier técnica que permite la detección del híbrido de ácido nucleico del oligonucleótido específico de locus y el ácido nucleico diana. Típicamente, el oligonucleótido específico de locus se puede acoplar a un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados para ácidos nucleicos en el contexto de las técnicas de hibridación son bien conocidos en la técnica y comprenden, por ejemplo, marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, tintes, marcadores enzimáticos, marcadores detectables por anticuerpos o aptámeros, y similares. Los marcadores previstos particulares son a los que se hace referencia en los ejemplos adjuntos, a continuación.

La determinación de la al menos una mutación se lleva a cabo detectando la hibridación específica. La información sobre la especificidad de locus del oligonucleótido indica, además, el tipo de mutación detectada por hibridación, es decir, puesto que el oligonucleótido se ha diseñado para hibridarse con una determinada secuencia diana que comprende, por ejemplo, una determinada mutación, la hibridación detectada también indica la presencia de la dicha determinada mutación en el ácido nucleico diana.

Típicamente, la etapa b) comprende además la etapa de generar un producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico NRAS amplificando el ácido nucleico NRAS en la muestra con uno o ambos de los siguientes cebadores oligonucleotídicos: cebador oligonucleotídico directo que tiene SEQ ID NO:11 y cebador oligonucleotídico inverso que tiene SEQ ID NO:12.

La amplificación se puede llevar a cabo por PCR como se especifica en otra parte en el presente documento en detalle, es decir, se deja que los cebadores inversos y directos se hibriden a la secuencia diana de modo que se pueda producir la síntesis de ADN. Posteriormente, las hebras de ADN recién sintetizadas se disocian y el ciclo se inicia de

nuevo. Típicamente, la PCR de amplificación se lleva a cabo durante de 15 a 45 ciclos, más típicamente durante de 16 a 40 ciclos e incluso más típicamente durante de 16 a 30 ciclos. Las condiciones de PCR adecuadas dependen de los cebadores directos e inversos aplicados y se pueden determinar por los expertos en la técnica sin más. Las condiciones de PCR particulares previstas de acuerdo con la presente invención son las especificadas en los ejemplos adjuntos, a continuación.

Para reforzar además la evaluación realizada por el procedimiento de la presente invención, también se prevé que, además de NRAS, otros biomarcadores de cáncer también. En un aspecto, el procedimiento engloba además determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en el gen BRAF, con lo que la presencia de la dicha al menos una mutación identifica además al sujeto como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK. La al menos una mutación de BRAF que se va a determinar es, típicamente, una de las sustituciones aminoacídicas BRAF a las que se hace referencia anteriormente. Dicha mutación de BRAF se puede determinar a nivel de proteína o ácido nucleico también de manera análoga a la determinación de la al menos una mutación de NRAS especificada en otra parte en el presente documento.

Más típicamente, la presencia de la al menos una mutación en el exón 15 de la subunidad catalítica del ácido nucleico BRAF se determina por una tecnología basada en hibridación y, en particular,

a) poniendo en contacto ácidos nucleicos en la muestra del sujeto con uno o más de los oligonucleótidos específicos de locus seleccionados del grupo que consiste en: CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y ATCCAGACAACTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4);

b) incubando la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica del oligonucleótido a su secuencia diana dentro de un ácido nucleico BRAF;

c) detectando dicha hibridación; y

d) determinando la al menos una mutación basada en dicha hibridación detectada en la etapa c).

Poner en contacto se realiza de modo que el uno o más oligonucleótidos específicos de locus pueden estar en proximidad física al ácido nucleico que se va a detectar, es decir, el ácido nucleico que codifica la proteína BRAF que tiene la al menos una mutación (el ácido nucleico BRAF).

Las condiciones de hibridación específicas que solo permiten la hibridación del uno o más oligonucleótidos específicos de locus a la secuencia diana de BRAF en el ácido nucleico BRAF si la mutación está presente se pueden determinar por el experto en la técnica sin más. Las condiciones pueden variar dependiendo del/de los oligonucleótido(s) específico(s) de locus aplicado(s). Las condiciones previstas particulares son a las que se hace referencia en los ejemplos adjuntos, a continuación.

La detección de la hibridación específica se puede llevar a cabo por cualquier técnica que permite la detección del híbrido de ácido nucleico del oligonucleótido específico de locus y el ácido nucleico diana. Típicamente, el oligonucleótido específico de locus se puede acoplar a un marcador detectable. Los marcadores previstos particulares son a los que se hace referencia en los ejemplos adjuntos, a continuación.

La determinación de la al menos una mutación se lleva a cabo detectando la hibridación específica. La información sobre la especificidad de locus del oligonucleótido indica, además, el tipo de mutación detectada por hibridación, es decir, puesto que el oligonucleótido se ha diseñado para hibridarse con una determinada secuencia diana que comprende, por ejemplo, una determinada mutación, la hibridación detectada también indica la presencia de la dicha determinada mutación en el ácido nucleico diana.

Típicamente, la etapa b) comprende además la etapa de generar un producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico BRAF amplificando el ácido nucleico NRAS en la muestra con uno o ambos de los siguientes cebadores oligonucleotídicos: cebador oligonucleotídico directo que tiene SEQ ID NO:5 y cebador oligonucleotídico inverso que tiene SEQ ID 6.

La amplificación se puede llevar a cabo por PCR como se especifica en otra parte en el presente documento. Las condiciones de PCR particulares previstas de acuerdo con la presente invención son las especificadas en los ejemplos adjuntos, a continuación.

Si la al menos una mutación en el gen NRAS se ha determinado como se expone anteriormente, el sujeto se debe identificar como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK. Normalmente, dicha identificación dará lugar a una recomendación de medidas terapéuticas que se van a aplicar a dicho sujeto. Como se analiza en otra parte en el presente documento,

se ha descubierto que un sujeto que tiene al menos una mutación en la proteína NRAS de acuerdo con la invención será un paciente que no responde al tratamiento con inhibidores de BRAF pero, al mismo tiempo, sí responderá al tratamiento con inhibidores de MAPK/ERK. En consecuencia, se prevé de acuerdo con la presente invención que se puede dar una recomendación de un tratamiento adecuado a un sujeto de este tipo tras una identificación apropiada.

5 Por lo tanto, en un aspecto, el procedimiento de la invención comprende además recomendar al sujeto la administración de un inhibidor de MAPK/ERK, en particular, un inhibidor de MAPK/ERK como se especifica en el presente documento, si el sujeto se ha identificado como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK. Aún en un aspecto, el procedimiento puede comprender además administrar al sujeto dicho inhibidor de MAPK/ERK, en particular, un  
10 inhibidor de MAPK/ERK como se especifica en el presente documento y, todavía en un aspecto, ajustar la dosificación de o abstenerse de la administración de un inhibidor de BRAF, en particular, un inhibidor de BRAF como se especifica en el presente documento.

15 Para caracterizar mejor la evolución de la heterogeneidad intrapaciente bajo diferentes regímenes de tratamiento, en los estudios subyacentes a la presente invención, se realizó una secuenciación del exoma en múltiples muestras de tres pacientes con melanoma en fase IV que recibieron cada uno un tratamiento diferente pero que progresaron rápidamente bajo el tratamiento. Se usó material de biopsia sobrante de diferentes fases (dependiendo de la disponibilidad) incluyendo sangre, nevos displásicos, tumores primarios y metástasis antes del tratamiento, así como metástasis después de la muerte obtenida durante la autopsia. Para caracterizar mejor la heterogeneidad intratumoral,  
20 se secuenciaron múltiples regiones histológicamente distintas del mismo tumor primario cuando fue posible y se prepararon clones unicelulares de cultivos de pasos tempranos para una resecuenciación dirigida. La confluencia de productos en desarrollo de inhibidores de rutas dirigidos cada vez más específicos y la aplicación de tecnologías de secuenciación de próxima generación potentes ha permitido, de forma ventajosa, una caracterización mejorada y un enfoque de tratamiento adaptado a las rutas iniciadoras clave más pertinentes para la progresión de melanoma metastásico <sup>2,22,23</sup>.

25 Específicamente, para caracterizar mejor cómo responden los pacientes con cáncer individuales a los tratamientos estándar, se han identificado tres pacientes con evoluciones temporales de tratamiento similares, pero diferentes mutaciones oncogénicas y regímenes terapéuticos. El primer paciente tenía una mutación BRAFV600E y tuvo una respuesta inicial al tratamiento con inhibidor de BRAF dirigido. El paciente 2 era homocigoto natural tanto para BRAF como para NRAS, y recibió pazopanib, que es un inhibidor de tirosina cinasa multirreceptor. Por último, el paciente 3 tenía una mutación NRASQ61R y se le administró un inhibidor de MEK. Se generaron datos de secuenciación del exoma completo a partir de sacabocados de material FFPE obtenidos de múltiples biopsias y se referenciaron a ADN de línea germinal aislado de la sangre de cada paciente. Este enfoque proporcionó una visión más exhaustiva de la heterogeneidad genómica intrapaciente que los estudios anteriores que investigaron cohortes de pacientes más grandes, pero con menos muestras de cada paciente.

30 Al analizar las variaciones mononucleotídicas (SNV) de alta calidad presentes en los tumores del paciente, se pudo demostrar que los tumores primarios de cada paciente contenían la mayor diversidad genética en comparación con todas sus metástasis. Esto es concordante con la expectativa de que el sitio de origen del cáncer contendría más variantes genéticas que los descendientes que surgieron después y presumiblemente tuvieron menos tiempo para la adquisición de mutaciones *de novo*. De forma interesante, ambos nevos displásicos del paciente 1 tenían una carga mutacional codificante de proteínas menor que cualquiera de las muestras tumorales secuenciadas de los tres pacientes. Aunque el motivo de esto no está claro, la diversidad genética reducida de los nevos puede ser el resultado de menos inestabilidad genómica o posiblemente un período de tiempo más corto para acumular mutaciones, entre otras causas posibles.

35 El análisis filogénico del exoma completo de estos datos se usó además para inferir las relaciones evolutivas entre los tumores dentro de cada paciente y para determinar cómo afectó cada régimen terapéutico a la evolución de la heterogeneidad genética. A diferencia de estudios previos que mostraron una evolución ramificada de los clones posteriores al tratamiento dirigido, se pudo observar que surge y recidiva una evolución monofilética fuerte y bien apoyada de metástasis después del tratamiento con inhibidores tanto de BRAF como de MEK. Por el contrario, el paciente 2, que recibió un inhibidor multicitinasa (es decir, pazopanib), no tuvo una topología monofilética de metástasis tumorales tardías, lo que es indicativo de una deriva genética entre las metástasis tardías.

40 De forma interesante, a pesar de la segregación monofilética de las metástasis tardías en el paciente que recibió el inhibidor de BRAF, no se compartió ningún mecanismo conocido de resistencia entre todas las biopsias secuenciadas. De hecho, se identificó tanto por secuenciación de Sanger como por PCR digital que la mutación activadora NRASQ61K estaba presente en una única metástasis del paciente 1, pero ausente en todas las demás muestras de tumor resistente de ese paciente. Esto es consecuente con los datos publicados previamente que muestran heterogeneidad en los mecanismos de resistencia dentro de pacientes individuales <sup>11</sup>, y agrava los esfuerzos tanto para catalogar las causas como para tratar a los pacientes que han desarrollado resistencia terapéutica. Por tanto, las diferentes metástasis probablemente contienen mecanismos divergentes de resistencia, aunque se observa una selección monofilética de subclones posteriores al tratamiento.

45 Al aislar y secuenciar colonias derivadas de 26 clones de células individuales de este tumor resistente, se pudo

demostrar por primera vez que ambas mutaciones de MAPK activadoras estaban presentes en una célula tumoral individual. Estas células con doble mutación crecieron en condiciones de cultivo normales, eran resistentes al inhibidor de BRAF con el que se había tratado al paciente, pero solo eran parcialmente resistentes a otros dos inhibidores de BRAF. Todavía se pudo observar una reducción en los niveles de pERK en presencia de LGX818 y PLX4032, aunque las células permanecieron resistentes a la inhibición de BRAF. De forma importante, las células con doble mutación permanecieron sensibles a la inhibición combinada de MEK y BRAF, así como a la inhibición de MEK y ERK de monoagente. Esta observación sugiere que el tratamiento simultáneo o de segunda línea con otros inhibidores de la ruta de MAPK y, en particular, los inhibidores de MAPK/ERK, todavía puede ser eficaz para controlar la progresión, a pesar de la presencia de mutaciones que confieren resistencia.

Sin embargo, puesto que el genotipo de doble mutación solo estaba presente en la metástasis tardía n.º 6 de las otras 5 metástasis del paciente 1 y los mecanismos subyacentes que confieren resistencia terapéutica a los otros tumores siguen sin estar claros, la eficacia de estos tratamientos de segunda línea o de combinación para controlar la carga tumoral global es cuestionable. Esto sería especialmente cierto si los otros tumores en el paciente 1 activaran diferentes rutas, tales como PI3K, PTEN y AKT, volviéndolos de este modo insensibles a la inhibición de MAPK. Por PCR digital, se demostró que la frecuencia de células con doble mutación es variable incluso dentro de un tumor resistente individual, lo que sugiere que estas células también pueden contribuir a la resistencia de manera paracrina o pueden tener heterogeneidad intratumoral en los mecanismos de resistencia.

La demostración de evolución monofilética de células cancerosas en pacientes que recibieron inhibición dirigida en los estudios subyacentes a la presente invención sugiere una selección de subclones heterogéneos que podrían sobrevivir mejor a ese entorno terapéutico. Sin embargo, la aparente falta de un mecanismo común de resistencia entre estos tumores indica que la aparición posterior de resistencia se puede haber producido a través de un mecanismo genético compartido no identificable por los enfoques de la presente invención, a través de medios no genéticos o de forma divergente en cada metástasis individual. Todas esas posibilidades plantean importantes desafíos terapéuticos. Pero la sensibilidad restante a la inhibición de MAPK de las células de melanoma de doble mutación sugiere que los tratamientos de combinación y de segunda línea que usan inhibidores de la ruta de MAPK en su lugar o además de, por ejemplo, los inhibidores de BRAF en el contexto de la medicina de precisión, todavía pueden ser eficaces si consideran la heterogeneidad genética espacial y temporal presente en pacientes con melanoma metastásico.

Gracias a la presente invención, ahora es posible caracterizar el cáncer y, en particular, el cáncer con células cancerosas positivas para BRAF para determinar la resistencia a los inhibidores de BRAF y para seleccionar tratamientos más eficaces para los pacientes que son resistentes. Además, la presente invención también proporciona tratamientos más eficaces basados en el uso de inhibidores de MEK/ERK en pacientes que padecen cánceres positivos para BRAF que presentan resistencia a los inhibidores de BRAF. En general, los estudios subyacentes a la presente invención también han proporcionado un procedimiento de diagnóstico para diagnosticar o evaluar el cáncer, en particular, con respecto a células cancerosas de doble mutación que portan al menos una mutación de NRAS y al menos una de BRAF.

Las explicaciones de las definiciones de los términos hechas en el presente documento anteriormente se aplican *mutatis mutandis* para los siguientes modos de realización.

En lo que sigue, se describen modos de realización típicos de la presente invención:

En un modo de realización del procedimiento de la invención, dicho procedimiento comprende además determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en el gen BRAF, con lo que la presencia de la dicha al menos una mutación identifica además al sujeto como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK.

En otro modo de realización del procedimiento de la invención, el cáncer positivo para BRAF es cáncer de melanoma.

En otro modo de realización del procedimiento de la presente invención, el cáncer positivo para BRAF está compuesto de una población celular derivada de un clon de célula individual.

Aún en un modo de realización del procedimiento de la presente invención, las células de la población celular contienen en su genoma al menos una mutación en el gen BRAF y al menos una mutación en el gen NRAS.

Aún en un modo de realización del procedimiento de la invención, el inhibidor de BRAF es un inhibidor de molécula pequeña de la actividad de BRAF. Típicamente, dicho inhibidor de molécula pequeña de la actividad de BRAF es LGX818, PLX4032 y/o GSK2118436.

En un modo de realización del procedimiento de la invención, el dicho inhibidor de MAPK/ERK es un inhibidor de molécula pequeña de la actividad de MEK o ERK. Típicamente, dicho inhibidor de la actividad de MEK es GSK1120212 o MEK162, y dicho inhibidor de la actividad de ERK es SCH772984.

Aún en un modo de realización del procedimiento de la invención, la mutación del gen NRAS da como resultado una sustitución aminoacídica en una posición correspondiente al aminoácido 61 del exón 2 de la proteína NRAS humana. Típicamente, dicha sustitución aminoacídica es una sustitución de glutamina a lisina (Q61K), una sustitución de glutamina a arginina (Q61R) o una glutamina a leucina (Q61L).

5 En otro modo de realización del procedimiento de la invención, la mutación del gen BRAF da como resultado una sustitución aminoacídica en la posición correspondiente al aminoácido 600 del exón 15 de la proteína BRAF humana. Típicamente, dicha sustitución aminoacídica es una sustitución de valina a glutamato (V600E), una sustitución de valina a lisina (V600K), una sustitución de valina a arginina (V600R) o una sustitución de valina a ácido aspártico (V600D).

Aún en un modo de realización del procedimiento de la invención, dicha muestra comprende una célula cancerosa positiva para BRAF.

15 En otro modo de realización del procedimiento de la invención, dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en muestras de resección de tejido, muestras de biopsia de tejido, muestras de tumor primario, muestras de lesión metastásica o muestras que comprenden células tumorales circulantes incluyendo sangre.

20 En un modo de realización del procedimiento de la presente invención, la presencia de la al menos una mutación en el exón 2 de la subunidad catalítica del ácido nucleico NRAS se determina

a) poniendo en contacto ácidos nucleicos en la muestra del sujeto con uno o más de los oligonucleótidos específicos de locus seleccionados del grupo que consiste en: GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10);

b) incubando la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica del oligonucleótido a su secuencia diana dentro de un ácido nucleico NRAS;

30 c) detectando dicha hibridación; y

d) determinando la al menos una mutación basada en dicha hibridación detectada en la etapa c).

Típicamente, la etapa b) comprende además la etapa de generar un producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico NRAS amplificando el ácido nucleico NRAS en la muestra con uno o ambos de los siguientes cebadores oligonucleotídicos: cebador oligonucleotídico directo que tiene SEQ ID NO: 11 y cebador oligonucleotídico inverso que tiene SEQ ID NO: 12.

40 En un modo de realización del procedimiento de la presente invención, la presencia de la al menos una mutación en el exón 15 de la subunidad catalítica del ácido nucleico BRAF se determina

a) poniendo en contacto ácidos nucleicos en la muestra del sujeto con uno o más de los oligonucleótidos específicos de locus seleccionados del grupo que consiste en: CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTAAGGTTTCTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4);

b) incubando la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica del oligonucleótido a su secuencia diana dentro de un ácido nucleico BRAF;

50 c) detectando dicha hibridación; y

d) determinando la al menos una mutación basada en dicha hibridación detectada en la etapa c).

Típicamente, la etapa b) comprende además la etapa de generar un producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico BRAF amplificando el ácido nucleico NRAS en la muestra con uno o ambos de los siguientes cebadores oligonucleotídicos: cebador oligonucleotídico directo que tiene SEQ ID NO:5 y cebador oligonucleotídico inverso que tiene SEQ ID 6.

60 Aún en un modo de realización del procedimiento de la invención, dicho procedimiento comprende además recomendar al sujeto la administración de un fármaco inhibidor de MAPK/ERK si el sujeto se ha identificado como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK.

La presente invención también se refiere a un inhibidor de MAPK/ERK para su uso en el tratamiento de un sujeto que

padece un cáncer positivo para BRAF, con lo que se ha descubierto que dicho cáncer (i) al menos tiene al menos una mutación en el gen NRAS o (ii) al menos tiene al menos una mutación en el gen NRAS y al menos una mutación en el gen BRAF. Además, el uso de un inhibidor de MAPK/ERK para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con cáncer positivo para BRAF, con lo que se ha descubierto que dicho cáncer (i) al menos tiene al menos una mutación en el gen NRAS o (ii) al menos tiene al menos una mutación en el gen NRAS y al menos una mutación en el gen BRAF, se contempla de acuerdo con la invención.

Por tanto, el inhibidor de MAPK/ERK se usará para tratar como medicamento y, en consecuencia, se puede formular como tal. El término "medicamento" como se usa en el presente documento se refiere, en un aspecto, a una composición farmacéutica que contiene el inhibidor al que se hace referencia anteriormente como compuesto farmacéuticamente activo, en el que la composición farmacéutica se puede usar para tratamiento humano o no humano de las enfermedades especificadas en el presente documento en una dosis terapéuticamente eficaz. El inhibidor, típicamente, puede estar presente en forma líquida o liofilizada. El medicamento es, en un aspecto, para administración tópica o sistémica. Convencionalmente, se administrará un medicamento por vía intramuscular o subcutánea. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y el modo de acción de un compuesto, el medicamento se puede administrar por otras vías además. El inhibidor será el ingrediente activo de la composición y, típicamente, se administra en formas de dosificación convencionales preparadas combinando el fármaco con vehículos farmacéuticos estándar de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y compresión, o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable se dicta por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas. Un vehículo debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el receptor del mismo. El vehículo farmacéutico empleado puede incluir un sólido, un gel o un líquido. Los ejemplos para vehículos sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los ejemplos de vehículos líquidos son solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes y similares. De forma similar, el vehículo o diluyente puede incluir material de retardo temporal bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera. Dichos vehículos adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania. Se selecciona un diluyente para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos, y similares. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del compuesto que se va a usar en un medicamento de acuerdo con la presente invención que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad a la que se hace referencia en la presente memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y la toxicidad del compuesto se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de la población) y DL50 (la dosis letal para un 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción DL50/DE50. El régimen de dosificación se determinará por el médico especialista y otros factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Se puede realizar un seguimiento del progreso por evaluación periódica. El medicamento al que se hace referencia en el presente documento se administra al menos una vez para tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o afección mencionada en la presente memoria descriptiva. Sin embargo, dicho medicamento se puede administrar más de una vez. Los medicamentos específicos se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo al que se hace referencia anteriormente en el presente documento en mezcla o asociado de otro modo con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para preparar esas composiciones farmacéuticas específicas, el/los compuesto(s) activo(s) normalmente se mezclará(n) con un vehículo o el diluyente. Las formulaciones resultantes se deben adaptar al modo de administración. Las recomendaciones de dosificación se indicarán en las instrucciones del médico prescriptor o del usuario para anticipar los ajustes de dosis dependiendo del receptor considerado. El medicamento de acuerdo con la presente invención puede comprender, en otro aspecto de la invención, fármacos además del inhibidor de MAPK/ERK que se añaden al medicamento durante su formulación. Los detalles sobre dichos medicamentos se encuentran en otra parte en el presente documento. Finalmente, se debe entender que la formulación de un medicamento tiene lugar en condiciones estandarizadas de GMP o similares para garantizar la calidad, seguridad farmacéutica y eficacia del medicamento.

De lo anterior se deduce que el inhibidor de MAPK/ERK también se puede usar en un procedimiento para tratar el cáncer positivo para BRAF en un sujeto que padece el mismo, dicho procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MAPK/ERK.

La invención también se refiere a un procedimiento para diagnosticar cáncer en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece cáncer que comprende:

a) generar uno o más productos de amplificación que contienen secuencias diana dentro del ácido nucleico BRAF y

el ácido nucleico NRAS amplificando los ácidos nucleicos en la muestra con dos de los siguientes oligonucleótidos cebadores: CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y/o ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4) y con dos de los siguientes oligonucleótidos cebadores: GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y/o ATCATCCTTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10);

b) poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más de los siguientes oligonucleótidos BRAF específicos de mutación: CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y/o ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4);

y con uno o más de los siguientes oligonucleótidos NRAS específicos de localización: GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y/o ATCATCCTTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10);

c) incubar la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica de los oligonucleótidos a sus respectivas secuencias diana dentro del ácido nucleico BRAF y el ácido nucleico NRAS;

d) detectar dicha hibridación, con lo que se diagnostica el cáncer.

El término "diagnosticar" como se usa en el presente documento quiere decir evaluar si un sujeto como se hace referencia en el presente documento padece cáncer (es decir, se admite en el grupo de pacientes con cáncer) o no (es decir, se descarta). Como se entenderá por los expertos en la técnica, una evaluación de este tipo normalmente no pretende ser correcta para un 100 % de los sujetos que se van a diagnosticar. Sin embargo, el término requiere que la evaluación de la presencia o ausencia de cáncer sea correcta para una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohorte). Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar como se describe en otra parte en el presente documento.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a todas las neoplasias malignas caracterizadas por crecimiento celular anómalo e invasividad. En particular, el cáncer al que se hace referencia en el presente documento es un cáncer positivo para BRAF como se especifica en otra parte en el presente documento.

La expresión "generar uno o más productos de amplificación" como se hace referencia en el presente documento se puede lograr por cualquier técnica de amplificación de ácido nucleico basada en cebador. En un aspecto, la generación se logra por técnicas basadas en PCR a las que se hace referencia en detalle en otra parte en el presente documento o en los ejemplos adjuntos.

En un modo de realización del procedimiento mencionado anteriormente, dicho cáncer se deriva de un clon de célula individual.

La invención también engloba un kit para diagnosticar cáncer, típicamente, derivado de un clon de célula individual, en una muestra de un sujeto que comprende los siguientes oligonucleótidos: CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4); GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y ATCATCCTTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10).

El término "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a una colección de los componentes mencionados anteriormente, típicamente, proporcionados por separado o en un único recipiente. El recipiente también comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. Estas instrucciones pueden estar en forma de un manual o se pueden proporcionar por un código de programa informático que puede llevar a cabo la identificación a la que se hace referencia en los procedimientos de la presente invención y establecer un diagnóstico en consecuencia cuando se implementa en un ordenador o un dispositivo de procesamiento de datos. El código de programa informático se puede proporcionar en un medio o dispositivo de almacenamiento de datos tal como un medio de almacenamiento óptico (por ejemplo, un disco compacto) o directamente en un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos. Además, el kit puede comprender ácidos nucleicos diana de control positivo y negativo. El kit, en un aspecto, también puede comprender otros componentes requeridos para realizar el procedimiento de la invención, tales como agentes de detección, por ejemplo, un anticuerpo, tampones, otros reactivos requeridos para la detección, por ejemplo, conjugado y/o sustratos y similares.

También se engloba por la invención un dispositivo para diagnosticar cáncer, típicamente, derivado de un clon de célula individual, en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece cáncer y/o para identificar si un sujeto

que padece un cáncer positivo para BRAF es o no un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF, y/o es un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK que comprende:

(i) una unidad de análisis que comprende uno o más de los siguientes oligonucleótidos BRAF específicos de mutación: CTAAGAGGAAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y/o ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4) y uno o más de los siguientes oligonucleótidos NRAS específicos de localización: GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y/o ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10) y

(ii) un detector que puede detectar la hibridación específica de los ácidos nucleicos BRAF y NRAS a dichos oligonucleótidos.

El término "dispositivo", como se usa en el presente documento se refiere a un sistema que comprende los componentes mencionados anteriormente unidos de forma funcional entre sí para permitir el diagnóstico o identificación de acuerdo con los procedimientos de la invención. La unidad de análisis, en un aspecto, comprende dichos oligonucleótidos en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que se debe poner en contacto con la muestra que comprende los ácidos nucleicos diana que se van a determinar. La unidad de análisis puede comprender además o estar unida de forma funcional a viales que comprenden soluciones de lavado e hibridación para llevar a cabo la reacción de hibridación.

El detector está adaptado para detectar la hibridación específica de los oligonucleótidos y los ácidos nucleicos diana. Dependiendo del marcador usado para los oligonucleótidos, se pueden usar diferentes detectores, por ejemplo, se pueden aplicar detectores ópticos en el caso de tintes o marcadores fluorescentes.

El dispositivo puede comprender además un dispositivo informático para la evaluación de datos. Un dispositivo informático de datos puede ser un ordenador de propósito general o un dispositivo informático portátil, por ejemplo. También se debe entender que se pueden usar múltiples dispositivos informáticos juntos, tales como en una red u otros procedimientos de transferencia de datos, para realizar una o más etapas de los procedimientos divulgados en el presente documento. Los dispositivos informáticos ejemplares incluyen ordenadores de sobremesa, ordenadores portátiles, agenda electrónica y teléfonos inteligentes, dispositivos móviles, tabletas, servidores y similares. En general, un dispositivo informático comprende un procesador que puede ejecutar una pluralidad de instrucciones (tales como un programa informático). Un dispositivo informático tiene acceso a una memoria. Una memoria es un medio legible por ordenador y puede comprender un único dispositivo de almacenamiento o múltiples dispositivos de almacenamiento, situados localmente con el dispositivo informático o bien accesibles al dispositivo informático a través de una red, por ejemplo. Los medios legibles por ordenador pueden ser cualquier medio disponible al que se puede acceder por el dispositivo informático e incluye medios tanto volátiles como no volátiles. Además, los medios legibles por ordenador pueden ser uno o ambos de medios extraíbles y no extraíbles. A modo de ejemplo, y sin limitación, los medios legibles por ordenador pueden comprender medios de almacenamiento informáticos. Los medios de almacenamiento informáticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, RAM, ROM, EEPROM, memoria flash o cualquier otra tecnología de memoria, CD-ROM, disco versátil digital (DVD) u otro almacenamiento en disco óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio que se pueda usar para almacenar una pluralidad de instrucciones a las que se puede acceder por el dispositivo informático y ejecutar por el procesador del dispositivo informático.

El dispositivo informático también puede tener acceso a un dispositivo de salida. Los dispositivos de salida ejemplares incluyen máquinas de fax, pantallas, impresoras y archivos, por ejemplo. De acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación, un dispositivo informático puede realizar una o más etapas de un procedimiento divulgado en el presente documento, y después de esto proporcionar una salida, por medio de un dispositivo de salida, con relación a un resultado del procedimiento.

La invención prevé un procedimiento de evaluación de la reactividad al tratamiento dirigido contra el cáncer, típicamente, derivada de un clon de célula individual, en un paciente que comprende:

- a) proporcionar una muestra del paciente,
- b) someter a prueba la muestra para determinar la presencia de mutaciones en los genes BRAF y NRAS, en el que someter a prueba se realiza por uno de los procedimientos seleccionados de un grupo que consiste en amplificación selectiva, hibridación de sonda o secuenciación de ácido nucleico;
- c) si se detectan mutaciones en los genes NRAS y BRAF, detectar la reactividad a un inhibidor de MAPK/ERK y la no reactividad a un inhibidor de BRAF.

En un aspecto del procedimiento mencionado anteriormente, la presencia de mutaciones en los genes BRAF y NRAS se determina por amplificación selectiva, hibridación de sonda o secuenciación de ácido nucleico como se describe



en detalle en otra parte en el presente documento. En particular, se pueden usar los oligonucleótidos específicos de locus o específicos de mutación o los oligonucleótidos cebadores especificados en otra parte en el presente documento.

5 Además, la invención se refiere a un procedimiento de evaluación del cáncer, típicamente, derivado de un clon de célula individual, en un paciente que comprende:

a) proporcionar u obtener una muestra del paciente que contiene ácidos nucleicos,

10 b) poner en contacto los ácidos nucleicos en la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para mutaciones en los genes BRAF y NRAS,

c) si se detectan mutaciones en los genes NRAS y BRAF, evaluar el cáncer como reactivo a un inhibidor de MAPK/ERK y no reactivo a un inhibidor de BRAF.

15 Aún más, la invención se refiere a un procedimiento de evaluación del cáncer, típicamente, derivado de un clon de célula individual, en un paciente que comprende:

a) proporcionar u obtener una muestra del paciente que contiene ácidos nucleicos,

20 b) poner en contacto los ácidos nucleicos en la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para mutaciones en los genes BRAF y NRAS,

25 c) si se detectan mutaciones en los genes NRAS y BRAF, informar de que el cáncer es reactivo a un inhibidor de MAPK/ERK y no reactivo a un inhibidor de BRAF.

En un aspecto del procedimiento mencionado anteriormente, la sonda de ácido nucleico específica para mutaciones en los genes BRAF y NRAS son los oligonucleótidos específicos de locus o específicos de mutación especificados en otra parte en el presente documento.

30 Todas las referencias a las que se hace referencia a lo largo de esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia con respecto a su contenido de divulgación específicamente mencionado y en su totalidad.

## FIGURAS

35 **Fig.1:** cohorte de pacientes y variaciones en el número de copias. (A) Las muestras del paciente 1 incluyeron el tumor primario, dos nevos displásicos, dos metástasis tempranas y 4 metástasis tardías después de la recidiva tumoral. (B) El paciente 1 tenía un melanoma mutado con BRAFV600E y recibió en primer lugar tratamiento con IFNa seguido de un tratamiento con inhibidor de BRAF específico al que respondió, pero después se volvió resistente. (C) Al paciente 40 2 se le diagnosticó un melanoma que era natural tanto para BRAF como para NRAS. Se perforó con sacabocados el tumor primario y se secuenció tres veces. Adicionalmente, se secuenciaron cinco metástasis tardías. (D) El paciente recibió el inhibidor de tirosina cinasa multirreceptor (Pazopanib), al que respondió, pero después se volvió resistente. (E) El paciente 3 tenía una mutación NRASQ61R. Se perforó con sacabocados el tumor primario dos veces y se tomaron biopsias de una metástasis temprana y tres tardías. (F) El paciente recibió el inhibidor de MEK GSK1120212, al que respondió, pero después se volvió resistente seguido de un breve período de tratamiento anti-CTLA4. (G) Se 45 representan las variaciones en el número de copias (CNV) usando Circos. Cada anillo muestra las CNV detectadas por Excavator de una biopsia, comenzando con dos nevos en los dos círculos más externos seguido del tumor primario, las dos metástasis tempranas y finalmente las metástasis tardías 1 a 4. (H) presenta las CNV del paciente 2 desde fuera hacia el centro: muestras de tumor primario 1 a 3 y las metástasis tardías 1 a 5. (I) muestra lo mismo para el paciente 3, desde fuera hacia el centro: las muestras de tumor primario 1 y 2, una metástasis temprana y las metástasis tardías 1 a 3. Las regiones agrandadas muestran una región comúnmente perdida en el cromosoma 9 que codifica el supresor tumoral CDKN2A. (K) Las variaciones en el número de copias en el cromosoma 22 del paciente 1 muestran un alto grado de heterogeneidad. El tumor primario tiene una ganancia en una región de 22p y una pérdida en un área grande de 22p y 22q. La ganancia, pero no la pérdida, se puede ver en la metástasis temprana 1 pero en ninguna otra metástasis. La pérdida, pero no la ganancia, se puede encontrar en la metástasis temprana 2 y metástasis 50 tardía 1, pero no en otras metástasis.

60 **Fig.2:** árboles filogénicos del exoma completo de biopsias de paciente. Las longitudes de rama representan distancias relativas basadas en SNV e indel, y las ramas se colorean de acuerdo con el tipo de biopsia. Se enraízan árboles filogénicos de máxima verosimilitud por la muestra de sangre del paciente 1 (A), paciente 2 (B) y paciente 3 (C). Se dan soportes de nodulos como valores de muestreo, considerando que más de un 50 % es soporte fuerte.

65 **Fig.3:** PCR digital y secuenciación de Sanger de muestras de paciente 1. (A) La dPCR usando una sonda frente a BRAFV600E y NRASQ61K mostró ADN mutado con BRAFV600E en todas las muestras tumorales. Las reacciones de dPCR positivas para NRASQ61K solo se pudieron detectar en la metástasis tardía 6 de este paciente. Se considera que los valores de precisión de menos de un 15 % son reacciones positivas altamente reproducibles. (B)

Espectrograma representativo y (C) secuencias de secuenciación de Sanger de 26 cultivos celulares cultivados a partir de células de melanoma individuales aisladas de metástasis tardía 6. Los 26 cultivos clonales tenían las mutaciones tanto BRAFV600E como NRASQ61K.

5 **Fig.4:** ensayos de viabilidad y señalización de pERK en células de melanoma con doble mutación. Un cultivo celular resistente establecido a partir de metástasis tardía 6 del paciente 1 mostró una respuesta variable para diferentes inhibidores de BRAF. (A) Ensayos de MTT por triplicado que miden la actividad enzimática de NAD(P)H después del tratamiento con diferentes inhibidores de BRAF normalizados para células tratadas con DMSO. La línea celular resistente M121224, derivada de un paciente que progresa durante el tratamiento con LGX818, es completamente resistente para LGX818, pero solo parcialmente resistente a PLX4032 y GSK2118436. (B) Inmunoelctrotransferencia y su cuantificación de los niveles de pERK en células M121224 después del tratamiento con inhibidor de BRAF. Se midió la densidad óptica de las bandas con ImageJ para obtener un gráfico de barras. Se eligieron concentraciones de fármaco en base a la CI50 de la línea celular sensible M000921, así como otros cultivos de pasos tempranos mutados con BRAFV600E. (C) qPCR que muestra la expresión relativa de genes diana pERK después del tratamiento con PLX4032 0,35  $\mu$ M. (D) Ensayo MTT que mide la actividad enzimática de NAD(P)H después del tratamiento con un inhibidor de MEK (MEK162), una combinación de inhibidor de MEK y BRAF (LGX818) e inhibidor de ERK (SCH772984) solo.

20 **Fig.5:** diversidad subclonal medida por proporciones de alelos mutantes (MAR). (A) Las frecuencias de proporciones de alelos mutantes del tumor primario del paciente 1 muestran SNV homocigotas, heterocigotas y posiblemente subclonales. Una comparación con los nevos y las metástasis del paciente 1 muestra un incremento en la frecuencia subclonal en el tumor primario. (B) SNV totales del tumor primario del paciente 2 (línea negra) en comparación con las SNV presentes exclusivamente en la primera biopsia en sacabocados del tumor primario del paciente 2 (línea gris). Las SNV particulares para las biopsias en sacabocados individuales tienen en general una MAR baja. Los valores debajo de los gráficos representan la MAR media.

25 **Fig.6:** ensayos de viabilidad en células de melanoma de doble mutación derivadas de clones de células individuales de melanoma metastásico. Ensayos de MTT por triplicado que miden la actividad enzimática de NAD(P)H después del tratamiento con el inhibidor de MEK MEK162 (A), el inhibidor de ERK SCH772984 (C) o los inhibidores de BRAF GSK21184362 (B), LGX818 (D) o PLX4032 (E) normalizados para células tratadas con DMSO. Las líneas celulares clonales con doble mutación BRAFV600E y NRASQ61R, M140307 y M150423, son resistentes al tratamiento con inhibidor de BRAF, pero sensibles al tratamiento con inhibidor de ERK.

## EJEMPLOS

35 Los ejemplos simplemente ilustran la invención o los aspectos de la misma. De ninguna manera se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

40 Se secuenció el exoma completo de múltiples muestras de tres pacientes con melanoma metastásico, que incluyeron diversos sitios anatómicos, tratamientos y fases de progresión de enfermedad (figura 1 A-F). El paciente 1 tenía una mutación BRAFV600E (figura 1A), el paciente 2 tenía un iniciador oncogénico desconocido (figura 1B) y el paciente 3 tenía una mutación NRASQ61R activadora (figura 1C) en el diagnóstico inicial. El paciente 1 recibió un inhibidor de BRAF dirigido (es decir, LGX818) y tuvo una respuesta parcial de acuerdo con tomografía computarizada (TAC) (figura 1D). El paciente 2 progresó bajo tratamiento con inhibidor multicitinasa, es decir (es decir, pazopanib), de acuerdo con TEP/TAC (figura 1E). El paciente 3 recibió un inhibidor de MEK dirigido (es decir, MEK162), y también fue progresivo de acuerdo con TAC (figura 1F). El análisis de los resultados de secuenciación mostró los números esperados de variaciones mononucleotídicas totales (SNV) en las muestras tumorales, como se publicó en estudios previos<sup>6,12</sup>. Ambos nevos displásicos del paciente 1 tuvieron una carga mutacional codificante de proteínas menor que cualquier biopsia tumoral de los tres pacientes, medida por el número total de genes con SNV no sinónimas. El nevo 1 tenía 133 y el nevo 2 tenía 101 genes mutados, mientras que las biopsias tumorales del paciente 1 tenían un promedio de 186 genes mutados. El paciente 2 y el paciente 3 tenían un promedio de 196 y 234 genes mutados en sus tumores, respectivamente. De forma interesante, además de tener en promedio menos números de genes mutados, los nevos tenían una proporción reducida de mutaciones no sinónimas con respecto a sinónimas (es decir, 0,79) en comparación con todas las otras lesiones de melanoma primario (1,20) y metastásico (1,22) secuenciadas, lo que indica una menor proporción de cambios codificantes de proteínas en nevos frente a tumores de melanoma en general. También es interesante destacar que los tumores primarios tenían cada uno mayores números de SNV particulares que las metástasis de cada paciente, lo que sugiere un incremento en la diversidad genética exclusiva en tumores primarios que en las metástasis<sup>13</sup>. Por ejemplo, el paciente 1 tenía 96 SNV particulares exclusivas del tumor primario y un promedio de 35 SNV particulares en todas las metástasis. El paciente 2 tenía un promedio de 48 SNV particulares exclusivas para cada una de las tres biopsias en sacabocados del tumor primario, y en promedio 24 SNV particulares en las metástasis. Asimismo, a excepción de la única metástasis atípica clara (es decir, tardía 1) en el paciente 3, cada una de las dos biopsias en sacabocados de tumor primario tenía mayores números de SNV particulares (es decir, 89) que las metástasis (es decir, 38). Por tanto, en general, los tumores primarios tenían números significativamente mayores de 2-2,7 veces (prueba de la t,  $p < 0,00048$ ) de SNV particulares que las metástasis del mismo paciente en la cohorte de la presente invención, mostrando una metástasis atípica números extraordinarios de mutaciones particulares.

La secuenciación del exoma pudo confirmar el estado de la mutación de BRAF y NRAS conocido que se identificó inicialmente por secuenciación de Sanger en el momento del diagnóstico para cada paciente (figura 1). Adicionalmente, se cribaron los datos de otros oncogenes y supresores tumorales conocidos que podrían desempeñar un papel en la progresión del melanoma en la cohorte de la presente invención. Aunque el paciente 2 no tenía iniciadores oncogénicos conocidos en el momento del diagnóstico, se identificó una mutación de línea germinal no sinónima en el receptor de melanocortina MC1RV92M, que se ha demostrado que está asociada significativamente con un riesgo elevado de adquirir melanoma metastásico <sup>14</sup>. Además, el paciente 3 tenía la mutación de la línea germinal MITFE318K que se asoció recientemente con un incremento en el riesgo de desarrollar melanoma <sup>15</sup>.

Para identificar las pérdidas genómicas en locus supresores tumorales potenciales en estos tres pacientes, se analizaron los datos del exoma con los algoritmos EXCAVATOR y CONTRA <sup>16,17</sup>, que permitieron inferir variaciones en el número de copias (CNV). Se pudo detectar un alto número de CNV en muchos cromosomas, y presentando algunas muestras grandes pérdidas en todo el genoma (figura 1 G-I).

Se pudieron identificar desequilibrios cromosómicos en la cohorte investigada que se sabe que se producen con frecuencia en el melanoma (figura 1 G-I). El paciente 1 ganó copias en 6p, 7, 8q y 17q (figura 1G) en las metástasis tardías 3 y 4 (figura 1G). El paciente 2 tuvo ganancias en el cromosoma 1q, 7 y 22 en las metástasis tardías (figura 1H). En el paciente 3, se encontraron ganancias en el cromosoma 1q, 6p y 20q (figura 1I). Todos los pacientes mostraron al menos pérdidas parciales en el cromosoma 6q, 9p y 10, así como en algunas muestras en los cromosomas 11, 2 y 17 (figura 1 G-I).

Además, CONTRA proporciona información específica de genes sobre las CNV. Se encontró una pérdida concordante del locus CDKN2A en el cromosoma 9 (figura 1G-I) en todas las muestras tumorales, excepto en los nevos del paciente 1. Se confirmó por qPCR que estas pérdidas eran homocigotas en los pacientes 1 y 3, y heterocigotas en el paciente 2 (datos no mostrados), como se predice por los algoritmos tanto EXCAVATOR como CONTRA (figuras 1G-I, supl. tabla 3). Además, se perdió PTEN (cromosoma 10) en todas las muestras del paciente 2 (figura 1H) y en la mayoría de las muestras del paciente 1, excepto en la metástasis temprana 1 y el tumor primario.

Un procedimiento para agrupar muestras tumorales y construir relaciones entre biopsias es suponer que las CNV, una vez se pierden, no se pueden recuperar <sup>18</sup>. Las filogenias tumorales se pueden inferir por tanto identificando pérdidas genómicas específicas en un tumor primario, que no se pueden recuperar en una metástasis derivada de este primario. Sin embargo, la alta variabilidad en los desequilibrios cromosómicos intrapaciente que se identificó podría dar lugar a muchas relaciones diferentes posibles dentro de las biopsias muestreadas (figura 1 G-I). Por ejemplo, en el paciente 3, las CNV del cromosoma 10 sugerirían que las metástasis tardías derivaron de la biopsia en sacabocados primaria n.º 2; sin embargo, las CNV del cromosoma 14 son más indicativas de un linaje tardío que deriva de la biopsia en sacabocados primaria n.º 1 (figura 1I). Asimismo, en el paciente 2 la biopsia en sacabocados primaria n.º 2 tiene menos pérdidas en el cromosoma 11 que las otras dos biopsias en sacabocados primarias, lo que sugiere menos similitud con las metástasis tardías, mientras que el patrón de pérdidas en el cromosoma 3 sugeriría una relación más estrecha entre la biopsia en sacabocados primaria n.º 2 y las metástasis tardías (figura 1 H). En general, la heterogeneidad de la CNV intrapaciente fue bastante alta, como se puede observar en pacientes donde se secuenciaron múltiples regiones del mismo tumor primario (figura 1 H,I). Por ejemplo, en el cromosoma 11 del paciente 2 y los cromosomas 7, 10, 12 y 14 del paciente 3, se encontraron pérdidas en solo una de las dos biopsias en sacabocados de tumores primarios. La heterogeneidad en las CNV también se puede ver claramente en el cromosoma 22 del paciente 1, por ejemplo, que tiene una ganancia prevista del número de copias de la región telomérica en el tumor primario, que no aparece en ninguna de las metástasis posteriores (figura 1J).

## **Ejemplo 2: el análisis filogénico del exoma completo identifica las relaciones intertumerales y las SNV pertinentes para la progresión**

Para investigar la relación evolutiva entre tumores de pacientes individuales en diferentes entornos terapéuticos, se aplicaron algoritmos filogénicos a la SNV y detecciones de indel de cada paciente. El análisis filogénico del exoma completo permitió no solo agrupar muestras tumorales basadas en sus SNV totales, inserciones y deleciones, sino también determinar las relaciones evolutivas entre las muestras e incluso encontrar caracteres de diagnóstico que soportan nódulos filogénicos específicos (figura 2). Las biopsias del paciente 1 y 3 (es decir, tratados con inhibidores dirigidos de BRAF y MEK, respectivamente) presentaron árboles con tumores posresistencia formando clados monofiléticos, lo que quiere decir que todas las muestras posresistentes se originaron en un solo nódulo. La confianza se muestra por soportes de muestreo (flecha) lo que refleja el porcentaje de árboles de muestreo que también resuelven el clado en los puntos finales de esa rama. El paciente 2, que recibió tratamiento no dirigido (es decir, el inhibidor de tirosina cinasa multirreceptor pazopanib) no mostró este soporte monofilético fuerte de las metástasis tumorales tardías (figura 2), pero las muestras posresistentes se originaron en múltiples nódulos (flechas).

La topología monofilética sólida de los árboles filogénicos del paciente 1 y 3 tras el tratamiento dirigido sugiere que el mecanismo de resistencia terapéutica puede soportar los nódulos que discriminan entre los clados pre y postratamiento (figura 2 A, C). Sin embargo, no se pudo identificar ningún mecanismo conocido y compartido de resistencia al tratamiento con inhibidor de BRAF o inhibidor de MEK en estos soportes de nódulo o en los datos del

exoma completo que pudiera explicar la resistencia terapéutica observada en los pacientes 1 y 3. Se investigó la intersección de SNV no sinónimas entre todos los exomas tumorales posteriores a la recidiva en cada paciente para encontrar potenciales mecanismos de resistencia genética novedosos. En el paciente 1 se encontró una mutación no sinónima somática en TACC1L452V que era ubicua y exclusiva de las muestras de tumores resistentes a inhibidor. Aunque se ha descubierto que TACC1 está mutado con frecuencia en tumores de melanoma, aún no se ha identificado ningún papel de TACC1 en la resistencia al tratamiento 12 6. Puesto que puede haber heterogeneidad intertumoral intrapaciente de mecanismos de resistencia, se buscó identificar cambios codificantes de proteínas explicativos en cualquiera de las muestras posteriores al tratamiento. En el paciente 1, se detectó una mutación no sinónima en GNAQT96S en la metástasis primaria y tardía 1, y TACC1C133A en la misma biopsia. Aunque estas mutaciones están en genes conocidos previamente por verse afectados en el melanoma, su papel en la resistencia al tratamiento sigue siendo desconocido. Asimismo, no se identificaron mecanismos conocidos de resistencia en los datos de exoma de los otros dos pacientes.

### Ejemplo 3: heterogeneidad genética intrapaciente de resistencia a LGX818

Dada la falta de mecanismos de resistencia conocidos y compartidos en los dos pacientes con tratamiento dirigido, se investigaron además las muestras de pacientes tratados con inhibidor de BRAF (es decir, paciente 1), debido al mayor conocimiento de los mecanismos de resistencia al inhibidor de BRAF en la literatura <sup>9</sup>. Se llevó a cabo la secuenciación de Sanger en las mismas muestras de biopsia y en biopsias adicionales para las que el ADN era demasiado limitante para la secuenciación del exoma sin amplificación. La mutación de BRAFV600E se pudo confirmar por secuenciación de Sanger estándar de amplicones de PCR de todas las muestras tumorales (datos no mostrados). Dado que las mutaciones de NRAS activadoras son el mecanismo de resistencia más común hasta ahora identificado, estando presente en un 17,8 % de los tumores resistentes a inhibidores de BRAF <sup>9</sup>, se eligió llevar a cabo en primer lugar la secuenciación de Sanger de los exones 2 y 3 del locus NRAS en todas las muestras del paciente 1. Al hacerlo, se identificó la mutación activadora NRASQ61K en la metástasis tardía número 6 del paciente 1, que surgió después de recidiva. La misma mutación estaba ausente en todas las otras muestras metastásicas. Además, se pudo confirmar que esta metástasis todavía tenía la mutación BRAFV600E, así como dos mutaciones adicionales que se encontraron de forma exclusiva y ubicua en todas las otras metástasis posteriores al tratamiento del paciente 1: TACC1L452V y C11orf30K22N (datos no mostrados). No se sometió a prueba ninguna otra mutación específica por secuenciación de Sanger, pero la secuenciación del exoma posterior de un cultivo celular primario derivado de la metástasis tardía 6 (es decir, número de cultivo M121224), también pudo confirmar la presencia de estas mutaciones.

Puesto que la secuenciación del exoma completo proporciona una amplia cobertura genómica, pero profundidad limitada en locus específicos (en este caso, cobertura promedio de 101x en todas las muestras), es difícil detectar subclones de baja abundancia de células cancerosas con genotipos alternativos <sup>19,20</sup>. Por este motivo, se aplicó PCR digital para investigar además la posibilidad de una subpoblación pequeña de células mutadas y resistentes en los tumores posteriores al tratamiento del paciente 1. La plataforma de PCR digital de la presente invención se basa en 20.000 reacciones de PCR simultáneas por ciclo, lo que permite la detección de variantes genómicas presentes en tan solo un 5 % de la población de células tumorales.

Por el uso de esta técnica se midió el número de copias mutadas con BRAFV600E o NRASQ61K por microlitro de ADN para cada muestra. Los valores con una precisión de menos de un 15 %, que indican un intervalo de confianza de +/- 15 % alrededor del número de copias medido, se consideraron aceptables. La PCR digital confirmó la presencia de la mutación BRAFV600E en todos los tumores pero no en el ADN obtenido de la sangre o el nevo 1 del paciente (figura 3A). Aunque la metástasis tardía 4 mostró un bajo número de copias por microlitro, (es decir, 35 copias) la precisión estaba dentro del intervalo aceptable (es decir, 8,59 %). Sin embargo, todas las otras biopsias tumorales del paciente 1, incluyendo las que no se habían secuenciado en el exoma (es decir, metástasis tardías 5 y 6), tenían números de copias de BRAFV600E mayores con buena precisión (figura 3A). También se validó la presencia de la mutación NRASQ61K en la metástasis tardía 6 por PCR digital, y se demostró que tenía un alto número de copias en esa metástasis (figura 3A, recuadro verde). Los resultados de la PCR digital también muestran la ausencia de subclones NRASQ61K detectables en cualquiera de las otras metástasis resistentes, aparte de la metástasis número 6 (figura 3A).

### Ejemplo 4: dos mutaciones de MAPK activadoras están presentes en células de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF, pero sensibles a inhibidores de MEK y ERK individuales

Aunque se pudo mostrar la presencia de ambas mutaciones de activación de MAPK BRAFV600E y NRASQ61K en un tumor posresistencia individual del paciente 1, estos resultados se pueden explicar por la presencia de dos subpoblaciones separadas de células, cada una con una mutación de MAPK activadora, o bien por la presencia de ambas mutaciones en células individuales. Para distinguir entre estas posibilidades, se aislaron células de melanoma individuales de M121224 por separación FACS, y se cultivaron nuevos cultivos a partir de cada una de estas células individuales. La secuenciación de Sanger de 26 cultivos derivados de 26 clones de células individuales diferentes pudo confirmar la presencia continuada de ambas mutaciones BRAFV600E y NRASQ61K en todas las 23 colonias derivadas independientemente (figura 3 B, C). Para confirmar que M121224 retuvo la resistencia al inhibidor de BRAF de la metástasis tardía 6, se trató M121224 con LGX818 y otros dos inhibidores de BRAF disponibles comercialmente (es decir, PLX4032 y GSK2128436), y se midió la viabilidad celular por el ensayo MTT (figura 4A). Se incluyó un cultivo

celular de melanoma mutado con BRAFV600E (M980513) como control positivo y un cultivo celular mutado con NRASQ61R (M010817) como control negativo para el tratamiento con inhibidor de BRAF. La línea M121224 todavía fue resistente a LGX818 en la misma medida que el cultivo celular BRAFwt, M010817 (figura 4A). Asimismo, M121224 también fue resistente a PLX4032 y GSK2118436 pero en menor medida que el inhibidor LGX818, al que el paciente derivó resistencia (figura 4A). Los niveles de ERK fosforilada (pERK) en M121224 disminuyeron significativamente a la concentración CI50 de LGX818 y PLX4032 (figura 4B). Se observó una regulación por disminución significativa de tres genes diana pERK en M980513 y M121224 a la concentración CI50 de PLX4032 y LGX818 (figura 4C), pero no en la línea celular NRASQ61R de control.

Aunque las células con doble mutación M121224 permanecieron viables en presencia de altas concentraciones del fármaco LGX818 (figura 4A), hubo curiosidad sobre cómo la coexistencia de dos mutaciones de MAPK activadoras podría afectar a la sensibilidad de estas células por otros inhibidores de la ruta de MAPK. El tratamiento de células M121224 tanto con la concentración CI50 estándar de LGX818 como con las concentraciones crecientes del inhibidor de MEK (MEK162), pudo mostrar perfiles de viabilidad similares a las células con mutaciones NRASQ61R individuales (figura 4D). Asimismo, el inhibidor de MEK solo fue tan eficaz para reducir la viabilidad de las células M121224 como lo fue con las células mutadas con NRASQ61R (figura 4D). Finalmente, un inhibidor de ERK específico solo también anuló la viabilidad de M121224 en el mismo grado que en las células con BRAFV600E (figura 4D).

La alta sensibilidad al tratamiento con inhibidor de ERK se confirmó además por experimentos con líneas celulares clonales de doble mutación adicionales aisladas de melanoma metastásico resistente a BRAF (figura 6).

### **Ejemplo 5: los tumores primarios presentan la mayor subclonalidad**

Es justo suponer que la mayoría de las mutaciones somáticas en el cáncer afectan a un alelo pero no al otro y, por tanto, son heterocigotas. En la población de cáncer clonal y puro, dichas mutaciones demuestran una proporción de alelo mutante (MAR) de 0,5, es decir, la mitad de todas las bases secuenciadas muestran el alelo mutante. Una desviación de este número puede ser indicativa de la presencia de subclones de cáncer, lo que da lugar a una MAR más pequeña que 0,5. Para estudiar la presencia de subclones en estos tumores primarios, se determinaron las MAR a través de las múltiples biopsias en sacabocados. Además, se calculó la proporción de alelo mutante (MAR) dividiendo el número de recuentos de lectura mutante frente a total para obtener una medida de la presencia potencial de subclones dentro de las muestras <sup>21</sup>. Se observó una mayor proporción de SNV con una MAR baja en los tumores primarios frente a nevos y metástasis en el paciente 1, teniendo el tumor primario una MAR media de un 44 %, mientras que los nevos y metástasis tuvieron una MAR media de un 50 % (figura 5A). Además, como el mismo tumor primario se perforó con sacabocados múltiples veces, la MAR pudo ser para todas las muestras de los tumores primarios de los pacientes 2 y 3. Presumiblemente, estas biopsias en sacabocados caracterizan diferentes porciones del tumor, encontrándose algunas mutaciones exclusivamente en una biopsia en sacabocados, pero no en la otra (mutaciones particulares). Se debe suponer que estas mutaciones particulares son subclonales y, por lo tanto, están presentes en un conjunto más pequeño de células. Los resultados en la figura 5B muestran claramente que la MAR media de las SNV particulares de cada biopsia en sacabocados de tumor primario fue considerablemente menor que la MAR global de todas las SNV. La MAR de las SNV particulares frente a totales de cada biopsia en sacabocados del paciente dos fue entre un 6 % y un 16 % menor en cada caso (figura 5B), y la MAR media fue entre un 9 % y un 15 % menor en las SNV particulares del paciente 3 que las SNV totales (figura 5C). Estos resultados sugieren que los tumores primarios contienen la mayor diversidad subclonal que se puede caracterizar por un gran número de SNV particulares con bajas frecuencias de alelos mutantes. Sin embargo, cada biopsia en sacabocados de tumor primario tuvo diferentes grados de subclonalidad, lo que sugiere heterogeneidad en la diversidad clonal dentro de los tumores.

En el paciente 1, se observó una distribución bimodal de las MAF en el tumor primario, con un pico a 0,35 y un pico secundario a 0,15. El primer pico corresponde probablemente a mutaciones heterocigotas clonales e indica una pureza tumoral de un 70 %.

### **Ejemplo 6: procedimientos experimentales**

#### *Preparación de muestras*

Solo se usó material del paciente después de que se diera consentimiento por escrito del paciente a través del programa de biobanco de la universidad de acuerdo con los números de aprobación ética 647 y 800. Se aisló ADN del tejido incluido en parafina almacenado en el biobanco del instituto de Dermatología del Hospital Universitario de Zúrich, tejido congelado en fresco o bien PBMC. Se aisló ADN de bloques de parafina usando el kit de aislamiento de ADN FFPE de Qiagen (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit n.º 56404) y protocolos optimizados desarrollados por Ultan McDermott en el instituto Sanger. Para el aislamiento de ADN a partir de muestras no incluidas en parafina, se siguieron los protocolos de aislamiento de ADN estándar publicados anteriormente. Con el consentimiento del paciente, se obtuvieron muestras durante la autopsia poco después de la muerte. Se procesaron muestras de inmediato después de la obtención para garantizar la mejor calidad de ADN y ARN posible. Cuando fue posible, se establecieron cultivos celulares primarios como en estudios previos <sup>28</sup>.

Para reducir la contaminación con tejido estromal, se perforaron con sacabocados bloques de parafina y se aisló ADN

de los sacabocados en lugar de cortes de todo el bloque. Antes del aislamiento de ADN, se evaluó cada muestra tumoral por un dermatohistopatólogo experto. Se comprobó la calidad del tejido así como el contenido en tumor y se marcaron las regiones adecuadas para el aislamiento de ADN. Cuando estuvo disponible, se secuenció ADN de nevos displásicos, tumores de melanoma primario y metástasis tomadas antes del tratamiento, así como metástasis obtenidas durante la necropsia. Se secuenció ADN de línea germinal de PBMC para todos los pacientes, si estaba disponible como referencia <sup>29</sup>.

*Preparación del banco y secuenciación*

Se midió la calidad de ADN por un bioanalizador Agilent 2100 o Agilent 2200 TapeStation. Se usó de uno a tres µg de ADN de alta calidad para preparar el banco de exoma completo usando el kit Agilent SureSelect V4 o V5. Se realizó la secuenciación en una máquina Illumina HiSeq 2000 en el Functional Genomics Center de la Universidad de Zúrich. Para la secuenciación de exoma completo, se secuenciaron 0,25 carriles por muestra, de ambos extremos, con lecturas de 100 pb.

*Análisis de secuenciación de exoma completo*

Se llevó a cabo un análisis bioinformático con un producto en desarrollo de GATK modificada <sup>30-32</sup>; se realizó el control de calidad con "FASTQC" <sup>33</sup>. Se realizó la alineación del archivo FASTQ con el genoma de referencia "hg19" <sup>34</sup> con "BWA" <sup>35</sup>. Se realizó la transformación del formato de archivo SAM a BAM con "BWA". Se marcaron los duplicados de PCR por MarkDuplicates de "Picard" <sup>36</sup>, realineación focal alrededor de indel con RealignerTargetCreator (GATK), realineación con IndelRealigner (GATK), corrección de información de emparejamientos con FixMateInformation (Picard), recalibración de puntuación de calidad base con Baserecalibrator (GATK) y PrintReads (GATK). Se realizó la detección de variantes con UnifiedGenotyper (GATK). Para la anotación de los archivos VCF se usó Annovar <sup>37</sup>. Además se usaron Samtools <sup>38</sup> y Bedtools <sup>39</sup>. Para la interpretación de datos se usaron Microsoft Access, Microsoft Excel, Venny <sup>40</sup>, ConSet <sup>41</sup> e IGV <sup>42,43</sup>.

Se calculó la frecuencia de alelos mutantes para todas las muestras para obtener una impresión del grado de contaminación con tejido no tumoral. La mayoría de las muestras mostraron una frecuencia de alelos mutantes de 0,4 a 0,5 lo que corresponde a cerca de un 100 % de material tumoral (datos no mostrados).

Para el análisis del número de copias se usaron Excavator 17 y Contra 16, los resultados del análisis con Excavator se visualizaron con Circos <sup>44</sup>.

Se filtraron las SNV de acuerdo con los siguientes criterios de recuento de lecturas: una base debe tener al menos cuatro lecturas mutantes y al menos 10 lecturas totales, si son menos de 10 lecturas totales, al menos la mitad de ellas debe estar mutada. Además, se excluyeron todas las SNV con una puntuación de calidad en escala Phred de <50 de análisis posterior. Una SNV se llamó somática si la muestra de sangre sin filtrar del mismo paciente no mostró ninguna lectura mutante para esta posición.

Se calcularon las proporciones de alelo mutante (MAR) dividiendo los recuentos de lecturas mutantes entre los recuentos de lecturas totales para cada SNV detectada. Se calcularon las frecuencias para estas proporciones y se representaron las líneas de tendencia en Excel con el procedimiento de promedio móvil (período: 3). Para reducir el número de SNV positivas falsas, se aplicó un filtrado más estricto en las SNV particulares. Se elevó el valor umbral de calidad hasta una puntuación Phred de 100, y la SNV necesitó tener al menos 10 lecturas totales. Se excluyeron los genes que tuvieron más de 8 SNV.

*dPCR*

Se llevó a cabo la PCR digital usando el sistema AB Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems Carlsbad, CA, EE. UU.) y con 15 µl de la mezcla maestra suministrada (AB Quant Studio 3D) y cantidades iguales (0,6 µM) de cebadores de Microsynth (Balgach, Suiza).

BRAF directo: 5'CTACTGTTTTCCTTACTTACTACACCTCAGA  
 inverso: 5'ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT  
 NRAS directo: 5'GGTGAAACCTGTTTGTGGACAT  
 inverso: 5'TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT

Adicionalmente, se usaron sondas de Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.):

BRAF V600E: 6-VIC-TAGCTACAGAGAAATC-MGB

NRAS Q61K: 6-FAM-CAGCTGGAAAAGAA-MGB

Se diluyó el ADN hasta una concentración final de 4 µM; la concentración de ADN varió de 0,3 ng/µl a 6,6 ng/µl

dependiendo de la frecuencia esperada de la secuencia diana. Las condiciones de carga de chips y termociclos se realizaron de acuerdo con las instrucciones de Life Technologies. Se realizó la medición de fluorescencia usando Quant Studio 3D y se procesó la salida por el programa informático QuantStudio 3D AnalysisSuite. Se corrigieron con Poisson los valores de fluorescencia y se calcularon copias por  $\mu\text{l}$ . Se clasificó cada muestra que mostró una precisión mayor de un 15 % como negativa para la mutación específica.

#### Secuenciación de Sanger

Después de la amplificación de ADN, se añadieron 12 ng de cada producto de PCR, 5x tampón de secuenciación Terminator (Applied Biosystems), cebadores 1,5  $\mu\text{M}$  (Microsynth)

BRAF directo: 5'CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG  
 inverso: 5'CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG  
 NRAS directo: 5'GATAGGCAGAAATGGGCCTTGA  
 inverso: 5'ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC

y 2  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción BigDye Ready (Applied Biosystems) hasta una mezcla de reacción de 10  $\mu\text{l}$ . Se realizaron las condiciones de ciclo como sigue: 60 s a 96 °C se siguieron de 16 ciclos durante 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C y 240 s a 60 °C en un ciclador Lab Cycler (Sensoquest, Gotinga, Alemania). Se purificaron las muestras usando el kit de purificación Big Dye XTerminator (Applied Biosystems) de acuerdo con el manual del fabricante. Se llevó a cabo la secuenciación de Sanger posterior usando el analizador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se realizó el análisis con el programa informático Variant Reporter (Life Technologies) donde cada mutación en la secuencia que superó el valor umbral de un 25 % se clasificó como positiva.

#### Separación celular

Para realizar la separación de células individuales de células de melanoma, se sedimentaron las células de un matraz de cultivo celular T75 confluentes y se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de tampón FACS (FBS al 1 %, EDTA 5 mM pH 8, NaN3/ddH2O al 0,01 % en PBS). Se incubaron las células durante 20 minutos a 4 °C con los siguientes anticuerpos fotosensibles: anti-MCSP humano-FITC (Miltenyi Biotec 130-098-794, Bergisch Gladbach Alemania), diluido 1:20 en tampón FACS. Antifibroblastos humanos/PE epitelial (ABIN319868, Aachen Alemania), diluidos 1: 200 en tampón FACS. Después del lavado, se resuspendieron las células en 200  $\mu\text{l}$  de tampón FACS y se separaron usando el Aria IIb (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.).

#### Aislamiento de células de melanoma de PBMC

Se usaron  $1 \times 10^7$  PBMC para aislar células de melanoma con el kit de aislamiento celular CD56+CD16+NK de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una desviación del manual en la última etapa, que es una selección positiva para linfocitos NK, mientras que el flujo continuo contuvo las células de melanoma; se agotaron otras células inmunitarias distintas de linfocitos NK en la primera etapa. Después de obtener el flujo continuo que contenía todas las células no inmunitarias, se sedimentaron las células durante 5 minutos a 1500 rpm y el aislamiento de ADN se siguió como con las muestras sin parafina informadas aquí.

#### Análisis filogénico:

Se construyó la filogenia de máxima parsimonia, bayesiana y máxima verosimilitud (ML) con la versión POSIX-threads de RAXML v8.0.19 (7). Se usó una corrección de sesgo de verificación y un modelo de sustitución general reversible en el tiempo (GTR) que representa la heterogeneidad de tasa entre sitios usando la distribución  $\Gamma$  y cuatro categorías de tasa (modelo ASC\_GTRGAMMA) para el cálculo del árbol óptimo. Se evaluó el soporte de nódulo con 100 pseudorreplacados de muestreo no paramétricos que filtran el árbol ML óptimo a través de los árboles de muestreo. Por lo tanto, los valores de soporte de nódulo indican la proporción porcentual de árboles de muestreo que contenían una rama internodular dada.

El diagnóstico de variantes para un clado dado se define como existente únicamente en ese clado y en ningún otro lugar para esa posición. Todas las hojas que emanan del nódulo en cuestión deben compartir una variante y todas las otras hojas deben contener un carácter diferente para que una variante sea de diagnóstico. Por lo tanto, las variantes de diagnóstico también se pueden denominar apomorfía.

#### Cultivo celular

Se obtuvieron cultivos celulares de biopsias de pacientes de melanoma cutáneo y metástasis de melanoma después del consentimiento informado a través del programa de biobanco de la universidad de acuerdo con los números de aprobación ética 647 y 800. Se cortó material tumoral en trozos pequeños y se digirió con dispasa 2,4 U/ml (Roche, Basilea, Suiza) en RPMI1640 (Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.)) durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente, se centrifugó el material (1500 rpm/5 min) y se retiró el sobrenadante. Después de esto, el sedimento se disolvió en

cloruro de calcio 0,005 M dihidrato y colagenasa 62,5 U/ml (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) en solución salina tamponada con Tris (pH 7,4) y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, el material se centrifugó (1500 rpm/5 min) y se retiró el sobrenadante. Se añadió solución de parada (base Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M y EDTA 0,01 M en H<sub>2</sub>O, pH final 7,4) durante 10 minutos. Después de esto, se lavó dos veces el sedimento con RPMI1640 y finalmente se cultivaron las células en RPMI1640 complementado con L-glutamina 5 mM (Biochrom, Berlín, Alemania), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) y FCS al 10 % (Gibco (Carlsbad, CA, EE. UU.)) a 37 °C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de varios pasos, se confirmó el cultivo de melanoma por inmunohistoquímica y se evaluó el estado de mutación de las células.

10 *Ensayo de viabilidad celular*

Se evaluó la sensibilidad celular para diferentes inhibidores de molécula pequeña para los cultivos celulares M980513 (BRAfV600E, NRASWT), M000921 (BRAfV600E, NRASWT), M010817 (BRAfWT, NRASQ61R) y M121224 (BRAfV600E, NRASQ61K). Se sembraron 1x10<sup>4</sup> células y se trataron durante 72 horas con diferentes concentraciones de un inhibidor de BRAf (PLX4032, LGX818 o GSK2118436), un inhibidor de MEK (MEK162), un inhibidor de ERK (SCH772984) o bien una combinación de un inhibidor de BRAf y MEK (LGX818+MEK162). Se usó tratamiento con DMSO como control. Después de 72 horas, se retiró el medio y se añadió RPMI1640 fresco complementado con FCS al 10 % y reactivo MTT al 8 % (Sigma, 5 mg/ml en PBS), y se incubaron las células a 37 °C. Después de 1 hora, se retiró RPMI1640 con reactivo MTT y se añadieron SDS al 10 % (Sigma) e isopropanol al 95 %/ácido fórmico al 5 % (Sigma) (proporción 1:1). Después de 5 min de incubación a 37 °C, se midió la absorbancia a 595 nm (referencia 620 nm) usando un lector de microplacas.

*Inmunoelctrotransferencia*

Se obtuvo proteína total lavando las células dos veces con PBS helado y posterior lisis en tampón RIPA (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), Triton X-100 al 1 % (Sigma), NaCl 137 mM, glicerol al 10 % e inhibidores de la proteasa (Roche). Se midió la concentración de la proteína con el ensayo de proteínas Bio-Rad Dc (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó SDS-Page para separar las proteínas, después de esto se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se sondaron las membranas con un anticuerpo anti-pERK de conejo (Cell Signaling, producto n.º 4376S) y un anticuerpo anti-GAPDH de conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido, producto n.º ab9385), seguido de anti-IgG de conejo caprino conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz, producto n.º sc-2030) Se detectaron los anticuerpos unidos por quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). Posteriormente, se midió la intensidad de banda usando el programa informático ImageJ ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)) y se corrigió la intensidad de banda pERK para la intensidad de banda GAPDH correspondiente.

*Análisis de qPCR*

Se extrajo ARN total de cultivos celulares usando TRIzol (Life Technologies), y después se transcribió 1 µg de ARN en ADNc con el sistema Reverse Transcription System (A3500, Promega, Madison, WI, EE. UU.). Para q-PCR, se usó el ViiA7 (Life Technologies), y la mezcla de reacción consistió en 5 µl de SYBR Green (Roche), 3,5 µl de H<sub>2</sub>O, 0,5 µl de cebador directo + inverso (10 µM) (Microsynth) y 1 µl de ADNc (50 ng)

Las condiciones de ciclo fueron: 10 min de 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 58 °C durante 30 segundos, terminando con 15 segundos de 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C.

Se calcularon las diferencias de expresión génica de los genes diana pERK, DUSP6, SPRY2 y EGR1 (PMID19251651), usando el procedimiento  $\Delta\Delta CT$ . Se usó GAPDH como gen constitutivo.

*Secuencia de cebador*

GAPDH directo: GAA GGT GAA GTT CGG AGT C  
inverso: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

DUSP6 directo: GAA ATG GCG ATC AGC AAG ACG  
inverso: CGA CGA CTC GTA TAG CTC CTG

SPRY2 directo: ATC AGA TCA GAG CCA TCC GAA  
inverso: TGG AGT CTC TCG TGT TTG TGC

EGR1 directo: GGT CAG TGG CCT AGT GAG C  
inverso: TGCTGTCGTTGGATGGCAC



**Referencias citadas a través de la solicitud**

1. Bollag G, Hirth P, Tsai J, *et al.* Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 2010;467(7315):596-599.
2. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-2516.
3. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, *et al.* Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(9):809-819.
4. Aplin AE, Kaplan FM, Shao Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2011;131(9):1817-1820.
5. Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, *et al.* Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat Genet*. 2006;38(4):468-473.
6. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet*. 2012;44(9):1006-1014.
7. Takata M, Morita R, Takehara K. Clonal heterogeneity in sporadic melanomas as revealed by loss-of-heterozygosity analysis. *Int J Cancer*. 2000;85(4):492-497.
8. Wilmott JS, Tembe V, Howle JR, *et al.* Intratumoral molecular heterogeneity in a BRAF-mutant, BRAF inhibitor-resistant melanoma: a case illustrating the challenges for personalized medicine. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(12):2704-2708.
9. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, *et al.* The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov*. 2014;4(1):94-109.
10. Nazarian R, Shi H, Wang Q, *et al.* Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010;468(7326):973-977.
11. Shi H, Hugo W, Kong X, *et al.* Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov*. 2014;4(1):80-93.
12. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012;150(2):251-263.
13. Nekrutenko A, Makova KD, Li WH. The K(A)/K(S) ratio test for assessing the protein-coding potential of genomic regions: an empirical and simulation study. *Genome Res*. 2002;12(1):198-202.
14. Fernandez L, Milne R, Bravo J, *et al.* MC1R: three novel variants identified in a malignant melanoma association study in the Spanish population. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1659-1664.
15. Berwick M, Macarthur J, Orlow I, *et al.* MITF E318K's effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27(3):485-488.
16. Li J, Lupat R, Amarasinghe KC, *et al.* CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics*. 2012;28(10):1307-1313.
17. Magi A, Tattini L, Cifola I, *et al.* EXCAVATOR: detecting copy number variants from whole-exome sequencing data. *Genome Biol*. 2013;14(10):R120.
18. Schwarz RF, Trinh A, Sapos B, Brenton JD, Goldman N, Markowitz F. Phylogenetic Quantification of Intra-tumour Heterogeneity. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(4):e1003535.
19. Flaherty P, Natsoulis G, Muralidharan O, *et al.* Ultrasensitive detection of rare mutations using next-generation targeted resequencing. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(1):e2.
20. Gerstung M, Beisel C, Rechsteiner M, *et al.* Reliable detection of subclonal single-nucleotide variants in tumour cell populations. *Nat Commun*. 2012;3:811.
21. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, *et al.* The life history of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):994-1007.
22. Guo J, Si L, Kong Y, *et al.* Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2904-2909.

23. Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, *et al.* MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013;14(3):249-256.
- 5 24. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, *et al.* MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(48):20411-20416.
25. Wagle N, Emery C, Berger MF, *et al.* Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol.* 2011;29(22):3085-3096.
- 10 26. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, *et al.* Loss of NF1 in Cutaneous Melanoma Is Associated with RAS Activation and MEK Dependence. *Cancer Res.* 2014;74(8):2340-2350.
- 15 27. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, *et al.* RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature.* 2011;480(7377):387-390.
28. Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, *et al.* Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012.
- 20 29. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
- 25 30. McKenna A, Hanna M, Banks E, *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303.
31. Van der Auwera GA. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. En: G. A. C, ed. *Current Protocols in Bioinformatics: Wiley Online Library*; 2013.
- 30 32. DePristo MA, Banks E, Poplin R, *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011;43(5):491-498.
33. Andrews S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- 35 34. Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
- 35 35. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760.
- 40 36. Picard. <http://picard.sourceforge.net/>.
37. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164.
- 45 38. Li H, Handsaker B, Wysoker A, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079.
- 50 39. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841-842.
40. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. 2007; <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- 55 41. Kim B, Lee B, Seo J. Visualizing Set Concordance with Permutation Matrices and Fan Diagrams. *Interact Comput.* 2007;19(5):630-643.
42. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013; 14(2):178-192.
- 60 43. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24-26.
44. Krzywinski M, Schein J, Birol I, *et al.* Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 2009;19(9):1639-1645.
- 65

45. Sensi, M., Nicolini, G., Petti, C., *et al.* Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene*, 2006, 25(24), 3357-3364.
- 5 46. Thumar, J *et al.* (2014). MEK targeting in N-RAS mutated metastatic melanoma. *Molecular cancer*, 13(1), 45.
47. Greger, J. G *et al.* (2012). Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. *Molecular cancer therapeutics*, 11(4), 909-920.
- 10 48. Romano, E. *et al.* (2013). Identification of multiple mechanisms of resistance to vemurafenib in a patient with BRAFV600E-mutated cutaneous melanoma successfully rechallenged after progression. *Clinical Cancer Research*, 19(20), 5749-5757.
- 15 49. Kaplan, F. M. *et al.* . (2012). SHOC2 and CRAF mediate ERK1/2 reactivation in mutant NRAS-mediated resistance to RAF inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41797-41807.
50. Documento WO 2012/068562 A2
51. Documento WO 2012/068468 A1
- 20 52. Documento US 2014/018405 A1
53. Documento US 2014/018372 A1
- 25 54. Documento WO 2012/058532 A2
55. Documento WO 2014/052613 A2

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Universität Zürich	
5	<120>	Medios y procedimientos para identificar a un paciente que tiene un cáncer positivo para BRAF como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y como un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK	
	<130>	RD32112EP	
10	<160>	28	
	<170>	PatentIn versión 3.3	
15	<210>	1	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
20	<400>	1	
		<b>ctaagaggaa agatgaagta ctatg</b>	<b>25</b>
	<210>	2	
	<211>	23	
25	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	2	
		<b>ctagtaactc agcagcatct cag</b>	<b>23</b>
30	<210>	3	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
35	<400>	3	
		<b>ctactgtttt cctttactta ctacacctca ga</b>	<b>32</b>
	<210>	4	
40	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	4	
45		<b>atccagacaa ctgttcaaac tgat</b>	<b>24</b>
	<210>	5	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
50	<213>	Homo sapiens	
	<400>	5	
		<b>ctactgtttt cctttactta ctacacctca ga</b>	<b>32</b>
55	<210>	6	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
60	<400>	6	
		<b>atccagacaa ctgttcaaac tgat</b>	<b>24</b>
	<210>	7	
	<211>	23	

ES 2 751 925 T3

	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 7		
5	<b>ggtgaaacct gtttgttgga cat</b>		<b>23</b>
	<210> 8		
	<211> 24		
	<212> ADN		
10	<213> Homo sapiens		
	<400> 8		
	<b>tgtattggtc tctcatggca ctgt</b>		<b>24</b>
15	<210> 9		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 9		
	<b>gataggcaga aatgggcttg a</b>		<b>21</b>
	<210> 10		
	<211> 25		
25	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 10		
	<b>atcatccttt cagagaaaat aatgc</b>		<b>25</b>
30	<210> 11		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 11		
	<b>ggtgaaacct gtttgttgga cat</b>		<b>23</b>
	<210> 12		
40	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 12		
45	<b>tgtattggtc tctcatggca ctgt</b>		<b>24</b>
	<210> 13		
	<211> 766		
	<212> PRT		
50	<213> Homo sapiens		
	<400> 13		

ES 2 751 925 T3

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly  
20 25 30

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp  
35 40 45

Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu  
50 55 60

Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu  
65 70 75 80

Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu  
85 90 95

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser  
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu  
115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val  
130 135 140

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe  
145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr  
165 170 175

Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro  
180 185 190

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile  
195 200 205

Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val  
210 215 220

Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys  
225 230 235 240

ES 2 751 925 T3

Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe  
 245 250 255  
 Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys  
 260 265 270  
 Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu  
 275 280 285  
 Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu  
 290 295 300  
 Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro  
 325 330 335  
 Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp  
 340 345 350  
 His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn  
 355 360 365  
 Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg  
 370 375 380  
 Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala  
 385 390 395 400  
 Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu  
 405 410 415  
 Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser  
 420 425 430  
 Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp  
 435 440 445  
 Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly  
 450 455 460  
 Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val  
 465 470 475 480  
 Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln  
 485 490 495

ES 2 751 925 T3

Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn  
500 505 510

Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val  
515 520 525

Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile  
530 535 540

Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr  
545 550 555 560

Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp  
565 570 575

Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile  
580 585 590

Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His  
595 600 605

Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val  
610 615 620

Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr  
625 630 635 640

Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr  
645 650 655

Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly  
660 665 670

Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala  
675 680 685

Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg  
690 695 700

Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser  
705 710 715 720

Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala  
725 730 735

Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys  
740 745 750



ES 2 751 925 T3

Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His  
 755 760 765

5 <210> 14  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys  
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr  
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly  
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr  
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys  
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr  
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val  
 100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys  
 115 120 125

Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr  
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val  
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp  
 165 170 175

Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met  
 180 185

10  
 15 <210> 15  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 751 925 T3

	<400> 15		
	<b>tagctacaga gaaatc</b>		<b>16</b>
5	<210> 16		
	<211> 14		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
10	<400> 16		
	<b>cagctggaaa agaa</b>		<b>14</b>
15	<210> 17		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 17		
	<b>ctaagaggaa agatgaagta ctatg</b>		<b>25</b>
25	<210> 18		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 18		
	<b>ctagttaactc agcagcatct cag</b>		<b>23</b>
35	<210> 19		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 19		
	<b>gatagggcaga aatgggcttg a</b>		<b>21</b>
45	<210> 20		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 20		
	<b>atcatccttt cagagaaaat aatgc</b>		<b>25</b>
55	<210> 21		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
60	<400> 21		
	<b>gaaggtgaag ttcggagtc</b>		<b>19</b>
65	<210> 22		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
70	<400> 22		
	<b>gaagatgggtg atgggatttc</b>		<b>20</b>
75	<210> 23		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		

ES 2 751 925 T3

	<400> 23		
	<b>gaaatgggoga tcagcaagac g</b>		<b>21</b>
5	<210> 24		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
10	<400> 24		
	<b>cgacgaactcg tatagctcct g</b>		<b>21</b>
	<210> 25		
	<211> 21		
15	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 25		
	<b>atcagatcag agccatccga a</b>		<b>21</b>
20	<210> 26		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 26		
	<b>tggagtctct cgtgtttgtg c</b>		<b>21</b>
	<210> 27		
	<211> 19		
30	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 27		
35	<b>ggtcagtggc ctagtgagc</b>		<b>19</b>
	<210> 28		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 28		
	<b>tgctgtcgtt ggatggcac</b>		<b>19</b>

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar si un sujeto que padece un cáncer positivo para BRAF, en el que dicho cáncer positivo para BRAF está compuesto de una población celular derivada de un clon de célula individual, es o no un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF, y/o es un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK que comprende las etapas de:
- (a) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos el gen NRAS en una muestra del sujeto;
- (b) identificar al sujeto como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK si se ha determinado la al menos una mutación en el gen NRAS.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende además determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en el gen BRAF, con lo que la presencia de la dicha al menos una mutación identifica además al sujeto como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el cáncer positivo para BRAF es cáncer de melanoma.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células de la población celular derivada de un clon de célula individual contienen en su genoma al menos una mutación en el gen BRAF y al menos una mutación en el gen NRAS.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inhibidor de BRAF es un inhibidor de molécula pequeña de la actividad de BRAF y, preferentemente, LGX818, PLX4032 y/o GSK2118436.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el dicho inhibidor de MAPK/ERK es un inhibidor de molécula pequeña de la actividad de MEK o de ERK y, preferentemente, GSK1120212, MEK162, y dicho inhibidor de la actividad de ERK es SCH772984.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la mutación del gen NRAS da como resultado una sustitución aminoacídica en una posición correspondiente al aminoácido 61 del exón 2 de la proteína NRAS humana.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha sustitución aminoacídica es una sustitución de glutamina a lisina (Q61K), una sustitución de glutamina a arginina (Q61R) o una glutamina a leucina (Q61L).
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la mutación del gen BRAF da como resultado una sustitución aminoacídica en una posición correspondiente al aminoácido 600 del exón 15 de la proteína BRAF humana.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha sustitución aminoacídica es una sustitución de valina a glutamato (V600E), una sustitución de valina a lisina (V600K), una sustitución de valina a arginina (V600R), o una sustitución de valina a ácido aspártico (V600D).
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la presencia de la al menos una mutación en el exón 2 de la subunidad catalítica del ácido nucleico NRAS se determina
- a) poniendo en contacto ácidos nucleicos en la muestra del sujeto con uno o más de los oligonucleótidos específicos de locus seleccionados del grupo que consiste en: GGTGAAACCTGTTTGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10);
- b) incubando la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica del oligonucleótido a su secuencia diana dentro de un ácido nucleico NRAS;
- c) detectando dicha hibridación; y
- d) determinando la al menos una mutación basada en dicha hibridación detectada en la etapa c).
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la etapa b) comprende además la etapa de generar un producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico NRAS amplificando el ácido nucleico NRAS en la muestra con uno o ambos de los siguientes cebadores oligonucleotídicos: cebador oligonucleotídico directo que

tiene SEQ ID NO:11 y cebador oligonucleotídico inverso que tiene SEQ ID NO:12.

13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que la presencia de la al menos una mutación en el exón 15 de la subunidad catalítica del ácido nucleico BRAF se determina

a) poniendo en contacto ácidos nucleicos en la muestra del sujeto con uno o más de los oligonucleótidos específicos de locus seleccionados del grupo que consiste en: CTAAGAGGAAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4);

b) incubando la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica del oligonucleótido a su secuencia diana dentro de un ácido nucleico BRAF;

c) detectando dicha hibridación; y

d) determinando la al menos una mutación basada en dicha hibridación detectada en la etapa c).

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la etapa b) comprende además la etapa de generar un producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico BRAF amplificando el ácido nucleico NRAS en la muestra con uno o ambos de los siguientes cebadores oligonucleotídicos: cebador oligonucleotídico directo que tiene SEQ ID NO:5 y cebador oligonucleotídico inverso que tiene SEQ ID 6.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho procedimiento comprende además recomendar al sujeto la administración de un fármaco inhibidor de MAPK/ERK si el sujeto se ha identificado como un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF y un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK.

16. Un inhibidor de MAPK/ERK para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer positivo para BRAF en el que dicho cáncer positivo para BRAF está compuesto de una población celular derivada de un clon de célula individual, con lo que se ha descubierto que dicho cáncer tiene al menos una mutación en el gen NRAS y al menos una mutación en el gen BRAF.

17. Un procedimiento para diagnosticar cáncer en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece cáncer, en el que dicho cáncer se deriva de un clon de célula individual que comprende:

a) generar uno o más productos de amplificación que contienen secuencias diana dentro del ácido nucleico BRAF y el ácido nucleico NRAS amplificando los ácidos nucleicos en la muestra con dos de los siguientes oligonucleótidos cebadores: CTAAGAGGAAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y/o ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4) y con dos de los siguientes oligonucleótidos cebadores: GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y/o ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10);

b) poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más de los siguientes oligonucleótidos BRAF específicos de mutación: CTAAGAGGAAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y/o ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4);

y con uno o más de los siguientes oligonucleótidos NRAS específicos de localización: GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y/o ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10);

c) incubar la muestra en condiciones que permiten la hibridación específica de los oligonucleótidos a sus respectivas secuencias diana dentro del ácido nucleico BRAF y el ácido nucleico NRAS;

d) detectar dicha hibridación, con lo que se diagnostica el cáncer.

18. Uso de un kit para diagnosticar cáncer por un procedimiento como se define en la reivindicación 17, en el que dicho cáncer se deriva de un clon de célula individual y en el que dicho kit comprende los siguientes oligonucleótidos: CTAAGAGGAAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT (SEQ ID NO:4); GGTGAAACCTGTTTGGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10).

- 5 19. Uso de un dispositivo para diagnosticar cáncer por un procedimiento como se define en la reivindicación 17 en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece cáncer, en el que dicho cáncer se deriva de un clon de célula individual, y/o para identificar si un sujeto que padece un cáncer positivo para BRAF, en el que dicho cáncer positivo para BRAF está compuesto de una población celular derivada de un clon de célula individual, es o no un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de BRAF, y/o es un paciente que responde al tratamiento con un inhibidor de MAPK/ERK que comprende:
- 10 (i) una unidad de análisis que comprende uno o más de los siguientes oligonucleótidos BRAF específicos de mutación: CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG (SEQ ID NO:1); CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG (SEQ ID NO:2); CTACTGTTTTCCTTTACTTACTACACCTCAGA (SEQ ID NO:3); y/o ATCCAGACAACGTGTCAAACGTGAT (SEQ ID NO:4) y uno o más de los siguientes oligonucleótidos NRAS específicos de localización: GGTGAAACCTGTTTGTGGACAT (SEQ ID NO:7); TGTATTGGTCTCTCATGGCACTGT (SEQ ID NO:8); GATAGGCAGAAATGGGCTTGA (SEQ ID NO:9); y/o ATCATCCTTTCAGAGAAAATAATGC (SEQ ID NO:10) y
- 15 (ii) un detector que puede detectar la hibridación específica de los ácidos nucleicos BRAF y NRAS a dichos oligonucleótidos.
- 20 20. Un procedimiento de evaluación de la reactividad al tratamiento dirigido en un sujeto que comprende:
- a) proporcionar una muestra del sujeto, en el que dicha muestra se deriva de un clon de célula individual;
- b) someter a prueba la muestra para determinar la presencia de mutaciones en los genes BRAF y NRAS, en el que someter a prueba se realiza por uno de los procedimientos seleccionados de un grupo que consiste en amplificación selectiva, hibridación de sonda o secuenciación de ácido nucleico
- 25 c) si se detectan mutaciones en los genes NRAS y BRAF, detectar la reactividad a un inhibidor de MAPK/ERK y la no reactividad a un inhibidor de BRAF.
- 30 21. Un procedimiento de evaluación del cáncer en un sujeto que comprende:
- a) proporcionar una muestra del sujeto que contiene ácidos nucleicos en el que dicha muestra se deriva de un clon de célula individual,
- 35 b) poner en contacto los ácidos nucleicos en la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para mutaciones en los genes BRAF y NRAS,
- c) si se detectan mutaciones en los genes NRAS y BRAF, evaluar el cáncer como reactivo a un inhibidor de MAPK/ERK y no reactivo a un inhibidor de BRAF.
- 40

Fig. 1

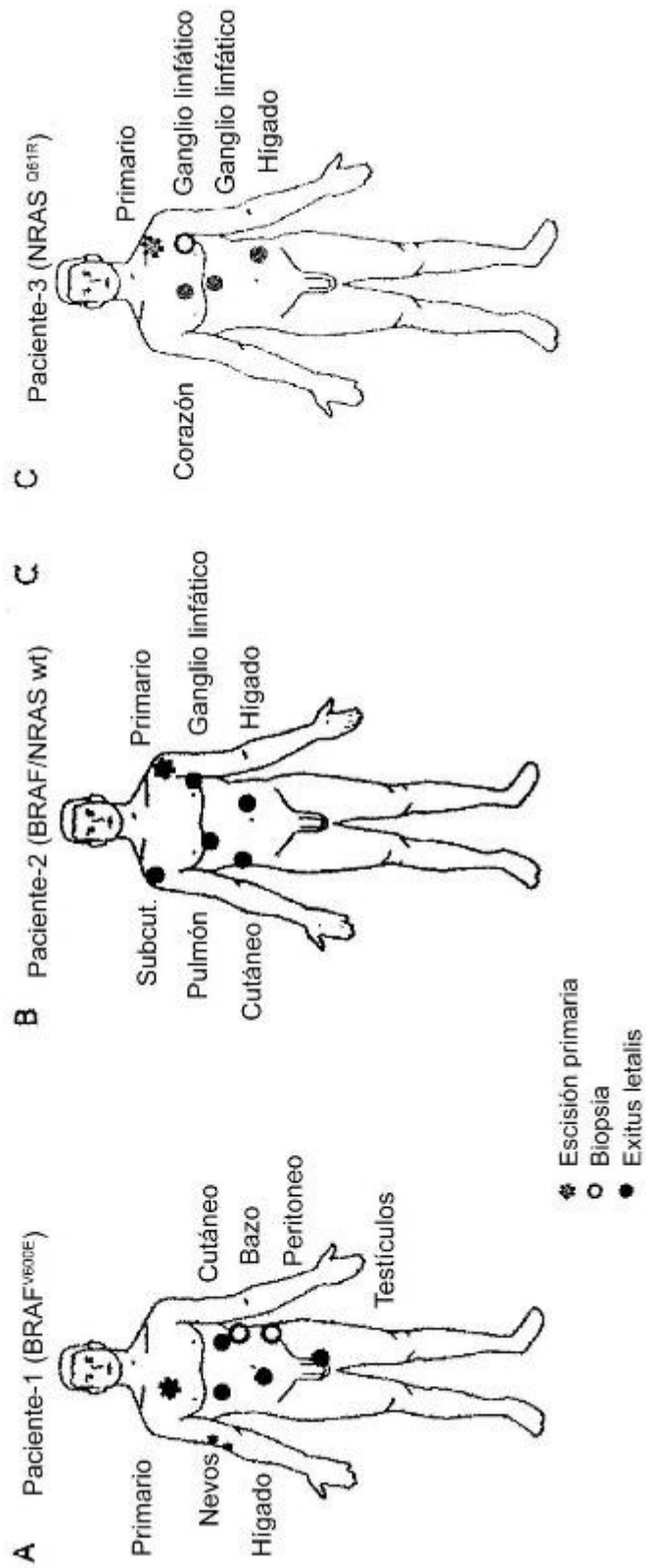


Fig. 1 cont.

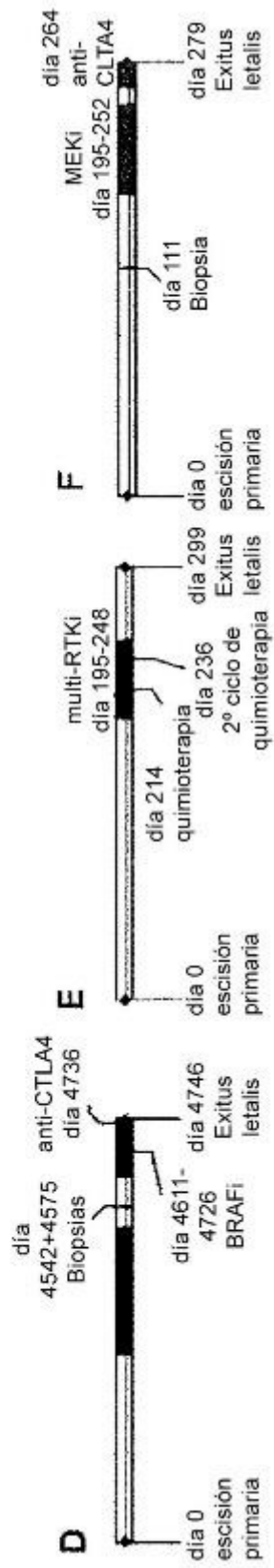






Fig. 1 cont.

Fig. 1 cont.

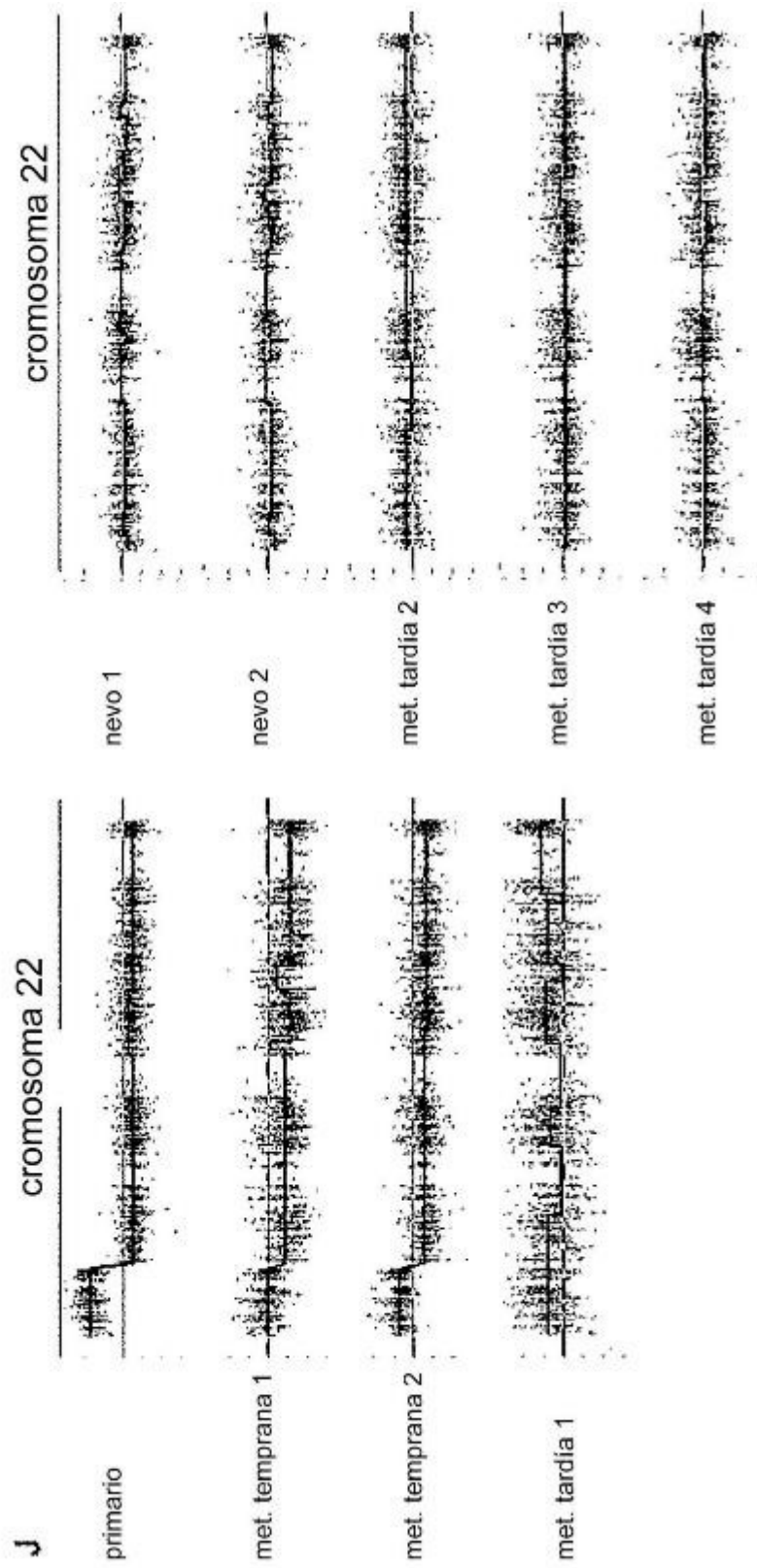


Fig. 2

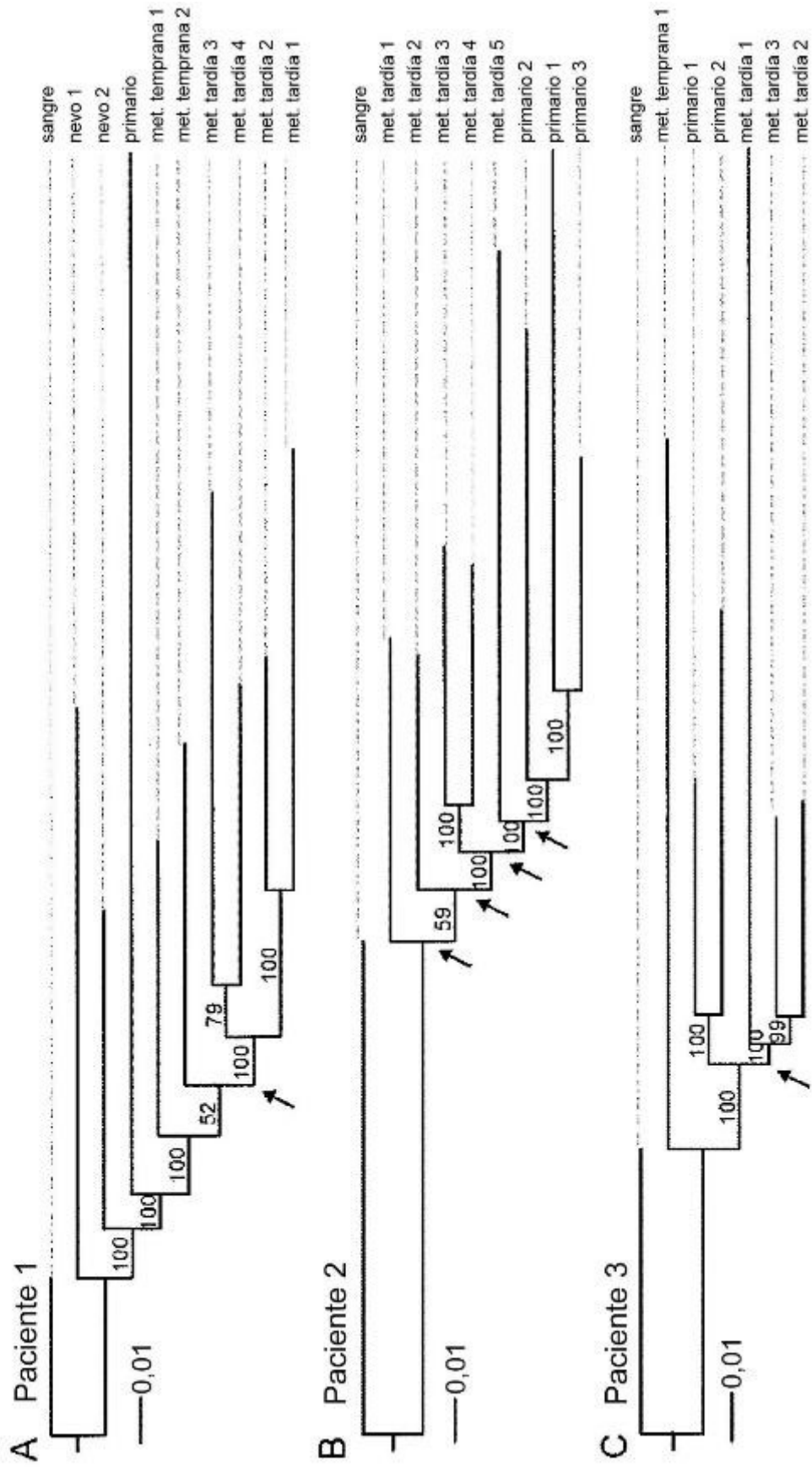


Fig. 3

Muestra	Copias/microlitro (BRAF <sup>V600E</sup> )	IC Copias/microlitro (BRAF <sup>V600E</sup> )	Precisión (BRAF <sup>V600E</sup> )	Copias/microlitro (NRAS <sup>Q61K</sup> )	IC Copias/microlitro (NRAS <sup>Q61K</sup> )	Precisión (NRAS <sup>Q61K</sup> )
control neg.	34,64	28,557 -- 42,02	21,30 %	27,898	22,497 -- 34,594	24,00 %
nevo 1	9,247	7,811 -- 10,946	18,38 %	5,882	4,761 -- 7,266	23,53 %
primario	356,17	339,28 -- 373,9	4,98 %	12,887	10,067 -- 16,496	28,01 %
met. temprana 2	775,6	754,86 -- 796,91	2,75 %	5,501	4,093 -- 7,392	34,38 %
met. tardía 1	174,2	165,22 -- 183,67	5,44 %	8,945	7,112 -- 11,252	25,78 %
met. tardía 2	273,99	260,34 -- 288,36	5,24 %	18,581	15,332 -- 22,519	21,19 %
met. tardía 4	35,058	32,285 -- 38,068	8,59 %	3,789	2,954 -- 4,86	28,26 %
met. tardía 5	57,048	51,101 -- 63,686	11,64 %	12,151	9,581 -- 15,411	26,83 %
met. tardía 6	7469,5	7328,9 -- 7612,7	1,92 %	12251	12017 -- 12490	1,95 %

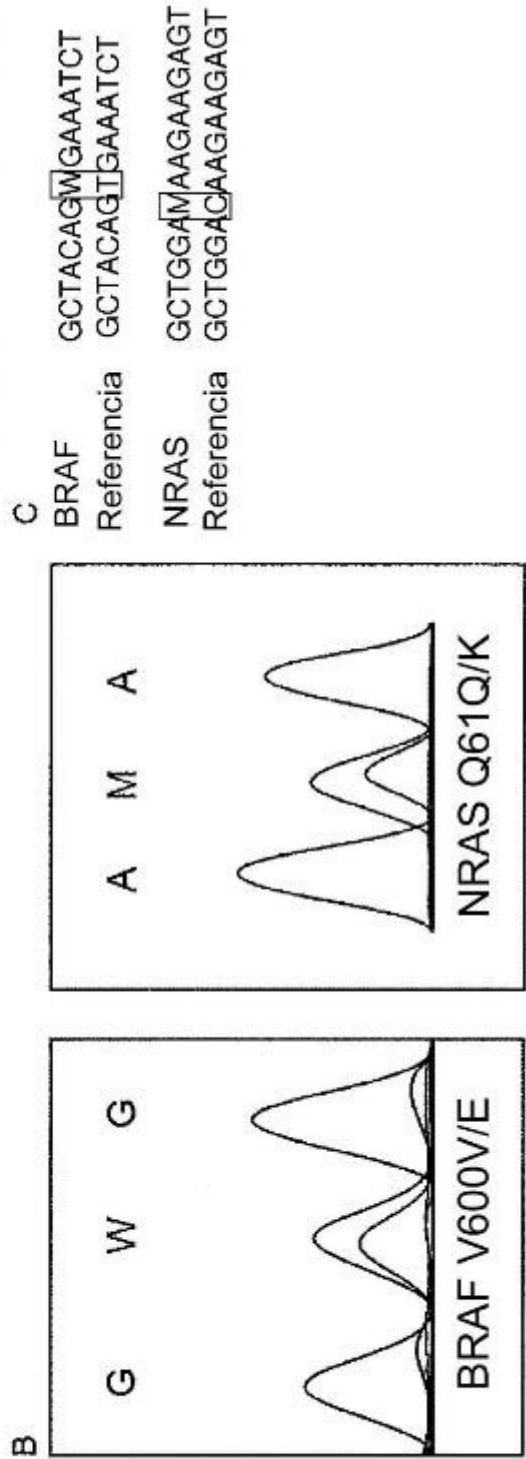


Fig. 4

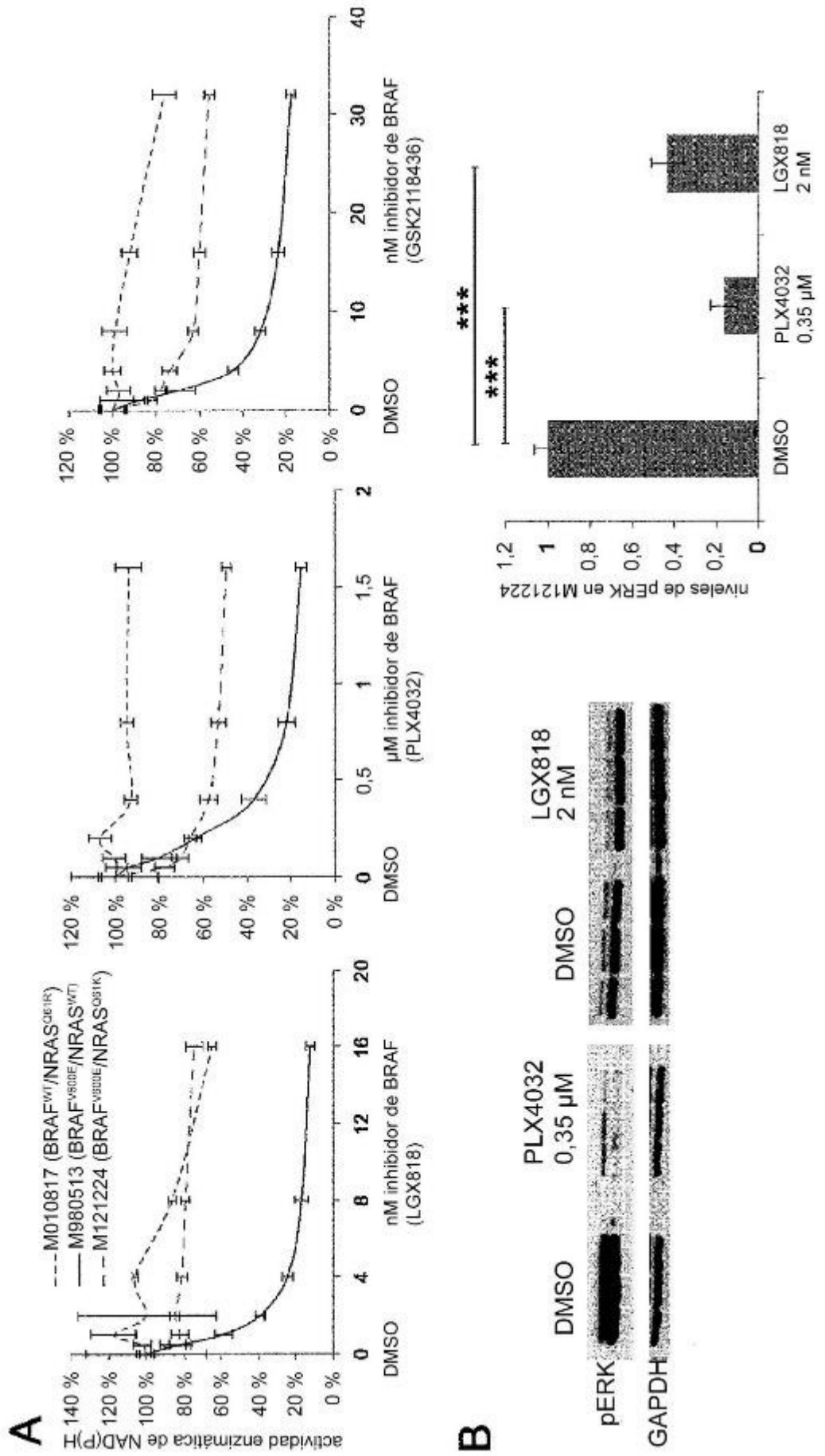


Fig. 4 cont.

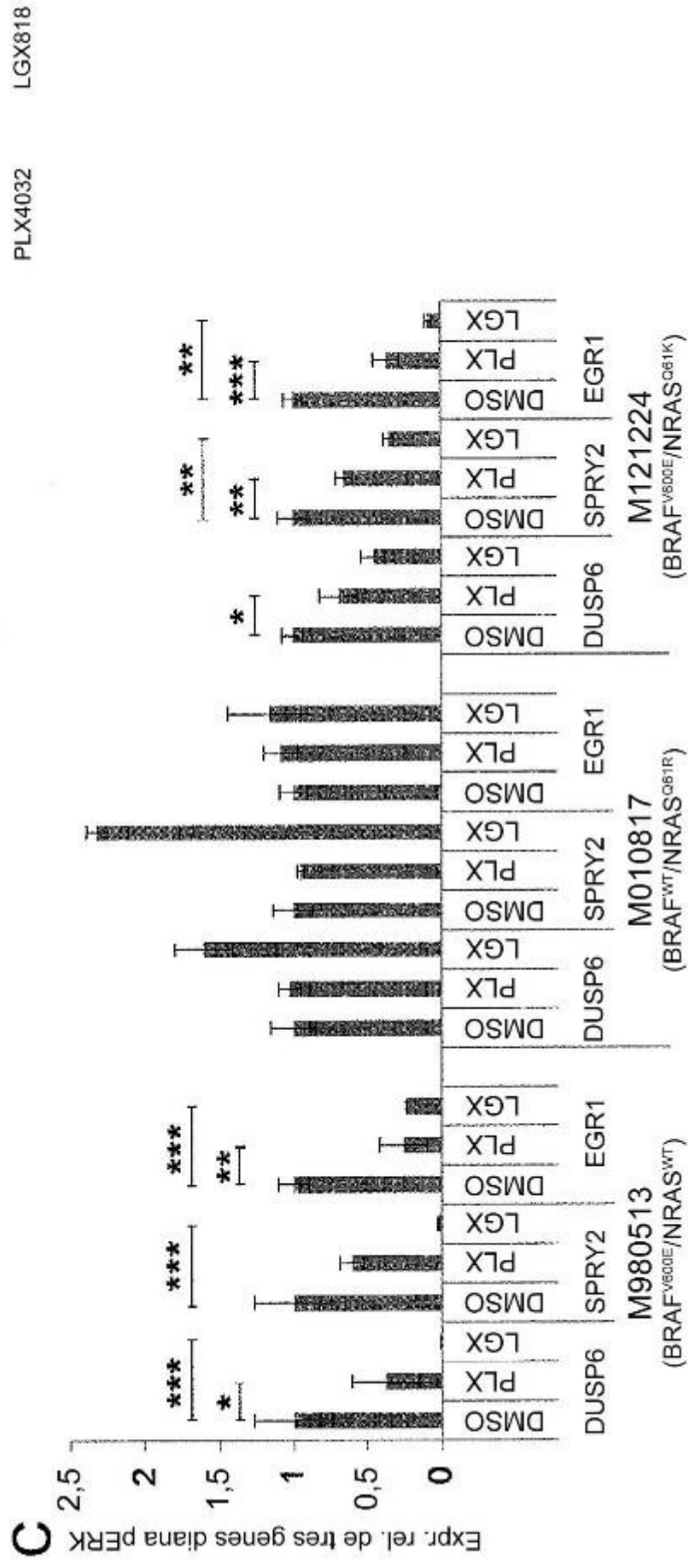


Fig. 4 cont.

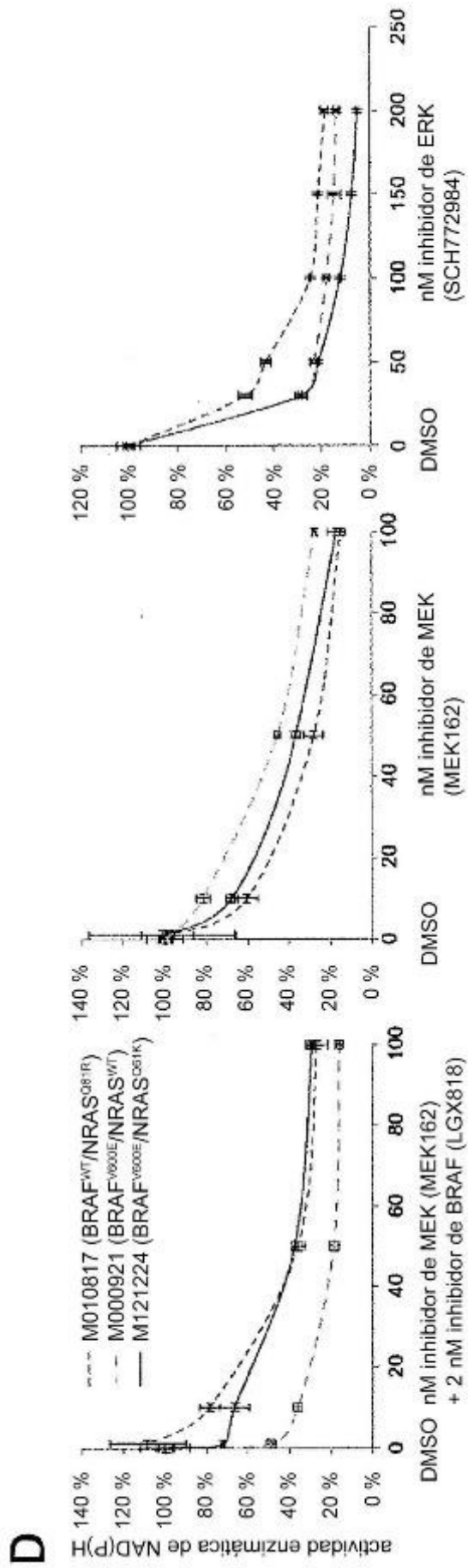


Fig. 5

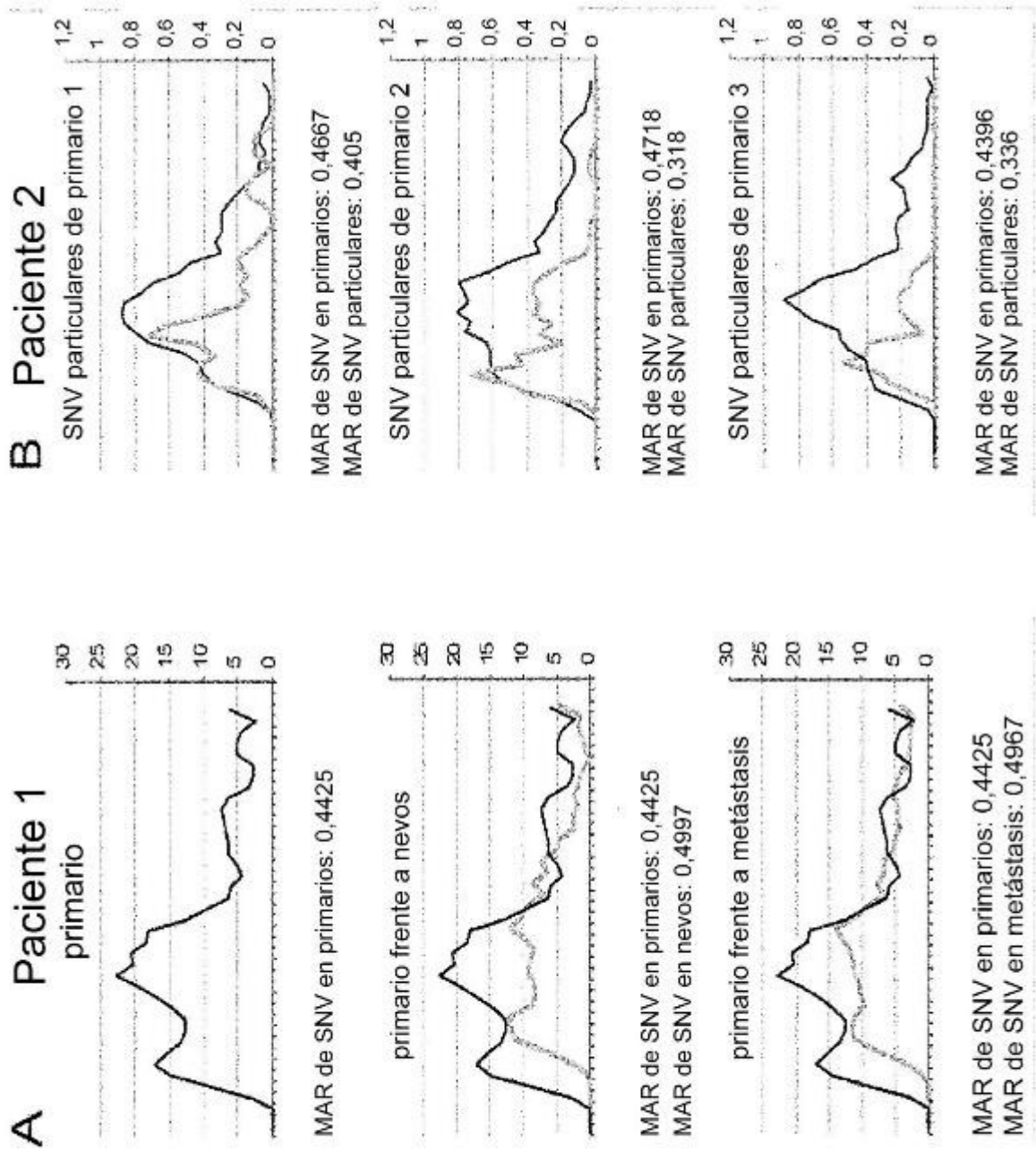
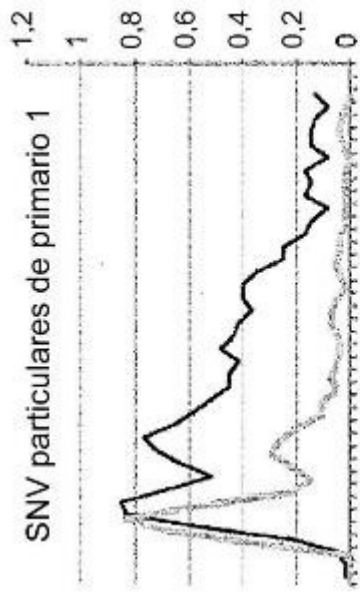


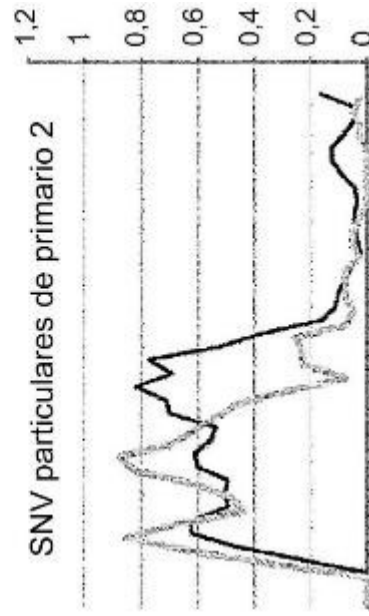


Fig. 5 cont.

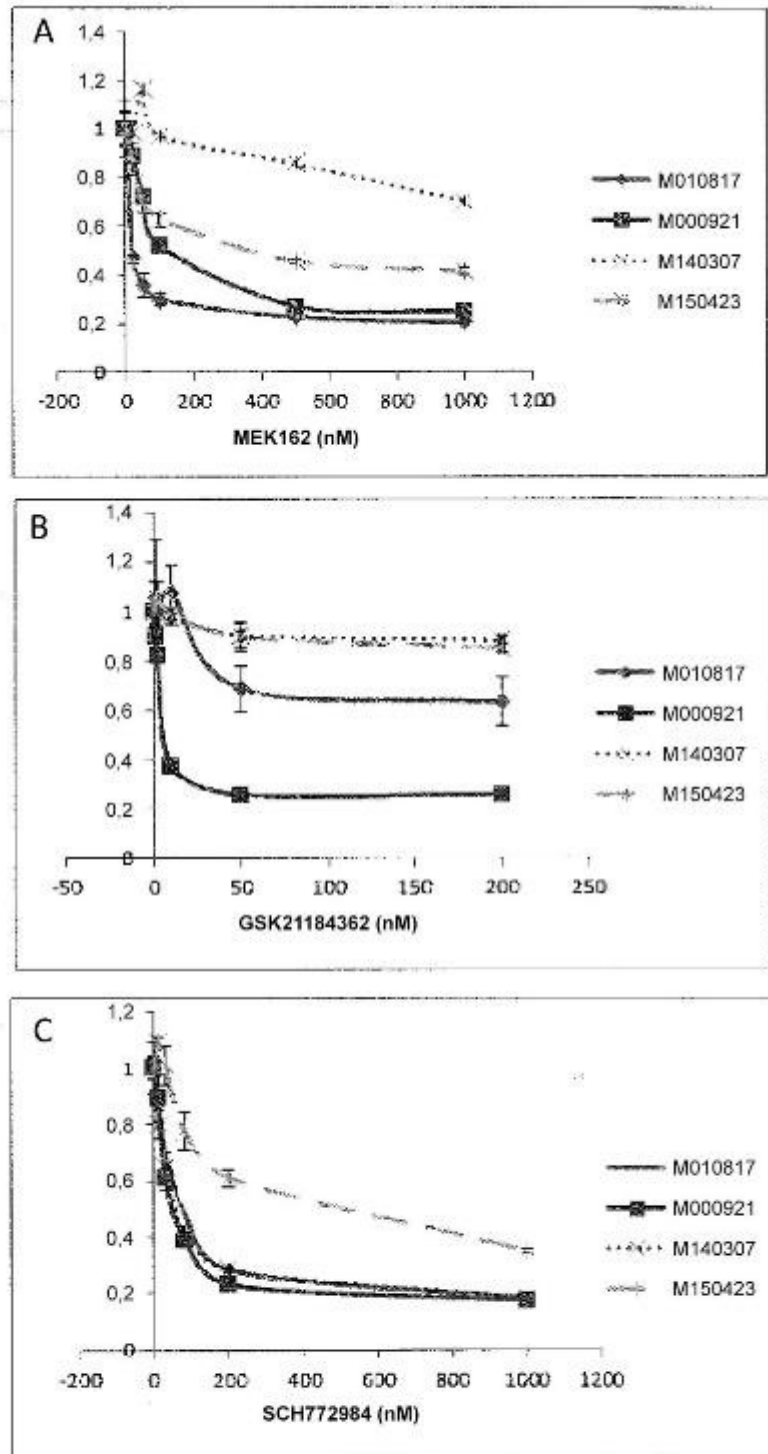
### C Paciente 3



MAR de SNV en primarios: 0,4396  
MAR de SNV particulares: 0,2584

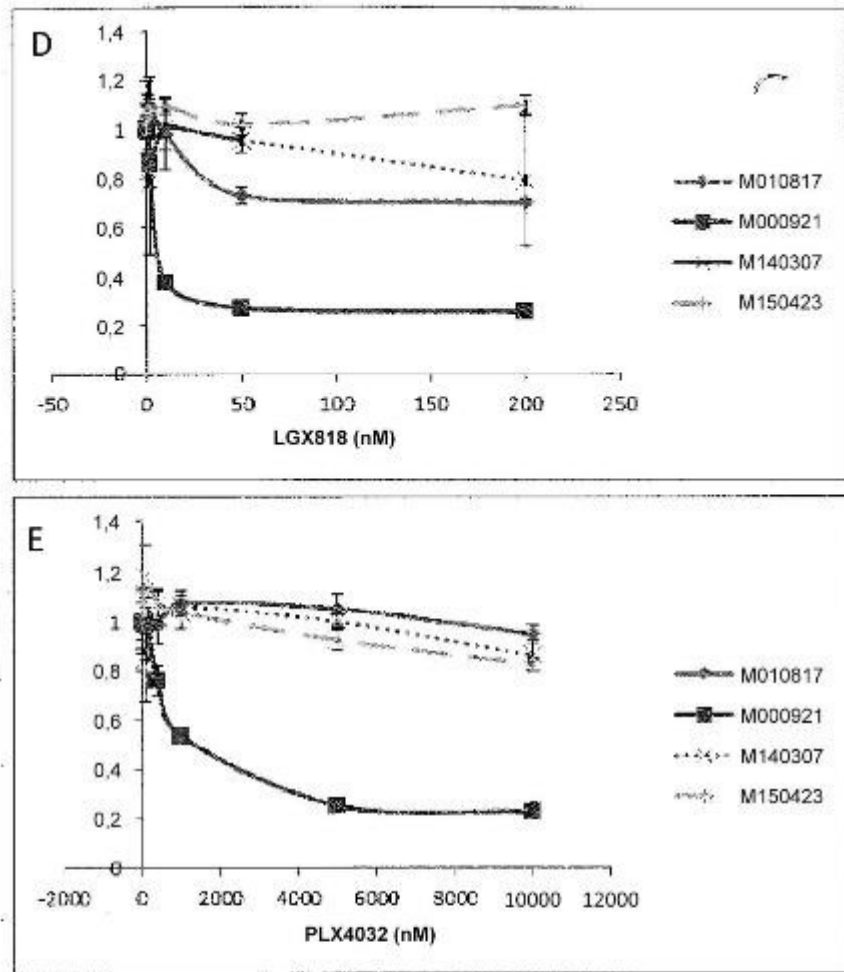


MAR de SNV en primarios: 0,3827  
MAR de SNV particulares: 0,2978



Línea celular	Mutación
M000921	BRAFV600 E
M010817	NRASQ61R
M140906	BRAFV600E/NRASQ61R
M140307	BRAFV600E/NRASQ61R
M150423	BRAFV600E/NRASQ61R

Fig. 6



Línea celular	Mutación
M000921	BRAFV600E
M010817	NRASQ61R
M140906	BRAFV600E/NRASQ61R
M140307	BRAFV600E/NRASQ61R
M150423	BRAFV600E/NRASQ61R

Fig. 6 cont.