



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201111517 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：099126740

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 11 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01) G01N33/50 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/11 美國 61/233,054
2009/08/26 美國 61/237,078
2010/02/05 美國 61/301,790

(71)申請人：雷斯邦司遺傳學股份有限公司(美國) RESPONSE GENETICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：史蒂芬斯 克瑞格 STEPHENS, CRAIG (US)；達奈柏格 凱瑟琳 DANENBERG,
KATHLEEN (US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：1 共 29 頁

(54)名稱

用於偵測 BRAF 突變之方法、引子、探針及套組

METHODS, PRIMERS, PROBES AND KITS USEFUL FOR THE DETECTION OF BRAF MUTATIONS

(57)摘要

本發明有關用於偵測樣本中存在之突變 BRAF 序列，特別是用於偵測存在之 BRAF V600E、V600D、V600K 以及 V600M 突變之方法、引子以及探針。

BRAF 突變引子與探針之序列表

序列辨識編號	序列
序列辨識編號：1	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA
序列辨識編號：2	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGA
序列辨識編號：3	AGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGC
序列辨識編號：4	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAT
序列辨識編號：5	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAA
序列辨識編號：6	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAGAA
序列辨識編號：7	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATAT
序列辨識編號：8	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAT
序列辨識編號：9	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACACAG
序列辨識編號：10	GATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGA
序列辨識編號：11	6FAM-TCCATCGAGATTC
序列辨識編號：12	6FAM-ACCCACTCCATCGAGA



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201111517 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：099126740

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 11 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01) G01N33/50 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/11 美國 61/233,054
2009/08/26 美國 61/237,078
2010/02/05 美國 61/301,790

(71)申請人：雷斯邦司遺傳學股份有限公司(美國) RESPONSE GENETICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：史蒂芬斯 克瑞格 STEPHENS, CRAIG (US)；達奈柏格 凱瑟琳 DANENBERG,
KATHLEEN (US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：1 共 29 頁

(54)名稱

用於偵測 BRAF 突變之方法、引子、探針及套組

METHODS, PRIMERS, PROBES AND KITS USEFUL FOR THE DETECTION OF BRAF MUTATIONS

(57)摘要

本發明有關用於偵測樣本中存在之突變 BRAF 序列，特別是用於偵測存在之 BRAF V600E、V600D、V600K 以及 V600M 突變之方法、引子以及探針。

BRAF 突變引子與探針之序列表

序列辨識編號	序列
序列辨識編號：1	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA
序列辨識編號：2	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGA
序列辨識編號：3	AGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGC
序列辨識編號：4	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAT
序列辨識編號：5	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAA
序列辨識編號：6	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAGAA
序列辨識編號：7	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATAT
序列辨識編號：8	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAT
序列辨識編號：9	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACACAG
序列辨識編號：10	GATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGA
序列辨識編號：11	6FAM-TCCATCGAGATTC
序列辨識編號：12	6FAM-ACCCACTCCATCGAGA

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

相關申請案

此申請案請求第61/233,054號(2009年8月11日提申);第61/237,078號(2009年8月26日提申)以及第61/301,790號(2010年2月5日提申)之優先權。

發明領域

本發明有關用於偵測樣本中存在之突變BRAF序列，特別是用於偵測存在之BRAF V600E、V600D、V600K、V600M以及V600A突變之方法、引子以及探針。

【先前技術】

發明背景

癌在正常細胞經歷腫瘤轉形且變成惡性細胞時形成。轉形的(惡性)細胞跳脫了指定細胞表型以及限制細胞增殖之正常的生理控制。在個體身體內之轉形的細胞因此增殖，形成腫瘤。當發現腫瘤時，臨床目的係選擇性地摧毀惡性細胞，然而減輕對進行治療之個體內任何正常細胞之傷害。

B-raf(或BRAF)編碼一種屬於絲胺酸/酰胺酸蛋白激酶之蛋白質。BRAF係Ras/Raf/MEK/MAP訊號傳導路徑之一部分，參與調節MAP激酶/ERK訊號路徑。此基因中之突變與各種癌症有關聯，諸如結腸直腸癌(CRC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、惡性黑色素瘤以及腺癌。BRAF中致癌基因的突變，將近全部係V600E突變，已在結腸癌中報告(Davies H, et

al. Nature 2002;417:949–54; Rajagopalan H, et al., Nature 2002;418:934.)。在所有的微衛星不穩定癌中超過一半以及穩定的結腸腫瘤中很少的亞型中，觀察到V600E突變(Wang L, et al., Cancer Res 2003;63:5209–12)。

V600E (以前V599E)突變位於B-raf基因之外顯子15上(登錄號NM_04333.4)位置1860處(編碼序列之1799)。在該編碼序列之位置1799處，胸腺嘧啶改變成腺苷酸，其導致野生型/無突變B-raf基因中之纈胺酸(V)變成突變基因中之麩胺醯胺(E)。此外，極少數的(<1%) V600K (1798-1799 GT>AA)突變亦存在。此外，該V600D突變占案例的4.6%，V600A突變占<1%的案例，而V600M突變占<1%的案例。此外，存在V600R以及K601E BRAF突變。

V600E BRAF突變可在許多組織/腫瘤類型中發現，包括：

神經系統、甲狀腺、皮膚、胃腸道、大腸、膽道、卵巢、眼睛、前列腺、中樞神經系統、肝、小腸、乳房、胰臟、軟組織、上呼吸消化道、腎上腺、自律神經節、造血組織以及淋巴組織、肺、食道、腦垂體以及胃。從此等類型之組織任一種中萃取而得之DNA或RNA，可被用於本發明之分析。

在穩定與不穩定癌二者中，>90%具BRAF突變之腫瘤具廣泛的甲基化CpG島或所謂的CpG島甲基化表型(CIMP)。已有報導與偶發性結腸癌中微衛星不穩定性(MSI)有關聯之改善的存活率(Samowitz WS, et al., Cancer

Epidemiol Biomarkers Prev 2001;10:917-23; Halling KC, et al., J Natl Cancer Inst 1999;91:1295-303), 因為偶發性不穩定腫瘤通常顯示出CIMP (Toyota M, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:8681-6; Toyota M, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:710-5)以及BRAF突變二者(Kambara T, et al., Gut 2004;53:1137-44; Nagasaka T, et al., J Clin Oncol 2004;22:4584-94), 吾人認為此等特徵亦可能顯示出與不穩定腫瘤中改善的存活率之關係。Samowitz研究過CIMP與微衛星穩定腫瘤之存活率間之關係, 以及評估BRAF突變與微衛星穩定結腸癌之存活率間之關係。見Samowitz, Wade S., et al., Cancer Research 65, 6063-6069, July 15, 2005。Samowitz已評估一大群具有結腸癌個體之樣本, 決定其與存活率以及其它臨床病理變量之關係。5%之微衛星穩定腫瘤以及51.8%之微衛星不穩定腫瘤中可見到V600E BRAF突變。在微衛星穩定腫瘤方面, 此突變與較差的存活率、CIMP高、美國聯合癌症委員會(AJCC)分期較高以及結腸直腸癌之家族史有關。在5年存活率之單變量分析(16.7%對60.0%)中; 在對年齡、期數以及腫瘤位置調整之分析中; 在針對AJCC第2至4期之特異階段、調整年齡的分析中(分別為HRR 4.88、3.60以及2.04)中; 以及對AJCC第2至4階段之Kaplan-Meier存活率評估中, 觀察到差的存活率。微衛星不穩定腫瘤與極佳的5年存活率有關聯, 不管V600E突變存在與否(分別為76.2%以及75.0%)。Samowitz總結, 微衛星穩定結腸癌中BRAF V600E突變與第2至4期結腸癌之顯著較

佳的存活率有關聯，但對微衛星不穩定腫瘤之極佳的預後沒有影響。

此外，在具有MMR基因MLH1與MSH2生殖細胞突變之遺傳性非息肉性結直腸癌症候群(HNPCC)家族之腫瘤中，證實無BRAF突變。此等數據顯示，BRAF致癌基因活化僅涉及偶發的結腸直腸腫瘤發生。在結腸直腸癌中偵測到BRAF-V600E突變陽性，暗示偶發起源的疾病以及無MLH1、MSH2以及MSH6生殖細胞改變。此等發現在HNPCC診斷之基因測試方面具有潛在的衝擊，且建議可使用BRAF作為HNPCC之排除標準，或作為偶發癌症之分子標記之可能性。見Domingo et al., *Oncogene* (2005) 24, 3995–3998。

Solit's研究群使用MEK之小分子抑制劑以及整合基因以及藥理分析發現，當與'野生型'細胞或帶有RAS突變之細胞相比，BRAF之突變與對MEK抑制作用之提高以及選擇敏感性有關聯。不管組織之世系，在BRAF突變細胞中觀察到此MEK依賴，且此與向下調節週期素D1蛋白表現以及誘導G1停滯有關聯。藥理學的MEK抑制作用完全地廢止BRAF突變異種移植中之腫瘤生長，然而RAS突變腫瘤僅部分被抑制。此等數據顯示BRAF突變腫瘤中MEK活性強烈的依賴性，為此基因鑑定的腫瘤亞型提供合理的治療策略。見Solit, David B., et al., *Nature* 439, 358-362 (19 January 2006)。

此外，根據基因研究、細胞生物學、分子病理學以及老鼠模型之結果，已顯現出人類黑色素細胞轉型之模型。研究已鑑定出涉及各種因子，包括黑色素瘤組織中鹼性纖

維母細胞生長因子產生、ERK活化以及頻繁的BRAF突變。BRAF之作用在RAS的下游，且研究證實RAS與BRAF同時發生突變在黑色素瘤中極端少見，顯示BRAF突變代替至少一些突變RAS之致癌功能。

能提供病人，針對其發展轉移之風險作更好的分級之腫瘤標記的發展，正在積極的研究當中。雖然腫瘤標記之評估且根據此結果選擇治療方法，為結腸癌以及乳癌管理之標準照護之一部分已有許多年了，但並無針對黑色素瘤之標記存在。許多研究已顯示出希望，但還沒有一個已進展通過初級階段的發展進入臨床使用分析。

儘管進來在黑色素瘤生物學上的研究有進展，但用於診斷和/或監控患有黑色素瘤之病人的分子工具之發展仍相對的新穎。在設計用於監控病人之疾病復發的操作程序，或選擇處於會發展成轉移之高風險之病人方面的進展很少。腫瘤期數，黑色素瘤之最佳的存活預測法，係以一般的臨床病理變數，諸如初級腫瘤之厚度以及潰瘍，以及在區域中或遠處的淋巴結中轉移疾病之出現為基礎。然而二個患有在顯微鏡上顯示出一致的中等厚度的初級腫瘤之病人，戲劇性地具有相異的存活率。缺少改良的診斷工具用於此等評估，使臨床醫師很難決定更好的治療策略。

在超過80%的黑色素瘤組織中已發現BRAF治癌基因之突變，頻率顯著地高於此疾病中任何其它的分子改變。實驗研究證實，數種BRAF突變，特別是T1799A (以前的命名T1796A)熱點突變(占黑色素瘤中BRAF突變之90%)，在培

養中可轉換成纖維母細胞。最近，阻斷黑色素瘤細胞培養中突變BRAF之表現之實驗，顯示出抑制細胞的成長以及促進細胞的死亡，顯示BRAF抑制劑可能可顯著的提高黑色素瘤的治療。

【發明內容】

發明概要

本發明揭示一種偵測樣本中BRAF V600E、V600D、V600K、V600M以及V600A突變之方法。本發明揭示一種組成物，其包含用於擴增以及偵測樣本中所存在之V600E、V600D、V600K、V600M或V600A突變BRAF序列之引子以及探針序列。在此所揭露之特別的引子組合係用於擴增特別的BRAF突變。熟悉此技藝之人士應能理解，吾人亦可設計對1798-1799 GT>AA雙突變具專一性之引子。

圖式簡單說明

第1圖顯示用於擴增以及偵測BRAF突變之引子以及探針。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明提供用於偵測BRAF突變之方法、引子、探針以及套組。本發明之方法、引子、探針以及套組可用於偵測許多不同細胞型中之BRAF V600E、V600D、V600K、V600M以及V600A突變，因此可用於診斷許多不同的癌症，像是，但不限於，黑色素瘤、結腸直腸癌、肺癌以及甲狀腺癌。本發明之方法可用作為癌症病人結果的預測。幫助改善患

有任一種的疾病，特別是癌症(由於其進行性及侵略性的本質)之病人的預後之一主要因素為早期以及精確的診斷。本發明之方法滿足快速、非侵入性以及精確篩選分析偵測突變BRAF序列(其之存在係一疾病轉移之陽性指標)之急迫性的需求。其鑑定出該等需要更積極進行治療之病人。此外，因為本發明可用於DNA或RNA，樣本易於製備，所以降低了在樣本製備方面，因實驗室技術人員之專業層度的差異所產生之分析變化。

舉一非限制性之範例，本發明之方法可用於監控後期、轉移性黑色素瘤之病人(第III/IV期)。此等病人正處於疾病進展之最高風險，而早期偵測到疾病活性的增加，可早期治療，改善結果。本發明之方法亦可針對於試驗具早期疾病(第I/II期)，其疾病有轉移擴散之風險的病人。再者，額外診斷試驗以及治療之早期介入，可改善病人的存活率。

本發明提供一種用於偵測樣本中存在之BRAF突變之方法，該方法包含：(a)從該樣本中分離出核酸，其中該樣本包含核酸序列；(b)進行該樣本之核酸序列之擴增反應，其中該擴增反應包含一能夠在BRAF序列之第一位置處專一性黏合BRAF突變序列之第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：1、序列辨識編號：2、序列辨識編號：3、序列辨識編號：4、序列辨識編號：5、序列辨識編號：6、序列辨識編號：7、序列辨識編號：8或序列辨識編號：9，以及一能夠在BRAF序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中該第二引子係序列辨識編號：10，其中該第一與

第二引子黏合至雙股BRAF序列之不同的股，其中當樣本之序列包含在該BRAF序列之第一位置處含有突變序列之BRAF序列時，該擴增反應能夠產生BRAF突變專一性擴增產物；以及(c)使該擴增反應產生之擴增產物顯像，其中偵測到BRAF突變專一性擴增產物，係該樣本中存在BRAF突變之陽性指標。

本發明亦提供一種用於偵測樣本中存在之轉移性黑色素瘤之方法，該方法包含：(a)從該樣本中分離出核酸，其中該樣本包含核酸序列；(b)進行該樣本之核酸序列之擴增反應，其中該擴增反應包含一能夠在BRAF序列之第一位置處專一性黏合BRAF突變序列之第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：1、序列辨識編號：2、序列辨識編號：3、序列辨識編號：4、序列辨識編號：5、序列辨識編號：6、序列辨識編號：7、序列辨識編號：8或序列辨識編號：9，以及一能夠在BRAF序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中該第二引子係序列辨識編號：10，其中該第一與第二引子黏合至雙股BRAF序列之不同的股，其中當該樣本之序列包含在該BRAF序列之第一位置處含有突變序列之BRAF序列時，該擴增反應能夠產生BRAF突變專一性擴增產物；以及(c)使該擴增反應產生之擴增產物顯像，其中偵測到BRAF突變專一性擴增產物，係該樣本中存在轉移性黑色素瘤之陽性指標。

本發明之具體例包含BRAF V600E、V600D、V600K、V600M以及V600A突變專一性引子。例示性BRAF V600 E

突變專一性引子對包括序列辨識編號：1、序列辨識編號：2或序列辨識編號：9以及序列辨識編號：10。例示性BRAF V600D突變專一性引子對包括序列辨識編號：1、序列辨識編號：2、序列辨識編號：4或序列辨識編號：7以及序列辨識編號：10。例示性BRAF V600K突變專一性引子對包括序列辨識編號：1、序列辨識編號：4、序列辨識編號：5或序列辨識編號：6以及序列辨識編號：10。例示性BRAF V600M突變專一性引子對包括序列辨識編號：6或序列辨識編號：8以及序列辨識編號：10。例示性BRAF V600A專一性引子對包括序列辨識編號：3以及序列辨識編號：10。此等引子係設計用於避免任何已知的BRAF多形性。如在此所述，此寡核苷酸可用可偵測之標籤標記。

BRAF V600突變專一性引子(序列辨識編號：1、序列辨識編號：2、序列辨識編號：3、序列辨識編號：4、序列辨識編號：5、序列辨識編號：6、序列辨識編號：7、序列辨識編號：8、序列辨識編號：9、序列辨識編號：10)或適當的BRAF突變專一性引子對，可為包含生物相容性鹽溶液和/或其它緩衝液或組份之組成物之組份。

本發明之具體例包含寡核苷酸探針序列，序列辨識編號：11以及序列辨識編號：12，其中該寡核苷酸用作為用於偵測BRAF突變序列之探針。此探針係設計用於避免任何已知的BRAF多形性。任擇地，該寡核苷酸係用可偵測之標籤標記。

本發明亦提供一種包含序列辨識編號：1-12中至少一

個之套組。

本發明之具體例可用於偵測V600E、V600D、V600K、V600M以及V600A BRAF突變。

樣本

方法包含從一個體(如，哺乳動物)中取得組織或體液樣本，其中該樣本含有核酸。可使用之組織或體液之非限制例子包括血液、血漿、淋巴、腫瘤切片以及身體組織。於一具體例中，該組織樣本包含石蠟包埋的組織檢體。於一些具體例中，該核酸係去氧核糖核酸(DNA)。於一些具體例中，該核酸係核糖核酸(RNA)。

本發明可應用於從病人上取得之任何類型的組織。此組織之來源包括，但不限於，神經系統、甲狀腺、皮膚、胃腸道、大腸、膽道、卵巢、眼睛、前列腺、中樞神經系統、肝、小腸、乳房、胰臟、軟組織、上呼吸消化道、腎上腺、自律神經節、造血組織以及淋巴組織、肺、食道、腦垂體以及胃。在檢驗腫瘤組織抗性方面，最好係檢驗腫瘤組織。於較佳具體例中，亦檢驗從取得腫瘤之病人身上之正常組織部分。

本發明之方法可應用於廣泛的腫瘤類型。此容許製備個別的“腫瘤表現曲線”，藉此測定個別病人樣本中之BRAF V600E、V600D、V600K、V600M或V600A突變序列的表現位準，以及預測對各種化療之反應。於某些具體例中，本發明之方法可應用於結腸癌或黑色素腫瘤。

分離核酸

本發明之具體例使用熟悉此技藝之人士已知之DNA分離方法。一般而言，目的係將在細胞核中之DNA與其它細胞組份分開。DNA之分離通常從水解或分解組織或細胞開始。此是破壞蛋白質結構，使從細胞核中釋出核酸的必須方法。水解係在含有使蛋白質變性之清潔劑或蛋白酶(消化蛋白質之酵素，諸如蛋白酶K)之鹽溶液中進行，於一些情況下二者均使用。此導致細胞分解以及細胞膜溶解。DNA分離方法包括，但不限於，苯酚：氯仿萃取法、高鹽沈澱法、鹼變性法、離子交換管柱色層分析法、樹脂結合法以及順磁性珠結合法。

本發明之具體例使用熟悉此技藝之人士已知之RNA分離方法。RNA可藉由使用下列各種方法予以分離以及製備以供雜交使用，包括，但不限於，Trizol[®]以及硫氰酸胍-酚-氯仿萃取法。RNA分離之原理係建立在細胞/組織水解、接著萃取、沈澱以及清洗之基礎上。熟悉此技藝之人士應能了解，RNA分離方法之選擇取決於樣本類型。US 12/144,388在此併入本案以為參考，其針對一種從石蠟包埋之組織(致癌基因標記測試之常見來源)中分離RNA之方法。

擴增反應

本發明之具體例使用熱以及等溫擴增方法，包括，但不限於，聚合酶鏈反應(PCR)、逆轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)、連接酶鏈反應(LCR)、依賴解旋酶擴增法(HDA)以及依賴核酸序列擴增法(NASBA)以及擴增受阻突變系統(ARMS)。於較佳具體例中，引子以及探針用於ARMS中。

偵測

本發明之具體例中使用包括下列，但不限於下列之偵測方法：在擴增步驟期間使用標籤引子，使得該擴增產物被可偵測標記標上標籤，以及使該擴增產物與以可偵測標記標上標籤之寡核苷酸探針雜交。可偵測標記包括，但不限於，化學冷光標籤、螢光標籤以及放射活性標籤。可使用與根據熟悉此技藝之人士已知之方法所使用之標籤類型相同之方法，直接測量標上標籤之擴增產物。可根據熟悉此技藝之人士已知之方法，使標上標籤之探針與該擴增產物雜交。

在進行本發明之方法方面，分析病人腫瘤樣本中BRAF V600E突變之表現位準，以便預先斷定治療方案之效力。在進行本發明之方法方面，分析病人腫瘤樣本中BRAF V600E突變之表現位準，以便預測治療方案之效力。在進行本發明之方法方面，分析病人腫瘤樣本中BRAF V600 D突變之表現位準，以便預測治療方案之效力。在進行本發明之方法方面，分析病人腫瘤樣本中BRAF V600 K突變之表現位準，以便預測治療方案之效力。在進行本發明之方法方面，分析病人腫瘤樣本中BRAF V600 M突變之表現位準，以便預測治療方案之效力。在進行本發明之方法方面，分析病人腫瘤樣本中BRAF V600 A突變之表現位準，以便預測治療方案之效力。

在進行本發明之此具體例之方法方面，較佳地從病人身上分離出腫瘤細胞。從病人身上手術切除固體或淋巴腫

瘤或其部分，或利用常規的外科手術取得。從冷凍或新鮮樣本中分離出之RNA，係利用任一種在此技藝中典型的方法從細胞中萃取出來的，例如，Sambrook, Fischer and Maniatis, Molecular Cloning, a laboratory manual, (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989)。較佳地，小心地避免RNA在萃取過程期間分解。

表1

引子名稱	序列	預測的突變偵測
Braf_1799A_1GT-F	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA <u>A</u>	600E、600D以及600K
Braf_1799A_2AT-F	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGA <u>A</u>	600E以及600D
Braf_V600A_2AT-F	AGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGC <u>C</u>	僅600A
Braf_V600D_2GA-F	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAT <u>T</u>	600D以及600K (弱)
Braf_V600K_2AT-F	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAA <u>A</u>	僅600K
Braf_V600M_2CG-F	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAGAA <u>A</u>	600K以及600M
Braf_V600D_2GC-F3	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATAT <u>T</u>	僅600D
Braf_V600M_2GT-F2	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAT <u>T</u>	僅600M
Braf_1799A_2GC-F	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACACAG	V600E

共同的反向引子(與以上全部的正向引子一起使用)

2Braf_C600-R	GATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGA
--------------	----------------------------

共同的探針(與全部的引子組合一起使用)

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

X鹼基= 次要突變

XX鹼基= 有興趣的突變

範例

範例1：本發明之引子之測試

製造合成V600E建構體，測試本發明之引子以及探

針，專一性擴增含有BRAF V600E突變之核酸之能力。二組針對BRAF V600E突變之引子/探針用於確認。將該V600E合成建構體在gDNA背景(0.67ng/uL，5ng/PCR)中依序稀釋(1:2) 17倍。突變濃度範圍從10fM至0.15aM。針對對照組(外顯子13)以及V600E突變之各稀釋樣本，一次雙份，分析6次(共12份)。

範例2：V600K BRAF突變之偵測

少見的V600K BRAF突變可使用與設計用於V600E突變相同的引子對偵測。V600K突變係1798-1799 GT> AA雙突變。序列辨識編號：2包含高度專一性引子，其僅在單一1799 T>A突變之存在下擴增產物。因此，當使用引子對序列辨識編號：1以及序列辨識編號：10進行擴增反應以及使用引子對序列辨識編號：2以及序列辨識編號：10在相同樣本上進行另一反應時，第一個反應可產生擴增反應(陽性)，而第二個反應不會產生產物(陰性)。此陽性與陰性之組合之結果指示存在V600K突變。

範例3：BRAF T1799A/GT1798-1799AA/TG1799 -1800AT突變專屬性測試

A)測試材料

1. 產生含有BRAF V600 D、E以及K突變之DNA合成片段

a. BRAF V600D：

AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGATAAATCTCGAT
GGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTT

b. BRAF V600E

c. BRAF V600K :

ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAGAAATCTC
GATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATT
TT

2. 針對BRAF突變V600 D、E以及K突變之序列專一性引子/探針(列於表1中之序列)

a. 1799A_1GT (對1799 T變成A鹼基對具專一性(V600E、V600D以及V600K))

b. V600D_2GA (對V600D具專一性)

c. V600K_2AT (對V600K具專一性)

B. 步驟程序

1. 在0.667 ng/ul基因組DNA中稀釋三種合成片段中每一個至濃度200 aM (Promega Corp. - 人類基因組DNA, 100ug)

2. 用全部三種引子組(對各突變具專一性), 以PCR擴增每一突變之合成專一性片段

3. 分析專屬性

C. 專屬性分析

下列二個引子/探針組係設計用於擴增專一性突變。用每一個合成片段測試此等引子之專屬性

a. 1799A_1GT (擴增V600E、V600D以及V600K)此引子/探針組已述於分析發展節段(7)中, 用於擴增在鹼基1799處之T變A之改變。

b. V600D_2GA (對V600D具專一性)此引子/探針組已

述於分析發展節段(7)中，用於擴增在鹼基1799-1800處之TG變AT之改變。

c. V600K_2AT (對V600K具專一性)此引子/探針組已述於分析發展節段(7)中，用於擴增在鹼基1798-1799處之CT變AA之改變。

於專屬性測試中使用全部的引子以及探針

結果：下表描述用專一性引子探針組成功地擴增之片段。加號(+)表示被擴增之專一性片段。

表2：用於界定各突變類型之引子之組合如下

1799A_1GT	V600K_2AT	V600D_2GA	突變
+	-	-	V600E
+	-	+	V600D
+	+	-	V600K
-	-	-	野生型
-	-	-	無效

結果：

吾人收集每一個合成以及引子/探針組合之Ct數據

	V600D 合成 Ct	V600E 合成 Ct	V600K 合成 Ct
V600D_2GA (僅擴增V600D)	30.39	36.87	33.79
1799A_1GT (擴增V600D、 V600E以及 V600K)	30.34	30.65	29.61
V600K_2AT (僅擴增V600K)	39.06	38.72	29.67

專屬性之測定係經由減去各樣板之PCR擴增的Ct而得(使用設計為對各樣板具專一性以及非專一性之引子/探針組)。

	V600D 合成 δCt	V600E 合成 δCt	V600K 合成 δCt
V600D_2GA (僅擴增V600D)	0	6.22	4.12
1799A_1GT (擴增V600D、 V600E以及 V600K)	-0.05	0	-0.06
V600K_2AT (僅擴增V600K)	8.67	8.07	0

δCt 測定如下：

範例：

V600D_2GA對V600D合成片段之專屬性 = 0

使用V600 D片段作為樣板，用V600D_2GA引子/探針進行擴增

$$dCt = 30.39 - 30.39 = 0 \text{ (專屬性)}$$

使用V600 D片段作為樣板，用1799A_1GT引子/探針進行擴增

$$dCT = 30.34 - 30.39 = -0.05 \text{ (專屬性)}$$

使用V600 D片段作為樣板，用V600K_2AT引子/探針進行擴增

$$dCT = 39.06 - 30.39 = 8.67 \text{ (非專一性)}$$

接受標準

dCT (使用對片段具專一性之引子之Ct - 使用對片段不具專一性之引子之Ct) ≤ 4

在第7節中所述之目前接受的標準(分析發展-見下表)，引子/探針1799_1GT可偵測在1799處T變A鹼基對之改變，因此可偵測所有的突變。

結果：

V600K_2AT專屬於V600K突變

V600D_2GA專屬於V600D突變

1799A_1GT專屬於1799 T變A之改變，其含於全部三種突變中(V600E、V600E以及V600K)

表3：用以界定各突變類型之引子的組合

BrafEx13	1799A_1GT	1799A_2AT	V600K_2AT	V600D_2GA	突變
+	+	+	-	-	V600E
+	+	-	-	+	V600D
+	+	-	+	-	V600K
+	-	-	-	-	野生型
>30 Ct	-	-	-	-	無效

【圖式簡單說明】

第1圖顯示用於擴增以及偵測BRAF突變之引子以及探針。

【主要元件符號說明】

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99126740

※ 申請日：99.8.11

※IPC 分類：

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於偵測BRAF突變之方法、引子、探針及套組
METHODS, PRIMERS, PROBES AND KITS USEFUL FOR THE
DETECTION OF BRAF MUTATIONS

二、中文發明摘要：

本發明有關用於偵測樣本中存在之突變BRAF序列，特別是用於偵測存在之BRAF V600E、V600D、V600K以及V600M突變之方法、引子以及探針。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to methods, primers and probes useful for detecting the presence of mutant BRAF sequences in a sample, specifically for detecting the presence of the BRAF V600E, V600D, V600K, and V600M mutations.

七、申請專利範圍：

1. 一種用於偵測樣本中BRAF突變之存在的方法，該方法包含：(a)從該樣本中分離出核酸，其中該樣本包含DNA序列；(b)進行該樣本之DNA序列之擴增反應，其中該擴增反應包含一能夠在BRAF DNA序列之第一位置處專一性黏合BRAF突變序列之第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：1、序列辨識編號：2、序列辨識編號：3、序列辨識編號：4、序列辨識編號：5、序列辨識編號：6、序列辨識編號：7、序列辨識編號：8或序列辨識編號：9，以及一能夠在BRAF DNA序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中該第一與第二引子係黏合至雙股BRAF DNA序列之不同股，其中當該樣本之DNA序列包含在該BRAF DNA序列之第一位置處含有突變序列之BRAF DNA序列時，該擴增反應能夠產生BRAF突變專一性擴增產物；以及(c)使該擴增反應產生之擴增產物顯像，其中偵測到BRAF突變專一性擴增產物，係該樣本中BRAF突變之陽性指標。
2. 一種用於偵測樣本中BRAF突變之存在的方法，該方法包含：(a)從該樣本中分離出核酸，其中該樣本包含RNA序列；(b)進行該樣本之該RNA序列之擴增反應，其中該擴增反應包含一能夠在BRAF RNA序列之第一位置處專一性黏合BRAF突變序列之第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：1、序列辨識編號：2、序列辨識編號：3、序列辨識編號：4、序列辨識編號：5、序列辨

識編號：6、序列辨識編號：7、序列辨識編號：8或序列辨識編號：9，以及一能夠在BRAF RNA序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中該第一與第二引子係黏合至雙股BRAF RNA序列之不同股，其中當樣本之RNA序列包含在該BRAF RNA序列之第一位置處含有突變序列之BRAF RNA序列時，該擴增反應能夠產生BRAF突變專一性擴增產物；以及(c)使該擴增反應產生之擴增產物顯像，其中偵測到BRAF突變專一性擴增產物，係該樣本中BRAF突變之陽性指標。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中BRAF突變之存在，係該樣本中轉移性黑色素瘤之陽性指標。
4. 如申請專利範圍第2項之方法，其中BRAF突變之存在，係該樣本中轉移性黑色素瘤之陽性指標。
5. 如申請專利範圍第1項或第2項之方法，其中該BRAF突變係擇自於由下列所構成之群組：BRAF V600E、BRAF V600D、BRAF V600K、BRAF V600M以及BRAF V600A突變。
6. 如申請專利範圍第1項或第2項之方法，其中該樣本係擇自於由下列所構成之群組：血液、組織或細胞。
7. 如申請專利範圍第1項或第2項之方法，其中該組織樣本係經福馬林固定的石蠟包埋組織。
8. 如申請專利範圍第1項或第2項之方法，其中該能夠在BRAF核酸序列之第二位置處專一性黏合之第二引子係序列辨識編號：10。

9. 一種決定用於治療病人之腫瘤之化療方案之方法，包含：
(a)取得該腫瘤之組織樣本，然後固定該樣本，以獲得一經固定的腫瘤樣本；
(b)從該經固定的腫瘤樣本中分離出mRNA；
(c)使用能夠擴增該BRAF基因區域之寡核苷酸引子對，使該mRNA進行擴增反應，以獲得BRAF擴增樣本；
(d)測定該擴增樣本中BRAF mRNA之量；
(e)比較步驟(d)之BRAF mRNA之量與內部對照基因之mRNA之量；以及(e)根據該擴增樣本中BRAF mRNA之量以及BRAF基因表現之閾值位準，決定化療方案。
10. 如申請專利範圍第9項之方法，其中該寡核苷酸引子係由下列寡核苷酸引子對構成：序列辨識編號：1以及序列辨識編號10、或序列辨識編號：2以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：3以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：4以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：5以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：6以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：7以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：8以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：9以及序列辨識編號：10，或與其等有至少80%一致之寡核苷酸引子對。
11. 一種用於偵測BRAF基因之表現之套組，包含寡核苷酸對序列辨識編號：1以及序列辨識編號：10、或序列辨識編號：2以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：3以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：4以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：5以及序列辨識編號：10、

序列辨識編號：6以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：7以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：8以及序列辨識編號：10、序列辨識編號：9以及序列辨識編號：10，或與其等有至少80%一致之寡核苷酸引子對。

12. 一種對BRAF V600E、V600D、V600K、V600M以及V600A突變具專一性之核酸探針，其中該探針包含序列辨識編號：11。
13. 一種對BRAF V600E、V600D、V600K、V600M以及V600A突變具專一性之核酸探針，其中該探針包含序列辨識編號：12。
14. 一種用於偵測突變BRAF核酸序列之存在的方法，包含加入一探針，其中該探針包含序列辨識編號：11或序列辨識編號：12之寡核苷酸序列。
15. 一種用於偵測樣本中BRAF V600K突變之存在的方法，該方法包含：(a)從該樣本中分離出核酸，其中該樣本包含DNA序列；(b)進行該樣本之DNA序列之第一擴增反應，其中該擴增反應包含一能夠在BRAF DNA序列之第一位置處專一性黏合BRAF突變序列之第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：1，以及一能夠在BRAF DNA序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中該第一與第二引子黏合至雙股BRAF DNA序列之不同的股，其中當該樣本之DNA序列包含在該BRAF DNA序列之第一位置處含有突變序列之BRAF DNA序列時，該擴增反應能夠產生BRAF突變專一性擴增產

物；(c)進行該樣本之DNA序列之第二擴增反應，其中該擴增反應包含一第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：2，以及一能夠在BRAF DNA序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中由於該第一引子之嚴苛度(stringency)，該擴增反應將無法產生BRAF突變專一性擴增產物；以及(d)使該第一擴增反應產生之擴增產物顯像，其中於一樣本中偵測到BRAF突變專一性擴增產物以及從第二反應中沒有偵測到擴增產物，係該樣本中BRAF V600K突變之陽性指標。

16. 一種用於偵測樣本中BRAF V600K突變之存在的方法，該方法包含：(a)從該樣本中分離出核酸，其中該樣本包含RNA序列；(b)進行該樣本之RNA序列之擴增反應，其中該擴增反應包含一能夠在BRAF RNA序列之第一位置處專一性黏合BRAF突變序列之第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：1，以及一能夠在BRAF RNA序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中該第一與第二引子黏合至雙股BRAF RNA序列之不同股，其中當該樣本之RNA序列包含在該BRAF RNA序列之第一位置處含有突變序列之BRAF RNA序列時，該擴增反應能夠產生BRAF突變專一性擴增產物；(c)進行該樣本之RNA序列之第二擴增反應，其中該擴增反應包含一第一引子，其中該第一引子係序列辨識編號：2，以及一能夠在BRAF RNA序列之第二位置處專一性黏合之第二引子，其中由於該第一引子之嚴苛度，該擴增反

應將無法產生BRAF突變專一性擴增產物；以及(d)使該第一擴增反應產生之擴增產物顯像，其中於一樣本中偵測到BRAF突變專一性擴增產物以及從第二反應中沒有偵測到擴增產物，係該樣本中BRAF V600K突變之陽性指標。

第 1 圖：BRAF 突變引子與探針之序列表

序列辨識編號	序列
序列辨識編號：1	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA
序列辨識編號：2	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGA
序列辨識編號：3	AGGTGATTTTGGTCTAGCTACTGC
序列辨識編號：4	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAAT
序列辨識編號：5	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAA
序列辨識編號：6	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAGAA
序列辨識編號：7	AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATAT
序列辨識編號：8	AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACTAT
序列辨識編號：9	AATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACACAG
序列辨識編號：10	GATCCAGACAACTGTTCAAAGTGA
序列辨識編號：11	6FAM-TCCATCGAGATTTTC
序列辨識編號：12	6FAM-ACCCACTCCATCGAGA

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：