

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2008.09.11</b>	(73) Titular(es): <b>F.HOFFMANN-LA ROCHE AG</b> <b>GRENZACHERSTRASSE 124 4070 BASEL CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>2007.09.11 US 993391 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2009.03.18</b>	(72) Inventor(es): <b>RACHEL LANGLAND US</b> <b>THAD SHARP US</b> <b>STEPHEN WILL US</b> <b>LIN WU US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.04.02</b> <b>112/2014</b>	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **TESTE DE DIAGNÓSTICO PARA SUSCEPTIBILIDADE A INIBIDORES DE B-RAF CINASE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS E REAGENTES PARA A DETECÇÃO DE UMA MUTAÇÃO EM BRAF E MÉTODOS DE SELECÇÃO DE DOENTES PARA TRATAMENTO DE UM INIBIDOR DE B-RAF CINASE, TAL COMO UM INIBIDOR DE B-RAF CINASE SELECTIVO.

## RESUMO

### **"TESTE DE DIAGNÓSTICO PARA SUSCEPTIBILIDADE A INIBIDORES DE B-RAF CINASE"**

A presente invenção proporciona métodos e reagentes para a detecção de uma mutação em *BRAF* e métodos de selecção de doentes para tratamento de um inibidor de B-Raf cinase, tal como um inibidor de B-Raf cinase selectivo.

## DESCRIÇÃO

### “TESTE DE DIAGNÓSTICO PARA SUSCEPTIBILIDADE A INIBIDORES DE B-RAF CINASE”

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O gene *BRAF* codifica B-Raf, uma serina/treonina cinase, a qual liga a sinalização de RAS activada a jusante de MAPK cinases (Wellbrock *et al.*, *Cancer Res.* 64:2338-2342, 2004). As mutações oncogénicas em B-Raf resultam em ganho de função de cinase, tornando a via de Raf-MEK-ERK activa de modo constitutivo na ausência dos factores de crescimento típicos. Esta activação constitutiva correlaciona-se com fraco prognóstico no melanoma metastático (Houben *et al.*, 2004, *supra*). As mutações de activação em *BRAF* foram referidas numa variedade de malignidades. Por exemplo, as mutações em *BRAF* verificam-se em tanto quanto 70% dos casos de melanoma humano. Uma mutação de uma única base (T>A) na posição 1799 de nucleótido no codão 600 do exão 15, conduz a uma substituição de valina em glutamato (V600E), a qual está presente em mais de 85% dos melanomas com uma mutação em B-Raf (Davies *et al.*, *Nature* 417: 949-954, 2002; Garnett e Marais, *Cancer Cell* 6: 313-319, 2004; Gray-Schopfer *et al.*, *Cancer Metastasis Rev.* 24:165-183, 2005; Houben *et al.*, 2004). Menos frequentemente, a V600E resulta da mutação de duas bases TG>AA nas posições 1799-1800 de nucleótido (Houben *et al.*, *J Carcinog.* 3:6, 2004).

É conhecido um número inibidores de cinase, incluindo os que inibem B-Raf. Esses inibidores incluem PLX4032, o qual inibe

selectivamente a actividade de cinase de B-Raf V600E. A presente invenção proporciona métodos de identificação de doentes positivos para V600E para seleccionar para tratamento utilizando um inibidor de B-Raf cinase, e. g., PLX4032.

LANGLAND *et al.*, 2006 ("Desenvolvimento de um teste de diagnóstico acompanhante para inibidores de BRAF de V600E", URL: <http://aacrmeetingabstracts.org/cgi/content/abstract/2006/2/A13>) divulgam um método para determinar a sensibilidade de células cancerígenas a PLX4032 com base na detecção da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> por PCR TaqMan em tempo real. Contudo, não são divulgadas sequências específicas de iniciadores ou sondas.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona métodos e kits para a detecção de doentes que são candidatos para tratamento com um inibidor de B-Raf cinase. Deste modo, num aspecto, a invenção proporciona um método de determinação da sensibilidade de células cancerígenas a um inibidor de B-Raf, o método compreendendo: (i) proporcionar uma amostra de ácido nucleico de células cancerígenas de um doente que tem um cancro; (ii) a amplificação de uma sequência polinucleotídica alvo na amostra de ácido nucleico utilizando um par de iniciadores que amplifica a sequência polinucleotídica alvo, em que a sequência polinucleotídica alvo compreende um sítio de mutação V600E, V600D ou V600K em *BRAF* e a amplificação é realizada na presença de uma sonda oligonucleotídica marcada que compreende a sequência apresentada na SEQ ID N°: 1, em que "n" é desoxiinosina e detecta a presença de uma sequência mutada no sítio de mutação V600E em *BRAF*; e (iii) a detecção da presença ou ausência de uma mutação V600E ou V600D ou V600K em

*BRAF*; determinando, desse modo, a sensibilidade do cancro ao inibidor de B-Raf. Em algumas formas de realização, a sonda tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 1. A amplificação pode ser realizada na presença de uma segunda sonda que detecta a presença de uma sequência de tipo selvagem no sítio de mutação V600E. Em algumas formas de realização, a segunda sonda compreende, pelo menos, 15 nucleótidos da SEQ ID N°: 2. Em algumas formas de realização, a segunda sonda tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 2. Em determinadas formas de realização, a sonda pode ser marcada com um marcador fluorescente. A sonda também pode ser marcada com dois marcadores, onde um dos marcadores é um corante fluorescente e o outro marcador é uma fracção de neutralização.

Em algumas formas de realização, ambos os iniciadores do par de iniciadores utilizado na reacção de amplificação se hibridam ao exão 15 de *BRAF*. Em algumas formas de realização, um dos iniciadores do par de iniciadores utilizado nas reacções de amplificação compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3, e. g., um dos iniciadores no par de iniciadores pode ter a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3. Em formas de realização adicionais, um dos iniciadores no par de iniciadores compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 4. Por exemplo, o iniciador pode ter a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 4. Em formas de realização adicionais, o par de iniciadores utilizado para a amplificação, compreende iniciadores tendo as sequências nucleotídicas apresentadas nas SEQ ID N°: 3 e SEQ ID N°: 4.

Em algumas formas de realização, o passo de amplificação da reacção compreende um RT-PCR.

O método pode ser empregue para detectar cancros que têm uma mutação na posição 600 de aminoácido de B-Raf, e. g., uma mutação V600E. Em algumas formas de realização, o cancro é melanoma. Noutras formas de realização, o cancro é cancro do cólon ou cancro da tiróide. Em algumas formas de realização, a amostra de ácido nucleico utilizada nos métodos da invenção para detectar a mutação pode ser de uma biópsia de pele. Noutras formas de realização, a amostra é de uma biópsia de cólon. A amostra também pode ser de tecido embebido em parafina. O método da invenção pode compreender, ainda, o registo de um diagnóstico a que o doente é sensível a um inibidor de B-Raf, tal como um inibidor de B-Raf específico de mutante, e. g., PLX4032.

Em algumas formas de realização da divulgação, o método compreende, ainda, a administração de um inibidor de B-Raf ao doente. O inibidor de B-Raf pode ser um inibidor de B-Raf específico de mutante, tal como, PLX4032.

Noutro aspecto, a divulgação proporciona um método de identificação de um candidato a tratamento de PLX4032, o método compreendendo: proporcionar uma amostra de um indivíduo; e a detecção de uma biomolécula compreendendo uma mutação de V600E de *BRAF* da amostra identificando, desse modo, o candidato a tratamento de PLX4032. Em algumas formas de realização, a biomolécula é um ácido nucleico. Noutras formas de realização, a biomolécula é um polipéptido. O polipéptido pode ser obtido, e. g., de uma amostra compreendendo células cancerígenas do doente. Em algumas formas de realização, o polipéptido pode ser

detectado utilizando um imunoensaio. O método também pode compreender a administração de PLX4032 ao indivíduo.

Noutro aspecto, a invenção proporciona um kit para a detecção de um doente que é um candidato para tratamento com um inibidor de B-Raf, em que o kit compreende uma primeira sonda específica de alelo, em que a primeira sonda é adequada para a detecção de uma mutação V600E, V600D ou V600K em *BRAF* e compreende a sequência apresentada na SEQ ID N°: 1. Em algumas formas de realização, a sonda tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 1. Um kit da invenção pode, ainda, compreender uma segunda sonda específica de alelo, em que a segunda sonda detecta a sequência de *BRAF* de tipo selvagem e compreende, pelo menos, 15 contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 2. Em algumas formas de realização, a segunda sonda tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 2.

Em formas de realização adicionais, um kit da invenção compreende, ainda, um par de iniciadores que amplifica uma região alvo de *BRAF* que compreende um sítio de mutação V600E. Por exemplo, o par de iniciadores pode compreender um iniciador que compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3. Em determinado aspecto, o iniciador tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3. Noutras formas de realização, o par de iniciadores pode compreender iniciadores que compreendem, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3 e SEQ ID N°: 4. Em algumas formas de realização, o par de iniciadores compreende iniciadores que têm a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3 e SEQ ID N°: 4.

Deste modo, em algumas formas de realização, um kit da invenção pode compreender: uma sonda que tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 1; uma sonda que tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 2; um iniciador que tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3; e um iniciador que tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 4.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra um alinhamento de um produto de amplificação de B-Raf V600E (SEQ ID N°: 5) com uma região correspondente do Cromossoma X (SEQ ID N°: 6). Os sítios de iniciadores de B-Raf V600E são mostrados com setas. O produto de amplificação inclui porções do exão 15 (letra maiúscula) e intrão 15 (letra minúscula). As barras verticais denotam posições de identidade entre as sequências de *BRAF* e cromossoma X. O codão 600 está dentro de uma caixa; GTG corresponde a valina (V). A região de ligação de sonda está destacada com sombreado; a sonda de mutante (MU) é mais comprida do que a sonda de tipo selvagem (WT) em dois nucleótidos (5'-CT na região destacada) e ambas as sondas se ligam ao complemento da sequência aqui mostrada.

A Figura 2 mostra um alinhamento de uma região do exão 15 de B-Raf circundando o codão 600 (seta) (SEQ ID N°: 7) com regiões homólogas de A-Raf (SEQ ID N°: 8) e C-Raf (SEQ ID N°: 9). Os asteriscos marcam diferenças de aminoácido relativamente à sequência de B-Raf (e. g., Mercer & Pritchard, *Biochim Biophys Acta* 1653:25-40, 2003).



A Figura 3 mostra um alinhamento do produto de amplificação de B-Raf V600E (SEQ ID N°: 5) com as correspondentes sequências dos genes *ARAF* (codifica A-Raf) (SEQ ID N°: 11) e *RAF1* (codifica C-Raf) (SEQ ID N°: 10). Os nucleótidos em letra minúscula diferem da sequência de *BRAF*.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Definições

No contexto deste pedido, uma “V600E” refere-se a uma mutação em *BRAF* (T>A na posição 1799 de nucleótido) que resulta na substituição de uma glutamina por uma valina na posição 600 de aminoácido de B-Raf. “V600E” também é conhecida como “V599E” (1796T>A) sob um sistema de numeração anterior (Kumar et al., *Clin. Cancer Res.* 9:3362-3368, 2003).

No contexto desta invenção, um “inibidor de B-Raf cinase” inibe a actividade de uma B-Raf cinase. Esse inibidor também pode inibir a actividade de outras cinases, incluindo outras raf cinases.

Um “inibidor de B-Raf cinase específico de mutante”, como aqui utilizado, refere-se a um inibidor de B-Raf que tem selectividade para um B-Raf mutante, tal como B-Raf tendo uma mutação no resíduo de valina na posição 600 de aminoácido, e. g., uma mutação V600E, em comparação com B-Raf de tipo selvagem. Esse inibidor é, pelo menos, duas vezes, mais frequentemente, pelo menos, três vezes, ou mais, tão potente quanto um inibidor de B-Raf mutante, e. g., um B-Raf tendo uma

mutação V600E, em comparação com o tipo selvagem. Por exemplo, em algumas formas de realização, um “inibidor de B-Raf específico de mutante” pode ter uma  $IC_{50}$  para actividade de inibição de cinase (ensaio bioquímico) de cerca de 30 nM para V600E B-Raf, enquanto que a correspondente  $IC_{50}$  para B-Raf de tipo selvagem é cerca de 100 nM. A potência também pode ser comparada em termos de valores de  $IC_{50}$  para ensaios celulares, *e. g.*, ensaios celulares que medem a inibição de crescimento. Um “inibidor de B-Raf específico de mutante”, no contexto desta invenção, também pode inibir cinases que não B-Raf, *e. g.*, outras raf cinases.

O termo “hibridação” refere-se à formação de uma estrutura de dúplice por dois ácidos nucleicos de cadeia única devido ao emparelhamento de bases complementar. A hibridação pode ocorrer entre cadeias de ácido nucleico exactamente complementares ou entre cadeias de ácido nucleico que contêm pequenas regiões de desemparelhamento. Como aqui utilizado, a expressão “substancialmente complementar” refere-se a sequências que são complementares, à excepção de pequenas regiões de desemparelhamento. Tipicamente, o número total de nucleótidos desemparelhados ao longo de uma região de hibridação não é mais de 3 nucleótidos para sequências cerca de 15 nucleótidos em comprimento. As condições sob as quais se irão hibridar apenas as cadeias de ácido nucleico exactamente complementares são referidas como “estringentes” ou condições de hibridação “específicas de sequência”. Os dúplises estáveis de ácidos nucleicos substancialmente complementares podem ser alcançados sob condições de hibridação menos estringentes. Os especialistas na técnica da tecnologia de ácido nucleico podem determinar a estabilidade de dúplice empiricamente, considerando um número de variáveis incluindo, por exemplo, o comprimento e concentração

de pares de bases dos oligonucleótidos, força iónica e incidência de pares de bases desemparelhados. Por exemplo, o software informático para o cálculo da estabilidade de dúplice está comercialmente disponível a partir de National Biosciences, Inc. (Plymouth, Minn.); e. g., versão 5 de OLIGO, ou de Software de ADN (Ann Arbor, Michigan), e. g., Visual OMP 6.

As condições de hibridação estringentes, específicas de sequência, sob as quais um oligonucleótido se hibridará apenas à sequência alvo exactamente complementar, são bem conhecidas na técnica (ver, e. g., as referências gerais proporcionadas na secção sobre a detecção de polimorfismos em sequências de ácidos nucleicos). As condições estringentes são dependentes de sequência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Em geral, as condições estringentes são seleccionadas para serem cerca de 5 °C mais baixas do que o ponto de fusão térmica ( $T_m$ ) para a sequência específica, a uma força iónica e pH definidos. O  $T_m$  é a temperatura (sob força iónica e pH definidos), à qual 50% dos pares de bases se dissociaram. A atenuação da estringência das condições de hibridação irá permitir que os desemparelhamentos de sequência sejam tolerados; o grau de desemparelhamento tolerado pode ser controlado por ajuste adequado das condições de hibridação.

O termo "iniciador" refere-se a um oligonucleótido que actua como um ponto de iniciação da síntese de ADN, sob condições nas quais a síntese de um produto de extensão de iniciador complementar à cadeia de ácido nucleico é induzida, i. e., na presença de quatro nucleósidos trifosfatos diferentes e um agente para polimerização (i. e., ADN polimerase ou transcriptase reversa), num tampão apropriado e a uma temperatura adequada. Um iniciador é, de um modo preferido, um

oligodesoxirribonucleótido de cadeia única. O iniciador inclui uma “região de hibridação” exactamente ou substancialmente complementar à sequência alvo, de um modo preferido, cerca de 15 a cerca de 35 nucleótidos em comprimento. Um oligonucleótido iniciador pode consistir inteiramente na região de hibridação ou pode conter características adicionais, as quais permitem para a detecção, imobilização ou manipulação do produto amplificado, mas as quais não alteram a capacidade do iniciador servir como um reagente de partida para a síntese de ADN. Por exemplo, uma cauda de sequência de ácidos nucleicos pode ser incluída na extremidade 5' do iniciador que se hibrida a um oligonucleótido de captura.

Um iniciador “específico de alelo”, como aqui utilizado, é um iniciador que se hibrida a uma sequência alvo de modo que a extremidade 3', habitualmente o nucleótido 3', do iniciador se alinhe com um sítio de interesse, e. g., nucleótido 1799, a qual é a segunda posição no codão 600 de *BRAF* e é exactamente complementar ao alelo de tipo selvagem ou alelo mutante na posição de interesse. Como aqui utilizado, o iniciador é “específico para” o alelo ao qual é exactamente complementar na extremidade 3', e. g., no nucleótido 3' ou penúltimo nucleótido. Em geral, a extensão de iniciador é inibida quando um desemparelhamento está presente na extremidade 3' do iniciador. Um iniciador específico de alelo, quando hibridado ao alelo exactamente complementar, é extensível com uma maior eficiência. O mesmo iniciador, quando hibridado ao outro alelo, não é tão facilmente extensível devido ao desemparelhamento na extremidade 3', e. g., o nucleótido 3' ou penúltimo nucleótido na extremidade 3', do iniciador no dúplice de hibridação. Deste modo, a utilização de um iniciador específico de alelo

proporciona discriminação alélica com base na formação diferencial de um produto de extensão.

O termo “sonda” refere-se a um oligonucleótido que se hibrida selectivamente a um ácido nucleico alvo sob condições adequadas.

Uma sonda “específica de alelo” contém uma “região de hibridação” exactamente ou substancialmente complementar à sequência alvo e é exactamente complementar à sequência alvo no sítio de interesse, e. g., nucleótido 1799 no codão 600 de *BRAF*. Deste modo, por exemplo, uma sonda específica de alelo de V600E detecta selectivamente uma sequência de mutação V600E, enquanto que uma sonda específica de alelo de *BRAF* de tipo selvagem detecta selectivamente a sequência de tipo selvagem. Um ensaio de hibridação efectuado utilizando a sonda sob condições de hibridação, suficientemente, estridentes possibilita a detecção selectiva de uma sequência alvo específica compreendendo o sítio de interesse. A região de hibridação de sonda tem, de um modo preferido, desde cerca de 10 a cerca de 35 nucleótidos em comprimento, de um modo mais preferido, desde cerca de 15 a cerca de 35 nucleótidos em comprimento. A utilização de bases ou análogos de bases modificadas que afectam a estabilidade de hibridação, as quais são bem conhecidas na técnica, pode possibilitar a utilização de sondas mais curtas ou mais longas com estabilidade comparável. Um oligonucleótido de sonda pode consistir inteiramente da região de hibridação ou pode conter características adicionais, as quais permitem para a detecção ou imobilização da sonda, mas as quais não alteram significativamente as características de hibridação da região de hibridação.

As expressões “sequência alvo” ou “região alvo” referem-se a uma região de um ácido nucleico que deve ser analisada e compreende o sítio polimórfico de interesse.

Como aqui utilizados, a expressão “ácido nucleico” e os termos “polinucleótido” e “oligonucleótido” referem-se a iniciadores, sondas e fragmentos oligoméricos. Os termos não estão limitados em comprimento e são genéricos a polímeros lineares de polidesoxirribonucleótidos (contendo 2-desoxi-D-ribose), polirribonucleótidos (contendo D-ribose) e qualquer outro N-glicósido de uma base de purina ou pirimidina, ou bases de purina ou pirimidina modificadas. Estes termos incluem ADN de cadeia dupla e única, assim como ARN de cadeia dupla e única. Os oligonucleótidos da invenção podem ser utilizados como iniciadores e/ou sondas.

Um ácido nucleico, polinucleótido ou oligonucleótido pode compreender ligações de fosfodiéster ou ligações modificadas, incluindo mas não limitadas a fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, ponte de fosforamidato, ponte de metileno-fosfonato, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, ponte de fosforotioato ou ligações de sulfona e combinações dessas ligações.

Um ácido nucleico, polinucleótido ou oligonucleótido pode compreender as cinco bases de ocorrência biológica (adenina, guanina, timina, citosina e uracilo) e/ou bases que não as cinco bases de ocorrência biológica. Estas bases podem servir um número de objectivos, e. g., estabilizar ou desestabilizar a hibridação; promover ou inibir a degradação de sonda; ou como pontos de conjugação para fracções detectáveis ou fracções

neutralizadoras. Por exemplo, um polinucleótido da invenção pode conter uma ou mais fracções de bases modificadas, não-padrão ou derivatizadas, incluindo mas não limitadas a N6-metil-adenina, N6-*terc*-butil-benzil-adenina, imidazole, imidazoles substituídos, 5-fluorouracilo, 5 bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5 (carboxi-hidroximetil)uracilo, 5 carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5 carboximetilaminometiluracilo, di-hidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6 isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), vibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2 tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6--diaminopurina e 5-propinilpirimidina. Outros exemplos de fracções de bases modificadas, não-padrão ou derivatizadas podem ser consultados nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 6001611; 5955589; 5844106; 5789562; 5750343; 5728525; e 5679785.

Além disso, um ácido nucleico, polinucleótido ou oligonucleótido pode compreender uma ou mais fracções de açúcar modificadas, incluindo mas não limitadas a arabinose, 2-fluoroarabinose, xilulose e uma hexose.

## **Introdução**

A invenção proporciona um ensaio de diagnóstico de V600E para utilização na selecção de doentes de cancro, e. g., doentes de cancro de melanoma, doentes de cancro de cólon, doentes de cancro de tiróide e doentes tendo cancros ovarianos serosos de baixo grau, os quais são candidatos para tratamento com um inibidor de B-Raf, tal como um inibidor de B-Raf mutante selectivo, e. g., PLX4032. Deste modo, o teste de diagnóstico pode ser utilizado para classificar doentes de acordo com a sua probabilidade de responderem a tratamento com PLX4032.

Tipicamente, a mutação V600E (também conhecida como V599E (1796T>A)) é detectada utilizando um método que compreende a determinação da presença de uma mutação de uma única base (T>A) na posição 1799 de nucleótido no codão 600 do exão 15. Esta mutação também pode resultar da mutação TG>AA de duas bases na posição 1799-1800 de nucleótido. A mutação de duas bases também pode ser detectada pela avaliação da posição 1799. Em algumas formas de realização, um ácido nucleico também pode ser avaliado para a presença de uma substituição na posição 1800.

Outras mutações também podem ocorrer no codão 600. Estas incluem V600K, V600D e V600R. Em algumas formas de realização, uma sonda que detecta uma mutação V600E também pode detectar outras mutações de codão 600, e. g., V600D, V600K e/ou V600R. Em algumas formas de realização, uma sonda também pode detectar uma mutação no codão 601.

A presença de uma mutação V600E é, tipicamente, determinada pela avaliação de ácido nucleico, e. g., ADN genómico ou ARNm, para a presença de uma substituição de base na posição 1799.



Está disponível uma ampla variedade de ensaios. Em algumas formas de realização, o ensaio é um ensaio de nuclease 5'.

A V600E também pode ser detectada pela detecção da presença de um V600E B-Raf mutante, *e. g.*, utilizando um imunoensaio.

A presença de V600E indica que o doente é um candidato para tratamento de um inibidor de B-Raf, tal como um inibidor de B-Raf específico de mutante. Por conseguinte, a invenção também compreende um método em que um doente que é determinado como tendo uma mutação V600E é tratado com um inibidor de B-Raf, tal como um inibidor de B-Raf específico de mutante, *e. g.*, PLX4032.

### **Amostra biológica**

A mutação V600E pode ser detectada em diversos tipos de cancro, incluindo melanoma; cancro colorrectal; cancro da tiróide, *e. g.*, cancro da tiróide papilar; e cancro ovariano, *e. g.*, carcinoma seroso de baixo grau. Em algumas formas de realização, as mutações V600E são detectadas em cancro do pulmão, gliomas, cancro da próstata, cancro da mama, sarcoma, cancro do fígado, cancro pituitário e cancros que ocorrem no intestino grosso, tracto biliar, olho, pâncreas, estômago, sistema nervoso central, tecido hematopoético e linfóide.

Uma mutação V600E é detectada numa amostra biológica de um doente. A amostra biológica compreende, tipicamente, uma célula cancerígena. Por exemplo, a amostra pode ser uma biópsia de tumor, *e. g.*, de um neoplasma melanocítico maligno, um tumor colorrectal ou um tumor da tiróide; ou de uma amostra de tecido de um sítio metastático. Noutras formas de realização, a amostra

biológica pode ser sangue ou outro fluido, onde o fluido compreende uma célula cancerígena. Noutras formas de realização, a amostra biológica pode compreender ácidos nucleicos em circulação (isentos de células).

A mutação é frequentemente detectada em ácidos nucleicos que são obtidos da amostra biológica. O ácido nucleico que é avaliado para a presença de uma mutação pode ser ARN ou ADN. Em algumas formas de realização, a mutação é detectada em ADN genómico.

Uma amostra biológica pode ser obtida utilizando qualquer de um número de métodos na técnica. Além disso, uma amostra biológica pode ser tratada com um fixador, tal como formaldeído, e embebida em parafina e seccionada para utilização. Alternativamente, pode ser empregue tecido fresco ou congelado. Noutras formas de realização, podem ser utilizados aspirados de agulha fina.

### **Detecção de uma mutação V600E numa sequência de ácidos nucleicos**

As técnicas de detecção para avaliação de ácidos nucleicos para a presença de uma mutação V600E envolvem processos bem conhecidos no campo da genética molecular. Além disso, muitos dos métodos envolvem a amplificação de ácidos nucleicos. É proporcionada na técnica ampla orientação para a realização desses processos. Referências exemplificativas incluem manuais, tais como *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, N.I., N.I., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications

(ed. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, 1994-1999, incluindo actualizações suplementares até Abril de 2004; Sambrook & Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª Ed., 2001).

Embora os métodos empreguem, tipicamente, passos de PCR, também podem ser utilizados outros protocolos de amplificação. Métodos de amplificação adequados incluem reacção em cadeia da ligase (ver, e. g., Wu & Wallace, *Genomics* 4:560-569, 1988); ensaio de deslocamento de cadeia (ver, e. g., Walker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396, 1992; Pat. U.S. N° 5455166); e vários sistemas de amplificação baseados em transcrição, incluindo os métodos descritos nas Pat. U.S. N° 5437990; 5409818; e 5399491; o sistema de amplificação de transcrição (TAS) (Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177, 1989); e replicação de sequência auto-sustentada (3SR) (Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878, 1990; documento WO 92/08800). Alternativamente, podem ser utilizados métodos que amplificam a sonda para níveis detectáveis, tal como amplificação de Q $\beta$ -replicase (framer & Lizardi, *Nature* 339:401-402, 1989; Lomeli et al., *Clin. Chem.* 35:1826-1831, 1989). Uma revisão de métodos de amplificação conhecidos é proporcionada, por exemplo, por Abramson e Myers em *Current Opinion in Biotechnology* 4:41-47, 1993.

Tipicamente, a detecção de V600E é realizada pela avaliação de ácidos nucleicos do doente, num ensaio compreendendo iniciadores e/ou sondas oligonucleotídicos. Os oligonucleótidos podem ser preparados por qualquer método adequado, habitualmente síntese química. Os oligonucleótidos podem ser sintetizados utilizando reagentes e instrumentos comercialmente disponíveis.

Alternativamente, podem ser adquiridos através de fontes comerciais. Os métodos de síntese de oligonucleótidos são bem conhecidos na técnica (ver, e. g., Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979; Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979; Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862; 1981; e o método de suporte sólido da Pat. U.S. Nº 4458066). Além disso, modificações aos métodos de síntese, descritos acima, podem ser utilizadas para impactar, de um modo desejável, o comportamento enzimático com respeito aos oligonucleótidos sintetizados. Por exemplo, a incorporação num oligonucleótido de ligações fosfodiéster modificadas (e. g., fosforotioato, metilfosfonatos, fosfoamidato ou boranofosfato) ou ligações que não um derivado de ácido fosforoso pode ser utilizada para prevenir a clivagem num sítio seleccionado. Além disso, a utilização de açúcares modificados em 2'-amino tende a favorecer o deslocamento à custa da digestão do oligonucleótido quando hibridado a um ácido nucleico que também é o molde para a síntese de uma nova cadeia de ácido nucleico.

A maioria dos ensaios para a detecção de uma mutação V600E ao nível de ácido nucleico implica um de vários protocolos gerais: hibridação utilizando oligonucleótidos específicos de alelo, extensão de iniciador, ligação específica de alelo, sequenciação ou técnicas de separação electroforética, e. g., polimorfismo conformacional de cadeia única (SSCP) e análise de heterodúplice. Os ensaios exemplificativos incluem ensaios de nuclease 5', incorporação de corante terminador dirigido a molde, ensaios oligonucleotídicos específicos de alelo de faróis moleculares, ensaios de extensão de base única e análise de mutações utilizando sequenciação de pirofosfato em tempo real. A análise de sequências amplificadas pode ser realizada utilizando diversas tecnologias, tais como microchips, ensaios de

polarização de fluorescência e espectrometria de massa de ionização de dessorção laser assistida por matriz (MALDI). Dois métodos adicionais que podem ser utilizados, são os ensaios baseados em clivagem invasiva com Flap nucleases e metodologias empregando sondas de cadeado.

A determinação da presença ou ausência de um alelo de V600E é, em geral, realizada pela análise de uma amostra de ácido nucleico que é obtida de uma amostra biológica compreendendo células cancerígenas de um doente a ser analisado. Frequentemente, a amostra de ácido nucleico compreende ADN genómico. O ADN genómico é, tipicamente, obtido de amostras tumorais, mas também pode ser obtido de outras células ou tecidos, *e. g.*, de sítio metastático ou sangue.

A amostra de ácido nucleico a ser analisada também pode ser ARN. Por exemplo, o ARNm de uma amostra biológica pode ser analisado para determinar a presença ou ausência de uma mutação V600E. A amostra de ácido nucleico é obtida de células nas quais o ácido nucleico alvo é expresso, *e. g.*, um tumor primário ou tecido de um sítio metastático. Essa análise pode ser realizada, em primeiro lugar, pela transcrição reversa do ARN alvo utilizando, por exemplo, uma transcriptase reversa viral e, depois, amplificação do ADNc resultante; ou utilizando uma transcrição reversa-reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR) de temperatura elevada combinada, como descrita nas Pat. U.S. N° 5310652; 5322770; 5561058; 5641864; e 5693517.

As metodologias frequentemente utilizadas para a análise de amostras de ácido nucleico para detectar substituições nucleotídicas são descritas resumidamente. Contudo, qualquer

método conhecido na técnica pode ser utilizado na invenção, para detectar a presença de substituições nucleotídicas.

### Sondas Específicas de Alelo

A hibridação específica de alelo baseia-se na distinção entre duas moléculas de ADN diferindo em, pelo menos, uma base, pela hibridação de um oligonucleótido que é específico para uma das sequências variantes a um produto amplificado obtido da amplificação da amostra de ácido nucleico. Um ensaio específico de alelo também pode compreender dois oligonucleótidos específicos de alelo, e. g., uma sonda específica de alelo para o primeiro variante e uma sonda específica de alelo para o segundo variante, onde as sondas se hibridam de modo diferencial a um variante *versus* o outro. A hibridação específica de alelo emprega, tipicamente, oligonucleótidos curtos, e. g., 15-35 nucleótidos em comprimento. Os princípios e orientação para a concepção dessa sonda estão disponíveis na técnica, e. g., nas referências aqui citadas. As condições de hibridação deverão ser suficientemente estridentes para que exista uma diferença significativa em intensidade de hibridação entre alelos e, de um modo preferido, uma resposta essencialmente binária, pelo que uma sonda híbrida-se a apenas um dos alelos. Algumas sondas são concebidas para se hibridarem a um segmento de ADN alvo, de modo que o sítio de interesse, o qual é a posição 1799 de nucleótido no codão 600 do exão 15 de *BRAF*, se alinhe com uma posição central (e. g., num oligonucleótido de 15 bases na posição 7; num oligonucleótido de 16 bases na posição 8 ou 9) da sonda, mas esta concepção não é requerida.

A quantidade e/ou presença de um alelo é determinada pela medição da quantidade de sonda específica de alelo que está hibridada à amostra. Tipicamente, o oligonucleótido é marcado com um marcador, tal como um marcador fluorescente. Por exemplo, uma sonda específica de alelo que é específica para uma substituição nucleotídica de V600E é hibridada a ácidos nucleicos, obtidos de uma amostra biológica sob condições de hibridação que resultam em hibridação preferencial a um alelo. A intensidade de fluorescência é medida para determinar se o oligonucleótido específico se hibridou.

Numa forma de realização da divulgação, o nucleótido presente na posição V600E é identificado por hibridação, sob condições de hibridação específicas de sequência, com uma sonda oligonucleotídica exactamente complementar à sequência mutante (ou de tipo selvagem) de *BRAF* que compreende o sítio de mutante de V600E. A sequência de hibridação de sonda e condições de hibridação específicas de sequência são seleccionadas de modo que um único desemparelhamento no sítio de mutação desestabilize suficientemente o dúplice de hibridação, de modo que não seja efectivamente formado. Deste modo, sob condições de hibridação específicas de sequência, os dúplices estáveis formar-se-ão apenas entre a sonda e a sequência alélica exactamente complementar. Deste modo, os oligonucleótidos desde cerca de 10 a cerca de 35 nucleótidos em comprimento, de um modo preferido, desde cerca de 15 a cerca de 35 nucleótidos em comprimento, os quais são exactamente complementares a uma sequência de alelo numa região a qual abrange o sítio de mutação, estão dentro do âmbito da invenção.

Numa forma de realização alternativa da divulgação, o nucleótido presente no sítio de mutação é identificado por

hibridação, sob condições de hibridação suficientemente estridentes, com um oligonucleótido substancialmente complementar ao alelo mutante ou de tipo selvagem numa região abrangendo o sítio de mutação e exactamente complementar ao alelo no sítio de mutação. Devido à ocorrência de desemparelhamentos nos sítios que não estão mutados, há desemparelhamentos com ambas as sequências de alelo, a diferença no número de desemparelhamentos num dúplice formado com a sequência de alelo alvo e num dúplice formado com a correspondente sequência de alelo não alvo é a mesma que quando um oligonucleótido exactamente complementar à sequência de alelo alvo é utilizado. Nesta forma de realização, as condições de hibridação são, suficientemente, atenuadas para permitir a formação de dúplices estáveis com a sequência alvo mantendo, simultaneamente, estridência suficiente para excluir a formação de dúplices estáveis com sequências não alvo. Sob essas condições de hibridação suficientemente estridentes formar-se-ão dúplices estáveis apenas entre a sonda e o alelo alvo. Deste modo, os oligonucleótidos desde cerca de 10 a cerca de 35 nucleótidos em comprimento, de um modo preferido, desde cerca de 15 a cerca de 35 nucleótidos em comprimento, os quais são substancialmente complementares a uma sequência de alelo numa região, a qual abrange o sítio de mutação e são exactamente complementares à sequência de alelo no sítio de mutação, estão dentro do âmbito da invenção.

A utilização de oligonucleótidos substancialmente, em vez de exactamente, complementares pode ser desejável em formatos de ensaio, nos quais a optimização das condições de hibridação seja limitada. Por exemplo, num formato de ensaio de sonda imobilizada multi-alvo, as sondas para cada alvo estão imobilizadas num único suporte sólido. As hibridações são



efectuadas simultaneamente pela colocação do suporte sólido em contacto com uma solução contendo ADN alvo. Como todas as hibridações são efectuadas sob condições idênticas, as condições de hibridação não podem ser optimizadas separadamente para cada sonda. A incorporação de desemparelhamentos numa sonda pode ser utilizada para ajustar a estabilidade de dúplice quando o formato de ensaio excluir o ajustamento das condições de hibridação. O efeito de um desemparelhamento particular, introduzido na estabilidade de dúplice é bem conhecido e a estabilidade de dúplice pode ser rotineiramente estimada e empiricamente determinada, como descrito acima. As condições de hibridação adequadas, as quais dependem do tamanho e sequência exactos da sonda, podem ser seleccionadas empiricamente utilizando a orientação aqui proporcionada e bem conhecida na técnica. A utilização das sondas oligonucleotídicas para detectar diferenças de um único par de bases na sequência é descrita, por exemplo, em Conner *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282 e Pat. U.S. Nº 5468613 e 5604099.

A alteração proporcional na estabilidade entre um dúplice de hibridação perfeitamente emparelhado e um desemparelhado com uma única base depende do comprimento dos oligonucleótidos hibridados. Os dúplices formados com sequências de sonda mais curtas são desestabilizados proporcionalmente mais pela presença de um desemparelhamento. Na prática, oligonucleótidos entre cerca de 15 e cerca de 35 nucleótidos em comprimento, são preferidos para detecção específica de sequência. Além disso, porque as extremidades de um oligonucleótido hibridado sofrem dissociação e reemparelhamento aleatórios contínuos devido a energia térmica, um desemparelhamento em qualquer extremidade desestabiliza menos o dúplice de hibridação do que um desemparelhamento ocorrendo internamente. De um modo preferido,

para discriminação de uma alteração de um único par de bases na sequência alvo, é seleccionada a sequência de sonda a qual se hibrida à sequência alvo, de modo que o sítio de mutação ocorra na região interior da sonda.

Os critérios acima para selecção de uma sequência de sonda que se hibrida a *BRAF*, aplicam-se à região de hibridação da sonda, i. e., aquela parte da sonda a qual está envolvida em hibridação com a sequência alvo. Uma sonda pode estar ligada a uma sequência de ácidos nucleicos adicional, tal como uma cauda de poli-T utilizada para imobilizar a sonda, sem alterar significativamente as características de hibridação da sonda. Um especialista na técnica reconhecerá que, para utilização nos presentes métodos, uma sonda ligada a uma sequência de ácidos nucleicos adicional a qual não é complementar à sequência alvo e, deste modo, não está envolvida na hibridação, é essencialmente equivalente à sonda não ligada.

#### Ensaio de 5'nuclease

Em algumas formas de realização, as amostras de ácido nucleico são avaliadas para a presença de uma mutação V600E utilizando um "TaqMan<sup>®</sup>" ou "ensaio de 5'nuclease", como descrito nas Pat. U.S. N° 5210015; 5487972; e 5804375; e Holland et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7280. No ensaio de TaqMan<sup>®</sup>, as sondas de detecção marcadas que se hibridam na região amplificada estão presentes durante a reacção de amplificação. As sondas são modificadas de modo a impedir as sondas de actuarem como iniciadores par a síntese de ADN. A amplificação é realizada utilizando uma ADN polimerase tendo actividade de exonuclease de 5' para 3'. Durante cada passo de síntese da

amplificação, qualquer sonda a qual se hibrida ao ácido nucleico alvo a jusante do iniciador sendo alongado, é degradada pela actividade de exonuclease de 5' para 3' da ADN polimerase. Deste modo, a síntese de uma nova cadeia alvo também resulta na degradação de uma sonda e a acumulação de produto de degradação proporciona uma medida da síntese de sequências alvo.

A sonda de hibridação empregue no ensaio pode ser uma sonda específica de alelo que discrimina entre os alelos mutantes e de tipo selvagem de *BRAF* no sítio de mutação V600E. Alternativamente, o método pode ser realizado utilizando um iniciador específico de alelo e uma sonda marcada que se liga ao produto amplificado.

Qualquer método adequado para a detecção de produto de degradação pode ser utilizado num ensaio de 5'nuclease. Frequentemente, a sonda de detecção é marcada com dois corantes fluorescentes, um dos quais é capaz de neutralizar a fluorescência do outro corante. Os corantes são conjugados à sonda, de um modo preferido, um conjugado ao terminal 5' e o outro é conjugado a um sítio interno, de modo que a neutralização ocorra quando a sonda está num estado não hibridado e de modo que a clivagem da sonda pela actividade de exonuclease de 5' para 3' da ADN polimerase ocorra entre os dois corantes. A amplificação resulta na clivagem da sonda entre os corantes com uma concomitante eliminação da neutralização e um aumento na fluorescência observável do corante inicialmente neutralizado. A acumulação de produto de degradação é monitorizada pela medição do aumento em fluorescência de reacção. As Pat. U.S. N° 5491063 e 5571673 descrevem métodos alternativos para a detecção da degradação da sonda, a qual ocorre concomitantemente com a amplificação.

Numa forma de realização, um ensaio de 5'nuclease pode ser realizado para avaliar amostras de doente para a presença da mutação V600E em *BRAF* utilizando os seguintes iniciadores ou sequências que são substancialmente idênticos aos iniciadores:

TTS068-BRAF\_F1: 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTE 3'  
(E= t-butil benzil dA) (SEQ ID N°: 25)

RL\_BRAF\_R5: 5'TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA 3'  
(SEQ ID N°: 4).

As sequências que são substancialmente idênticas às sequências de iniciador incluem as que se hibridam à mesma sequência complementar. Deste modo, em algumas formas de realização, as sequências de iniciador para utilização na invenção compreendem, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos, por vezes, pelo menos, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26 nucleótidos contíguos de TTS068-BRAF\_F1 ou RL\_BRAF\_R5. Em algumas formas de realização, um iniciador tem, pelo menos, 27, 28, 29 ou 30 nucleótidos contíguos de TTS068-BRAF\_F1. Noutras formas de realização, os iniciadores para utilização na invenção têm, pelo menos, 80% de identidade, em algumas formas de realização, pelo menos, 85% de identidade e, noutras formas de realização, pelo menos, 90% ou maior identidade com TTS068-BRAF\_F1 ou RL\_BRAF\_R5. Em algumas formas de realização, o iniciador directo é TTS068-BRAF-F1 e o iniciador inverso é um iniciador que permite para a discriminação do pseudogene de cromossoma X, mas não se sobrepõe com RL\_BRAF\_R5, ou tem sobreposição de menos de 10 pares de bases com RL\_BRAF\_R5. Em algumas formas de realização, o iniciador inverso pode ligar-se

a um sítio que inclui 20 nucleótidos ou menos, a jusante do sítio de ligação para RL\_BRAF\_R5.

Por exemplo, também podem ser empregues os iniciadores inversos das seguintes sequências:

5' A AAT AGC CTC AAT TCT TAC CAT CCA CAA AA 3'  
(SEQ ID N°: 12)

5' TAG CCT CAA TTC TTA CCA TCC ACA AAA 3' (SEQ ID N°: 13)

5' TAG CCT CAA TTC TTA CCA TCC ACA AAE 3' (SEQ ID N°: 1)

5' AGG GCC AAA AAT TTA ATC AGT GGA AAA A 3' (SEQ ID N°: 15)

5' CAG TGG AAA AAT AGC CTC AAT TCT TAC CA 3'  
(SEQ ID N°: 16)

Em algumas formas de realização, o iniciador directo pode ligar-se a um sítio que inclui 20 bases a montante do sítio de ligação de BRAF-F1. Em algumas formas de realização, o iniciador directo pode ser:

5' TTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATE 3' (SEQ ID N°: 17); ou

5' ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAE 3' (SEQ ID N°: 18).

Uma mutação V600E também pode ser detectada onde o ARN seja o molde de partida. Esse ensaio pode compreender um iniciador inverso, e. g., um iniciador compreendendo uma sequência:

5' ATG ACT TCT GGT GCC ATC CAC AA 3' (SEQ ID N°: 19).

Outros iniciadores inversos que podem ser empregues incluem:

5' AAA AAT AGC CTC AAT TCT TAC CAT CCA CAA AA 3'  
(SEQ ID N°: 20);

5' GCC ATC CAC AAA ATG GAT CCA GAC A3' (SEQ ID N°: 21); ou

5' CAA AAT GGA TCC AGA CAA CTG TTC AAA 3' (SEQ ID N°: 22).

Numa forma de realização da invenção, um ensaio de 5'nuclease é realizado utilizando uma ou ambas das seguintes sondas específicas de alelo, as quais detectam uma sequência de mutante (TTS155-BRAF\_MU) ou de tipo selvagem (TTS148-BRAF\_WTs):

TTS155-BRAF\_MU 5' QCTACAIAIFAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'  
(SEQ ID N°: 23)

TTS148-BRAF\_WT 5' QACAITGEAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'  
(SEQ ID N°: 24)

(E = Corante Repórter HEX, F= Corante Repórter FAM, I = desoxiinosina, Q = Corante Neutralizador BHQ2, P= 3'-Fosfato). O corante (F ou E) é inserido entre dI e dA (TTS155-BRAF\_MU) ou entre dG e dA (TTS148-BRAF\_WT).

Como compreendido na técnica, uma sonda de TTS155-BRAF\_MU ou TTS148-BRAF\_WT também pode incluir modificações, e. g., o corante fluorescente particular, o neutralizador e/ou as posições do corante, que são diferentes das representadas acima.

Em algumas formas de realização, a sonda que detecta V600E, e. g., TTS155-BRAF\_MU, também detecta V600D (1799\_1800TG>AT) e V600K (1798\_1799GT>AA). Em algumas formas de realização, a sonda que detecta uma mutação V600E também detecta K601 E (1801A>G) e V600R (1798\_1799GT>AG).

Em algumas formas de realização da divulgação, uma sequência substancialmente idêntica a uma sequência de sonda pode ser utilizada. As sequências que são substancialmente idênticas às sequências de sonda incluem as que se hibridam à mesma sequência complementar que a sonda. Deste modo, em algumas formas de realização, as sequências de sonda para utilização na invenção compreendem, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos, por vezes, pelo menos, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleótidos contíguos de TTS155-BRAF\_MU ou TTS148-BRAF\_WT. Em algumas formas de realização, um iniciador tem, pelo menos, 27, 28, 29 ou 30 nucleótidos contíguos de TTS155-BRAF\_MU ou TTS148-BRAF\_WT. Noutras formas de realização, os iniciadores para utilização na invenção têm, pelo menos, 80% de identidade, em algumas formas de realização, pelo menos, 85% de identidade e, noutras formas de realização, pelo menos, 90% ou maior identidade com TTS155-BRAF\_MU ou TTS148-BRAF\_WT.

Um ensaio de 5'nuclease para a detecção de uma mutação V600E em *BRAF* pode empregar qualquer polimerase que tenha uma actividade de 5' para 3' de exonuclease. Deste modo, em algumas formas de realização, as polimerases com actividade de 5'nuclease são ácido nucleico polimerases termoestáveis e termoactivas. Essas polimerases termoestáveis, incluem mas não estão limitadas, a formas nativas e recombinantes de polimerases de uma variedade de espécie dos géneros eubacterianos *Thermus*, *Thermatoga* e *Thermosipho*, assim como suas formas quiméricas. Por

exemplo, as polimerases da espécie *Thermus* que podem ser utilizadas nos métodos da invenção incluem *Thermus aquaticus* (Taq) ADN polimerase, *Thermus thermophilus* (Tth) ADN polimerase, espécie *Thermus* Z05 (Z05) ADN polimerase, espécie *Thermus* sps17 (sps17) e espécie *Thermus* Z05 (e. g., descritas nas Pat. U.S. N° 5405774; 5352600; 5079352; 4889818; 5466591; 5618711; 5674738 e 5795762). As polimerases de *Thermatoga* que podem ser utilizadas nos métodos da invenção incluem, por exemplo, *Thermatoga maritima* ADN polimerase e *Thermatoga neapolitana* ADN polimerase, enquanto que um exemplo de uma polimerase de *Thermosipho* que pode ser utilizada é *Thermosipho africanus* ADN polimerase. As sequências de *Thermatoga maritima* e *Thermosipho africanus* ADN polimerases estão publicadas na Publicação de Patente Internacional WO 92/06200. A sequência de *Thermatoga neapolitana* pode ser consultada na Publicação de Patente Internacional N° WO 97/09451.

No ensaio de nuclease 5', a detecção de amplificação é, tipicamente, concorrente com a amplificação (i. e., "em tempo real"). Em algumas formas de realização, a detecção de amplificação é quantitativa e a detecção de amplificação é em tempo real. Em algumas formas de realização, a detecção de amplificação é qualitativa (e. g., detecção de ponto final da presença ou ausência de um ácido nucleico alvo). Em algumas formas de realização, a detecção de amplificação é subsequente à amplificação. Em algumas formas de realização, a detecção de amplificação é qualitativa e a detecção de amplificação é subsequente à amplificação.

A sonda pode ser marcada com qualquer número de marcadores mas é, tipicamente, um marcador fluorescente. Em algumas formas de realização, a fracção de fluoróforo é seleccionada do grupo



consistindo de corantes da família de fluoresceína, corantes da família de poli-halofluoresceína, corantes da família de hexaclorofluoresceína, corantes da família de cumarina, corantes da família de rodamina, corantes da família de cianina, corantes da família de oxazina, corantes da família de tiazina, corantes da família de esquaraína, corantes da família de lantanídeo quelado, corantes da família de azo, corantes da família de trifenilmetano e corantes da família de BODIPY®.

O ensaio compreende, frequentemente, uma sonda marcada com um marcador fluorescente e uma fracção neutralizadora. Em algumas formas de realização, a fracção neutralizadora é seleccionada do grupo consistindo de corantes da família de fluoresceína, corantes da família de poli-halofluoresceína, corantes da família de hexaclorofluoresceína, corantes da família de cumarina, corantes da família de rodamina, corantes da família de cianina, corantes da família de oxazina, corantes da família de tiazina, corantes da família de esquaraína, corantes da família de lantanídeo quelado, corantes da família de BODIPY®, corantes da família de azo, corantes da família de trifenilmetano, fracções neutralizadoras de baixa fluorescência (*i. e.*, “dadores ténues”) e fracções neutralizadoras não fluorescentes (*e. g.*, denominados “neutralizadores escuros”, incluindo Black Hole Quenchers™ (BHQ)).

Numa forma de realização, a fracção de fluoróforo é um corante da família de fluoresceína e a fracção neutralizadora é um corante da família de cianina. Numa forma de realização, a fracção de fluoróforo é um corante da família de fluoresceína e a fracção neutralizadora é um corante da família de hexaclorofluoresceína. Numa forma de realização, a fracção de fluoróforo é um corante da família de hexaclorofluoresceína e a

fracção neutralizadora é um corante da família de cianina. Numa forma de realização, o neutralizador é um neutralizador escuro, por exemplo, um BHQ-1, a BHQ-2 ou um BHQ-3 (Biosearch Technologies, Novato, CA). Numa forma de realização, a fracção de fluoróforo é um corante da família de fluoresceína ou um corante da família de cianina e a fracção neutralizadora é um neutralizador escuro.

### *Suportes imobilizados*

Em algumas formas de realização, a hibridação específica de alelo é realizada num formato de ensaio utilizando um alvo imobilizado ou sonda imobilizada. Esses formatos são conhecidos na técnica e incluem, e. g., formatos de transferência em ponto e formatos de ensaio de transferência em ponto reversa que são descritos nas Pat. U.S. N° 5310893; 5451512; 5468613; e 5604099.

### Iniciadores Específicos de Alelo

A presença ou ausência de uma mutação V600E pode ser detectada utilizando métodos de amplificação ou extensão de iniciador específicos de alelo. Estas reacções envolvem, tipicamente, a utilização de iniciadores que são concebidos para visar especificamente o sítio mutante (ou de tipo selvagem) por meio de um desemparelhamento na extremidade 3' de um iniciador, e. g., no nucleótido 3' ou penúltimo nucleótido 3'. A presença de um desemparelhamento efectua a capacidade de uma polimerase alongar um iniciador quando a polimerase é desprovida de actividade de correcção de erros. Por exemplo, para detectar uma sequência mutante de V600E utilizando um método baseado em

amplificação ou extensão específicas de alelo, um iniciador complementar ao alelo A mutante na posição 1799 de nucleótido no codão 600 de *BRAF* é concebido de modo que o nucleótido terminal 3' se hibride na posição mutante. A presença do alelo mutante pode ser determinada pela capacidade do iniciador iniciar a extensão. Se o terminal 3' for desemparelhado, a extensão é impedida. Deste modo, por exemplo, se um iniciador corresponder ao nucleótido de alelo mutante na extremidade 3', o iniciador será eficientemente alongado. A amplificação também pode ser realizada utilizando um iniciador específico de alelo que seja específico da sequência de tipo selvagem de *BRAF* na posição 1799.

Tipicamente, o iniciador é utilizado em conjunto com um segundo iniciador numa reacção de amplificação. O segundo iniciador hibrida-se num sítio não relacionado com a posição mutante. A amplificação prossegue a partir dos dois iniciadores, conduzindo a um produto detectável, significando que a forma alélica particular está presente. Os métodos baseados em amplificação ou extensão específicas de alelo são descritos, por exemplo, no documento WO 93/22456; Pat. U.S. N° 5137806; 5595890; 5639611; e Pat. U.S. N° 4851331.

Utilizando a genotipagem baseada em amplificação específica de alelo, a identificação dos alelos requer apenas a detecção da presença ou ausência de sequências alvo amplificadas. Os métodos para a detecção de sequências alvo amplificadas são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, os ensaios de gel de electroforese e hibridação de sonda descritos são frequentemente utilizados para detectar a presença de ácidos nucleicos.

Num método sem sonda alternativo, o ácido nucleico amplificado é detectado pela monitorização do aumento na quantidade total de ADN de cadeia dupla na mistura reaccional, é descrito, e. g., na Pat. U.S. N° 5994056; e Publicações de Patente Europeia N° 487218 e 512334. A detecção de ADN alvo de cadeia dupla baseia-se na fluorescência aumentada que os diversos corantes de ligação de ADN, e. g., SYBR Green, exibem quando ligados a ADN de cadeia dupla.

Como entendido por alguém da técnica, os métodos de amplificação específica de alelo podem ser realizados em reacção que emprega múltiplos iniciadores específicos de alelo para alelos alvo particulares. Os iniciadores para essas aplicações múltiplex são, em geral, marcados com marcadores distinguíveis ou são seleccionados de modo que os produtos de amplificação produzidos dos alelos sejam distinguíveis por tamanho. Deste modo, por exemplo, os alelos de V600E mutante e de tipo selvagem numa única amostra podem ser identificados utilizando uma única reacção de amplificação por análise de gel do produto de amplificação.

Um iniciador oligonucleotídico específico de alelo pode ser exactamente complementar a um dos alelos na região de hibridação ou pode ter alguns desemparelhamentos em posições que não o terminal 3' do oligonucleótido. Por exemplo o penúltimo nucleótido 3' pode ser desemparelhado num oligonucleótido específico de alelo. Noutras formas de realização, os desemparelhamentos podem ocorrer em sítios (não mutantes) em ambas as sequências de alelo.

### Métodos de detecção de mutação de ácido nucleico de V600E BRAF adicionais

A presença (ou ausência) de uma mutação V600E também pode ser detectada por sequenciação directa. Os métodos incluem métodos baseados em sequenciação de didesoxi e métodos, tal como Pyrosequencing™, de produtos de comprimento de oligonucleótido. Esses métodos empregam, frequentemente, técnicas de amplificação, tal como PCR. Outro método semelhante para sequenciação não requer a utilização de um PCR completo mas, tipicamente, utiliza apenas a extensão de um iniciador por uma única molécula de ácido didesoxirribonucleico (ddNTP) marcada com fluorescência que é complementar ao nucleótido a ser investigado. O nucleótido no sítio polimórfico pode ser identificado por meio de detecção de um iniciador que foi alongado em uma base e é marcado fluorescentemente (e. g., Kobayashi et al., *Mol. Cell. Probes*, 9:175-182, 1995).

Os produtos de amplificação produzidos, utilizando uma reacção de amplificação também podem ser analisados pela utilização de electroforese em gel de gradiente desnaturante: Diferentes alelos podem ser identificados com base nas diferentes propriedades de fusão dependentes de sequência e migração electroforética de ADN em solução (ver, e. g., Erlich, ed., PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, W. H. Freeman e Co, Nova Iorque, 1992, Capítulo 7).

Noutras formas de realização, os alelos de sequências alvo podem ser diferenciados utilizando análise de polimorfismo de conformação de cadeia única, a qual identifica diferenças de bases por alteração na migração electroforética de produtos de

PCR de cadeia única, como descrito, e. g., em Orita et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86, 2766-2770 (1989). Os produtos de PCR amplificados podem ser produzidos como descrito acima e aquecidos ou, de outro modo, desnaturados, para formar produtos de amplificação de cadeia única. Os ácidos nucleicos de cadeia única podem reenrolar-se ou formar estruturas secundárias, as quais estão parcialmente dependentes da sequência de bases. As diferentes mobilidades electroforéticas de produtos de amplificação de cadeia única podem ser relacionadas com diferenças de sequência entre alelos de regiões alvo.

Os métodos utilizados para detectar a presença de uma mutação V600E em *BRAF* empregam, tipicamente, oligonucleótidos marcados, e. g., marcadores fluorescentes, como descritos acima. Os oligonucleótidos podem ser marcados pela incorporação de um marcador detectável por meio espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, imunoquímico ou químico. Marcadores úteis incluem corantes fluorescentes, marcadores radioactivos, e. g.,  $^{32}\text{P}$ , reagentes electronicamente densos, enzima, tais como peroxidase ou fosfatase alcalina, biotina ou haptenos e proteínas para as quais estão disponíveis anti-soros ou anticorpos monoclonais. As técnicas de marcação são bem conhecidas na técnica (ver, e. g., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra; Sambrook & Russell, supra).

### **Detecção de variantes de proteína**

Uma mutação V600E em B-Raf também pode ser detectada por métodos que discriminam entre B-Raf de tipo selvagem e mutante. Frequentemente, estes métodos empregam um anticorpo específico para B-Raf mutante.

Uma perspectiva global da tecnologia aplicável pode consultar-se em Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) e Harlow & Lane, *Using Antibodies* (1999). Os métodos de produção de anticorpos policlonais e monoclonais que reagem especificamente com um variante alélico são conhecidos dos especialistas na técnica (ver, e. g., Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *supra*; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986); e Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)). Essas técnicas incluem a preparação de anticorpo por selecção de anticorpos de bibliotecas de anticorpos recombinantes em vectores fágicos ou semelhantes, assim como a preparação de anticorpos policlonais e monoclonais pela imunização de coelhos ou murganhos (ver, e. g., Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)).

O B-Raf mutante pode ser detectado por uma variedade de métodos de imunoensaio. Para uma revisão de processos imunológicos e de imunoensaio, ver *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr eds., 7ª ed. 1991). Além disso, os imunoensaios da presente invenção podem ser realizados em qualquer de várias configurações, as quais são revistas extensivamente em *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); e Harlow & Lane, *supra*. Para uma revisão dos imunoensaios gerais, ver também *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7ª ed. 1991).

Os ensaios geralmente utilizados incluem ensaios não competitivos, e. g., ensaios de sanduíche, e ensaios competitivos. Tipicamente, pode ser utilizado um ensaio tal como

um ensaio de ELISA. A quantidade do variante polipeptídico pode ser determinada pela realização de análises quantitativas.

Outras técnicas de detecção, e. g., MALDI, podem ser utilizadas para detectar directamente a presença de V600E em B-Raf.

Uma amostra para análise é obtida de células cancerígenas, e. g., tecido tumoral, do doente.

### **Tratamento**

O método de detecção de mutação aqui divulgado, pode incluir a utilização de software de análise de dados que irá informar o utilizador se o doente deverá ser ou não tratado com um inibidor de B-Raf, tal como um inibidor de B-Raf específico de mutação, e. g., PLX4032, com base na presença ou ausência, respectivamente, da mutação V600E de B-Raf.

Um doente que é determinado como sendo positivo para a presença de uma mutação na posição 600 de aminoácido, e. g., uma mutação V600E, é um candidato para o tratamento com um inibidor de B-Raf cinase, e. g., um inibidor de B-Raf cinase específico de mutante, tal como PLX4032. Diversos inibidores de B-Raf cinase, incluindo inibidores de B-Raf cinase específicos de mutante, são descritos, e. g., nos documentos WO 2007/002325 e WO 2007/002433. O PLX4032 é referido nos documentos WO 2007/002433 e WO 2007/002325 como "P-0956".

Orientação para administração de inibidores de B-Raf cinase, e. g., um inibidor de B-Raf cinase específico de



mutante, pode consultar-se, e. g., nos documentos WO/2007/002325 e WO/2007/002433. As formas de dosagem adequadas dependem, em parte, da utilização ou da via de administração, por exemplo, oral, transdérmica, transmucosal, inalação ou por injeção (parentérica). Essas formas de dosagem deverão permitir que o composto atinja células alvo. Outros factores são bem conhecidos na técnica e incluem considerações, tais como toxicidade e formas de dosagem, as quais retardam o composto ou composição de exercer os seus efeitos. As técnicas e formulações podem consultar-se, em geral, em *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edição, Lippincott, Williams e Wilkins, Filadélfia, PA, 2005.

As composições farmacêuticas podem incluir veículos ou excipientes. Os veículos ou excipientes podem ser escolhidos para facilitar a administração do composto. Os exemplos de veículos incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, diversos açúcares, tais como lactose, glucose ou sacarose, ou tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais, polietilenoglicóis e solventes fisiologicamente compatíveis. Os exemplos de solventes fisiologicamente compatíveis incluem soluções estéreis de água para injeção (WFI), solução salina solução e dextrose.

Os compostos podem ser administrados por vias diferentes, incluindo intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, oral, transmucosal, rectal, transdérmica ou inalação. Em algumas formas de realização, o inibidor de B-Raf cinase específico é administrado oralmente. Para administração oral, por exemplo, os compostos podem ser formulados em formas de dosagem oral convencionais, tais como cápsulas, comprimidos e

preparações líquidas, tais como xaropes, elixires e gotas concentradas.

Para inalações, os inibidores de B-Raf podem ser formulados como pó seco ou uma solução, suspensão ou aerossol adequados. Os pós e soluções podem ser formulados com aditivos adequados conhecidos na técnica. Por exemplo, os pós podem incluir uma base de pó adequada, tais como lactose ou amido, e as soluções podem compreender propilenoglicol, água estéril, etanol, cloreto de sódio e outros aditivos, tais como ácido, alcali e sais de tampão. Essas soluções ou suspensões podem ser administradas pela inalação por meio de spray, bomba, atomizador ou nebulizador e semelhantes.

Alternativamente, os inibidores de B-Raf podem ser injectados (administração parentérica) podem ser utilizados, e. g., intramuscular, intravenoso, intraperitoneal e/ou subcutâneo. Para injeção, os inibidores são formulados em soluções líquidas estéreis, de um modo preferido, em tampões ou soluções fisiologicamente compatíveis, tais como solução salina, solução de Hank ou solução de Ringer. Além disso, os compostos podem ser formulados na forma sólida e redissolvidos ou suspensos imediatamente antes da utilização. Também podem ser produzidas formas liofilizadas.

A administração também pode ser por meio transmucosal, tópico ou transdérmico. Para administração transmucosal, tópica ou transdérmica, são utilizados na formulação penetrantes apropriados à barreira a ser permeada. Esses penetrantes são, em geral, conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, sais biliares e derivados de ácido fusídico. Além disso, podem ser utilizados detergentes para

facilitar a permeação. A administração transmucosal pode, por exemplo, ser através de sprays nasais ou supositórios (rectais ou vaginais). As composições tópicas desta invenção são formuladas, de um modo preferido, como óleos, cremes, loções, pomadas e semelhantes, por escolha de veículos apropriados conhecidos na técnica. Os veículos adequados incluem óleos vegetais ou minerais, petrolato branco (vaselina branca), gorduras ou óleos de cadeia ramificada, gorduras animais e álcool de elevado peso molecular. Os veículos preferidos são aqueles nos quais o ingrediente activo é solúvel. Emulsionantes, estabilizantes, humectantes e antioxidantes também podem ser incluídos, assim como agentes conferindo cor ou fragrância, se desejado. Os cremes para aplicação tópica podem ser formulados de uma mistura de óleo mineral, cera de abelhas auto-emulsionante e água, em cuja mistura o ingrediente activo, dissolvido numa pequena quantidade de solvente (e. g., um óleo), é misturado. Além disso, a administração por meio transdérmico pode compreender um adesivo ou penso transdérmico, tais como uma ligadura impregnada com um ingrediente activo e, opcionalmente, um ou mais veículos ou diluentes conhecidos na técnica. Para ser administrada na forma de um sistema de distribuição transdérmica, a administração de dosagem irá, evidentemente, ser contínua, em vez de intermitente, ao longo do regime de dosagem.

As quantidades de diversos compostos a serem administrados podem ser determinadas por processos correntes, tendo em conta factores, tais como a  $IC_{50}$  de composto, a meia-vida biológica do composto, a idade, tamanho e peso do indivíduo e diversos outros parâmetros associados ao indivíduo. A importância destes e outros factores é bem conhecida de alguém com conhecimentos gerais na técnica. Em geral, a dose será entre cerca de 0,01 e

50 mg/kg, de um modo preferido 0,1 e 20 mg/kg, do indivíduo a ser tratado. Podem ser utilizadas múltiplas doses.

Os inibidores de B-Raf também podem ser utilizados em conjunto com outras terapias de cancro.

### **Kits**

A invenção também proporciona kits compreendendo componentes úteis para a prática dos métodos, compreendendo uma sonda específica de alelo compreendendo a SEQ ID N°: 1, em que “n” é desoxiinosina. Em algumas formas de realização, o kit pode compreender uma ou mais sondas oligonucleotídicas que são específicas para o alelo mutante ou de V600E. Esse kit também pode conter iniciadores de amplificação para a amplificação de uma região de locus de *BRAF* que abrange o sítio da mutação V600E. Deste modo, em algumas formas de realização, um kit compreende o conjunto de iniciadores

TTS068-BRAF\_F1: 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTE 3'  
(E= t-butil benzil dA) (SEQ ID N°: 25) e

RL\_BRAF\_R5: 5' TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA 3'  
(SEQ ID N°: 4),

os quais amplificam uma região alvo de *BRAF*. O kit pode compreender, ainda sondas, tal como as sondas específicas de alelo.

Os exemplos de sondas específicas de alelo que podem ser utilizadas num kit da invenção são:

TTS155-BRAF\_MU 5' QCTACAIAIFAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'  
(SEQ ID N°: 23)

TTS148-BRAF\_WT 5' QACAITGEAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'  
(SEQ ID N°: 24).

Um kit também pode compreender iniciadores e/ou sondas que são substancialmente idênticos aos oligonucleótidos notados. Em algumas formas de realização, um kit para utilização na invenção compreende um ou mais oligonucleótidos que compreendem, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência de ácidos nucleicos e SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3 e/ou SEQ ID N°: 4.

Outros componentes opcionais dos kits incluem reagentes adicionais para a determinação da presença de substituições nucleotídicas. Por exemplo, um kit pode conter uma polimerase, nucleósido trifosfatos de substrato e tampões apropriados para reacções de amplificação e instruções para efectuar o presente método. Outros componentes de kit podem incluir reagentes de extracção de ADN e protocolo e cofactor de ião divalente. O tampão pode incluir, e. g., UNG. Em algumas formas de realização, o tampão pode incluir aptâmero.

Um kit também pode incluir controlos, tal como controlos de ADN de V600E.

## EXEMPLOS

### **Detecção de mutação V600E de B-Raf**

Este exemplo demonstra um teste de diagnóstico baseado em PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real para a medição da mutação V600E de B-Raf (nucleótido 1799 T >A de BRAF) em ADN genómico extraído de tecidos tumorais de cancro, fixos em formalina, embebidos em parafina (FFPE). Neste exemplo, o ADN genómico extraído de tecido de FFPE foi testado por análise de PCR de TaqMan. Para a reacção de PCR, foi preparada uma Mistura Principal pela combinação de Mistura Reaccional de ARN de TaqMan, Mistura de Iniciador-Sonda e o cofactor acetato de magnésio ( $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ). A amplificação foi realizada utilizando 125 ng de ADN genómico. Os produtos de amplificação foram detectados utilizando um Analisador COBAS TaqMan 48.

A região genómica contendo o sítio de B-Raf V600E (BRAF 1799 T>A) no exão 15 foi amplificada, produzindo um ADN de cadeia dupla de 116 pares de bases (produto de amplificação). A reacção de amplificação foi realizada durante 55 ciclos. O sistema de amplificação e detecção media, em tempo real, as quantidades de produtos de PCR produzidos em cada ciclo de amplificação pela medição do sinal fluorescente resultante de clivagem das sondas específicas de alvo. As sondas de tipo selvagem (WT; V600) de B-Raf e de mutação V600E de B-Raf específicas de alvo foram, cada, marcadas com um corante repórter diferente. A medição específica de comprimento de onda da fluorescência emitida por estes corantes repórter, durante cada ciclo de amplificação, permitiu a identificação dos produtos de amplificação WT e V600E de B-Raf num único tubo reaccional. Assim que o sinal fluorescente de cada corante

repórter atingiu um nível de limiar predefinido, foram calculados os valores de ciclo para limiar (Ct) para o alelo de WT e de mutação V600E na reacção múltiplex.

Os iniciadores de *BRAF* foram concebidos para amplificar uma região do exão 15 de *BRAF* de 115 pares de bases (pb). Utilizando a ferramenta BLAT do Navegador do Genoma de UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) no Agrupamento de Genoma Humano de Março de 2006, o exão 15 de *BRAF* tem 93,4% de homologia com uma sequência de cromossoma X (chrX) chrX:74721094-74721213, um aparente pseudogene. Um iniciador inverso que inclui uma porção do intrão 15 de *BRAF* foi utilizado para amplificar especificamente a sequência de *BRAF* pretendida. Como mostrado na Figura 1, o iniciador inverso tem apenas 55,6% (15 de 27 nucleótidos) de homologia com a sequência de cromossoma X. As sondas na Mistura de Iniciador-Sonda de *BRAF* são complementares à cadeia de produto de amplificação resultante da extensão deste iniciador inverso, garantindo ainda, que o resultado de teste é específico para a sequência de *BRAF*.

Os iniciadores foram sintetizados num Sintetizador de ADN ABI 394 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) utilizando desoxinucleótido fosforamiditos padrão, dicianoimidazole (DCI) como activador e ciclos de síntese padrão (com pequenas modificações) na orientação 3' para 5' convencional num suporte de vidro de poro controlado de fase sólida (CPG). O 3'-t-Butil Benzil dA foi introduzido como um nucleósido modificado, como parte do CPG (Roche Applied Sciences, Penzberg, Alemanha) utilizado como o suporte sólido para a síntese de ADN. Após a adição da última base, o grupo protector 5'-dimetoxitritilo (DMT) foi removido no sintetizador e o oligonucleótido foi

desprotegido com hidróxido de amónio, a 55 °C, durante 16 horas. O oligonucleótido em bruto foi evaporado para remover a amónia e purificado utilizando a coluna de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de permuta aniónica forte Mono-Q HR 16/10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), com um gradiente linear de cloreto de sódio, a pH elevado. As fracções foram analisadas utilizando uma coluna de permuta iónica DNAPac PA100 (Dionex Inc., Sunnyvale, CA) e agregadas utilizando um critério de pureza mínimo de >90%. As fracções agregadas foram dessalinizadas e formuladas em Tris a 10 mM, pH 8,0. Para a reacção de PCR foram sintetizados os seguintes iniciadores:

TTS068-BRAF\_F1: 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTE 3'  
(E= t-butil benzil dA) (SEQ ID N°: 25) e

RL\_BRAF\_R5: 5' TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA 3'  
(SEQ ID N°: 4).

As sondas TaqMan foram sintetizadas num Sintetizador de ADN ABI 394 (Applied Biosystems Inc.) utilizando desoxinucleótido fosforamiditos ultramoderados (Pierce Biotechnology, Milwaukee, WI), DCI como activador e ciclos de síntese padrão (com pequenas modificações) na orientação 3' para 5' convencional num suporte de CPG de fase sólida. Marcador fluorescente, cx-FAM (6-carboxifluoresceína, Biogenex Inc.) ou cx-HEX (6-carboxi-hexaclorofluoresceína (Biogenex Inc., San Ramon, CA) e neutralizador Black Hole Quencher (BHQ-2) (Biosearch Inc., Novato, CA) foram incorporados utilizando reagentes de fosforamidito e ciclos de ligação de 10 minutos. O 3'-fosfato foi introduzido por meio de extensão 3' de Blocker CPG (Clontech Inc., Mountain View, CA). Após a síntese, o grupo protector DMT foi removido no sintetizador e o oligonucleótido foi



desprotegido com hidróxido de amónio, à temperatura ambiente, durante 16 horas. O oligonucleótido em bruto foi purificado utilizando a coluna de HPLC de permuta aniónica forte Mono-Q HR 16/10 (Amersham Biosciences), com um gradiente linear de cloreto de sódio. As fracções foram analisadas utilizando uma coluna de permuta iónica DNAPac PA100 (Dionex Inc., Sunnyvale, CA) e agregadas utilizando um critério de pureza mínimo de >90%. As fracções agregadas foram dessalinizadas e formuladas em tampão de armazenamento de sonda, compreendendo Tricina a 80 mM, pH 8,2, acetato de potássio a 240 mM, EDTA a 0,1 mM e azida de sódio a 0,09%. As sondas Taqman<sup>®</sup> são:

V600E (TTS155-BRAF\_MU): 5'

QCTACAIAIFAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEQ ID N°: 23)

tipo selvagem (TTS148-BRAF\_WT): 5'

QACAITGEAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3' (SEQ ID N°: 24)

(E = corante repórter HEX, F= corante repórter FAM,  
I = desoxiinosina, Q = corante neutralizador BHQ2,  
P= 3'-fosfato).

A reacção de amplificação também incluía AmpErase (uracil-N-glicosilase, UNG) e desoxiuridina trifosfato (dUTP). A AmpErase reconhece e catalisa a destruição de cadeias de ADN contendo desoxiuridina, mas não ADN contendo timidina. A desoxiuridina não está presente no ADN de ocorrência natural, mas está sempre presente no produto de amplificação, devido à utilização de desoxiuridina trifosfato em vez de timidina trifosfato como um dos dNTP no reagente de Mistura Reaccional de PCR. A incorporação de UNG na Mistura Reaccional minimiza a contaminação causada por arrasto de produto de amplificação. A

AmpErase não irá degradar o produto de amplificação se e sondas e kits de teste.

#### *Detecção de Produtos de PCR*

A mistura de iniciador-sonda de BRAF empregue nesta análise continha duas sondas fluorescentes duplamente marcadas que são específicas para as sequências nucleotídicas codificando WT ou V600E de B-Raf, respectivamente, possibilitando a detecção em tempo real da acumulação de produto de PCR específico através da libertação de sinal fluorescente durante o processo de amplificação. As sondas WT e V600E de B-Raf são marcadas com diferentes corantes repórter fluorescentes e o mesmo corante neutralizador. Quando as sondas estão intactas, a fluorescência de corante repórter é suprimida pelo corante neutralizador devido à transferência de energia de tipo Förster. Durante o PCR, cada sonda hibrida-se num modo dependente de sequência à sua sequência alvo e é clivada pela actividade de nuclease 5' da Z05 ADN polimerase, separando os dois corantes. Assim que os corantes repórter e neutralizador estão separados, a fluorescência do corante repórter é detectável. Com cada ciclo de PCR produzindo mais produto de amplificação, o sinal cumulativo do corante repórter é eficazmente aumentado. A amplificação das sequências de WT e V600E de B-Raf foi monitorizada independentemente pela medição de cada sonda na sua correspondente gama de comprimento de onda de emissão específica durante cada ciclo.

Cada amostra de ADN genómico foi amplificada numa reacção de 100 µL, compreendendo 50 µL de uma mistura principal de trabalho, a qual foi preparada pela adição de 17 µL de mistura

de iniciador-sonda e 13 µL do cofactor  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  a 25 mM a 20 µL de mistura reaccional de ARN de TaqMan por amostra. Uma amostra de ADN genómico (125 ng) foi adicionada, num volume de 50 µL, à mistura principal de trabalho. Cada amostra foi amplificada em duplicado. As reacções de amplificação foram realizadas sob as condições mostradas na Tabela 1. Cada corrida incluía uma reacção de controlo positivo para V600E e uma reacção de controlo positivo de tipo selvagem, assim como uma reacção de controlo negativo.

**Tabela 1: Perfil de Ciclização Térmica**

<b>Etapas</b>	<b>Descrição</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
1	Descontaminação de UNG	50 °C	5 min.	1X
2	Desnaturação de Pré-Ciclização	95 °C	1 min.	1X
3	Desnaturação 1	95 °C	15 seg.	2X
	Emparelhamento/Extensão 1	61 °C	30 seg.	
4	Desnaturação 2	92 °C	15 seg.	53X
	Emparelhamento/Extensão 2	61 °C	30 seg.	
5	Retenção de Pós-Ciclização	40 °C	2 min.	1X

### *Análise de dados*

Os valores de Ct para B-Raf V600E (canal 1) e WT (canal 2) foram calculados pelo software AmpliLink 3.1 na estação de trabalho do Analisador COBAS TaqMan 48. Os valores de Ct das reacções de controlo negativo e positivo foram utilizados para determinar se uma corrida era válida. A Tabela 2 lista os valores de Ct aceitáveis para cada reacção de controlo.

**Tabela 2: Valores de Ct Aceitáveis para Reacções de Controlo**

a.	b. Canal 1	d. Canal 2
	c. (FAM, sonda de V600E) *	e. (HEX, sonda de WT) *
f. Negativo	g. Ct = -1	h. Ct = -1
i. Controlo Positivo Nº 1 (Plasmídeo de V600E)	j. Ct entre 29 e 33	k. C = -1
1. Controlo Positivo Nº 2 (Plasmídeo de WT)	m. Ct = -1	n. Ct entre 28 e 32

\* Um valor de Ct de -1 indica que não foi detectada amplificação significativa.

Para corridas válidas, o valor de Ct para cada amostra foi avaliado contra gamas aceitáveis para cada canal que foram definidas por estudos de desempenho analítico. A Tabela 3 proporciona um exemplo de como cada par de valores de Ct foi traduzido numa chamada de estatuto de mutação de B-Raf V600E.

**Tabela 3: Tabela de Valores de Ct para Atribuição de Estatuto de V600E.**

<b>o. Canal 1 p. (FAM, sonda de V600E) *</b>	<b>q. condicional</b>	<b>r. Canal 2 s. (HEX, sonda de WT) *</b>	<b>t. Estatuto de V600E</b>
u. Ct = -1	v. e	w. Ct	x. Negativo
y. $15 \leq Ct \leq 50$	z. e	aa. $15 \leq Ct \leq 40$	bb. Positivo
cc. Ct <15 ou >50	dd. ou	ee. Ct <15 ou >40	ff. Indeterminado

\* Um valor de Ct de -1 indica que não foi detectada amplificação significativa.

Chave: E = Corante Repórter HEX, F= Corante Repórter FAM, I = desoxiinosina, Q = Corante Neutralizador BHQ2, P= 3'-Fosfato

Foram avaliadas as seguintes amostras. Os resultados de PCR de TaqMan® foram validados por sequenciação.

**Tabela 4. Características de Amostra Clínica**

<b>Amostra ID</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>% de Tumor</b>
M1	FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMÁRIO	60
M2	MELANOMA	95
M3	FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMÁRIO	75

(continuação)

<b>Amostra ID</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>% de Tumor</b>
M4	MELANOMA,	50
M5	FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMÁRIO	85
M6	FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMÁRIO	90
M7	MELANOMA	90
M8	FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMÁRIO	90
M9	FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL DE MELANOMA PRIMÁRIO	90
M10	FASE DE CRESCIMENTO RADIAL DE MELANOMA PRIMÁRIO	95
RM1	Melanoma metastático (LN)	10
RM2	Melanoma metastático (LN)	45
RM3	Melanoma metastático (LN)	30
RM4	Melanoma metastático (LN)	10
RM5	Melanoma metastático (LN)	50
RM6	Melanoma metastático (LN)	30
RM7	Melanoma metastático (LN)	50
RM8	Melanoma metastático (LN)	40
RM9	Melanoma metastático (LN)	40
RM10	Melanoma metastático (LN)?	10
RM11	Melanoma metastático (LN)	75
RM12	Melanoma metastático (LN)	55
RM13	Melanoma metastático (LN)	30

(continuação)

<b>Amostra ID</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>% de Tumor</b>
RM14	Melanoma metastático	50
RM15	Melanoma metastático (LN)	80
RM16	Melanoma metastático (LN)	45
RM17	Melanoma metastático (LN)	50
RM18	Melanoma metastático (LN)	50
RM19	Melanoma metastático (LN)	50
RM20	Melanoma metastático (LN)	35

O ADN foi extraído de trinta espécimes de melanoma de FFPE (Tabela 4). As amostras resultantes continham uma mistura de ADN de células tumorais e normais. Os resultados de detecção de mutação do ensaio de TaqMan® em comparação com pirossequenciação e sequenciação de GS20 são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5 Estatuto de V600E como Determinado por Três Métodos Independentes**

<b>Amostra ID</b>	<b>TaqMan®</b>	<b>Pirossequenciação</b>	<b>Sequenciação de GS20</b>
M1	negativo	negativo	negativo
M2	negativo	negativo	negativo
M3	negativo	falhou	negativo
M4	positivo	positivo	positivo
M5	positivo	positivo	positivo

(continuação)

<b>Amostra ID</b>	<b>TaqMan®</b>	<b>Pirossequenciação</b>	<b>Sequenciação de GS20</b>
M6	positivo	positivo	positivo
M7	positivo	positivo	positivo
M8	negativo	negativo	negativo
M9	negativo	negativo	negativo
M10	negativo	negativo	negativo
RM1	negativo	falhou	negativo
RM2	negativo	negativo	negativo
RM3	positivo	negativo	positivo
RM4	negativo	negativo	negativo
RM5	positivo	positivo	positivo
RM6	positivo	negativo	positivo
RM7	negativo	negativo	negativo
RM8	positivo	negativo	positivo
RM9	negativo	negativo	negativo
RM10	negativo	negativo	negativo
RM11	negativo	negativo	negativo
RM12	negativo	negativo*	negativo
RM13	negativo	negativo*	negativo
RM14	positivo	positivo*	positivo
RM15	positivo	positivo	positivo
RM16	positivo	positivo	positivo
RM17	positivo	negativo*	positivo
RM18	negativo	negativo	negativo
RM19	negativo	negativo	negativo



(continuação)

<b>Amostra ID</b>	<b>TaqMan®</b>	<b>Pirossequenciação</b>	<b>Sequenciação de GS20</b>
RM20	negativo	negativo	negativo

\* Interpretação manual.

As amostras M3 e RM1 falharam a amplificação para pirossequenciação, mesmo após uma segunda extração; ambas as amostras foram denominadas negativas para V600E (WT) pelos métodos de TaqMan® e GS20. Quatro amostras requereram interpretação manual para uma chamada de pirossequenciação: Para RM17, a chamada de pirossequenciação era negativa para V600E, enquanto que os resultados de TaqMan® e GS20 indicaram que a amostra era positiva para V600E; nos restantes três casos, os três métodos deram resultados concordantes. Três amostras adicionais (RM3, RM6, RM8), denominadas negativas para V600E por pirossequenciação, eram positivas para V600E pelos métodos TaqMan® e GS20. Estes resultados são consistentes com um rendimento insuficiente de ADN contendo mutação de RM3, RM6, RM8 e RM17 para detecção de mutação por pirossequenciação. A amostra RM8 era positiva para V600E em 4% das 4300 leituras de Sequenciação de GS20 (~2000 cada direcção), a percentagem mais baixa de BRAF mutado observada de entre todas as amostras positivas para V600E.

Devido à maior sensibilidade da Sequenciação de GS20 comparada com a pirossequenciação, o método de GS20 foi utilizado como o método de referência para o teste de TaqMan®. O nível de concordância entre o Teste de B-Raf V600E de COBAS TaqMan® e Sequenciação de GS20 é 12/12 = 100% para amostras positivas para V600E e 18/18 = 100% para negativas para V600E (WT).

**Sequências Exemplificativas:**

**SEQ ID Nº: 1 BRAF\_MU (I = desoxiinosina P= 3'-Fosfato)**

5' CTACAIAIAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'

**SEQ ID Nº: 2 BRAF\_WT (I = desoxiinosina P= 3'-Fosfato)**

5' ACAITGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAP 3'

**SEQ ID Nº: 3 BRAF\_F1:**

5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCT 3'

**SEQ ID Nº: 4 BRAF\_R5:**

5' TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA 3'

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> TESTE DE DIAGNÓSTICO PARA SUSCEPTIBILIDADE A  
INIBIDORES DE B-RAF CINASE

<130> 24003 EP-HS

<140> Ainda não atribuído

<141> Ainda não atribuído

<150> US 60/993391

<151> 2007-09-11

<160> 24

<170> FastSEQ para Windows, Versão 4.0

<210> 1

<211> 31

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sonda BRAF\_MU sintética

<221> base\_modificada

<222> (6)...(6)

<223> n= desoxiinosina

<221> base\_modificada  
<222> (8)...(8)  
<223> n= desoxiinosina

<221> base\_modificada  
<222> (31)...(31)  
<223> a = a com 3'-fosfato

<400> 1  
ctacananaa atctcgatgg agtgggtccc a

31

<210> 2  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> sonda BRAF\_WT sintética

<221> base\_modificada  
<222> (4)...(4)  
<223> n = desoxiinosina

<221> base\_modificada  
<222> (29)...(29)  
<223> a = a com 3'-fosfato

<400> 2  
acantgaaat ctcgatggag tgggtccca

29

<210> 3  
<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador BRAF\_F1 sintético

<400> 3

cctcacagta aaaataggtg attttggctct

30

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador BRAF\_R5 sintético

<400> 4

tagcctcaat tcttaccatc cacaaaa

27

<210> 5

<211> 116

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência de produto de amplificação de B-Raf V600E  
sintética

<400> 5

cctcacagta aaaataggtg attttggctct agctacagtg aaatctcgat ggagtgggtc 60  
ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg gtaagaattg aggcta 116

<210> 6

<211> 116

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Sequência correspondente a cromossoma X de  
*Homo sapiens* para B-Raf

<400> 6

```
cctcacagtg gaaatagggtg attttgggtct agccacagtg aaatcttgat ggagtgggtc 60
ccatcagttt gaacagttgt ctggatcttt tttgtgtatg gcaccagaag tcatca      116
```

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Região de exão 15 de B-Raf circundando o codão 600

<400> 7

```
Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly
 1           5           10           15
Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln
          20           25           30
Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met
      35           40
```

<210> 8

<211> 40

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Região de A-Raf

<400> 8

Asn	Ile	Phe	Leu	His	Glu	Gly	Leu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly
1				5					10					15	
Leu	Ala	Thr	Val	Lys	Thr	Arg	Trp	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Leu	Glu	Gln
			20					25					30		
Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Trp	Met								
		35					40								

<210> 9

<211> 40

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Região de C-Raf

<400> 9

Asn	Ile	Phe	Leu	His	Glu	Gly	Leu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly
1				5					10					15	
Leu	Ala	Thr	Val	Lys	Ser	Arg	Trp	Ser	Gly	Ser	Gln	Gln	Val	Glu	Gln
			20					25					30		
Pro	Thr	Gly	Ser	Val	Leu	Trp	Met								
		35					40								

<210> 10

<211> 116

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> RAF1; codifica C-Raf

<400> 10

```
cttaacagtg aaaattggag attttgggtt ggcaacagta aagtcacgct ggagtgggtc 60
tcagcagggt gaacaaccta ctggctctgt cctctggatg gtgagaatct gggctc    116
```

<210> 11

<211> 116

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> ARAF; codifica A-Raf

<400> 11

```
gctcacggtg aagatcggtg actttggctt ggccacagtg aagactcgat ggagcggggc 60
ccagcccttg gagcagccct caggatctgt gctgtggatg gtgagttggg ccaggc    116
```

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 12

```
aaatagcctc aattcttacc atccacaasa 30
```

<210> 13

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial



<220>

<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 13

tagcctcaat tcttaccatc cacaaaa

27

<210> 14

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<221> base\_modificada

<222> (26)...(26)

<223> a = a com 6-carboxi-hexaclorofluoresceína (HEX)

<400> 14

tagcctcaat tcttaccatc cacaaaa

26

<210> 15

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 15

agggccaaaa atttaatcag tggaaaaa

28

<210> 16  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 16  
cagtqgaaaa atagcctcaa ttcttacca

29

<210> 17  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador directo de BRaf sintético

<221> base\_modificada  
<222> (29)...(29)  
<223> t = t com 6-carboxi-hexaclorofluoresceína (HEX)

<400> 17  
tttcttcatg aagacctcac agtaaaaat

29

<210> 18  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador directo de BRaf sintético

<221> base\_modificada

<222> (30)...(30)

<223> a = a com 6-carboxi-hexaclorofluoresceína (HEX)

<400> 18

atatatttct tcatgaagac ctcacagtaa

30

<210> 19

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 19

atgacttctg gtgccatcca caa

23

<210> 20

<211> 32

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 20

aaaaatagcc tcaattctta ccatccacaa aa

32

<210> 21  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 21  
gccatccaca aaatggatcc agaca 25

<210> 22  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador inverso de BRaf sintético

<400> 22  
caaaatggat ccagacaact gttcaaa 27

<210> 23  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> sonda de TTS155-BRAF\_MU sintética

<221> base\_modificada  
<222> (1)...(1)

<223> n = desoxiinosina conjugada a 3' do esqueleto de fosfato de desoxirribose modificado por FAM conjugado a 3' do oligonucleótido 5'CTACAIA3', onde 5' C é modificado por neutralizador BHQ2 e I = desoxiinosina

<221> base\_modificada

<222> (24)...(24)

<223> a = a com 3'-fosfato

<400> 23

naaatctcga tggagtgggt ccca

24

<210> 24

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sonda de TTS148-BRAF\_WT sintética

<221> base\_modificada

<222> (1)...(1)

<223> n = g conjugado a 3' do esqueleto de fosfato de desoxirribose modificado por HEX conjugado a 3' do oligonucleótido 5'ACAIT3', onde 5' A é modificado por neutralizador BHQ2 e I = desoxiinosina

<221> base\_modificada

<222> (24)...(24)

<223> a = a com 3'-fosfato

<400> 24

naaatctcga tggagtgggt ccca

24

<210> 25

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador TTS068-BRAF\_F1 sintético

<221> base\_modificada

<222> (30)...(30)

<223> t=t com t-butil benzil dA

<400> 30

cctcacagta aaaataggtg attttgggtct

30

Lisboa, 2 de Junho de 2014

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método de determinação da sensibilidade de células cancerígenas a um inibidor de B-Raf cinase, o método compreendendo:
  - proporcionar uma amostra de ácido nucleico de células cancerígenas de um doente que tem um cancro;
  - amplificar de uma sequência polinucleotídica alvo na amostra de ácido nucleico utilizando um par de iniciadores que amplifica a sequência polinucleotídica alvo, em que a sequência polinucleotídica alvo compreende um sítio de mutação V600E, V600D ou V600K em *BRAF* e a amplificação é realizada na presença de uma sonda oligonucleotídica marcada que compreende a SEQ ID N°: 1, em que "n" é desoxiinosina e detecta a presença de uma sequência mutada no sítio de mutação V600E, V600D ou V600K em *BRAF*; e
  - detectar da presença ou ausência de uma mutação V600E, V600D ou V600K em *BRAF*; determinando, desse modo, a sensibilidade do cancro ao inibidor de B-Raf.
2. Método da reivindicação 1, em que a amplificação é realizada na presença de uma segunda sonda que detecta a presença de uma sequência de tipo selvagem no sítio de mutação V600E, V600D ou V600K.
3. Método da reivindicação 2, em que a segunda sonda compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 2.


4. Método da reivindicação 1, em que um dos iniciadores no par de iniciadores compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3.
5. Método da reivindicação 1, em que um dos iniciadores no par de iniciadores compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 4.
6. Método da reivindicação 1, em que o passo de amplificação da reacção compreende um RT-PCR.
7. Método da reivindicação 1, em que o inibidor de B-Raf cinase é um inibidor de B-Raf cinase específico de mutante.
8. Método da reivindicação 1, em que o inibidor de B-Raf cinase é PLX4032.
9. Kit para a detecção de um doente que é um candidato para tratamento com um inibidor de B-Raf cinase, em que o kit compreende uma primeira sonda específica de alelo, em que a primeira sonda é adequada para detecção de uma mutação V600E, V600D ou V600K em *BRAF* e compreende a SEQ ID N°: 1, em que "n" é desoxiinosina.
10. Kit da reivindicação 9 compreendendo, ainda, uma segunda sonda específica de alelo, em que a segunda sonda detecta a sequência de *BRAF* de tipo selvagem e compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 2.



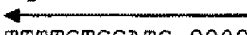
11. Kit da reivindicação 9 compreendendo, ainda, um par de iniciadores que amplifica uma região alvo de BRAF que compreende um sítio de mutação V600E, V600D ou V600K.
12. Kit da reivindicação 11, em que o par de iniciadores compreende um iniciador que compreende, pelo menos, 15 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 3.
13. Kit da reivindicação 11, em que o par de iniciadores compreende iniciadores que têm as sequências apresentadas nas SEQ ID N°: 3 e SEQ ID N°: 4.
14. Kit da reivindicação 9, em que a primeira sonda tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 1 e o kit compreende, ainda, uma segunda sonda que tem a sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID N°: 2 e um par de iniciadores compreende iniciadores que têm as sequências nucleotídicas apresentadas nas SEQ ID N°: 3 e SEQ ID N°: 4.

Lisboa, 2 de Junho de 2014

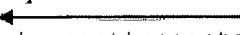
Figura 1

**Iniciador BRAF\_F1** **V600**  


BRAF amplicon CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCTCGAT 00000050  
 >>>>>>> ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| >>>>>>>  
 ChrX 74721113 CCTCACAGTGGAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCCACAGTGAAATCTTGAT 74721163

**p Iniciador BRAF\_R5**  


BRAF 00000051 GGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 00000100  
 >>>>>>> ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| >>>>>>>  
 ChrX 74721163 GGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCTTTTTTGTGTATG 74721212

**| Iniciador BRAF\_R5**  


BRAF 00000101 gtaagaattgaggcta 00000116  
 >>>>>>> | | | | | >>>>>>>  
 ChrX 74721213 gcaccagaagtcatca 74721228

Figura 2

↓

B-Raf : NIFLHEDLTVKIGDFGLATVKSRWSGSHQFEQLSGSILWM  
                   \*                                  \*      \*\*\*\*      \*      \*  
 A-Raf : NIFLHEGLTVKIGDFGLATVKTRWSGAQPLEQPSGSVLWM

↓

B-Raf : NIFLHEDLTVKIGDFGLATVKSRWSGSHQFEQLSGSILWM  
                   \*                                  \*      \*      \*      \*  
 C-Raf : NIFLHEGLTVKIGDFGLATVKSRWSGSQQVEQPTGSVLWM

Figura 3

**Iniciador BRAF\_F1** V600

BRAF CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCTCGATGGAGTGGGTC  
 RAF1 CtTaACAGTgAAAATtGGaGATTTTGGTtTgGCaACAGTaAAgTCaCGcTGGAGTGGtTC  
 ARAF gCTCACgGTgAAgATcGGTGAcTTTGGctTgGCcACAGTGAagaCTCGATGGAGcGGGgC

**Iniciador BRAF\_R5**

BRAF CCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA  
 RAF1 tCAgCAGgTTGAACAacctaCTGGcTctgTccTcTGGATGGTgAGAATctgGGCTc  
 ARAF CCAgCccTTgGAgCAGcccTCaGGATCtgTgcTGTGGATGGTgAGttggGccaggc