



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102575295 B

(45) 授权公告日 2016.02.17

(21) 申请号 201080045765.7

(22) 申请日 2010.08.10

(30) 优先权数据

61/233,054 2009.08.11 US

61/237,078 2009.08.26 US

61/301,790 2010.02.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.04.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/044997 2010.08.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/019704 EN 2011.02.17

(73) 专利权人 应答遗传公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 C. 斯蒂芬斯 K. 达南伯格

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101487051 A, 2009.07.22, 全文.

YANCOVITZ 等. Detection of mutant BRAF alleles in the plasma of patients with metastatic melanoma. 《Journal of Molecular Diagnostics》. 2007, 第 9 卷 (第 2 期), 摘要、材料与方法.

JARRY. A. 等. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. 《Materials and Method》. 2004, 第 18 卷 (第 5 期), 第 349-352 页.

审查员 徐荣

权利要求书1页 说明书9页

序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

可用于检测 BRAF 突变的方法、引物、探针和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及可用于检测样品中的突变体 BRAF 序列的存在, 特别地用于检测 BRAF V600E、V600D、V600K、和 V600M 突变的存在的方法、引物和探针。

BRAF 突变引物和探针的序列列表

SEQ ID NO	序列
SEQ ID NO: 1	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA
SEQ ID NO: 2	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTCA
SEQ ID NO: 3	AGGTGATTTGGTCTAGCTACTGC
SEQ ID NO: 4	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAT
SEQ ID NO: 5	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAA
SEQ ID NO: 6	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAA
SEQ ID NO: 7	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAT
SEQ ID NO: 8	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAT
SEQ ID NO: 9	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTCA
SEQ ID NO: 10	GATCCACACACTGTTCAACTCA
SEQ ID NO: 11	GTAAATCATGAGATTTTC
SEQ ID NO: 12	GTAAATCATGAGATTTTC

1. 寡核苷酸 SEQ ID NO:2 在制备用于检测样品中的 BRAF 突变的存在的试剂盒中的用途,所述检测包括:(a) 自所述样品分离核酸,其中所述样品是经甲醛固定的、经石蜡包埋的(FFPE)组织样品,其中所述样品包含 DNA 序列;(b) 对所述样品的所述 DNA 序列实施扩增反应,其中所述扩增反应包含能够与 BRAF 突变体序列在 BRAF DNA 序列中的第一位特异性退火的第一引物,其中所述第一引物由 SEQ ID NO:2 组成,和能够在 BRAF DNA 序列中的第二位特异性退火的第二引物,其中所述第一和第二引物与双链 BRAF DNA 序列的不同链退火,其中当所述样品的 DNA 序列包含在所述 BRAF DNA 序列的所述第一位包含突变体序列的 BRAF DNA 序列时,所述扩增反应能够生成 BRAF 突变体特异性扩增产物;并(c) 显现通过所述扩增反应生成的扩增产物,其中 BRAF 突变体特异性扩增产物的检出是所述样品中的 BRAF 突变的阳性指示剂。

2. 寡核苷酸 SEQ ID NO:2 在制备用于检测样品中的 BRAF 突变的存在的试剂盒中的用途,所述检测包括:(a) 自所述样品分离核酸,其中所述样品是经甲醛固定的、经石蜡包埋的(FFPE)组织样品,其中所述样品包含 RNA 序列;(b) 对所述样品的所述 RNA 序列实施扩增反应,其中所述扩增反应包含能够与 BRAF 突变体序列在 BRAF RNA 序列中的第一位特异性退火的第一引物,其中所述第一引物由 SEQ ID NO:2 组成,和能够在 BRAF RNA 序列中的第二位特异性退火的第二引物,其中所述第一和第二引物与双链 BRAF RNA 序列的不同链退火,其中当所述样品的 RNA 序列包含在所述 BRAF RNA 序列的所述第一位包含突变体序列的 BRAF RNA 序列时,所述扩增反应能够生成 BRAF 突变体特异性扩增产物;并(c) 显现通过所述扩增反应生成的扩增产物,其中 BRAF 突变体特异性扩增产物的检出是所述样品中的 BRAF 突变的阳性指示剂。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述 BRAF 突变的存在是所述样品中的转移性黑素瘤的阳性指示剂。

4. 权利要求 2 的用途,其中所述 BRAF 突变的存在是所述样品中的转移性黑素瘤的阳性指示剂。

5. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述 BRAF 突变选自下组: BRAF V600E、BRAF V600D、BRAF V600K、BRAF V600M 和 BRAF V600A 突变。

6. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述样品选自下组: 血液、组织或细胞。

7. 权利要求 1 或 2 的用途,其中能够在 BRAF 核酸序列中的第二位特异性退火的所述第二引物由 SEQ ID NO:10 组成。

可用于检测 BRAF 突变的方法、引物、探针和试剂盒

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 61/233,054(2009 年 8 月 11 日提交);61/237,078(2009 年 8 月 26 日提交)和 61/301,790(2010 年 2 月 5 日提交)的优先权。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明涉及用于检测样品中的突变体 BRAF 序列的存在,特别地用于检测 BRAF V600E、V600D、V600K、V600M 和 V600A 突变的存在的方法、引物和探针。

[0005] 发明背景

[0006] 在正常细胞经历新生物转化(neoplastic transformation)并变为恶性细胞时出现癌症。转化的(恶性)细胞逃脱规定细胞表型并限制细胞增殖的正常生理控制。如此,个体身体中的转化细胞增殖,形成肿瘤。在发现肿瘤时,临床目标是选择性破坏恶性细胞,同时减轻对经历治疗的个体中的正常细胞引起的任何损害。

[0007] B-raf(或 BRAF)编码一种属于丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶的蛋白质。BRAF 是 Ras/Raf/MEK/MAP 信号传导途径的一部分,并且在调节 MAPKinse/ERK 信号传导途径中发挥作用。此基因的突变已经与多种癌症,诸如结肠直肠癌(CRC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、恶性黑素瘤和腺癌联系起来。已经在结肠癌中报告了 BRAF 的癌基因突变(几乎均为 V600E 突变)(Davies H 等 Nature 2002 ;417 :949-54 ;Rajagopalan H 等, Nature 2002 ;418 :934.)。已经在所有微卫星不稳定性癌的超过一半中及在小得多的稳定性结肠肿瘤亚类中观察到 V600E 突变(Wang L 等, Cancer Res 2003 ;63 :5209-12)。V600E(先前为 V599E)突变位于 B-raf 基因(登录号 NM_04333.4)的外显子 15 上于第 1860 位(编码序列的第 1799 位)。在编码序列的第 1799 位,胸苷变为腺苷,这导致从野生型/非突变体 B-raf 基因中的缬氨酸(V)变化为突变基因中的谷氨酰胺(E)。另外,也存在罕见的(<1%)V600K(1798-1799 GT > AA)突变。此外, V600D 突变在 4.6%的病例中存在, V600A 突变在小于 1%的病例中存在,而 V600M 突变在小于 1%的病例中存在。另外,存在着 V600R 和 K601E BRAF 突变。

[0008] V600E BRAF 突变存在于许多组织/肿瘤类型中,包括:神经系统、甲状腺、皮肤、胃肠道、大肠、胆道、卵巢、眼、前列腺、中枢神经系统、肝、小肠、乳房、胰、软组织、上呼吸消化道、肾上腺、自主神经节、造血和淋巴组织、肺、食管、脑垂体、和胃。可以在本发明的测定法中利用自这些组织类型之任一的样品提取的 DNA 或 RNA。

[0009] 在稳定性和不稳定性癌症两者中,大于 90%的具有 BRAF 突变的肿瘤具有广泛的 CpG 岛甲基化或称为 CpG 岛的甲基化物表型(CpG island methylator phenotype, CIMP)。已经报告了与散发性结肠癌中的微卫星不稳定性(MSI)有关的存活改善(Samowitz WS 等, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001 ;10 :917-23 ;Hailing KC 等, J Natl Cancer Inst 1999 ;91 :1295-303),并且因为散发性不稳定性肿瘤通常显示 CIMP(Toyota M 等, Proc Natl Acad Sci U S A 1999 ;96 :8681-6 ;Toyota M 等, Proc Natl Acad Sci U S A 2000 ;97 :710-5)和 BRAF 突变(Kambara T 等, Gut 2004 ;53 :1137-44 ;Nagasaka T 等, J Clin Oncol 2004 ;22 :4584-94)两者,会预期这些特征也会显示与不稳定性肿瘤中的存活改善的关系。Samowitz 已经研究了微卫星稳定性肿瘤中的 CIMP 与存活间的关系,而且已经

评估了微卫星稳定性结肠癌中的 BRAF 突变与存活间的关系。参见 Samowitz, Wade S. 等, Cancer Research 65,6063-6069,2005 年 7 月 15 日。Samowitz 已经评估了基于大群体的患有结肠癌的个体的样品以测定其与存活和其它临床病理学变量的关系。在 5% 的微卫星稳定性肿瘤和 51.8% 的微卫星不稳定性肿瘤中看到 V600E BRAF 突变。在微卫星稳定性肿瘤中,此突变与结肠直肠癌的较差存活、CIMP 较高的、晚期美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 阶段、和家族史相关。在 5 年存活的单变量分析中 (16.7% 对 60.0%) ;在针对年龄、阶段、和肿瘤部位调节的分析中 ;在对 AJCC 阶段 2 至 4 的阶段特异性、年龄经调整的分析中 (HRR 分别为 4.88、3.60、和 2.04) ;及在对 AJCC 阶段 2 至 4 的 Kaplan-Meier 存活评估中观察到较差的存活。微卫星不稳定性肿瘤与卓越的 5 年存活有关,无论 V600E 突变存在或缺乏 (分别为 76.2% 和 75.0%)。Samowitz 已经推断,微卫星稳定性结肠癌中的 BRAF V600E 突变与阶段 2 至 4 结肠癌中显著较差的存活有关,但是对微卫星不稳定性肿瘤的卓越预后没有影响。

[0010] 此外,证明了来自具有 MMR 基因 MLH1 和 MSH2 中的种系突变的遗传性非息肉病性结肠直肠癌综合征 (HNPCC) 家族的肿瘤中缺乏 BRAF 突变。这些数据提示了 BRAF 的癌基因激活仅牵涉散发性结肠直肠肿瘤发生。结肠直肠癌中的阳性 BRAF-V600E 突变的检出提示了疾病的散发性起源和 MLH1、MSH2 以及还有 MSH6 的种系改变的缺乏。这些发现在 HNPCC 诊断学的遗传测试中具有潜在的影响,并且提示了 BRAF 作为 HNPCC 的排除标准 (exclusion criteria) 或作为散发性癌症的分子标志物的潜在用途。参见 Domingo 等, Oncogene (2005) 24, 3995-3998。

[0011] 使用 MEK 的小分子抑制剂和整合的遗传和药理学分析,Solit 的小组已经发现了,BRAF 的突变与在“野生型”细胞或包含 RAS 突变的细胞相比时对 MEK 抑制的增强的且为选择性的敏感性有关。不管组织谱系,在 BRAF 突变体细胞中观察到此 MEK 依赖性,并且它与细胞周期蛋白 D1 蛋白表达的下调和 G1 阻滞的诱导两者相关联。药理学 MEK 抑制完全消除 BRAF 突变体异种移植物中的肿瘤生长,而 RAS 突变体肿瘤仅受到部分抑制。这些数据提示了对 BRAF 突变体肿瘤中的 MEK 活性的强烈依赖性,而且为此遗传限定的肿瘤亚型提供了合理的治疗策略。参见 Solit, David B. 等, Nature 439, 358-362 (2006 年 1 月 19 日)。

[0012] 另外,基于遗传研究的结果、细胞生物学、分子病理学和小鼠建模,已经出现人黑素细胞转化的模型。研究已经鉴定出黑素瘤组织中牵涉各种因素,包括碱性成纤维细胞生长因子生成、ERK 激活、和常见的 BRAF 突变。BRAF 在 RAS 下游起作用,并且研究已经表明了 RAS 和 BRAF 中的同时突变在黑素瘤中是极端罕见的,提示了 BRAF 突变替代突变体 RAS 的至少一些癌基因功能。

[0013] 对更好地满足有风险形成转移的患者的肿瘤标志物的开发处于活跃的研究中。虽然基于结果的肿瘤标志物评估和治疗选择作为结肠和乳腺癌管理中的护理标准的一部分已有多数,但是对于黑素瘤不存在此类标志物。许多研究已经显示为有希望,但是均尚未通过开发的初步阶段成为临床上有用的测定法。

[0014] 尽管在黑素瘤生物学研究中有最近的进展,但是可用于诊断和 / 或监测黑素瘤患者的分子工具的开发仍是相对较新的。在为了对患者监测疾病复发,或选择有形成转移的高风险的患者而设计的方案中获得的进展很少。肿瘤阶段 (即来自黑素瘤的存活的最好预示) 基于常规的临床病理学变量,诸如原发性肿瘤的厚度和溃疡及区域性淋巴结中或远端

部位中转移性疾病的存在。然而,两名具有在显微镜下表现为相同的中间厚度的原发性肿瘤的患者可以具有明显不同的存活。用于此类评估的改善的预后手段的缺乏使主治医生难以确定最好的治疗策略。

[0015] 已经在多至 80% 的黑素瘤组织(显著高于此疾病中的任何其它分子改变的频率)中发现了 BRAF 癌基因的突变。还已经在来自其它类型的癌症的肿瘤组织中检出 BRAF 突变。实验研究已经表明了,几种 BRAF 突变,特别是 T1799A(先前称作 T1796A) 热点突变(其占黑素瘤中的 BRAF 突变的 90%) 可以转化培养中的成纤维细胞。最近,显示了阻断黑素瘤细胞培养物中的突变体 BRAF 表达的实验抑制细胞生长并促进细胞死亡,提示了 BRAF 抑制剂可以显著支持黑素瘤治疗。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明公开了检测样品中的 BRAF V600E、V600D、V600K、V600M 和 V600A 突变的方法。本发明公开了包含用于扩增和检测样品中存在的 V600E、V600D、V600K、V600M、或 V600A 突变体 BRAF 序列的引物和探针序列的组合物。在扩增特定的 BRAF 突变中使用如本文中所公开的特定的引物组合。本领域技术人员应当领会,也可以设计对 1798-1799 GT > AA 双重突变特异性的引物。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1 显示了扩增和检测 BRAF 突变中所使用的引物和探针。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明提供了可用于检测 BRAF 突变的方法、引物、探针和试剂盒。可以使用本发明的方法、引物、探针和试剂盒来检测许多不同细胞类型中的 BRAF V600E、V600D、V600K、V600M、和 V600A 突变,并且如此可以用于诊断许多不同癌症,诸如但不限于黑素瘤、结肠直肠癌、肺癌和甲状腺癌。本发明的方法可以用作癌症患者结果的预示。促成患有任何疾病且特别是癌症(由于其进行性和侵入性性质)的患者的结果改善的关键因素之一是早期且精确的诊断。本发明的方法解决对于用于检测突变体 BRAF 序列(其存在是转移性疾病的阳性指示剂)的快速的、非侵入性的、且精确的筛选测定法的迫切需要。因此,它鉴定出那些需要用更具攻击性的治疗方案治疗的患者。此外,因为可以对 DNA 或 RNA 使用本发明,所以样品制备是容易的,由此降低测定法变化性,其可以源自牵涉样品制备的实验室技术人员的专门知识水平的差异。

[0022] 作为一个非限制性的例子,可以使用本发明的方法来监测晚期转移性黑素瘤(III/IV 期)患者。这些患者有最高的疾病进展风险,并且疾病活动性升高的早期检测会导致较早的治疗和结果的改善。本发明的方法也可以针对测试较早阶段疾病(I/II 期)患者,这些患者有他们的疾病会转移性扩散的风险。此外,用别的诊断测试和治疗的早期干预会导致改善的患者存活。

[0023] 本发明提供了一种用于检测样品中的 BRAF 突变的存在的方法,所述方法包括:(a) 自所述样品分离核酸,其中所述样品包含核酸序列;(b) 对所述样品的所述核酸序列实施扩增反应,其中所述扩增反应包含能够与 BRAF 突变体序列在 BRAF 序列中的第一位特异性退火的第一引物,其中所述第一引物是 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:9,和能够在 BRAF 序列中的第二位特异性退火的第二引物,其中所述第二引物是 SEQ ID NO:10,其中

所述第一和第二引物与双链 BRAF 序列的不同链退火,其中当所述样品的序列包含在所述 BRAF 序列的所述第一位包含突变体序列的 BRAF 序列时,所述扩增反应能够生成 BRAF 突变体特异性扩增产物;并(c)显现通过所述扩增反应生成的扩增产物,其中 BRAF 突变体特异性扩增产物的检出是所述样品中的 BRAF 突变存在的阳性指示剂。

[0024] 本发明还提供了一种用于检测样品中的转移性黑素瘤的存在的方法,所述方法包括:(a)自所述样品分离核酸,其中所述样品包含核酸序列;(b)对所述样品的所述核酸序列实施扩增反应,其中所述扩增反应包含能够与 BRAF 突变体序列在 BRAF 序列中的第一位特异性退火的第一引物,其中所述第一引物是 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:9,和能够在 BRAF 序列中的第二位特异性退火的第二引物,其中所述第二引物是 SEQ ID NO:10,其中所述第一和第二引物与双链 BRAF 序列的不同链退火,其中当所述样品的序列包含在所述 BRAF 序列的所述第一位包含突变体序列的 BRAF 序列时,所述扩增反应能够生成 BRAF 突变体特异性扩增产物;并(c)显现通过所述扩增反应生成的扩增产物,其中 BRAF 突变体特异性扩增产物的检出是所述样品中的转移性黑素瘤的阳性指示剂。

[0025] 本发明的实施方案包含 BRAF V600E、V600D、V600K、V600M、和 V600A 突变体特异性引物。例示性的 BRAF V600E 突变体特异性引物对包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、或 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。例示性 BRAF V600D 突变体特异性引物对包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、或 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:10。例示性 BRAF V600K 突变体特异性引物对包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、或 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:10。例示性 BRAF V600M 突变体特异性引物对包括 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:10。例示性 BRAF V600A 特异性引物包括 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:10。这些引物设计为避免任何已知的 BRAF 多态性。如本文中所描述的,此类寡核苷酸可以是可检测地标记的 (detectably labeled)。

[0026] BRAF V600 突变体特异性引物 (SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10) 或合适的 BRAF 突变体特异性引物对可以是包含生物学相容的盐溶液和/或其它缓冲液或组分的组合物的组分。

[0027] 本发明的实施方案包括寡核苷酸探针序列 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12,其中使用寡核苷酸作为探针以供检测 BRAF 突变体序列。此探针设计为避免任何已知的 BRAF 多态性。任选地,寡核苷酸是可检测地标记的。

[0028] 本发明还提供了包含 SEQ ID NO:1-12 中至少一项的试剂盒。

[0029] 可以利用本发明的实施方案来检测 V600E、V600D、V600K、V600M、和 V600A BRAF 突变。

[0030] 样品

[0031] 所述方法包括自受试者(例如,哺乳动物)获得组织或体液样品,其中所述样品含有核酸。可以使用的组织或体液的非限制性例子包括血液、血浆、淋巴、肿瘤活组织检查、和身体组织。在一个实施方案中,组织样品包括经石蜡包埋的组织样本。在一些实施方案中,所述核酸是脱氧核糖核酸(DNA)。在一些实施方案中,核酸是核糖核酸(RNA)。

[0032] 可以将本方法应用于来自患者的任何类型的组织。此类组织的来源包括但不限于

神经系统、甲状腺、皮肤、胃肠道、大肠、胆道、卵巢、眼、前列腺、中枢神经系统、肝、小肠、乳房、胰、软组织、上呼吸消化道、肾上腺、自主神经节、造血和淋巴组织、肺、食管、脑垂体、和胃。为了检查肿瘤组织的抗性,优选的是检查肿瘤组织。在一个优选的实施方案中,也检查来自其获得肿瘤的患者正常组织的一部分。

[0033] 可以在一大批肿瘤类型里应用本发明的方法。这容许制备个体“肿瘤表达概况”,由此在个体患者样品中测定 BRAF V600E、V600D、V600K、V600M、或 V600A 突变体序列的表达水平,并预测对各种化疗剂的响应。在某些实施方案中,将本发明的方法应用于结肠癌或黑色素瘤肿瘤。

[0034] 分离核酸

[0035] 本发明的实施方案利用本领域技术人员已知的 DNA 分离方法。一般地,目的是将细胞的细胞核中存在的 DNA 与其它细胞组分分开。DNA 的分离通常以裂解或分解组织或细胞开始。此过程对于破坏蛋白质结构是至关重要的,并且容许自细胞核释放核酸。在盐溶液中实施裂解,所述盐溶液含有使蛋白质变性的去污剂或蛋白酶(降解蛋白质的酶),诸如蛋白酶 K,或在一些情况中含有这两者。它导致细胞的分解,并溶解膜。DNA 分离方法包括但不限于酚:氯仿提取、高盐沉淀、碱变性、离子交换柱层析、树脂结合、和顺磁性珠结合。

[0036] 本发明的实施方案利用本领域技术人员已知的 RNA 分离方法。可以通过多种方法,包括但不限于 Trizol®和硫氰酸胍-酚-氯仿提取来将 RNA 分离并准备好以供杂交。RNA 分离的原理基于细胞/组织裂解,接着进行提取、沉淀和清洗。本领域技术人员应当理解, RNA 分离的选择会取决于样品类型。通过提及而收录 US 12/144,388,其涉及一种自经石蜡包埋的组织(一种用于癌基因标志物测试的常见来源)分离 RNA 的方法。

[0037] 扩增

[0038] 本发明的实施方案利用热和等温扩增方法,包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)、逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)、连接酶链式反应(LCR)、螺旋酶依赖性扩增(HDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)及扩增受阻突变系统(ARMS)。在一个优选的实施方案中,在 ARMS 中使用所述引物和探针。

[0039] 检测

[0040] 本发明的实施方案利用检测方法,包括但不限于标记扩增步骤期间使用的引物,使得用可检测标志物标记扩增产物,并将扩增产物与用可检测标志物标记的寡核苷酸探针杂交。可检测标志物包括但不限于化学发光标签、荧光标签、和放射性标签。

[0041] 可以使用与依照本领域技术人员会已知的方法使用的标记物类型对应的方法来直接测量经标记的扩增产物。可以依照本领域技术人员已知的方法将经标记的探针与扩增产物杂交。

[0042] 在实施本发明的方法中,在患者肿瘤样品中测定 BRAF V600E 突变体表达水平以预测治疗方案的功效。在实施本发明的方法中,在患者肿瘤样品中测定 BRAF V600E 突变体表达水平以预测治疗方案的功效。在实施本发明的方法中,在患者肿瘤样品中测定 BRAF V600D 突变体表达水平以预测治疗方案的功效。在实施本发明的方法中,在患者肿瘤样品中测定 BRAF V600K 突变体表达水平以预测治疗方案的功效。在实施本发明的方法中,在患者肿瘤样品中测定 BRAF V600M 突变体表达水平以预测治疗方案的功效。在实施本发明的方法中,在患者肿瘤样品中测定 BRAF V600A 突变体表达水平以预测治疗方案的功效。

[0043] 在实施本发明的此实施方案的方法中,优选地,自患者分离肿瘤细胞。自患者手术切出或通过常规的活组织检查获得实体或淋巴肿瘤或其部分。通过本领域中典型的任何方法,例如Sambrook,Fischer and Maniatis,Molecular Cloning,a laboratory manual(第二版),Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,(1989)从细胞提取自冷冻或新鲜的样品分离的RNA。优选地,注意避免提取过程期间的RNA降解。

[0044] 表 1

[0045]

引物名称	序列	预测的突变检测
Braf_1799A_1GT-F	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA	600E、600D和600K

[0046]

Braf_1799A_2AT-F	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGA	600E和600D
------------------	-----------------------------	-----------

[0047]

Braf_V600A_2AT-F	AGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGC	仅600A
Braf_V600D_2GA-F	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAT	600D 和 600K (弱的)
Braf_V600K_2AT-F	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAA	仅600K
Braf_V600M_2CG-F	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAGAA	600K和600M

[0048]

Braf_V600D_2GC-F3	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATAT	仅 600D
Braf_V600M_2GT-F2	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAT	仅 600M
Braf_1799A_2GC-F	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACACAG	V600E

[0049] 常见的反向引物(与所有上述正向引物一起使用)

[0050]

2Braf_C600-R	GATCCAGACAACGTTCAAACTGA
--------------	-------------------------

[0051] 常见的探针(与所有引物组合一起使用)

[0052]

Braf_C600-Mc2	6FAM-TCCATCGAGATTTC	
Braf_C600-Mc3	6FAM-ACCCACTCCATCGAGA	

[0053] X 碱基=次要突变

[0054] XX碱基=感兴趣的突变

实施例

[0055] 实施例 1:测试本发明的引物

[0056] 制备合成的 V600E 构建体以测试本发明的引物和探针特异性扩增含有 BRAF V600E 突变的核酸的能力。使用针对 BRAF V600E 突变的两组引物 / 探针来进行验证。将 V600E 合成构建体在 gDNA (0.67ng/uL, 5ng/PCR) 的背景中连续稀释 (1 : 2) 17 次。突变浓度范围为 10fM 至 0.15aM。对对照 (外显子 13) 和 V600E 突变一式二份测定每个稀释样品 6x (总共 12 次)。

[0057] 实施例 2 : V600K BRAF 突变的检测

[0058] 可以利用为 V600E 突变设计的相同引物对来检测罕见的 V600K BRAF 突变。V600K 突变是 1798-1799 GT > AA 双重突变。SEQ ID NO : 2 构成高度特异性引物, 其仅会在存在单一 1799 T > A 突变的情况中生成扩增产物。如此, 在实施利用引物对 SEQ ID NO : 1 和 SEQ ID NO : 10 的扩增反应和利用引物对 SEQ ID NO : 2 和 SEQ ID NO : 10 对同样品的另一反应时, 第一反应会提供扩增产物 (阳性), 而第二反应不会提供产物 (阴性)。阳性和阴性结果的此种组合指示 V600K 突变的存在。

[0059] 实施例 3 : BRAF T1799A/GT1798-1799AA/TG1799-1800AT 突变排他性 (exclusivity) 测试

[0060] A) 测试材料

[0061] 1. 生成 DNA 合成片段, 其含有 BRAF V600D、E、和 K 突变

[0062] a. BRAF V600D :

[0063] AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGATAAATCTCGA

[0064] TGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTT

[0065] b. BRAF V600E

[0066] c. BRAF V600K :

[0067] ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAGAAATCTC

[0068] GATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCAT

[0069] TTT

[0070] 2. 针对 BRAF 突变 V600D、E 和 K 突变的序列特异性引物 / 探针 (表 1 中所列的序列)

[0071] a. 1799A_1GT (对 1799T 至 A 碱基对变化 (V600E、V600D 和 V600K 特异性))

[0072] b. V600D_2GA (对 V600D 特异性)

[0073] c. V600K_2AT (对 V600K 特异性)

[0074] B. 规程

[0075] 1. 将三种合成片段之每种在 0.667ng/uL 基因组 DNA (Promega Corp. - 人基因组 DNA, 100ug) 中稀释至 200aM 的浓度

[0076] 2. 用所有三种引物组 (对每种突变特异性) PCR 扩增每种突变的合成的特异性片段

[0077] 3. 分析排他性

[0078] C. 对排他性的分析

[0079] 下列两个引物 / 探针组已经设计为扩增特定的突变。用每种合成片段测试这些引物以测试排他性

[0080] a. 1799A_1GT (扩增 V600E、V600D 和 V600K)。已经在测定法开发部分 (7) 中描述

了此引物 / 探针组以扩增碱基 1799 处的 T 至 A 变化。

[0081] b. V600D_2GA (对 V600D 特异性)。已经在测定法开发部分 (7) 中描述了此引物 / 探针组以扩增碱基 1799-1800 处的 TG 变化成 AT。

[0082] c. V600K_2AT (对 V600K 特异性)。已经在测定法开发部分 (7) 中描述了此引物 / 探针组以扩增碱基 1798-1799 处的 CT 变化成 AA。

[0083] 在排他性测试中使用所有引物和探针。

[0084] 结果 : 下表描述了用特异性引物探针组成功扩增的片段。加号 (+) 表示扩增特异性片段。

[0085] 表 2 : 限定每种突变体类型的引物组合如下 :

[0086]

1799A_1GT	V600K_2AT	V600D_2GA	突变体
+	-	-	V600E
+	-	+	V600D
+	+	-	V600K
-	-	-	野生型
-	-	-	无效的

[0087] 结果 :

[0088] 我们收集了关于每个合成物和引物 / 探针组合的 Ct 数据

	V600D 合成物Ct	V600E 合 成物Ct	V600K合 成物Ct
V600D_2GA (仅扩增 V600D)	30.39	36.87	33.79
[0089] 1799A_1GT (扩增 V600D、V600E、和 V600K)	30.34	30.65	29.61
V600K_2AT (仅扩增 V600K)	39.06	38.72	29.67

[0090] 通过扣除使用设计为对各个模板特异性和非特异性的引物 / 探针组来对每个模板的 PCR 扩增的 Ct 测定排他性

	V600D 合 成物Delta Ct	V600E 合 成物Delta Ct	V600K合 成物Delta Ct
V600D_2GA (仅扩增 V600D)	0	6.22	4.12
[0091] 1799A_1GT (扩增 V600D、V600E、和 V600K)	-0.05	0	-0.06

[0092]				
	V600K_2AT (仅扩增 V600K)	8.67	8.07	0

[0093] 如下测定 delta Ct :

[0094] 例子 :

[0095] V600D_2GA 对 V600D 合成片段的排他性 = 0

[0096] 使用 V600D 片段作为模板,用 V600D_2GA 引物 / 探针实施扩增

[0097] $dCt = 30.39 - 30.39 = 0$ (排他的)

[0098] 使用 V600D 片段作为模板,用 1799A_1GT 引物 / 探针实施扩增

[0099] $dCt = 30.34 - 30.39 = -0.05$ (排他的)

[0100] 使用 V600D 片段作为模板,用 V600K_2AT 引物 / 探针实施扩增

[0101] $dCt = 39.06 - 30.39 = 8.67$ (非特异性)

[0102] 接受标准

[0103] dCt (使用对片段特异性的引物的 Ct - 使用对片段非特异性的引物的 Ct) 小于等于 4

[0104] 第 7 部分 (测定法开发 - 参见下表) 中描述的预置的接受标准,即引物 / 探针 1799_1GT 会检出 1799 处的 T 至 A 碱基对变化,并且因此会检出所有突变。

[0105] 结果:

[0106] V600K_2AT 对于 V600K 突变是排他的

[0107] V600D_2GA 对于 V600D 突变是排他的

[0108] 1799A_1GT 对于所有三种突变 (V600E, V600D 和 V600K) 中含有的 1799 T 至 A 变化是排他的。

[0109] 表 3 :限定每种突变体类型的引物组合

[0110]

BrafEx13	1799A_1GT	1799A_2AT	V600K_2AT	V600D_2GA	突变体
+	+	+	-	-	V600E
+	+	-	-	+	V600D
+	+	-	+	-	V600K
+	-	-	-	-	野生型
> 30Ct	-	-	-	-	无效的

[0001]

序列表

<110> 应答遗传公司 (RESPONSE GENETICS, INC)

<120> 可用于检测 BRAF 突变的方法、引物、探针和试剂盒

<140> PCT/US2010/044997

<141> 2010-08-10

<150> 61/233, 054

<151> 2009-08-11

<150> 61/237, 078

<151> 2009-08-26

<150> 61/301, 790

<151> 2010-02-05

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 1

aaa aat agg tga ttt tgg tct agc tac ata

30

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 2

aat agg tga ttt tgg tct agc tac tga

27

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 3

agg tga ttt tgg tct agc tac tgc

24

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 4

aat agg tga ttt tgg tct agc tac aaa t

28

[0002]

<210> 5	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述：合成引物	
<400> 5	
aaa ata ggt gat ttt ggt cta gct act aa	29
<210> 6	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述：合成引物	
<400> 6	
aaa ata ggt gat ttt ggt cta gct aga a	28
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述：合成引物	
<400> 7	
aaa tag gtg att ttg gtc tag cta cat at	29
<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述：合成引物	
<400> 8	
aaa ata ggt gat ttt ggt cta gct act at	29
<210> 9	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述：合成引物	
<400> 9	
aat agg tga ttt tgg tct agc tac aca g	28
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述：合成引物	
<400> 10	
gat cca gac aac tgt tca aac tga	24

[0003]

<210> 11	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述: 合成引物	
<400> 11	
tcc atc gag att tc	14
<210> 12	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述: 合成引物	
<400> 12	
acc cac tcc atc gag a	16
<210> 13	
<211> 86	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
<400> 13	
agt aaa aat agg tga ttt tgg tct agc tac aga taa atc tcg atg gag	48
tgg gtc cca tca gtt tga aca gtt gtc tgg atc cat tt	86
<210> 14	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
<400> 14	
aca gta aaa ata ggt gat ttt ggt cta gct aca aag aaa tct cga tgg	48
agt ggg tcc cat cag ttt gaa cag ttg tct gga tcc att tt	89

SEQ ID NO	序列
SEQ ID NO: 1	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA <u>T</u> <u>A</u>
SEQ ID NO: 2	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACT <u>G</u> <u>A</u>
SEQ ID NO: 3	AGGTGATTTTGGTCTAGCTACT <u>G</u> <u>C</u>
SEQ ID NO: 4	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAA <u>T</u>
SEQ ID NO: 5	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACT <u>A</u> <u>A</u>
SEQ ID NO: 6	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAGAA
SEQ ID NO: 7	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u>
SEQ ID NO: 8	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACT <u>A</u> <u>T</u>
SEQ ID NO: 9	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACACAG
SEQ ID NO: 10	GATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGA
SEQ ID NO: 11	6FAM-TCCATCGAGATTTC
SEQ ID NO: 12	6FAM-ACCCACTCCATCGAGA

图 1 :BRAF 突变引物和探针的序列列表