



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0214840-4 B1



(22) Data do Depósito: 23/12/2002

(45) Data de Concessão: 08/12/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ONCOGÊNICAS HUMANAS, MÉTODOS AUTOMATIZADOS PARA DETECTAR UMA MUTAÇÃO E MÉTODO E ENSAIO PARA IDENTIFICAR UM OU MAIS COMPOSTOS TENDO ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA

(51) Int.Cl.: C12N 9/12; C07K 16/40; C12Q 1/48; C12Q 1/68; A61K 38/43; (...).

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2001 GB 0130796.6; 24/12/2001 US 60/344,684.

(73) Titular(es): THE WELLCOME TRUST.

(72) Inventor(es): MIKE STRATTON; ANDY FUTREAL; RICHARD WOOSTER; RICHARD MALCOLM MARAIS; CHRIS MARSHALL.

(86) Pedido PCT: PCT GB2002005891 de 23/12/2002

(87) Publicação PCT: WO 2003/056036 de 10/07/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/06/2004

(57) Resumo: "GENES". A invenção se refere a mutações nos produtos de gene B-Raf. As mutações descritas são identificadas em tumores humanos de origem natural. Essas mutações estão associadas com fenótipos cancerosos e podem ser usadas como uma base para o diagnóstico do câncer, células cancerosas ou uma predisposição ao câncer em indivíduos humanos, e ao desenvolvimento de terapêuticos anti-câncer.

“MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ONCOGÊNICAS HUMANAS, MÉTODOS AUTOMATIZADOS PARA DETECTAR UMA MUTAÇÃO E MÉTODO E ENSAIO PARA IDENTIFICAR UM OU MAIS COMPOSTOS TENDO ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a mutantes específicos para câncer de genes *B-raf* e usos dos mesmos na detecção de células anormais e câncer. Além disso, a invenção descreve métodos para o diagnóstico do câncer, a detecção de células cancerosas em indivíduos e ao desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento do câncer.

INTRODUÇÃO

[002] O câncer pode desenvolver-se em qualquer tecido de qualquer órgão, em qualquer idade. A maioria dos cânceres detectados num estágio primário são potencialmente curáveis, assim, a capacidade em examinar pacientes para sinais iniciais de câncer, e assim, permitir a intervenção logo no início, é altamente desejável (ver, por exemplo, o Merck Manual of Diagnosis and therapy (1992) 16a. ed. Merck & Co).

[003] Células cancerosas apresentam um crescimento desregulado, falta de diferenciação e capacidade em invadir tecidos locais e evoluir em metástase. Assim, as células cancerosas são diferentes de células normais, e são potencialmente identificáveis, porém não apenas por seus traços fenotípicos, porém também por suas características bioquímicas e biológicas moleculares. Tais características, são, por seu turno ditadas pelas alterações nas células cancerosas o que ocorre ao nível genético, num subconjunto de genes celulares conhecidos como oncogenes, que direta ou indiretamente controlam o crescimento e diferenciação celular.

[004] A família do oncogene Raf inclui três genes altamente conservados denominados A-, B- e C-*raf* (também denominado *raf-1*). C-*Raf* o elemento mais bem caracterizado da família *raf*, é o homólogo celular de *v-raf* o gene transformante do vírus de sarcoma de murídeos 3611. O oncogene *raf* viral codifica uma proteína que carece das seqüências amino-terminais da proteína Raf normal. Essas seqüências amino-terminais são cruciais para a regulação da atividade quinase de proteína serina/treonina de RAF, e sua deleção ou substituição resulta na atividade constitutiva da proteína RAF codificada por oncogene. Esta atividade desregulada promove a proliferação celular, resultando na transformação da célula. Alegou-se que o DNA de uns poucos tumores contém uma atividade transformante detectável por transfecção de DNA de células NIH/3T3, identificadas como derivadas de C-*raf-1* truncado. Contudo, esses resultados são prováveis de serem artefatos de transfecção, porque as mesmas mutações não foram encontradas em tumores dos quais o DNA transformante se derivou. Mutações criadas artificialmente no gene C-*raf* quando introduzidas em células *in vitro* podem induzir transformação.

[005] O gene B-*raf* é o homólogo humano do proto-oncogene *c-Rmil* de avícola codificando uma quinase serina/treonina de 94 kD detectada em células de aves. Esta proteína contém seqüências amino-terminais não encontradas em outras proteínas da família do gene *mil/raf*. Essas seqüências são codificadas por 3 éxons no genoma de avícola. Eychene *et al.* (1992) *Oncogene* 7:1657-1660 relata que, esses 3 éxons são conservados no gene B-*raf* humano e que eles codificam uma seqüência de aminoácido similar àquela do gene avícola. Eles identificaram 2 locais B-*raf* humanos : B-*raf 1* que foi mapeado para 7q34 por hibridização *in situ* de fluorescência e mostram codificar o produto genético funcional e B-*raf 2* um pseudogene processado inativo localizado em Xq13.

[006] Por exame de uma biblioteca cDNA de camundongo com uma sonda oncogenética *v-raf*, Huebner *et al.*, (1986) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83:3934-3938 isolou

um cDNA relacionado a raf transformante, *A-raf* que representou um gene distinto de *raf1*. O único local *A-raf* do camundongo e o local *A-raf1* do homem são ativamente transcritos em varias linhas de célula de camundongo e de humano. A seqüência completa de 606 aminoácidos do oncogene *A-raf1* de humano foi deduzida da seqüência de 2.453 nucleotídeos do cDNA. O gene *A-raf* é ligado ao X.

[007] Um mecanismo conhecido para conversão de proto-oncogenes par oncogenes é a aparência de mutações únicas na seqüência de DNA, conhecida como mutações por ponto, que resulta numa alteração na seqüência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. Por exemplo, oncogenes *ras* não estão presentes em células normais, mas suas contrapartes proto-oncogenes estão presentes em todas as células. AS proteínas Rãs do tipo selvagem são pequenas proteínas de ligação GTP, que estão envolvidas em transdução de sinal. Contudo, muitos oncogenes *ras* de vírus e tumores humanos têm uma mutação por ponto no número de códon 12: o códon GGC que normalmente codifica uma glicina é alterado para GTC, que codifica uma valina. Mutações múltiplas foram documentadas neste códon, incluindo pelo menos 5 diferentes substituições que são de ativação. Esta única alteração de aminoácidos previne a atividade GTPase da proteína Ras, e torna Ras essencialmente ativado, visto permanecer ligado a GTP. Os aminoácidos as posições 13 e 61 também são freqüentemente alteados nos oncogenes *ras* de tumores humanos. A proteína Raf é uma quinase serina/treonina que, está estruturalmente relacionada com a família (PKC de proteína quinase C, e é essencial no crescimento e diferenciação celular. Proteínas Raf estão envolvidas na transdução de sinal na ativação de MAP quinase que é altamente conservado em organismos eucarióticos. MAP quinases (proteína quinases ativadas por mitógeno), que incluem ERK1 e ERK2, fatores de transcrição diretamente fosforilados para regular eventos biológicos. MAPKKs (MAP quinase quinases) e MAPKKKs (MAPKK quinases) por sua vez, regulam MAP quinases.

[008] Proteínas Raf são MAPKKKs e se acredita que fosforilam o MAPKKK MEK *in vivo* em sistemas biológicos de mamífero. Genes *raf* distintos codificam A-Raf, B-Raf, e Raf-1 (também conhecido como c-Raf) em vertebrados (revisto em Papin et al., 1998, *Oncogene* 12:2218-2221). As três proteínas não são iguais em sua capacidade em ativar MEK. A-Raf, o membro menos bem caracterizado da família, parecer ser um ativador de MEK fraco, sendo sua atividade difícil de medir (Pritchard et al., 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15, 6430-6442). B-Raf e Raf-1 também diferem em sua capacidade em ativar MEK. Embora Raf-1 seja onipresentemente expressado, B-Raf demonstra os maiores níveis de expressão em tecidos neurais (Barnier et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 23381-23389). Contudo, B-RAF tenha sido identificado como o ativador de MeK principal, mesmo em células onde sua expressão é raramente detectável por análise de manchamento western (Catling et al., 1994, Jaiswal et al., 1994; Reuter et al., 1995; Huser et al, 2001, Mikula et al., 2001). Com persistência, B-Raf desempenha maior afinidade para MEK-1 e MEK-2 do que Raf-1 (Papin et al., 1996, Papin et al. 1998) e é mais eficiente na fosforilação de MAPKK MEK.

[009] O ativador a montante de B-Raf é o GTPase Rãs. Uma série de isoformas de Ras existem em mamíferos, N-Ras, Ha-Ras, Ki-Ras4A e Ki-Ras4B. Outras GTPases da superfamília RAS também podem interagir com B-Raf. Por exemplo, Rap-1, revisto em Peysonnaux *et al.*, (2001) *Biology of the Cell* 93:53-62 parece ser um ativador seletivo de B-Raf.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0010] Mutantes de ponto nos produtos genéticos B-Raf são descritos no presente. As mutações de ponto descritas são identificadas em tumores humanos de origem natural. Essas mutações de ponto estão associadas com fenótipos cancerosos e podem ser utilizadas como uma base para a diagnose do câncer, células cancerosas ou uma predisposição ao câncer em indivíduos humanos.

[0011] Visto muitos trajetos de sinalização que são mediados pela ativação da atividade quinase de B-Raf estarem envolvidos no controle da proliferação celular e transformação oncogénica, seria de conveniência ser capaz de detectar rapidamente alterações no gene *B-raf* o que pode resultar num carácter oncogénico.

[0012] Assim, num primeiro aspecto, é providenciado um mutante associado a câncer, de ocorrência natural, de um polipeptídeo B-RAf humano compreendendo uma ou mais mutações.

[0013] De preferência, o mutante associado ao câncer é isolado de um tumor humanos primário de ocorrência natural.

[0014] De preferência, a mutação situa-se no domínio quinase de B-RAf.

[0015] A presente invenção providencia várias de tais mutações, que foram vistas estarem associadas com um fenótipo canceroso em cânceres humanos, e assim, estabelecer um elo entre mutações B-RAf e câncer *in vivo*.

[0016] De preferência, a mutação é uma mutação de ponto. Mutações também podem incluir alterações tais como inserções, deleções, ou substituições de um ou mais nucleotídeos, de preferência 2, 3, 4, 5 ou 6 nucleotídeos.

[0017] Vantajosamente, as mutações estão localizadas na posição C-terminal ao aminoácido 300 em B-Raf. Posições preferidas são 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 e 599.

[0018] Numa modalidade mais preferida, as mutações são selecionadas dentre o grupo que consiste de V599E, V599D, G595R, G465V, G465E, G465A, G468A, G468E, E585K, F594L, G595R, L596V, L596R e G463E.

[0019] De preferência o polipeptídeo é isolado.

[0020] A invenção além disso, abrange fragmentos dos polipeptídeos de acordo com a invenção onde tais fragmentos incluem a mutação conforme descrita.

[0021] Num segundo aspecto, é providenciado um ácido nucléico codificando um polipeptídeo B-Raf mutante ou seu fragmento de acordo com a presente invenção. De preferência o ácido nucléico compreende uma ou mais mutações de ponto.

[0022] De preferência o ácido nucléico é isolado.

[0023] Mutações de ponto em genes *B-raf* foram detectados mostrando associação com tumores. Vantajosamente, a mutação de ponto ocorre em uma ou mais das posições 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 e 1786 de B-raf. De preferência a mutação de ponto é G1388T, G1783C, TG1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, 61787G ou C1786G em *B-raf*.

[0024] A invenção além disso, providencia o complemento de qualquer ácido nucléico descrito acima.

[0025] Numa modalidade adicional, é providenciado um ácido nucléico que hibridiza especificamente para um ácido nucléico de acordo com a invenção conforme aqui escrito. Um tal ácido nucléico pode por exemplo, ser um primer que direciona a amplificação específica de um ácido nucléico codificando B-Raf mutante de acordo com a invenção numa reação de amplificação de ácido nucléico.

[0026] Num terceiro aspecto, a invenção providencia um ligante que se liga seletivamente a um polipeptídeo B-Raf mutante de acordo com a invenção.

[0027] Um tal ligante é vantajosamente uma imunoglobulina, e é preferivelmente um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antígeno.

[0028] De acordo com um quarto aspecto, é providenciado um método para detecção da transformação celular compreendendo as etapas de:

- (a) isolar uma amostra do material celular de um indivíduo,
- (b) examinar o material de ácido nucléico de pelo menos uma parte de um ou mais genes B-raf no referido material celular, e

(c) determinar se um tal material de ácido nucléico compreende uma ou mais mutações numa seqüência codificando um polipeptídeo B-Raf.

[0029] Vantajosamente a mutação é uma mutação de ponto.

[0030] Vantajosamente a mutação ocorre em uma ou mais das posições 1388, 1394, 1403, 1753, 1783, 1783, 1796, 1797, 1787 e 1786 e *B-raf*. De preferência a mutação de ponto é G1388T, G1783C, 6G1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, 61787G ou C1786G em *B-raf*.

[0031] As mutações identificadas de acordo com a invenção são, com vantagem, mutações somáticas, que ocorreram em tecido somático e não são transmitidas através da linha germinativa. Assim, a invenção refere-se além disso, a um método para detecção da transformação, compreendendo as etapas de:

(a) isolar uma primeira amostra do material celular de tecido de um indivíduo, com suspeita de câncer, e uma segunda amostra do material celular de um tecido não-canceroso do mesmo indivíduo,

(b) examinar o material de ácido nucléico de pelo menos uma parte de um ou mais genes *B-raf* em ambas as amostras de material celular, e

(c) determinar se tal material de ácido nucléico compreende uma ou mais mutações por ponto numa seqüência codificando um polipeptídeo B-Raf, e tal mutação estando presente no material celular do tecido com suspeita de câncer, porém não presente no material celular do tecido não-canceroso.

[0032] A invenção além disso providencia um método para detecção de transformação celular, compreendendo as etapas de:

(a) obter uma amostra do material celular de um indivíduo,

(b) examinar tal amostra com um ligante que se liga seletivamente a um polipeptídeo B-Raf mutante de acordo com a invenção, e

(c) detectar um ou mais polipeptídeo B-Raf mutantes na dita amostra.

[0033] Num aspecto adicional ainda, a invenção refere-se a um método para identificar um ou mais compostos com atividade anti-proliferativa, compreendendo as seguintes etapas:

- (a) providenciar um ou mais polipeptídeo B-Raf mutantes de acordo com a presente invenção,
- (b) contatar tal/tais polipeptídeo(s) com um ou mais compostos para serem testados e
- (c) detectar uma interação entre um ou mais compostos e tais polipeptídeos mutantes.

[0034] De preferência, a interação é uma interação de ligação.

[0035] Além disso, a invenção providencia um ensaio para identificar um ou mais compostos com atividade anti-proliferativa, compreendendo as etapas de:

- (a) providenciar um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes de acordo com a invenção,
- (b) providenciar um substrato a jusante para o polipeptídeo B-Raf,
- (c) detectar modificação do substrato na presença do(s) composto(s) para teste.

[0036] B-RAf é uma proteína quinase, e portanto, os substratos desta são capazes de seres fosforilados ou desfosforilados. De preferência a ação do mutante B-Raf no substrato resulta numa alteração aí identificável. Vantajosamente, o substrato é uma quinase ou fosfatase adicional que, pro sua vez, modifica uma terceira molécula na qual ocorre uma alteração detectável.

[0037] Por exemplo, o substrato pode ser a quinase MEK. Fosforilação de MEK pode ser detectada diretamente, ou de preferência, detectada através da ativação de MEK para fosforilar MAP Quinase.

[0038] Vantajosamente, uma atividade de referência do mutante B-Raf no substrato é estabelecida e a atividade na presença e/ou ausência do(s) composto(s)

para teste comparada com o valor de referência. Uma redução na atividade do mutante B-Raf é indicativa de uma redução na atividade proliferativa.

[0039] A invenção além disso, providencia um ensaio com base em célula para seleção de compostos com atividade anti-proliferativa. Numa primeira modalidade, a invenção providencia um ensaio de formação de foco 3T3 compreendendo as etapas de:

- (a) providenciar uma cultura de células NIH 3T3
- (b) transfectar tais células com um ácido nucléico B-raf mutante de acordo com a invenção,
- (c) expor tais células a um ou mais composto(s) para teste, e
- (d) determinar a diferença no número de focos formados entre as células transfectadas expostas a tal/tais composto(s) para este e células transfectadas sem essa exposição.

[0040] O ensaio baseado em célula é normalmente realizado usando células NIH 3T3. Contudo, outros tipos de célula, especialmente, fibroblastos podem ser usadas em um tal ensaio.

[0041] Vantajosamente, uma atividade de referência de formação de foco de um gene B-raf mutante nas células usadas no ensaio é estabelecido, e a atividade na presença e/ou ausência do(s) composto(s) para teste comparada com o valor de referência. Uma diminuição na atividade de formação de foco do gene *B-raf* mutante é indicativa de uma redução na atividade proliferativa, e portanto, da atividade anti-proliferativa no(s) composto(s) em teste.

[0042] Métodos automatizados e aparelhos para detecção das mutações de acordo com a invenção também são providenciados.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0043] Figura 1A: Ensaio da atividade B-Raf. A atividade quinase de B-Raf foi medida num ensaio de cascata por imunoprecipitação de quinase usando MBP

como o substrato final. A atividade é mostrada como número de contagens incorporadas ao MBP. O ensaio foi realizado em triplicata e a média é mostrada, com barras de erro para representar desvios da média. Tanto a atividade quinase basal (barras vazias) como as atividade quinase estimuladas por Ras^{V12} (barras hachuradas) são mostradas.

[0044] Figura 1B: ensaios da atividade B-Raf. A atividade quinase de B-Raf foi medida num ensaio em cascata de imunoprecipitação de quinase usando MBP como o substrato final. A atividade se demonstra como o número de pontos incorporados ao MBP. O ensaio foi realizado em triplicata e a média é mostrada, com barras de erro representando desvios da média. Tanto a atividade quinase basal (barras vazias) e a atividade quinase estimulada por Ras^{V12} são mostradas.

[0045] Figura 2: Transformação de células NIH3T3 por B-Raf e mutantes e ativação. As células foram transfectadas com os construtores indicados e determinou-se o número de colônias. Os resultados são a média de pelo menos três ensaios. Está mostrado o número de colônias relativo ao número induzido por B-Raf.

[0046] Figura 3A. V599D é uma mutação ativante em BRAF. BRAF ou BRAF^{V599D} foram expressos sozinhos, ou juntamente com RAS oncogênica, conforme indicado. A atividade das proteínas BRAF foram determinadas usando um ensaio em cascata de imunoprecipitação de quinase em que o BRAF imunoprecipitado é usado para ativar seqüencialmente MEK e ERK. A ativação de ERK é determinada usando proteína básica mielina e ATP[P³²]- γ como substratos.

[0047] Figura 3B. A inibição de ERK em linhas de célula de melanoma usando reagentes farmacológicos. Células WM266.4 ou A375P foram tratadas com U0126 10 μ M, BAY 43-9006 10 μ M ou DMSO como controle. Quantidades equivalentes de proteínas celulares foram resolvidas em géis de SDS e os níveis de ERK ativo foram determinados usando o anticorpo ppERK.

[0048] Figura 4. Inibição do crescimento celular por agentes farmacológicos. Células WM-266.4 foram incubadas na presença de U0126 (10 μ M) ou BAY 43-9006 (10 μ M) ou o controle veículo (DMSO). Após 48 horas, a síntese de DNA foi determinada por incubação das células com timidina[H^3] e determinou-se os níveis de timidina incorporados ao DNA celular.

[0049] Figura 5A. A expressão de CRAF é suprimida por siRNA. Células WM-266.4, Colo 829 ou BE foram tratadas com uma sonda siRNA específica para CRAF (CRAF), a sonda genética siRNA desordenada, oligofectamina (oligo) ou (controle) não tratado. As células foram incubadas por 24 horas e os níveis de proteína CRAF foram determinados por mancha Western.

[0050] Figura 5B. A expressão BRAF é suprimida por siRNA. Células WM-266.4, Colo 829 ou BE foram tratadas com uma sonda siRNA específica para BRAF, a sonda siRNA desordenada ou foram deixadas sem tratamento como mostrado. As células foram incubadas por 24 horas e os níveis de atividade BRAF foram testados usando um ensaio de imunoprecipitação de quinase MEK e ERK como ensaios seqüenciais. A atividade de ERK foi determinada usando MBP e ATP[P^{32}]- γ como substratos.

[0051] Figura 6. A ablação de BRAF, porém não CRAF bloqueia a atividade de ERK em células de melanoma. Células WM-266.4 ou Colo 829 foram tratadas com uma sonda siRNA específica para BRAF (BRAF), ou o controle de competição (sBRAF) ou uma sonda específica para CRAF (CRAF) ou seu controle competitivo (sCRAF), ou oligofectamina (oligo) ou deixadas sem tratamento (controle) como indicado. As células foram incubadas pelos tempos indicados, e as células Colo 829 foram tratadas por 24 horas. Os níveis de atividade ERK em quantidades equivalentes de extrato celular foram determinados por mancha Western com o anticorpo ppERK.

[0052] Figura 7. A ablação de BRAF, porém não CRAF induz apoptose em células de melanoma. Células WM-266.4 foram tratadas com uma sonda siRNA específica para BRAF (BRAFi) ou o controle competitivo (sBRAFi) ou uma sonda siRNA específica para CRAF (CRAFi), ou U0126 ou DMSO 9oligo) ou deixadas sem tratamento (controle) como indicado. As células foram incubadas por 96 horas e o perfil do ciclo celular foi analisado por FACS ou a expressão PARP foi examinada por mancha Western.

[0053] Figura 8. A validade da atividade B-Raf e GST – MKKI. O ensaio realizado usando lisado WTS 1B-RAF (lote A), GST MKKI (6,5 µg/ml) e ERK2 (quinase competente, 100 µg/ml) para medir incorporação de P³³-γ-fosfato ao MBP (0,3 mg/ml). Os dados mostrados são a média ±SD de determinações em triplicata.

[0054] Figura 9. Avaliação da Placa de Filtro e Plataforma de Ensaio Radiométrico FlahsPlate. O ensaio foi realizado usando lisado B-RAf1 WTS1 (lote A) e GST MKKL (6,5 µg/ml) para medir incorporação de P³³-γ-fosfato ao GST-kdERK2 (100 µg/ml). Os dados mostrados são a média ±SD de determinações e triplicata.

[0055] Figura 10. Avaliação de plataforma de ensaio não-radiométrico DELFIA. 100 ng GST-kdERK2 foi pré-ligado a cada reservatório seguido por adição de lisado B-RAf (lote A), GST-MKKL (6,5 µg/ml e ATP (500µM). Os dados mostrados são a média ±SD de determinações em triplicata.

[0056] Figura 11. A titulação de anti-fofo-ERK2 em Ensaio DELFIA. 100 ng GST-kdERK2 foi pré-ligado ao reservatório seguido por adição de lisado B-RAf (lote A), GST-MKKL (6,5 µg/ml) e ATP (500 µM). Os dados mostrados são a média de determinações em duplicata.

[0057] Figura 12. Titulação de anticorpo secundário rotulado com európio em Ensaio DELFIA. 100 ng de GST-kdERK2 foi pré-ligado ao reservatório seguido pela adição de lisado B-RAf (lote A), GST-MKKL (6,5 µg/ml) e ATP (500 µM) Os dados demonstram a média de determinações em duplicata.

[0058] Figura 13. Avaliação de Protocolo de Ensaio Homogêneo. O ensaio homogêneo foi realizado numa placa de 96 reservatórios usando um volume de reação de 50 µl contendo um lisado B-RAf (lote B), 6,5 µg/ml de GST-MKKL, 80 µg/ml de GST-kdERK2 e 500 µM de ATP. Os dados demonstrados são a média ±SD de determinações em triplicata.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0059] A menos que indicado de outra forma, todos os termos técnicos e científicos aqui empregados têm o mesmo significado normalmente entendido pelo versado na técnica (por exemplo, na cultura celular, genética molecular, química de ácido nucléico, técnicas de hibridização e bio-química). Técnicas padrão, são usadas párea métodos molecu-lares, genéticos e bioquímicos. Ver, geralmente Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4a. Ed., John Wiley & Sons, Inc., bem como Guthrie et al., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Vol, 194, Academic Press, Inc., (1991), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al., 1990. Academic Press, San Diego, Calif.), McPherson et al., PCR Volume 1, Oxford University Press, (1991), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2a. Ed (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, N.Y), and Gene Transfer and Expression Protocols, págs. 109-128 ed. E. J. Murray, The Human Press Inc. Clifton, N.J). Esses documentos estão ora incorporados a título de referência.

Definições:

[0060] O presente pedido descreve mutantes de polipeptídeo B-Raf. Como aqui empregado, o termo "Polipeptídeo RAF"é empregado para indicar um polipeptídeo da família RAF. RAF foi primeiro identificado num vírus de camundongo tipo C, de replicação defeituosa de transformação crítica, singular clonado, que

continha um oncogene *v-raf* (Rapp, et al., Proc. Nat. Acad. sci 80:4218-4222. 1983). O homólogo celular *c-raf*, está presente no DNA de mamífero. Outros homólogos desde então foram descobertos em humanos e pássaros, onde *raf* foi visto como o homólogo do oncogene *mil* de pássaros. B-RAf está relacionados a RAF mas possui três éxons N-terminal adicionais. O termo “B-Raf” assim, abrange todos os homólogos B-RAf de humano conhecidos e variantes, bem como outros polipeptídeos, que mostram suficiente homologia para B-RAf para identificação como homólogos de B-RAf. O termos não incluem ARAF, CRAF ou RAF1. De preferência, B-Raf, é identificado como um polipeptídeo tendo a seqüência mostrada no n° de acesso NP_004324, ácido nucléico n° de acesso NM_004333.

[0061] O termo “B-RAF” preferivelmente, inclui polipeptí-deos que são 85% , 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogos a NP_004324. Comparações de homologia podem ser realizadas por estimativa, ou mais comumente, com o auxílio de programas de comparação de seqüência prontamente disponíveis. Esses programas de computador comercialmente disponíveis podem calcular a homologia perceptual (%) entre duas ou mais seqüências.

[0062] Homologia percentual pode ser calculada durante seqüências adjacentes, ou seja, uma seqüência é alinhada com a outra seqüência e cada aminoácidos em uma seqüência diretamente comparado com o correspondente aminoácidos na outra seqüência, um resíduo de cada vez. A isto se denomina um alinhamento “sem intervalo”. Tipicamente, tais alinhamentos sem intervalo são realizados apenas em um numero relativamente pequeno de resíduos (por exemplo, menos que 50 aminoácidos adjacentes).

[0063] Embora este seja um método muito simples e resumido, ele falha em levar em consideração o fato de, por exemplo, num par de seqüências de outro modo idêntico, uma inserção ou deleção irá fazer com que os seguintes resíduos de aminoácidos sejam colocados fora de alinhamento, resultando potencialmente,

numa grande redução na homologia percentual quando for realizado um alinhamento global. Conseqüentemente a maior parte dos métodos de comparação de seqüência são planejados para produzir alinhamentos ótimos, que levam em consideração possíveis inserções e deleções, sem penalizar indevidamente a marca de homologia global. Isto se consegue por inserção de “intervalos” no alinhamento de seqüência para tentar maximizar a homologia local.

[0064] Contudo, esses métodos mais complexos conferem “desvantagens de intervalo” para cada intervalo que ocorre no alinhamento, de forma, que, para o mesmo número de aminoácidos idênticos, um alinhamento de seqüência com tão poucos intervalos quanto possível – refletindo maior corre-lação entre duas seqüências comparadas - irá conseguir mais marcas do que um com muitos intervalos. “Custas de intervalo afins” são tipicamente empregados, que são relativamente mais dispendiosos pela existência de um intervalo e uma desvantagem menor para cada resíduo subsequente no intervalo. Isto consiste no sistema de marcação de intervalo mais comumente usado. Desvantagens com grande intervalo, produzirão, obviamente, alinhamentos otimizados com menores intervalos. A maior parte dos programas de alinhamento permite a modificação das desvantagens de alinhamento. Contudo, prefere-se usar os valores de default, quando se usa tal software para comparações de seqüência. Por exemplo, quando se usa o pacote GCG Wisconsin Besfit (ver abaixo) a desvantagem no intervalo de default para seqüências de aminoácidos é -12 para um intervalo e -4 para cada extensão.

[0065] O cálculo da homologia percentual máximo, portanto, requer, primeiramente a produção de um alinhamento ótimo, levando em consideração desvantagens de intervalo. Um programa de computador adequado para realizar um tal alinhamento é o pacote GCG Wisconsin Besfit (University of Wisconsin U.S.A. Devereux *et al.*, 1984 Nucleic Acids Research 12:387). Exemplos de outros

softwares que podem realizar comparações de seqüência incluem, sem estar a estes limitados, o pacote BLAST (ver Ausubel et al., 1999 *ibid* – capítulo 18), GASTA (Atschul et al, 1990, J. Mol. Biol. 403-410) e o conjunto GENWORKS de ferramentas de comparação. Ambos BLAST E FASTA são disponíveis para pesquisa offline e online (ver Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* páginas 758 a 7-60). Contudo, prefere-se usar o programa GCG Bestfit.

[0066] Embora a homologia percentual final possa ser medida em termos de identidade, o próprio processo de alinhamento não está tipicamente baseado em uma comparação de par “tudo ou nada”. Ao contrário, uma matriz de marcação com similaridade escalonada é geralmente usada que determina marcações para cada comparação aos pares com base na similaridade química ou distância evolutiva. Um exemplo de uma tal matriz comumente usada é a matriz BLOSUM62 – a matriz de default para o conjunto BLAST de programas. Programas Wisconsin GCG geralmente usam, ou os valores de default públicos, ou uma tabela de comparação de simbologia de praxe caso seja fornecida (ver Manual do usuário para mais detalhes). Prefere-se o uso de valores de default públicos para o pacote GCG, ou no caso de outro software, a matriz de default como BLOSUM62.

[0067] Uma vez o software tenha produzido um alinhamento ótimo, é possível calcular a percentagem de homologia, de preferência identidade de seqüência percentual. O software, tipicamente, o faz como parte da comparação de seqüência e gera um resultado numérico.

[0068] Um “fragmento” de um polipeptídeo de acordo com a invenção é um fragmento de polipeptídeo que abrange os aminoácidos mutantes descritos de acordo com a invenção. O fragmento pode ser de qualquer extensão até o comprimento total do polipeptídeo B-Raf, ele assim abrange os polipeptídeos B-Raf que foram truncados por uns poucos aminoácidos, bem como fragmentos mais curtos. Vantajosamente, os fragmentos estão entre cerca de 764 e cerca de 5 aminoácidos

em comprimento, de preferência cerca de 5 a cerca de 20 aminoácidos em comprimento, vantajosamente, entre cerca de 10 e cerca de 50 aminoácidos em comprimento. Os fragmentos de acordo com a invenção são úteis, *inter alia*, na imunização de animais para criar anticorpos. Assim, os fragmentos de polipeptídeos de acordo com a invenção, vantajosamente, compreendem pelo menos um determinante antigênico (epitopo) característico do mutante B-Raf como aqui descrito. Onde for que um fragmento de polipeptídeo particular detenha tais propriedades antigênicas, ele pode ser prontamente determinado por métodos rotineiros conhecidos na técnica. Peptídeos compostos de no mínimo seis resíduos de aminoácidos são freqüentemente conhecidos por suscitarem uma resposta imune.

[0069] Um “ácido nucléico” da presente invenção é um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo B-Raf humano conforme acima. O termo, além disso, inclui os polinucleotídeos capazes de hibridizar, sob condições de hibridização rigorosas, nos ácidos nucléicos de ocorrência natural, conforme identificados acima, ou nos seus complementos. “Condições de hibridização rigorosas” refere-se a uma incubação noturna a 42°C numa solução compreendendo 50% de formamida, SSC 5x (NaCl 750 nM, citrato trissódico 75 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6) solução de Denhardt a 5x, sulfato de dextrana a 10%, e 20 pg/ml de DNA de esperma de salmão raspado, desnaturado, seguido pro lavagem dos filtros em SSC 0,1 x a cerca de 65°C.

[0070] Embora os ácidos nucléicos, como aqui referidos, sejam geralmente ácidos nucléicos de ocorrência natural, o termo pode incluir incluído em seu escopo, ácidos nucléicos artificiais, modificados, tendo estruturas centrais modificadas, ou bases, como é do conhecimento da técnica.

[0071] Um ácido nucléico codificando um fragmento de acordo com a invenção pode ser o resultado da amplificação de ácido nucléico de uma região

específica de um gene *B-raf*, incorporando uma mutação de acordo com a presente invenção.

[0072] Um polipeptídeo ou ácido nucléico “isolado” como aqui empregado, refere-se ao material removido de seu meio original (por exemplo, o meio natural em que ele ocorre na natureza) e assim é alterado pela mão do homem de seu estado natural. Por exemplo, um polinucleotídeo isolado pode ser parte de um vetor ou uma composição de matéria, ou pode estar contido numa célula e ainda ser “isolado” porque aquele vetor, composição ou matéria, ou célula particular não é o meio original do polinucleotídeo. De preferência, o termo “isolado” não se refere as bibliotecas genômicas ou cDNA, célula total completa ou preparações de mRNA, preparações de DNA genômico (incluindo os separados por eletroforese e transferidos sobre borrões), preparações de DNA genômico de célula total esbulhadas ou outras composições onde a técnica não demonstre características distintivas dos polipeptídeos/ ácidos nucléicos da presente invenção.

[0073] Os polipeptídeos de acordo com a invenção compreendem uma ou mais mutações.

[0074] “Mutações” incluem adição, deleção ou substituição de aminoácidos, vantajosamente ela refere-se a substituições de aminoácidos. Tais mutações ao nível polipeptídico são refletidas ao nível de ácido nucléico por adição, deleção ou substituição de um ou mais nucleotídeos. Geralmente tais mutações não alteram o quadro de leitura do ácido nucléico. Vantajosamente, as alterações ao nível do ácido nucléico são mutações de ponto, em que um único nucleotídeo é substituído por um outro, alterando o códon do qual ele é parte para especificar um diferente aminoácido.

[0075] As mutações em B-Raf identificadas na presente invenção ocorrem naturalmente, e não foram intencionalmente induzidas nas células ou tecido pela aplicação de carcinógenos ou outros fatores tumorigênicos. Assim, as mutações aqui

identificadas refletem com precisão, a tumorigênese natural em tecidos humanos a *in vivo*. Sua detecção é assim, uma base muito melhor para o diagnóstico do que a detecção de mutações identificadas em roedores após indução tumoral química artificial.

[0076] Uma mutação “somática” é uma mutação que não é transmitida através da linha de germinação de um organismo, e ocorre em tecidos somáticos do mesmo. Vantajosamente, uma mutação somática é uma que é determinada como somática, através de análise da amostra normal/amostra de tumor.

[0077] Toda a numeração de aminoácido e nucleotídeo aqui empregada inicia-se do aminoácido +1 do polipeptídeo B-Raf ou do primeiro ATG da seqüência de nucleotídeo que o codifica.

[0078] Reações de “amplificação” são reações de ácido nucléico que resultam em amplificação específica de ácidos nucléicos alvo sobre ácidos nucléicos não-alvo. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma reação de amplificação bem conhecida.

[0079] Uma “imunoglobulina” pertence a uma família de polipeptídeos que detém a característica de dobra de imunoglobulina de moléculas de imunoglobulina (anticorpo), que contém duas camadas β e, normalmente uma ponte dissulfeto conservada. Membros da superfamília da imunoglobulina estão envolvidos em muitos aspectos de interações celular e não-celulares *in vivo*, incluindo funções em todo o sistema imune (por exemplo, anticorpos, moléculas receptores de célula T e similar), envolvimento na adesão celular (por exemplo, as moléculas IÇAM) e sinalização intracelular (por exemplo, moléculas receptoras tais como o receptor de PDGF). A presente invenção, de preferência, é aplicável a anticorpos, que são capazes de ligarem-se a antígenos alvo com alta especificidade.

[0080] “Anticorpos” podem ser anticorpos completos, ou fragmentos destes de ligação ao antígeno. Por exemplo, a invenção inclui fragmentos como Fv e FAB,

bem como Fab'e F(ab')₂, e variantes de anticorpo tais como scFv, anticorpos de domínio único, anticorpos DAb e outras moléculas baseadas no anticorpo de ligação ao antígeno.

[0081] "Câncer" é aqui empregado para referir-se ao crescimento neoplástico que surge da transformação celular em um fenótipo neoplástico. tal transformação celular freqüentemente envolve mutação genética. no contexto da presente invenção, a transformação envolve mutação genética por alteração de um ou mais genes *B-raf* como aqui descritos.

Métodos para Detecção de Ácidos nucleicos

[0082] A detecção de ácidos nucleicos mutantes codificando B-Raf pode ser empregada no contexto da presente invenção para diagnosticar a presença ou predisposição à transformação celular e câncer. Visto que as mutações em genes *B-raf* geralmente ocorrem ao nível de DNA, os métodos da invenção podem ser baseados na detecção de mutações em DNA genômico, bem como nos próprios transcriptos e proteínas. Pode ser conveniente confirmar mutações em DNA genômico por análise de transcriptos e/ou polipeptídeos de modo a garantir que a mutação detectada é, de fato, expressada no indivíduo.

[0083] Mutações no ácido nucleico genômicos são vantajosamente detectadas por técnicas com base no desvio da mobilidade em fragmentos de ácido nucleico ampliados. Por exemplo, Chemn et al., Anal. Biochem 1996 Jul. 15; 239(1):61-9, descrevem a detecção de mutações com base única por um ensaio competitivo de desvio da mobilidade. Além disso, os ensaios com base na técnica de Marcelino *et al.*, Bio Techniques 26(6): 1134-1148 (Junho 1999) estão comercialmente disponíveis.

[0084] Num exemplo preferido, pode ser usada análise duplex diferente capilar para detectar a presença de mutações com base no desvio da mobilidade de

ácidos nucléicos duplex em sistemas capilares como resultado da presença de incompatibilidades.

[0085] A geração de ácidos nucléicos para análise de amostras requer, geralmente a amplificação do ácido nucléico. Muitos métodos de amplificação confiam na reação em cadeia enzimática (tal como uma reação em cadeia da polimerase, uma reação em cadeia da ligase ou uma replicação de seqüência auto-mantida) ou da replicação de toda ou parte do vetor para o qual ele foi clonado. De preferência, a amplificação de acordo com a invenção é uma amplificação exponencial conforme apresentado, em, por exemplo, reação em cadeia da polimerase.

[0086] Muitos métodos de amplificação alvo e de sinal foram descritos na literatura, por exemplo, consultas gerais desses métodos em Landegren, U., et al., Science 242:229-237 (1988) e Lewis, R., Genetic Engineering News 10:1, 54-55 (1990). Esses métodos de amplificação podem ser usados nos métodos da presente invenção, e incluem reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR *in situ*, reação de amplificação da ligase (LAR), hibridização da ligase, replicase de bacteriófago Qbeta, sistema de amplificação com base na transcrição (TAS), amplificação genômica com seqüenciamento do transcrito (GAWTS), amplificação com base na seqüência do ácido nucléico (NASBA) e hibridização *in situ*. Primers adequados para uso em várias técnicas de amplificação podem ser preparados de acordo com os métodos conhecidos na técnica.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

[0087] PCR é um método de amplificação de ácido nucléico descrito *in ter alia*, nas Patente U.S. n.ºs. 4.683.195 e 4.683.202. PCR consiste de ciclos de DNA polimerase repetidos de reações de extensão do primer gerado por DNA polimerase. O DNA alvo é desnaturado com calor e dois oligonucleotídeos, que equiparam a seqüência alvo em filamentos opostos do DNA a ser amplificado são hibridizados.

Esses oligonucleotídeos tornam-se primers para uso com o DNA polimerase. O DNA é copiado pela extensão do primer para fazer uma segunda cópia de ambas as filamentos. Repetindo-se o ciclo de desnaturação térmica, a hibridização do primer e extensão, do DNA alvo pode ser amplificado um milhão de vezes ou mais em cerca de duas a quatro horas. PCR é uma ferramenta da biologia molecular, que deve ser usada em conjunto com uma técnica de detecção para determinar os resultados da amplificação. Uma vantagem de PCR é que ela aumenta a sensibilidade por amplificação da quantidade do DNA alvo em 1 milhão a 1 bilhão de vezes em aproximadamente 4 horas. PCR pode ser usado para amplificar qualquer ácido nucléico conhecido num contexto de diagnóstico (Mok et al., (1994), *Gynaecologic Oncology*, 52:247-252).

Replicação da Seqüência Independente (3SR)

[0088] A replicação da seqüência independente (3SR) é uma variação da seqüência TAS, que envolve a amplificação isotérmica de uma matriz de ácido nucléico via turnos seqüenciais de transcriptase reversa (TR), atividades polimerase e nuclease que são mediadas por um coquetel enzimático e primers de oligonucleotídeos apropriados (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:1874). A degradação enzimática do RNA do heteroduplex de RNA/DNA e'usada no lugar da desnaturação térmica. RNase H e outras enzimas são adicionadas para a reação e todas as etapas ocorrem na mesma temperatura e se mais adições de reagente. Seguinte a este processo, amplificações de 10^6 a 10^9 foram conseguida em uma hora a 42°C.

Amplificação de Ligação (LAR/LAS)

[0089] Reação de amplificação da ligação ou sistemas de amplificação de ligação utiliza DNA ligase e quatro oligonucleotídeos, dois para cada filamento alvo. Esta técnica está descrita por Wu, D. Y e Wallace, R.B (1989) *Genomics* 4:560. Os

oligonucleotídeos hibridizam para seqüências adjacentes no DNA alvo e são unidos pela ligase. A reação é termo-desnaturada e o ciclo repetido.

Q β Replicase

[0090] Nesta técnica, RNA replicase para o bacteriófago Q β , que replica RNA de filamento simples é usado para amplificar o DNA alvo, conforme descrito por Lizardi et al., (1988) *Bio/Technology* 6:1197. Primeiro, o DNA alvo é hibridizado a um primer incluindo um promotor T7 e uma região de seqüência Q β 5'. Usando este primer, a transcriptase reversa gera um cDNA que conecta o primer a sua extremidade 5' no processo. Essas duas etapas são similares ao protocolo TAS. O heteroduplex resultante é termo-desnaturado. A seguir, um segundo primer contendo uma região da seqüência Q β 3' é usado para iniciar um segundo turno de síntese de cDNA. Isto resulta num DNA duplamente filamentado contendo tanto extremidades 5' e 3' do bacteriófago Q β , bem como um sítio de ligação de RNA T7 polimerase. RNA T7 polimerase então transcreve o DNA de filamento duplo a seu novo RNA, que imita o Q β . Após extensa lavagem para remover qualquer sonda não hibridizada, o novo RNA é eluído do alvo e replicado por Q β replicase. A última reação cria amplificação aumentada em 10⁷ em cerca de 20 minutos.

[0091] Tecnologia de amplificação alternativa pode ser explorada na presente invenção. Por exemplo, amplificação de círculo corrente (Lizardi *et al.*, (1998) *Nat Genet* 19:225) é uma tecnologia de amplificação comercialmente disponível (RCATtm) que é acionada por DNA polimerase e pode replicar sondas de oligonucleotídeos circulares com cinética seja linear ou geométrica sob condições isotérmicas.

[0092] Na presença de dois primers adequadamente projetados, ocorre uma amplificação geométrica via deslocamento de filamento de DNA e hiper-ramificação para gerar 10¹² ou mais cópias de cada círculo em 1 hora.

[0093] Caso seja usado um único primer, RCAT gera em poucos minutos, uma cadeia linear de milhares de cópias de DNA ligados em tandem de um alvo covalentemente ligado àquele alvo.

[0094] Uma outra técnica, amplificação por deslocamento da filamento (SDA; Walker *et al.*, (1992) PNAS (USA) 80:392) inicia com uma seqüência especialmente definida única para um alvo específico. Mas diferente de outras técnicas que confiam na ciclização térmica, SDA é um processo isotérmico que utiliza uma série de primers, DNA polimerase e uma enzima de restrição para amplificar exponencialmente a seqüência de ácido nucléico única

[0095] SDA compreende tanto uma fase de geração alvo e uma fase de amplificação exponencial.

[0096] Numa geração alvo, DNA duplamente filamentado é termo-desnaturado, criando duas cópias de filamento simples. Uma série de primers especialmente fabricados combinam-se com DNA polimerase (primers de amplificação para cópia da seqüência base e primers bumper para deslocamento dos filamentos recentemente criados) para formar alvos alterados capazes de amplificação exponencial.

[0097] Um primer de amplificação está ligado a cada filamento a sua seqüência de DNA complementar. DNA polimerase então utiliza o primer para identificar um local para estender o primer de sua extremidade 3', usando o alvo alterado como uma matriz para adição de nucleotídeos individuais. O primer prolongado forma assim, um segmento de DNA duplamente filamentado contendo um sítio de reconhecimento de enzima de restrição completo em cada extremidade.

[0098] Uma enzima de restrição é a seguir ligada ao segmento de DNA duplamente filamentado em seu sítio de reconhecimento. A enzima de restrição dissocia-se do sítio de reconhecimento após ter clivado apenas um filamento do segmento de dois lados, formando um corte. DNA polimerase reconhece o corte e

estende o filamento do sítio, deslocando o filamento previamente criado. O sítio de reconhecimento é assim repetidamente cortado e restaurado pela enzima de restrição e DNA polimerase com contínuo deslocamento dos filamentos de DNA contendo o segmento alvo.

[0099] Cada filamento deslocado está a seguir disponível para anelamento com primers de amplificação como acima. O processo continua com picotamento, extensão e deslocamento repetidos dos novos filamentos de DNA resultando numa amplificação exponencial do DNA alvo original.

[00100] Uma vez que o ácido nucléico foi amplificado, uma série de técnicas são disponíveis para detecção de mutações de pares de base simples. Uma tal técnica trata-se de Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP). Detecção de SSCP está baseada na migração aberrante do DNA que passou por mutação de filamento simples comparado com o DNA de referência durante eletroforese. A mutação produz alteração conformational num único DNA de filamento simples, resultando no desvio da mobilidade. SSCP fluorescente usa primers rotulados com fluorescência para ajudar na detecção. DNA de referência e mutante são assim amplificados usando primers rotulados com fluorescência. O DNA amplificado é desnaturado e resfriado repentinamente para produzir moléculas de DNA de filamento simples, que são examinadas por eletroforese de gel não desnaturaste.

[00101] A clivagem inadequada química (CMC) é baseada no reconhecimento e clivagem dos pares de base mal combinados de DNA por uma combinação de hidroxilamina, tetróxido de ósmio e piperidina. Assim, tanto DNA de referência e DNA mutante são amplificados com primers rotulados fluorescentes. Os amplicons são hibridizados e a seguir submetidos a clivagem usando tetróxido de ósmio, que se liga a uma base T mal combinada ou hidroxilamina, que se liga a base C mal combinada, seguido por piperidina que cliva no sítio de uma base modificada. Fragmentos divididos são então detectados por eletroforese.

[00102] Técnicas baseadas em polimorfismos de fragmento de restrição (RFLPs) também podem ser usadas. Embora muitos polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) não permitam análise RFLP convencional, a PCR de análise de restrição induzida por primer (PIRA-PCR) pode ser usada para introduzir sítios de restrição usando primers Pcr num modo dependente de SNP. Primers para PIRA-PCR que introduzem sítios de restrição adequados podem ser planejados por análise computacional por exemplo, conforme descrito em Xiaiyi *et al.*, (2001) *Bioinformatics* 17:838-839.

[00103] Numa modalidade alternativa, a presente invenção propicia a detecção da expressão genética ao nível de RNA. Formatos de teste típicos utilizando hibridização de ácido ribonucléico incluem ensaios de composição nucleares, PCR-RT e ensaios de proteção de RNase Melton *et al.*, *Nucleotídeo. Acids Res.* 12:7035. Métodos para detecção que podem ser empregados incluem rótulos radioativo, rótulos enzimáticos, rótulos quimiluminescentes, rótulos fluorescentes e outros rótulos adequados.

[00104] PCR-RT é usada para amplificar RNA alvos. Neste processo, a enzima transcriptase reversa é usada para converter RNA no DNA complementar (cDNA), que pode então ser ampliado usando PCR. Este método provou ser útil para a detecção de RNA viral. Sua aplicação está, sob outros aspectos no tocante a PCR, descrita acima.

Métodos para Detecção de polipeptídeos

[00105] A invenção propicia um método onde é detectada uma proteína codificada por um gene *B-raf* mutante. Proteínas podem ser detectadas por ensaio de gel de proteína, ensaio de ligação ao anticorpo ou outros métodos de detecção conhecidos na técnica.

[00106] Por exemplo, portanto, polipeptídeos B-RAf mutantes, podem ser detectados por mobilidade diferencial nos géis de proteína, ou por outras técnicas de

análise de tamanho tais como espectrometria de massa, em que a presença dos aminoácidos mutantes pode ser determinada de acordo com o peso molecular. Peptídeos derivados de polipeptídeo B-Raf mutantes em particular, são suscetíveis de diferenciação por análise de tamanho

[00107] Vantajosamente, os meios de detecção são específicos para seqüência, tal que uma mutação por ponto partícula pode ser identificada precisamente no polipeptídeo B-RAF mutante. Por exemplo, polipeptídeo ou moléculas de RNA podem se desenvolver, reconhecendo especificamente polipeptídeo B-Raf mutantes *in vivo* ou *in vitro*.

[00108] Por exemplo aptâmeros de RNA podem ser produzidos por SELEX. SELEX é um método para a evolução *in vitro* de moléculas de ácido nucléico com ligação altamente específica a moléculas alvo. Está descrito, por exemplo, nas patentes U.S. 5654151, 5503978, 5567588 e 5270163, bem como na publicação PCT WO 96/38579, cada uma das quais está ora especificamente incorporada por referência.

[00109] O método SELEX envolve a seleção de aptâmeros de ácido nucléico, ácidos nucléicos de filamento simples capazes de ligarem-se a um alvo desejado de uma biblioteca de oligonucleotídeos. Iniciando de uma biblioteca de ácidos nucléicos, de preferência compreendendo um segmento de seqüência aleatória, o método SELEX inclui as etapas de contato da biblioteca com o alvo sob condições favoráveis para ligação, separando ácidos nucléicos não ligados desses ácidos nucléicos que se ligaram especificamente a moléculas alvo, dissociação dos complexos ácido nucléico-alvo, amplificação dos ácidos nucléicos dissociados dos complexos de ácido nucléico/alvo para render uma biblioteca enriquecida de ligante de ácidos nucléicos, e a seguir reiterar as etapas de ligação, separação, dissociação e amplificação através de quantos ciclos for desejado, para render ligantes de ácido nucléico de alta afinidade altamente específicos para a molécula alvo.

[00110] SELEX é baseada no princípio de que dentro de uma biblioteca de ácido nucléico contendo um grande número de possíveis seqüências e estruturas, há uma ampla faixa de afinidades de ligação para um dado alvo. Uma biblioteca de ácido nucléico compreendendo, por exemplo, um segmento aleatório de 20 nucleotídeo pode ter possibilidades estrutu-rais da ordem de 4^{20} . Aqueles que têm as maiores constantes de afinidade para o alvo são considerados os mais prováveis de ligar. O processo de separação, dissociação e amplificação gera uma segunda biblioteca de ácido nucléico, enriquecida para os candidatos com maior afinidade de ligação. Ciclos adicionais de seleção favorecem progressiva-mente os melhores ligantes até que a biblioteca resultante seja predominantemente composta de apenas uma ou umas poucas seqüências. Estes podem então ser clonados, seqüenciados e individualmente testados para afinidade de ligação como ligantes puros.

[00111] Ciclos de seleção e amplificação são repetidos até que seja conseguido um desejado objetivo. No caso mais genérico, a seleção/amplificação continua até que nenhuma melhora significativa no poder de ligação seja conseguido na repetição do ciclo. O método iterativo de seleção/ampli-ficação é sensível o suficiente para permitir isolamento de uma única variante na seqüência numa biblioteca contendo pelo menos 10^{11} seqüências. O método pode, em princípio, ser usado para amostragem de tantas quanto cerca de 10^{18} diferentes espécies de ácido nucléico. Os ácidos nucléicos da biblioteca, de preferência incluem uma parte da seqüência aleatorizada, bem como seqüências conservadas necessárias para amplificação eficiente. Variantes de seqüência de ácido nucléico podem ser produzidas numa série de modos, incluindo a síntese de seqüência de ácido nucléico aleatorizado e seleção por tamanho de ácidos nucléicos celulares clivados aleatoriamente. A parte da seqüência variável pode conter seqüência total ou parcialmente aleatória, ela pode conter também sub-partes da seqüência

conservada incorporada com a seqüência aleatorizada. Variação na seqüência nos ácidos nucleicos de teste podem ser introduzidas ou aumentadas por mutagênese antes ou durante as iterações de seleção/amplificação e por modificação específica dos aptâmeros clonados.

Anticorpos

[00112] Polipeptídeos B-RAf ou peptídeos derivados dos mesmos, podem ser usados para gerar anticorpos para uso na presente invenção. Os peptídeos B-Raf usados, de preferência compreendem um epitopo que é específico para um polipeptídeo B-Raf mutante de acordo com a invenção. Fragmentos de polipeptídeo que funcionam como epitopos podem ser produzidos por qualquer meio convencional (ver por exemplo, US 4.631.311). Na presente invenção, epitopos antigênicos contém de preferência uma seqüência de pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, e mais preferivelmente entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos. Polipeptídeos preferidos compreendendo epitopos imunogênicos ou antigênicos são pelo menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 resíduos de aminoácidos em comprimento.

[00113] Anticorpos podem ser gerados usando epitopos antigênicos de polipeptídeo B-Raf de acordo com a invenção por imunização de animais como coelhos ou camundongos, com peptídeos seja livres ou acoplados a veículo, por exemplo, por injeção intraperitoneal e/ou intradérmica de emulsões contendo cerca de 100 µg de peptídeo ou proteína veículo e adjuvante de Freund ou quaisquer outros adjuvantes conhecidos por estimular uma resposta imune. Várias injeções de reforço podem ser necessárias, por exemplo, a intervalos de cerca de duas semanas, para providenciar um título útil de anticorpos anti-peptídico que pode ser

detectado, por exemplo, por ensaio ELISA usando peptídeo livre adsorvido a uma superfície sólida. O título de anticorpos anti-peptídicos no soro de um animal imunizado pode ser aumentado por seleção de anticorpos anti-peptídeo, por exemplo, por adsorção ao peptídeo sobre um suporte sólido e eluição dos anticorpos selecionados de acordo com métodos do conhecimento da técnica.

[00114] Os polipeptídeos B-RAf da presente invenção, e seus fragmentos de epitopo imunogênicos e/ou antigênicos podem ser fundidos a outras seqüências de polipeptídeo. Por exemplo, os polipeptídeos da presente invenção podem ser fundidos com domínios imunoglobulínicos. Proteínas quiméricas consistindo dos primeiros dois domínios do polipeptídeo CD4 e vários domínios das regiões constantes das cadeias pesadas ou leves de imunoglobulinas de mamífero demonstraram possuir propriedades vantajosas *in vivo* (ver, por exemplo, EP 0394827, Trauneker et al., (1988) Nature, 331:84-86). A liberação aumentada de um antígeno através da barreira epitelial para o sistema imune foi demonstrada para antígenos (como insulina) conjugada a um parceiro de ligação FcRn tal como fragmentos IgG ou Fc (ver, por exemplo, WO 96/22024 e WO 9/04813).

[00115] Além disso, os polipeptídeos da presente invenção podem ser fundidos a seqüências marcadoras, tais como um peptídeo que facilita a purificação do polipeptídeo fundido. Em modalidades preferidas, a seqüência de aminoácido marcadora é um peptídeo hexa-histidina, tal como o rótulo provido num vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) dentre outros, muitos dos quais estão comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:821-824 (1989), por exemplo, hexa-histidina providencia purificação conveniente da proteína de fusão. Um outro peptídeo tag útil para purificação, o tag "HA", corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., (1984) Cell 37: 767. Assim, quaisquer dessas fusões acima

podem ser endinheiradas usando os ácidos nucleicos ou os polipeptídeos da presente invenção.

[00116] Numa modalidade preferida, a invenção providencia anticorpos que reconhecem, especificamente mutantes B-RAf como aqui descrito.

[00117] Anticorpos como aqui descrito, são especialmente indicados para aplicação de diagnóstico. Portanto, eles podem ser anticorpos alterados compreendendo uma proteína efetora como um rótulo. São especialmente preferidos os rótulos que permitem a formação de imagem da distribuição do anticorpo *in vivo*. Tais rótulos podem ser rótulos radioativos ou rótulos radio-opacos, tais como partículas metálicas, que são prontamente visualizadas dentro do corpo de um paciente. Além disso, eles podem ser rótulos fluorescentes ou outros rótulos que são visíveis no tecido.

[00118] Tecnologia de DNA recombinante pode ser usada para melhorar os anticorpos da invenção. Assim anticorpos quiméricos podem ser construídos de modo a reduzir a imunogenicidade dos mesmos em aplicações de diagnóstico ou terapêutico. Além disso, a imunogenicidade pode ser minimizada por humanização dos anticorpos por enxertia CDR [ver Pedido de Patente Europeu 0 239 400 (Winter)] e, opcionalmente, modificação de quadro [EP 0 239 400; Riechmann, L. et al., Nature, 332, 323-327, 1988; Verhoeyen M. et al., Science 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4, 773-783, 1991, Maeda, H. et al., Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991, Gorman S. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest P. R. et al., Bio/Technology, 9 266-271, 1991; Co, M. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. et al., J. Immunol., 148, 1149-1154, 1992 e Sato, K. et al., Cancer Res., 53, 851-856, 1993].

[00119] Anticorpos como aqui descritos, podem ser produzidos em cultura celular. A tecnologia de DNA recombinante pode ser usada para produzir os

anticorpos de acordo com o procedimento estabelecido, em cultura bacteriana, ou preferivelmente, cultura celular de mamífero. O sistema de cultura celular selecionado secreta, opcionalmente, o produto de anticorpo, embora produtos de anticorpo possam ser isolados de células não-secretoras.

[00120] Conseqüentemente, a presente invenção inclui um processo para produção de um anticorpo de acordo com a invenção compreendendo cultura de um hospedeiro, por exemplo, *E. coli* uma célula de inseto ou uma célula de mamífero, que foi transformada com um vetor híbrido compreendendo um cassete de expressão compreendendo um promotor operavelmente ligado a uma primeira seqüência de DNA codificado um peptídeo de sinal ligado no quadro de leitura apropriado a uma segunda seqüência de DNA codificando tal proteína de anticorpos, e isolamento da referida proteína.

[00121] A multiplicação de células do hibridoma ou células hospedeiras de mamífero *in vitro* é realizada em meio de cultura adequado, que são o meio de cultura padrão costu-meiro, por exemplo, Meio Eagle Modificado da Dulbeco (DMEM) ou meio RPMI 1640, opcionalmente substituído por um soro de mamífero, por exemplo, soro bovino fetal ou traços de elemento e suplementos de sustentação do crescimento, por exemplo, células alimentadoras tais como células de exsudato peritoneal de camundongo normais, células de baço, macrófagos de medula espinhal, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baixa densidade, ácido oléico ou similar. A multiplicação de células hospedeiras que são células bacterianas ou células de levedura é similarmente, realizada em meio de cultura adequado, conhecido na técnica, por exemplo, para bactérias no meio LB NZCYM, NZYM, NZM, Caldo Terrífico, SOC, SOC, 2 x YT, ou Meio Mínimo M9 e para levedura em meio YPD, YEPD, Meio Mínimo ou Meio de Passagem.

[00122] A produção *in vitro* providencia preparações de anticorpo relativamente puras e permite etapas dando grandes quantidades dos desejados

anticorpos. Técnicas para cultivo de célula bacteriana, de levedura ou célula de mamífero são do conhecimentos na área e incluem cultura em suspensão homogênea, por exemplo, num reator suspenso a ar ou num reator de agitação contínua, ou cultura celular imobilizada ou aprisionada, por exemplo, em fibras ocas, microcápsulas ou micro-pérolas de agarose ou cartuchos de cerâmica.

[00123] Grandes quantidades dos desejados anticorpos também podem ser obtidos pro multiplicação de células de mamífero *in vivo*. Para este fim, células do hibridoma produzindo os desejados anticorpos são injetadas em mamíferos histocompatíveis para causar o desenvolvimento de tumores produtores de anticorpos. Opcionalmente, os animais são iniciados com um hidrocarboneto, especialmente óleos minerais, tais como pristano (tetrametil-pentadecano) antes da injeção. Após uma a três semanas, os anticorpos são isolados dos fluidos corporais desses mamíferos. Por exemplo, células de hibridoma obtidas por fusão de células de mieloma adequadas com células de baço produtoras de anticorpos provenientes de camundongos Balb/c ou células transfectadas derivadas de linha celular de hibridoma Sp2/0 que produzem os desejados anticorpos são injetadas intraperitonealmente em camundongos Balb/c, opcionalmente pré-tratados com pristano, e depois, uma a duas semanas, o fluido ascítico (cavidade abdominal) é retirado dos animais.

[00124] A técnica precedente e outras são discutidas, por exemplo, em Kohler e Milstein, (1975) Nature 256:495-497, US 4.376.110; Harlow e Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988), Cold Spring Harbor, ora incorporados por referência. Técnicas para preparação de moléculas de anticorpo recombinantes estão descritas nas referências acima e também, em, por exemplo, EP 0623679; EP 0368684 e EP 0436597, que estão ora incorporados por referência.

[00125] Os sobrenadantes da cultura celular são examinados para os desejados anticorpos, preferencialmente por um imunoensaio enzimático, por exemplo, um ensaio sanduíche ou um ensaio por ponto ou um rádio-imunoensaio.

[00126] Para isolamento dos anticorpos, a imunoglobulina no sobrenadante da cultura ou no fluido ascítico pode ser concentrada, por exemplo, por precipitação com sulfato de amônio, diálise contra material higroscópico tal como polietileno glicol, filtração através de membranas seletivas ou similar. Caso necessário e/ou desejado, os anticorpos são purificados por métodos de cromatografia costumeira, por exemplo, filtração com gel, cromatografia de troca de íon, cromatografia sobre DEAE-celulose e/ou cromatografia de (imuno)-afinidade por exemplo, cromatografia de afinidade com o antígeno alvo, ou com Proteína-A.

[00127] A invenção ainda se refere a células de hibridoma secretando os anticorpos monoclonais da invenção. Células de hibridoma preferidas da invenção são geneticamente estáveis, secretam anticorpos monoclonais da invenção de especificidade desejada e podem ser ativadas de culturas profundamente congeladas por descongelamento e reclonagem.

[00128] A invenção numa modalidade preferida, refere-se a produção de anticorpos B-Raf anti mutantes, Assim, a invenção também se refere a um processo para preparação de uma linha celular de hibridoma secretando anticorpos monoclonais de acordo com a invenção, caracterizado pelo fato de que um mamífero adequado, por exemplo, um camundongo Balb/c é imunizado com um ou mais polipeptídeos PDGF ou fragmentos antigênicos destes, ou um veículo antigênico contendo um polipeptídeo B-Raf mutante, células produtoras de anticorpos do mamífero imunizadas, fundidas com células de uma linha celular de mieloma adequada, células híbridas obtidas na fusão são clonadas, e os clones de célula secretando os anticorpos desejados são selecionados. Por exemplo, célula de baço de camundongos Balb/c imunizadas com B-RAF mutante são fundidas com células

de linha celular de mieloma PAI ou a linha celular de mieloma Sp2/0-Ag14 as células híbridas obtidas são examinadas para secreção dos desejados anticorpos, e as células de hibridoma positivas são clonadas.

[00129] Prefere-se um processo para preparação de uma linha celular de hibridoma, caracterizado pelo fato de que os camundongos Balb/c são imunizados por injeção subcutânea e/ou intraperitoneal entre 1 e 100 µg de B-RAf mutante e um adjuvante adequado, como adjuvante de Freund, várias vezes, por exemplo, quatro a seis vezes, durante vários meses, por exemplo, entre dois e quatro meses, e células do baço de camundongos imunizados são retiradas dois a quatro dias após a última injeção e fundidas com células da linha celular de mieloma PAI, na presença de um promotor de fusão, de preferência polietileno glicol. De preferência, as células de mieloma são fundidas com um excesso de três a vinte vezes de células de baço de camundongos imunizados numa solução contendo cerca de 30% a cerca de 50% de polietileno glicol de um peso molecular em torno de 4000. Após a fusão, as células são expandidas num meio de cultura adequado conforme descrito antes, suplementado com um meio de seleção, por exemplo, meio HAT a intervalos regulares, de modo a evitar as células de mieloma normal de superdesenvolvimento das células de hibridoma desejadas.

[00130] A invenção também se refere a ácidos nucléicos recombinantes compreendendo um inserto codificando para um domínio variável de cadeia pesada e/ou para um domínio variável de cadeia leve de anticorpos direcionados a B-RAF mutante conforme descrito antes. Por definição tais DNAs compreendem DNAs de filamento simples de codificação, DNAs de filamento duplo, consistindo de tais DNAs de codificação, e de DNAs complementares a estes, ou esses próprios DNAs complementares (filamento simples).

[00131] Além disso, DNA codificando um domínio variável de cadeia pesada e/ou para um domínio variável de cadeia leve de anticorpos direcionado a um B-Raf

mutante pode ser um DNA enzimaticamente ou quimicamente sintetizado com a seqüência autêntica de DNA codificando para um domínio variável de cadeia pesada e/ou para um domínio variável de cadeia leve ou um seu mutante. Um mutante do DNA autêntico e um DNA codificando um domínio variável de cadeia pesada e/ou um domínio variável de cadeia leve dos anticorpos supramencionados em que um ou mais aminoácidos são deletados ou trocados com um ou mais de outros aminoácidos. De preferência tais modificadores estão fora dos CDRs de domínio variável de cadeia pesada e/ou do domínio variável de cadeia leve do anticorpos. Um tal DNA mutante também pretende ser um mutante mudo onde um ou mais nucleotídeos são substituídos com outros nucleotídeos, com os novos códons codificando para os mesmos aminoácidos. Uma tal seqüência mutante também é uma seqüência degenerada. Seqüências degeneradas são degeneradas dentro do significado do código genético pelo fato de que um número ilimitado de nucleotídeos são substituídos por outros nucleotídeos sem resultar numa mudança na seqüência de aminoácidos originalmente codificada. Tais seqüências degeneradas podem ser úteis, devido a seus sítios de restrição deferentes e/ou freqüência de códons particulares que são preferidos pelo hospedeiro específico, particularmente, *E. coli*, para se obter uma ótima expressão do domínio variável de murídeo de cadeia pesada e/ou um domínio variável de murídeo de cadeia leve.

[00132] Neste contexto, o termo mutante destina-se a incluir um DNA mutante obtido por mutagênese *in vitro* do autêntico DNA de acordo com métodos conhecidos na técnica.

[00133] Para a montagem das moléculas de imunoglobulina tetraméricas completas e expressão de anticorpos quiméricos, os insertos de DNA recombinantes codificando para domínio variáveis e cadeia pesada e leve são fundidos com os correspondentes DNAs codificando para domínios constantes de cadeia pesada e

leve, sendo a seguir transferidos para células hospedeiras apropriadas, por exemplo, após incorporação a vetores híbridos.

[00134] A invenção, portanto, refere-se também a ácidos nucleicos recombinantes compreendendo um inserto codificando para um domínio variável de murídeo de cadeia pesada de um anticorpo B-Raf anti-mutante fundido a um domínio constante humano γ , por exemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ ou $\gamma 4$, de preferência $\gamma 1$ ou $\gamma 4$. Similarmente, a invenção refere-se a DNAs recombinantes compreendendo um inserto codificando para um domínio variável de murídeo de cadeia leve de um anticorpo B-Raf anti-mutante direcionado ao mutante B-Raf fundido a um domínio constante humano κ ou λ , de preferência κ .

[00135] Em uma outra modalidade, a invenção é pertinente a DNAs recombinantes codificando para um polipeptídeo recombinante onde o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável e cadeia leve são ligados por meio de um grupo espaçador, opcionalmente, compreendendo uma seqüência de sinal facilitando o processamento do anticorpo na célula hospedeira e/ou um DNA codificando para um peptídeo que facilita a purificação do anticorpos e/ou um sítio de clivagem e/ou um espaçador peptídico e/ou uma molécula efetora.

[00136] Anticorpos e fragmentos de anticorpo de acordo com a invenção, são úteis na diagnose. Portanto, a invenção providencia uma composição para diagnose compreendendo um anticorpos de acordo com a invenção.

[00137] No caso de uma composição para diagnóstico, o anticorpo, é de preferência providenciado juntamente com meios para detectar o anticorpos, que pode ser enzimático, fluorescente, de radioisótopos ou outros meios. O anticorpos e os meios de detecção podem ser providenciados para uso simultâneo, simultâneo separado ou seqüencial, num kit diagnóstico destinado à diagnose.

[00138] Os anticorpos da invenção podem ser submetidos a ensaio para ligação imuno específica por qualquer método conhecido na técnica. Os

imunoenaios que podem ser usados incluem, sem estar a eles limitado, sistemas de ensaio competitivos e não-competitivos usando técnicas tais como borrão western, rádioimunoenaios, ELISA, imunoenaios sanduíche, ensaio de imunoprecipitação, reações de precipitina, reações de precipitina de difusão por gel, ensaios de imunodifusão, ensaio de aglutinação, ensaios complemento-fixação, ensaios, imuno-radiométricos, imunoenaios fluorescentes e imunoenaios de proteína A. Tais ensaios são rotineiros na técnica (ver, por exemplo, Ausubel et. al. eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que está ora incorporado por referência em sua totalidade). Imunoenaios exemplares estão descritos resumidamente abaixo.

[00139] Protocolos de imunoprecipitação compreendem, geralmente, a lise de uma população de células num tampão de lise como tampão RIPA (1% NP-40 ou Triton X-100, desoxicolato de sódio a 1%, SDS 0,1%, NaCl 0,15M, fosfato de sódio 0,01 M a pH 7. Trasilol 2,15) suplementado com fosfatase protéica e/ou inibidores de protease (por exemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato sódico) adicionando o anticorpo de interesse ao lisado celular, incubando por um período de tempo (por exemplo, 1-4 horas) a 4°C adicionar contas de Sefarose de proteína A e/ou proteína G ao lisado celular, incubando por cerca de uma hora ou mais a 4°C, lavar as contar em tampão de lise e ressuspensão das contas em SDS/tampão da amostra. A capacidade do anticorpos e interesse em imunoprecipitar um antígeno particular pode ser avaliada, por exemplo, por análise de manchamento western.

[00140] A análise de manchamento Western geralmente compreende preparar amostras de proteína, eletroforese das amostras de proteína num gel de poli(acrilamida (por exemplo, 8%-20% SDS-PAGE dependendo do peso molecular do antígeno) transferir a amostra de proteína do gel de poli(acrilamida para uma membrana como nitrocelulose, PVDF ou náilon, bloqueio da membrana em solução de bloqueio, (por exemplo, PBS com BSA a 3% ou leite desnatado), lavar membrana

em tampão de lavagem (por exemplo, PBS-Tween 20), expor a membrana a um anticorpo primário (o anticorpo de interesse) diluído em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem, expor a membrana a um anticorpos secundário (que reconhece o anticorpos primário, por exemplo, um anticorpo anti-humano) conjugado a um substrato enzimático (por exemplo, peroxidase de rábano de cavalo ou fosfatase alcalina) ou molécula radioativa (por exemplo, P^{32} ou I^{125}) diluído em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem, e detectar quanto à presença do antígeno.

[00141] ELISAs compreendem a preparação do antígeno, revestimento do reservatório de uma placa microtitulada de 96 reservatório com o antígeno, adicionar o anticorpos de interesse conjugado a um composto detectável tal como um substrato enzimático (por exemplo, peroxidase de rábano de cavalo ou fosfatase alcalina) ao reservatório e incubar durante um período de tempo detectando a presença do antígeno. Em ELISAs o anticorpo de interesse não tem de ser conjugado a um composto detectável, ao contrário, um segundo anticorpos (que reconhece o anticorpo de interesse) conjugado a um composto detectável, pode ser adicionado para o compartimento. Adicionalmente, no lugar de cobrir o reservatório com o antígeno, o anticorpos pode ser revestido ao reservatório. Neste caso, um segundo anticorpo conjugado ao composto detectável pode ser adicionado seguinte a adição do antígeno de interesse ao reservatório revestido.

[00142] A afinidade de ligação de um anticorpos a um antígeno e o coeficiente extra de uma interação anticorpo-antígeno pode ser determinado por ensaios de ligação competitivos. Um exemplo de um ensaio de ligação competitivo é um rádioimunoensaio compreendendo a incubação do antígeno rotulado (por exemplo, H^3 ou I^{125}) com o anticorpos de interesse na presença de quantidades crescentes de antígeno não rotulado, e a detecção do anticorpos ligado ao antígeno rotulado. A afinidade do anticorpos de interesse para um dado antígeno e os

coeficientes extras de ligação podem ser determinados dos dados por análise num plotador improvisado. A competição com um segundo anticorpo pode também ser determinada usando rádioimunoensaios. Neste caso, o antígeno é incubado com o anticorpos de interesse conjugado a um composto rotulado (por exemplo, H³ ou I¹²⁵) na presença de quantidades crescentes de um segundo anticorpos não rotulado.

Preparação dos polipeptídeos B-Raf mutantes

[00143] Polipeptídeo B-Raf mutantes de acordo com a presente invenção podem ser produzidos por qualquer técnica desejada, incluindo síntese química, isolamento de amostras biológicas e expressão de um ácido nucléico codificando um tal polipeptídeo. Ácidos nucléicos, por sua vez, podem ser sintetizados ou isolados de fontes biológica de mutante B-Raf.

[00144] A invenção refere-se assim, a vetores codificando um polipeptídeo de acordo com a invenção, ou um seu fragmento. O vetor, pode ser, por exemplo, um vetor de fago, de plasmídeo, viral ou retroviral.

[00145] Ácidos nucléicos de acordo com a invenção podem constituir parte de um vetor contendo um marcador selecionável para propagação num hospedeiro. Geralmente, um vetor de plasmídeo é introduzido num precipitado, tal como precipitado de fosfato de cálcio, ou num complexo com um lipídio carregado. Caso o vetor seja um vírus, ele podem ser acondicionado *in vitro* usando uma linha celular acondicionada apropriada, sendo a seguir levado para células hospedeiras por transdução.

[00146] O inserto de ácido nucléico está operativamente ligado a um promotor apropriado, tal como o promotor fago lambda PL, o lac *E. coli*, trp, phoA e promotores tac, os promotores SV40 primitivo e tardio e promotores de LTRs retrovirais. Outros promotores adequados são conhecidos dos versados na técnica. A expressão construtores contém ainda sítios para iniciação da transcrição, terminação e, na região transcrita, um sítio de ligação ao ribossoma para tradução. A

parte de codificação dos transcriptos expressos pelos construtores, de preferência inclui um códon de iniciação da tradução no começo e um códon de terminação (UAA, UGA ou UAG) apropriadamente posicionado no final do polipeptídeo a ser traduzido.

[00147] Como indicado, os vetores de expressão, de preferência incluem pelo menos um marcador selecionável. Tais marcadores incluem diidrofolato redutase, G418 ou resistência a neomicina para cultura celular eucariótica e tetraciclina, genes resistentes a canamicina ou ampicilina para cultura em *E. coli* e outras bactérias. Exemplos representativos de hospedeiros apropriados incluem, sem estar a eles limitado, células bacterianas tais como *E. coli*, *Streptomyces* e células de *Salmonella typhimurium*, células fúngicas, tais como células de levedura (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*), células de inseto como *Drosophila S2* e *Spodoptera Sf9*, células de animal como CHO, COS, 293 e célula de melanoma de Bowes, e células vegetais.

[00148] Meio de cultura apropriado e condições para as células hospedeiras supradescritas são conhecidas na técnica e estão comercialmente disponíveis.

[00149] Dentre vetores preferidos para uso nas bactérias inclui-se pQE70, pQE60 e pQE-9, disponíveis de QIAGEN inc., vetores pBluescript, vetores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponíveis de Stratagene Cloning Systems, Inc. e ptrc99a, pKK2233, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponíveis de Pharmacia Biotech, Inc. Dentre vetores eucarióticos preferidos estão pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI e pSG disponíveis de Stratagene, e pSVK3, pBPV, pMSG e pSVI disponíveis de Pharmacia. vetores de expressão preferidos par uso em sistemas e levedura incluem, sem estar limitado a estes, pYES2, pYDI, pTEFI/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3,5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3,5K, pPIC9K e PA0815 (todos disponíveis de Invitrogen, Carlsbad, CA).

[00150] A introdução do construtor na célula hospedeira pode ser realizada por transfecção de fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrana, transfecção mediada por lipídio catiônico, eletroporação, transdução, infecção, ou outros métodos. Tais métodos estão descritos em muitos manuais de laboratório padrão, tais como Sambrook et al., aqui referido supra.

[00151] Um polipeptídeo de acordo com a invenção pode ser recuperado e purificado por culturas celulares recombinantes por métodos bem conhecidos incluindo sulfato de amônio ou precipitação com etanol, extração com ácido, cromatografia de troca de ânion ou cátion, cromatografia de fosfocelulose, cromatografia interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia de hidróxilapatita e cromatografia de lectina. Mais preferivelmente, é empregado cromatografia líquida de alto desempenho ("HPLC") para purificação.

[00152] Os polipeptídeos de acordo com a presente invenção podem também ser recuperados de fontes biológicas, incluindo fluidos corpóreos, tecidos e células, especialmente células derivadas de tecido tumoral ou de tecidos com suspeita de tumor de um indivíduo.

[00153] Além disso, os polipeptídeos de acordo com a invenção podem ser quimicamente sintetizados usando técnicas conhecidas (por exemplo, ver Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & co., N. Y. ad Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)). Por exemplo, um polipeptídeo correspondente a um fragmento de um polipeptídeo B-Raf mutante pode ser sintetizado mediante uso de um sintetizador de peptídeo.

Mutações B-Raf

[00154] Mutações em B-Raf foram identificadas em células de tumor humano. A Tabela 1 descreve o local dessas mutações e os tumores em que elas foram identificadas. As mutações estão no domínio quinase de B-Raf. A maioria das mutações podem ser confirmadas como somáticas, indicando que uma amostra de

célula normal/tumor equiparada foi testada e a mutação encontrada apenas na amostra de tumor.

TABELA 1

Gene	Nº de acesso do cDNA	Nº de acesso da Proteína	Mutação do ácido nucléico	Mutação da proteína	Tumor	Tipo de tumor	Somático
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	A101D	melanoma	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	A2058	melanoma	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	A375	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	A673	Sarcoma (Ewings)	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	C32	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	COLO-205	Colo-retal	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	COLO-679	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	COLO-741	Colo-retal	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	COLO-800	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	Colo-829	Melanoma Maligno	N/a
B-Raf	NM_004333	NP_004324	T1796A	V599E	Colo-829	par de linha celular de melanoma	Sim

				p-loop	Cólon		
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	DBTRG-05MG	glioma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	DU-4475	Câncer de mama	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	DU-4475	Mama	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 103	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 104	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G1394C	G465A	Duke Mel 105	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 108	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 110	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 111	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 113	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 115	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Duke Mel 114	Melanoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	G-361	Melanoma	N/a

B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	GCT	sarcoma (GCT/histiocitoma)	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	HT-144	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	HT29	Câncer colo-retal	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	HT29	Colo-retal	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G1388A	G463E	Hx62-26	Ovário/bexiga?	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	HxLL	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	KG-1-C	Glioma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	LS-411N	Colo-retal	N/a
				p-loop	Lung		
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Malme-3M	Melanoma Maligno	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Malme-3M	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G1388T	G463V	MDA-MB-231	Mama	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	MDA-MB-435	Câncer de mama	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	MDA-MB-435	Mama	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G1403C	G468A	NCI-H1395	NSCLC	N/a
B-Raf	NM_00433	NP_00432	G1394T	G465V	NCI-H1666	NSCLC	N/a

	3	4					
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G1403C	G468A	NCI-H1755	NSCLC	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	C1786G	L596V	NCI-H2087	NSCLC	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	C1786G	L596V	NCI-H2087	NSCLC	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G1783C	G595R	NCI-H508	Colo-retal	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	NMC-G1	Glioma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1795A	V599E	Ov-90-93	Câncer ovariano	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	PT-18-92-T	Câncer ovariano	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G1753A	E585K	PT-52-91-T	Câncer ovariano	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1787G	L596R	PT-66-91-T	Câncer ovariano	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	PT-93-13956-T	Câncer de cólon,hk	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	PT-93-7014T	Câncer de cólon,HK	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	PT-93-7014-T	Câncer de cólon,HK	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1782G	F594L	PT-97-51-T	Cólon adenocarcinoma, Duke	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	C1786G	L596V	PT-97-51-T	Cólon adenocarcinoma, Duke	Sim
B-Raf	NM_00433	NP_00432	T1796A	V599E	PT-97-93-T	Câncer ovariano	Sim

	3	4					
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	RPMI-7951	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	RUCH2-DH	Rabdomiosarcoma	N/a

B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	Sarcoma 24	Histiocitoma	Sim
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	SH-4	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	S86-5261	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	S93-11360	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	S94-6209	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	S95-10334	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	S-99-11631	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	SK-HEP-1	Hapatocelular	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	SK-MEL-24	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	SK-MEL-28	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	SK-MEL-3	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	SW1417	Colo-retal	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	SW872	Sarcoma(liposarcoma)	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	TE-159-T	Rabdomiosarcoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T1796A	V599E	AM-38	Glioma	N/a

B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	TG1796- 97AT	V599E	WM-266-4/WM- 115	Melanoma	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	G2041A	R681Q	HEC-1-A	Útero	N/a
B-Raf	NM_00433 3	NP_00432 4	T974C	I325T	ZR-75-30	Mama	N/a

Ensaio do Composto

[00155] De acordo com a presente invenção B-Raf mutante é usado como um alvo para identificar compostos por exemplo, compostos condutores para farmacêuticos que são capazes de modular a atividade proliferativa de B-Raf mutante. Portanto, a invenção refere-se a um ensaio e providencia um método para identificar um composto ou compostos capazes, direta ou indiretamente de modular a atividade de B-Raf mutante, compreendendo as etapas de:

- (a) incubar B-Raf mutante com o composto ou compostos para avaliação, e
- (b) identificar os compostos que influenciam a atividade do b-RAf mutante.

[00156] B-RAf mutante é como indicado no contexto da presente invenção.

[00157] De acordo com uma primeira modalidade deste aspecto inventivo, o ensaio é configurado para detectar polipeptídeos que se ligam diretamente ao mutante B-Raf.

[00158] A invenção, portanto, providencia um método para identificar uma proliferação celular moduladora, compreendendo as etapas de

- (a) incubar B-Raf mutante com o composto ou compostos para avaliação e
- (b) identificar os compostos que se ligam ao B-Raf mutante.

De preferência o método compreende ainda a etapa de:

- (c) avaliar os compostos que se ligam ao B-Raf mutante para a capacidade de modular proliferação celular num ensaio com base em célula.

[00159] A ligação ao mutante B-RAf pode ser avaliada por qualquer técnica conhecida dos versados nessa técnica. Exemplos de ensaios adequados incluem os dois sistemas de ensaio híbrido, que mede interações *in vivo*, ensaios de cromatografia de afinidade, por exemplo, envolvendo a ligação a polipeptídeos imobilizados numa coluna, ensaios de fluorescência, em que a ligação dos

compostos e do mutante B-Raf está associada com alteração na fluorescência de um ou ambos os componentes num par de ligação e similar. Ensaios preferidos são realizados *in vivo* em células, tais como o ensaio duplo híbrido.

[00160] Num aspecto preferido desta modalidade, a invenção providencia um método para identificar um composto condutor para um fármaco útil no tratamento de doenças envolvendo ou utilizando proliferação celular, compreendendo a incubação de um composto ou compostos para serem testados com o mutante B-RAf, sob condições, em que, simplesmente pela presença do composto ou compostos para teste, B-Raf associa-se com RAS com uma afinidade de referência,

determinar a finidade de ligação do mutante B-Raf para RAS na presença do composto ou compostos para teste, e

seleciona os compostos que modulam a afinidade de ligação do mutante B-Raf para RAS com relação à afinidade de ligação de referencia.

[00161] De preferência, portanto, o ensaio de acordo com a invenção é calibrado na ausência do composto ou compostos para teste, ou na presença de um composto de referência cuja atividade na ligação ao mutante B-RAf é conhecida, ou é de outro modo desejável como um valor de referência. Por exemplo num sistema duplo-híbrido um valor de referência pode ser obtido na ausência de qualquer composto. A adição de um composto ou compostos que aumentam a afinidade de ligação do mutante B-Raf para um alvo aumenta a conferência do ensaio supra, acima do nível de referência, enquanto a adição de um composto ou compostos que reduzem esta afinidade resulta numa redução da conferencia do ensaio abaixo do nível de referência.

[00162] Numa segunda modalidade, a invenção pode ser configurada para detectar interações funcionais entre um composto ou compostos e o mutante B-Raf. Tais interações ocorrerão, seja ao nível d regulação do B-Raf mutante, tal que esta

quinase é ela mesma ativada ou inativada, por exemplo, por RAS, em resposta ao composto ou compostos para testes, ou ao nível da modulação do efeito biológico do B-Raf mutante nos alvos a jusante tal como MEK. Como aqui empregado, “ativação” e “inativação” inclui a modulação da atividade, enzimática, ou de outro modo, de um composto, bem como, a modulação da taxa de produção do mesmo, por exemplo, pela ativação ou repressão da expressão de um polipeptídeo numa célula. Os termos incluem ação direta na transcrição genética de foram a modular a expressão do produto genético.

[00163] Ensaios que detectam a modulação da interação funcional entre o B-Raf a jusante e seus parceiros a montante ou a jusante num passo de sinalização são de preferência ensaios com base em célula. Por exemplo, eles podem ser baseados numa avaliação do grau de fosforilação de MAPK, que é indicativo do grau de ativação MEK, resultante da ativação do B-RAf mutante.

[00164] Em modalidades preferidas, um ácido nucléico codificando B-Raf mutante é ligado a um vetor, e introduzido em células hospedeiras adequadas para produzir linhas celulares transformadas que expressa B-RAf mutante. As linhas de célula resultantes podem então ser produzidas por análise qualitativa e/ou quantitativa reproduzível dos efeitos dos compostos potenciais afetando a função de B-Raf mutante. Assim, células de expressão de B-Raf mutante podem ser empregada para identificação dos compostos, particularmente compostos de baixo peso molecular, que modulam a função do mutante B-Raf. Assim, células hospedeiras expressando mutante B-raf são úteis para seleção de droga e constitui um outro objeto da presente invenção providenciar um método par identificar compostos que modulam a atividade do B-Raf mutante, tal método compreendendo expor as células contendo DNA heterólogo codificando B-Raf mutante, onde tais células produzem B-RAf mutante funcional, a pelo menos um composto ou mistura de compostos ou sinal cuja capacidade em modular a atividade de tal B-RAf mutante

procura-se determinar e a seguir monitorar tais células para alterações ocasionadas por tal modulação. Um tal ensaio permite a identificação de moduladores, tais como agonistas, antagonistas e moduladores alostéricos, ou B-RAf mutante. Como aqui empregado, um composto ou sinal que modula a atividade do B-RAf mutante refere-se a um composto que altera a atividade do mutante B-Raf de um modo tal que a atividade do B-RAf mutante em um alvo do mesmo, tal como MEK, é deferente na presença do composto ou sinal (se comparado a ausência do tal composto ou sinal).

[00165] Ensaio de seleção baseados em célula, podem ser planejados por construção de linhas de célula em que a expressão de uma proteína repórter, ou seja, uma proteína facilmente testável, tal como β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT) ou luciferase, é dependente da ativação de um substrato B-RAf mutante. Por exemplo, um gene repórter codificando um dos polipeptídeos supra pode ser colocado sob controle de um elemento de resposta que é especificamente ativado por MEK ou MAPK. Um tal ensaio permite a detecção dos compostos que modulam diretamente a função B-RAf mutante, tal como compostos que antagonizam fosforilação de MEK por B-Raf mutante, ou compostos que inibem ou potenciam outras funções celulares requeridas para atividade do mutante B-Raf. As células em que B-Raf não-mutante do tipo selvagem está presente propiciam controles adequados.

[00166] Alternativamente formatos de ensaio incluem ensaios que avaliam diretamente respostas proliferativa num sistema biológico. A expressão constitutiva do B-RAf mutante não regulado resulta num fenótipo proliferativo em células animais. Sistemas baseados em célula, ta como fibroblastos 3T3, podem ser usados para avaliar a atividade de reguladores potenciais de B-Raf mutante.

[00167] Num aspecto preferido desta modalidade da invenção, é providenciado um método para identificar um composto de referência para um

farmacêutico útil no tratamento de doença envolvendo ou usando uma resposta inflamatória, compreendendo;

incubação de um composto ou compostos para teste com B-Raf mutante e MEK, sob condições em que, unicamente pela presença do composto ou compostos para teste, B-Raf mutante direta ou indiretamente ocasiona a fosforilação de MEK com uma eficiência de fosforilação de referência;

determinar a capacidade do B-Raf mutante ocasionar a fosforilação, direta ou indiretamente, de MEK na presença do composto ou compostos para serem testados, e

seleção dos compostos que modulam a capacidade do B-RAF mutante em fosforilar MEK com relação à eficiência de fosforilação de referência.

[00168] Num aspecto preferido adicional, a invenção refere-se a um método para identificar um composto de referência para um farmacêutico, compreendendo as etapas de:

providenciar uma molécula de B-Raf mutante purificada;

incubar a molécula de B-Raf mutante com um substrato conhecido como fosforilado por B-Raf mutante e um composto de teste ou composto, e

identificar o composto ou compostos de teste capazes de modular a fosforilação do substrato.

[00169] Um substrato para a fosforilação de B-Raf mutante é MERK. De preferência, portanto, MEK é usado como um substrato para monitorar compostos capazes de modular a atividade quinase de B-Raf mutante. Isto facilita aos versados na técnica selecionar diretamente quanto a moduladores de quinase. De preferência moduladores de quinase são inibidores de quinase (B-Raf mutante).

[00170] Numa modalidade preferida, a atividade de BRaf pode ser medida de acordo com o seguinte protocolo:

[00171] 1. AS células são solubilizadas em tampão de lise (150 mM NaCl, 25 mM HEPES [Ph 7,3], 1 Mm ortovanadato de sódio, 1% Triton X-100, inibidores de protease, ditioneitol).

[00172] 2. O lisado é incubado em gelo por 10 minutos e centrifugado a 14.000 g por 10 minutos, e o sobrenadante incubado com anticorpos policlonal anti-B-Raf, e a seguir com proteína G-Sepharose a 4°C por 1 hora.

[00173] 3. Os imunoprecipitados são lavados duas vezes com tampão de lise, e a reação de quinase realizada a 30°C por 10 minutos em tampão quinase (0,2 mM ATP, 30 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 40 mM β-glicerofosfato de sódio, 0,2 mM ortovana-dato de sódio, 2mM de ácido ocadáico, 0,2% de β-mercaptoetanol) com 1 mg de MEK1 recombinante purificado adicionado como o substrato.

[00174] 4. Após ativação de MEK1, 15 mCi de ATP^[γ-P³²] e 1 mg de quinase defeituosa (K52R) Erk são adicionados como o substrato por mais 2 minutos. A reação termina com adição de tampão de amostra, sendo a mistura fervida por 5 minutos e as proteínas separadas por SDS-PAGE.

[00175] 5. As proteínas do gel são transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno em que a quantidade de K52R Erk rádirotulada é quantificada por um PhosphorImager.

[00176] 6. Para cálculos da atividade B-Raf, a quantidade de proteína B-Raf na mesma membrana é determinada por sonda genética da membrana com IgG anti-camundongo de cabra rotulado com I¹²⁵ seguinte a manchamento anti-B-Raf monoclonal de camundongo.

[00177] 7. O ensaio pode ser repetido na presença ou ausência do(s) composto(s) para teste.

[00178] Opcionalmente, o composto(s) de teste identificado podem então ser submetidos a teste *in vivo* para determinar sua eficácia num trajeto de sinalização de B-Raf mutante, por exemplo, como indicado na modalidade precedente

[00179] Como aqui empregado, “atividade B-Raf mutante” pode referir-se a qualquer atividade do BRaf mutante, incluindo sua atividade de ligação, em particular refere-se a atividade de fosforilação do B-Raf mutante. Portanto, a invenção pode ser configurada para detectar a fosforilação do(s) compostos alvo por B-Raf mutante, e a modulação desta atividade por agentes terapêuticos potenciais.

[00180] Exemplos de compostos que modulam a atividade de fosforilação do B-RAF mutante, incluem mutantes negativos dominantes do próprio B-Raf. Tais compostos são capazes de competir para o alvo de B-Raf mutante, reduzindo assim, a atividade do B-Raf mutante num sistema biológico ou artificial. Assim, a invenção além disso, refere-se a compostos capazes de modular a atividade de fosforilação do B-Raf mutante.

[00181] Compostos que influenciam a atividade de B-Raf mutante podem ser de quase qualquer descrição genérica, incluindo compostos de baixo peso molecular, incluindo compostos orgânicos que podem ser lineares, cíclicos, policíclicos ou uma combinação destes, peptídeos polipeptídeos incluindo anticorpos, ou proteínas. Em geral, como aqui empregado, “peptídeos” “polipeptídeos” e “proteínas” são considerados equivalentes.

[00182] Muitos compostos de acordo com a presente invenção podem ser compostos condutores úteis para desenvolvimento da droga. Compostos condutores úteis são especialmente anti-corpos e peptídeos, e particularmente, anticorpos intracelulares expressados dentro da célula num contexto de terapia genética, que pode ser usado como modelo para o desenvolvimento do peptídeo ou terapêuticos de baixo peso molecular. Num aspecto preferido da invenção, compostos condutores e B-Raf mutante ou outros peptídeos alvo podem ser co-cristalizados de modo a facilitar o planejamento de compostos de baixo peso molecular adequados que imitam a interação observada com o composto condutor.

[00183] A cristalização envolve a preparação de um tampão de cristalização, por exemplo, misturação de uma solução do peptídeo ou complexo peptídico com um “tampão reservatório” de preferência numa relação 1:1 com uma concentração mais baixa do agente de precipitação necessário para formação do cristal. A formação do cristal, a concentração do agente de precipitação é aumentada, por exemplo, por adição do agente de precipitação, por exemplo, por titulação ou por permissão da concentração do agente de precipitação a equilibrar por difusão entre o tampão de cristalização e um tampão reservatório. Sob condições adequadas tal difusão do agente de precipitação ocorre ao longo do gradiente do agente de precipitação, por exemplo, do tampão reservatório com uma concentração maior de agente de precipitação para o tampão de cristalização com uma concentração menor do agente de precipitação. A difusão pode ser conseguida por exemplo, por técnicas de difusão a vapor que permitem a difusão na fase de gás comum. Técnicas conhecidas são, por exemplo, métodos de difusão a vapor, tais como método da “gota pendente” ou “gota assentada”. No método de difusão a vapor uma gota do tampão de cristalização contendo a proteína fica pendurada acima ou assentada junto de um tanque muito maior de tampão reservatório. Alternativamente, o equilíbrio do agente de precipitação pode ser conseguido através de uma membrana semipermeável que separa o tampão de cristalização do tampão reservatório e previne a diluição da proteína para o tampão reservatório.

[00184] No tampão de cristalização o peptídeo ou complexo de peptídeo/parceiro de ligação, de preferência tem uma concentração de até 30 mg/ml, de preferência, de cerca de 2 mg/ml a cerca de 4 mg/ml.

[00185] A formação dos cristais pode ser adquirida sob condições variadas que são essencialmente determinada pelos parâmetros a seguir: pH, presença dos sais e aditivos, agente de precipitação, concentração e temperatura da proteína. O pH pode variar desde cerca de 4,0 a 9,0. A concentração e tipo de tampão não é

importante, e portanto variável, por exemplo na dependência do desejado pH. Sistemas de tampão adequados incluem fosfato, acetato, citrato, Tris, MES e HEPES. Sais úteis e aditivos incluem, por exemplo, cloretos, sulfatos, e outros sais conhecidos os versados na técnica. O tampão contém um agente de precipitação selecionado dentre o grupo que consiste de um solvente orgânico miscível em água, de preferência polietilenoglicol com um peso molecular dentre 100 e 20000, de preferência entre 4000 e 10000, ou um sal adequado, tal como sulfatos, particularmente sulfato de amônio, um cloreto, um citrato ou um tartrato.

[00186] Um cristal de um peptídeo ou complexo peptídeo/ parceiro de ligação, de acordo com a invenção pode ser quimicamente modificado, por exemplo, por derivatização de átomo pesado. Em resumo, tal derivatização é passível de ser adquirida por encharcamento de um cristal numa solução contendo sais de átomo de metal pesado, ou um composto organometálico, por exemplo, cloreto de chumbo, tiomolato de ouro, timerosal ou acetato de uranil, que é capaz de difundir através do cristal e ligar-se à superfície da proteína. Os locais dos átomos de metal pesado ligados podem ser determinados por análise de difração de raios-X do cristal encharcado, cuja informação pode ser usada, por exemplo, para construir um modelo tridimensional do peptídeo.

[00187] Um modelo tridimensional pode ser obtido, por exemplo, de um derivado de átomo pesado de um cristal e/ou de toda ou parte dos dados estruturais providenciados pela cristalização. De preferência a construção de tal modelo envolve modelagem de homologia e/ou substituição molecular.

[00188] O modelo de homologia preliminar pode ser criado pela combinação do alinhamento de seqüência com qualquer RAF quinase cuja estrutura é conhecida, previsão de estrutura secundária e seleção de bibliotecas estruturais. Por exemplo, as seqüências do B-Raf mutante e um peptídeo candidato podem ser alinhados usando um programa de software adequado.

[00189] Software computacional pode também ser usado para previsão da estrutura secundária do peptídeo ou complexo peptídico. A seqüência peptídica pode ser incorporada à estrutura B-Raf mutante. Incoerências estruturais, por exemplo, fragmento estruturais em torno de inserções/ deleções, podem ser modeladas por seleção de uma biblioteca estrutura para peptídeo de desejado comprimento e com uma conformação adequada. Para previsão da conformação de cadeia lateral, pode ser empregada uma biblioteca de rotâmero de cadeia lateral.

[00190] O modelo de homologia final é usado para solucionar a estrutura de cristal do peptídeo por substituição molecular usando software de computador apropriado. O modelo de homologia é posicionado de acordo com os resultados da substituição molecular, e submetido a mais refinamento compreendendo cálculos dinâmicos moleculares, e modelagem do inibidor usado para cristali-zação na densidade do elétron.

Estudos de ativação de quinase

[00191] Mutantes quinase constitutivamente ativos são ferramentas de pesquisa valiosos no entendimento dos trajetos de sinalização e no desenvolvimento de agentes terapêuticos que modulam tais trajetos. A atividade de cinco dos mutantes de acordo com a invenção foi examinada. Estes são G463V, G468A, G955R, L596V e V599E. Para examinar a atividade dos mutantes, versões rotuladas smyc-epitopo de B-Raf são passageiramente expressados em células CÓS. A fim de examinar a atividade deste B-RAf exogenamente expressado, a proteína é imunoprecipitada usando o myc-tag e examinada num ensaio de cascata quinase, usando GST-MEK, GST-ERK bacterialmente produzido e proteína básica mielina (MBP) como substratos seqüenciais (Marais et al (1997); J. Biol. Chem 272:4378-83). B-RAf possui altos níveis de atividade quinase basal sendo significativamente mais ativo na ausência de ativadores do que, ou Raf-1 ou A-Raf (Marais et al (1997); J. Biol. Chem 272:4378-83). Além disso, enquanto Raf-1 e A-Raf requerem tanto

Ras oncogênico (Ras^{V12}) e Src ativado para estimular sua atividade completamente, B-Raf é completamente ativado por co-expressão com Ras^{V12} sozinho. O efeito que essas mutações têm em ambas as atividades basal de B-Raf e atividade estimulada por Ras^{V12} é por conseguinte testado. Comparado com B-Raf do tipo selvagem B-Raf^{G463V}, B-Raf^{G468A}, B-Raf^{L596V} e B-Raf^{V599E} todos possuem atividade quinase basal fortemente elevada (Figura 1A, 1B). Por comparação, G-Raf^{G595R} reduziu a atividade basal comparado com a proteína do tipo selvagem (Figura 1a). Resultados similares são observados *in vivo*. Todos os cinco mutantes são estimulados por Ras oncogênico (Ras^{V12}). Contudo, a ativação em dobro para cada um dos mutantes é reduzida comparado com B-Raf do tipo selvagem (Figura 1A, B) e é particularmente pequena no caso de B-Raf^{V599E}. Contudo, visto a atividade basal de cada um de B-Raf^{G463V}, B-Raf^{G468A}, B-Raf^{L596V} e B-Raf^{V599E} ser maior do que a proteína do tipo selvagem, os níveis absolutos de atividade vistos são maiores em cada caso a presença de Ras^{V12} do que para a proteína do tipo selvagem. Curiosamente, B-Raf^{G595R} também é estimulado por Ras^{V12}, porém a ativação foi muito fraca, provavelmente devido aos baixos níveis de partida.

[00192] A capacidade de cada um dos mutantes ativados em transformar células NIH3T3 também é examinada. Neste ensaio, células transformantes B-Raf do tipo selvagem tem eficiência muito baixa (~0,02% do número de colônias visto com Ras^{V12}). Contudo, como se vê na Figura 2, cada um dos mutantes ativados transformam células NIH3T3 40 a 85 vezes mais eficiente do que o faz B-raf tipo selvagem.

[00193] A extensão de dependência do desenvolvimento das células que contém os mutantes B-Raf no trajeto Ras/MEK é investigada. Para esses estudos, são usados dois ensaios. O primeiro se presta a verificar se seu crescimento é suprimido por microinjeção do anticorpo monoclonal Y13-259, um anticorpos que neutraliza a atividade do ras celular. Os resultados são mostrados na Tabela 2 Os

dados são dividido em três grupos. O primeiro grupo têm B-raf tipo selvagem e seu crescimento é inibido (40-100%) por Y13-259. O segundo grupo tem mutações de ativação em B-Raf e seu crescimento não foi inibido (<15%) por Y13-259. O terceiro grupo (apenas um caso) contém uma célula que possui, tanto um Ras de ativação e uma mutação B-RAF ativante. Curiosamente, o crescimento desta linha celular foi inibido por Y13-259, mas isto pode ser devido ao crescimento ser dependente de, tanto Ras como B-Raf.

[00194] A segunda abordagem é examinar os efeitos do composto U0126, um inibidor de MEK1/2, os únicos substratos conhecidos para B-Raf. Esses resultados demonstram que, o tratamento das células que têm mutações de ativação em B-RAF resulta na supressão da proliferação celular, quando a atividade MEK é inibida indicando que, a ativação da sinalização da célula por mutantes ativados de B-raf é um alvo terapêutico. Ver Tabela 3.

Considerados juntos, os dados acima demonstram que:

[00195] 1. Há duas classes de mutação B-RAF em tumores humanos, mutações de ativação e inativação.

[00196] 2. As versões ativadas de B-Raf são capazes de transformar células NIH3T3 e portanto, podem ser indicadas como oncogenes.

[00197] 3. Linhas celulares de tumor humano que expressam proteína B-Raf ativada não são sensíveis a Y13-259, um anticorpos neutralização de Ras, indicando que, seu crescimento não é dependente das proteínas RAs e, portanto, são improváveis de responder a compostos direcionados a proteínas Ras. Isto indica que, os mutantes de ativação podem superar o requisito para sinais de Ras em células tumorais.

[00198] 4. Contudo, sua atividade é suprimida pelo composto U0126, indicando que seu crescimento é dependente da atividade deste trajeto, e portanto provável de responder a agentes terapêuticos que visam atividade B-Raf.

[00199] 5. Visto que algumas das mutações estão no circuito ligação de fosfato do domínio quinase (G463, G465, G468) e esses aminoácidos são conservados em todas as quinases essas mutações representam um mecanismo global e conveniente para ativar quinases. Isto tem importantes implicações na seleção para genes terapêuticos.

[00200] A invenção, portanto, providencia uma quinase constitutivamente ativa compreendendo uma mutação no circuito de ligação fosfato da mesma, selecionado do grupo que consiste de mutações em uma ou mais posições correspondentes a posições 463, 465 e 468 de B-Raf.

[00201] De preferência, a mutação fica em uma ou mais posições 463 e 468.

[00202] Mais preferivelmente são G463V e G468A.

[00203] Muitas quinases são identificadas por estarem associadas com uma doença específica, mas seus mecanismos de ativação podem não ser sempre totalmente entendidos. Mutantes constitutivamente ativados das mesmas como aqui descrito propiciam um reagente que pode ser usado para selecionar inibidores sem ter primeiro que esclarecer seu mecanismo de ativação..

[00204] Quinases exemplares incluem outras quinases no trajeto de quinase MAP, tal como MEK e ERK e outros trajetos de quinase MAP, tal como p38, JNK e suas quinases a montante. Embora algo seja conhecido acerca de seus mecanismos de ativação, para algumas não se sabe como ativá-las por mutação direta. A presente invenção propicia mutantes ativados de tais finalidades de seleção de quinases. Além disso, quinases que estão a jusante das quinases MAP, tais como p90Rsk, mnk, etc podem também ser ativadas. Embora mecanismos de ativação alternativos sejam conhecidos, a mutação pode ser uma via preferida nos ensaios de seleção.

[00205] A invenção também abrange algumas quinases conhecidas que não têm mecanismo de ação conhecido, como Lkb1, que está envolvido na síndrome de

Putz-jegers e quinase PDK1 que pode ser constitutivamente ativo, mas que pode ainda ser ativável para seleção de droga. Esta quinase está envolvida na sinalização de insulina, portanto pode ser um alvo útil para diabetes. Também envolvida no diabetes tipo II está a quinase ativada por AMP, que novamente é ativada por fosforilação e portanto, é suscetível de ativação por mutação.

[00206] Conseqüentemente, a invenção propicia um método para seleção de um ou mais compostos para um efeito inibidor de uma quinase, compreendendo:

(a) preparar um quinase mutante compreendendo uma substituição, deleção ou inserção de aminoácido em uma ou mais das posições 463, 465 ou 468 como detalhado supra,

(b) expor a quinase mutante a um ou mais compostos na presença de um substrato quinase, e

(d) determinar a capacidade da quinase em fosforilar o substrato na presença de um ou mais compostos.

[00207] A atividade de fosforilação da quinase na presença dos compostos de teste é vantajosamente comparada com sua atividade na ausência dos compostos, uma redução na atividade basal da quinase mutante é indicativo de inibição da quinase pelos compostos. Para ensaios múltiplos um nível de referência de fosforilação pode ser determinado para um dado ensaio, e usado como uma base para comparação.

[00208] De preferência a quinase é uma proteína quinase Raf, vantajosamente ela é B-Raf.

[00209] De modo inverso, mutantes constitutivamente reprimidos tais como B-Raf G595R são úteis na seleção de ativadores de quinase.

Confirmação de BRAF como um alvo de droga

[00210] De modo a confirmar BRAF como um alvo no câncer, este foi primeiro testado se o crescimento de células que expressam formas mutantes

ativadas de BRAF necessitou o passo e sinalização RAF-MEK-ERK para crescimento. Para este fim, linhas de célula de melanoma e colo-retal que abrigam mutações no gene RAF são tratadas com agentes farmacológicos que bloqueiam a sinalização através deste passo. Dois compostos são testados. Um é o composto U0126, que é um inibidor de MEK e que portanto, desacopla a sinalização de RAF-ERK nas células (Sebolt-Leopold et al., 1999) BAY 43-9006 também foi testado. Este se trata de um inibidor e proteínas RAF (Lyon set al, 2001). A capacidade desses compostos em bloquear atividade de ERK foi testada em linha celular de melanoma WM266,4, que tem substituição de um ácido aspártico por valina na posição 599 do gene BRAF. Esta é uma mutação ativadora (Figura 3A). Essas células também tem atividade quinase basal elevada como julgado usando um anticorpo (ppERK) que apenas se liga à versão de ERK ativada duplamente fosforilada. quando o anticorpos ppERK é usado para manchamento Western de células WM266.4, um forte sinal é visto na região de 42-44 kDA, indicando que ERK tem elevada atividade quinase basal nessas células (Figura 3B) contudo, quando as células são tratadas com U0126 ou Bay 43-006, a atividade de ERK é fortemente suprimida (Figura 3B). Resultados similares foram obtidos usando célula A375, uma linha celular de melanoma que abriga uma mutação V599E no gene BRAF (Davies et al., 2002) Esses dados demonstram que, a sinalização de RAF e MEK é necessária para manutenção da atividade de ERK elevada nessas células.

[00211] Testou-se a seguir que efeito BAY 43-9002 tinha sobre o crescimento de células WM266.4 e descobriu-se que este composto bloqueou o crescimento dessas células com um IC50 de ~6,1µM (Tabela 4).

[00212] BAY 43-9006 também bloqueou o crescimento de células colo 829 e de células BE na faixa micromolar (Tabela 4). Células colo 829 são uma linha celular de melanoma que abriga uma mutação V599E no gene BRAF e células BE são uma linha colo-retal que abriga uma mutação G463 no gene BRAF (Davies et al., 2002)

Como se demonstrou, ambas essas mutações são ativas (Davies et al., 2002). Finalmente, testou-se os efeitos desses inibidores na síntese de DNA. A incubação de células WM-266.4 com 10 μ M U0126 ou 10 μ M BAY 43-9006 suprimiu fortemente a síntese de DNA nessas células (Figura 4). Esses dados demonstram que, a ativação de ERK e proliferação nas células que abrigam mutações de ativação no gene BRAF são dependentes de atividades RAF e MEK.

[00213] Existem três genes RAF em células de mamífero, CRAF (também denominado RAF-1), ARAF e BRAF. U0126 é um inibidor de MEK e, portanto não será capaz de distinguir a sinalização CRAF de BRAF ou ARAF. Similarmente, BAY 43-9006 pode inibir tanto CRAF e BRAF, portanto não distinguirá entre as diferentes isoformas RAF. Portanto, de modo a determinar que isoforma RAF sinalizou para ERK em WM266.4, as células foram tratadas com sondas RNA de pequena interferência (siRNA) que são seletivas para isoformas de RAF individuais. Células WM266.4 foram tratadas com sondas siRNA projetadas para especificidade BRAF, ou CRAF ou um controle competitivo que não reconheceria quaisquer isoformas. A eficiência do reconhecimento para CRAF foi determinada por manchamento Western. O tratamento das células WM 266.4 com uma sonda siRNA específica para CRAF resultou em forte supressão da expressão CRAF (Figura 5A). Resultados similares foram observados em células Colo 82 e células BE (Figura 5a). Quando células WM-266.4 foram tratadas com uma sonda siRNA específica para BRAF, a atividade BRAF nas células foi fortemente suprimida, porém nenhuma supressão se observou, quando as células foram tratadas com o controle competitivo (figura 5B). Resultados similares foram observados em células Colo 829 e BE (figura 5B).

[00214] Os dados acima mostram que siRNA pode ser usado para suprimir seletivamente a expressão das proteínas BRAF e CRAF. Examinou-se, portanto como a ablação de cada uma dessas proteína afetou a atividade ERK nessas células. Quando se usou siRNA para remover a expressão da proteína BRAF em

WM-266.4 a atividade eRK foi suprimida num modo dependente de tempo (Figura 6). Em contraste, a ablação da expressão CRAF ou tratamento com sondas siRNA competitivas não afetou a atividade ERK (Figura 6). Resultados similares foram obtidos em células Colo 829 (Figura 6). Esses resultados demonstram, que, BRAF é a principal isoforma que sinaliza para ERK em células de melanoma que expressa proteínas BRAF ativadas. CRAF não parece sinalizar para atividade ERK basal nessas células.

[00215] Finalmente, examinou-se como a ablação de BRAF afetou o crescimento celular, examinando os efeitos na apoptose em células WM-266.4. Para esses estudos, as células foram fixadas em etanol a 70%, manchadas com iodeto de proprídio e seus perfis de ciclo celular foram examinados por classificação de célula ativada por fluorescência (FACS). Usando esta análise, as células apoptóticas aparecem no pico sub-G1. Nessas células, a apoptose espontânea é muito baixa, com menos que 1% de

[00216] Confirmação de reagente da célula aparecendo no pico sub-G1 (Figura 7, tabela 5). Quando as células são tratadas com U0126, a proporção de células no pico sub-G1 é significativamente aumentada (~3,5%, figura 7, Tabela 5). Similarmente, a ablação da expressão BRAF mediante uso de siRNA também aumenta o número de células no pico sub-G1, enquanto a ablação de CRAF ou tratamento com o controle competitivo não aumenta. Também examinou-se a clivagem de PARP, um marcador de indução de apoptose. O tratamento das células com siRNA de BRAF induziu a clivagem de PARP, enquanto o controle competitivo não. Esses dados demonstram que, quando a proteína BRAF mutante é removida em células de melanoma induz-se a apoptose.

[00217] Em resumo, esses resultados demonstram que, em linhas de célula de melanoma que expressam mutantes ativados de BRAF, a sinalização através de RAF e MEK é necessária para ativação de ERK e para o crescimento celular. BRAF,

ao invés de CRAF parece ser a isoforma RAF principal que estimula a atividade de eRK, e parece protege as células de apoptose. Esses dados sugerem, que BRAF é um importante alvo terapêutico em células que confiam na sinalização de BRAF para crescimento e proteção da apoptose.

Desenvolvimento e Ensaio de Seleção de Alta Produtividade

[00218] Um ensaio HTS foi revelado para o mutante V599E de B-raf. De modo a avaliar os resultados, lisado expressando RAf e reagentes GST-MKKL foram verificados quanto a atividade por realização de um ensaio acoplado padrão empregando GST-ERK2 (quinase competente) e medição da incorporação de P³³- γ -fosfato em proteína básica de mielina (MBP). Como se vê na figura 8, na presença do lisado B-RAf um aumento de 16 vezes no sinal foi observado comparado com o lisado de controle (sem expressão).

Confirmação da Plataforma de Ensaio

Opção 1: Ensaio Quinase Acoplado em FlashPlate de Glutaciona

[00219] Princípio da Plataforma: Substrato rotulado GST (ERK -2) é capturado em paredes embutidas com cintilação de uma ("flashplate") via revestimento de glutaciona. a incorporação de P³³- γ -fosfato ao substrato resultou num sinal de cintilação mensurável.

[00220] A possibilidade de medição da incorporação de P³³- γ -fosfato em ERK2 (GST-kdERK2) morto por GST-quinase) como uma produção da atividade B-Raf foi avaliada num ensaio de flashplate de glutaciona. A figura 9 demonstra que, usando as condições transferidas do exercício de confirmação de reagente, fomos incapazes de detectar a incorporação dependente de B-Raf de P³³ ao GST-kdERK2 usando esta plataforma. Um ensaio de placa de filtro p81 também provou o insucesso. Como conseqüência das características de amplificação deste ensaio e cascata, mantendo um sinal de ensaio na ausência da etapa de ensaio fina (ou seja, fosforilação de MBP ERK2) iria muito provavelmente requerer níveis aumentados de

cada um dos constituintes restantes. Pesou-se, portanto ser apropriado avaliar a plataforma com base no anticorpos antes de apoiar-se no exercício oneroso de titulações de reagente de B-Raf, MKKI e ERK2 nesta plataforma radiométrica.

Opção 2: Ensaio Quinase Acoplada e formato DELFIA

[00221] Ensaio DELFIA (Imunoensaio fluorescente de Lanta-nídeo Intensificado por Dissociação) envolve a medição de fosforilação ERK2 via ligação de um anticorpos fosfo-específico. O ensaio quinase acoplado B-Raf/GST-MKKI/GST-kdERK2 gera GST-kdERK2 fosforilado. Uma placa anti-GST revestida é usada para capturar o GST-kdERK2. Um anticorpo primário é adicionado, o qual detecta especificamente ERK2 fosforilado em Treonina e Tirosina. Um anticorpos secundário rotulado com európio (Eu) é a seguir adicionado. Na presença de Solução de intensificação, o rótulo-Eu dissocia-se do anticorpos absorvendo a 335 nm e permitindo a detecção fluorimétrica a um comprimento de onda de emissão de 620 nm.

[00222] O ensaio B-Raf foi avaliado nesta plataforma empregando uma combinação de ensaio quinase do exercício de confirmação de reagente e condições de ensaio DELFIA. A figura 10 mostra que na presença do lisado B-Raf um aumento em 12,2 vezes no sinal foi observado, comparado com o lisado de controle (sem expressão). O sinal observado foi inteiramente dependendo da presença de todos os três componentes enzima/substrato.

[00223] Com base nos experimentos preliminares a plataforma DELFIA foi selecionada para desenvolvimento.

Desenvolvimento do Ensaio Quinase

Lisado B-raf

[00224] Três lotes de lisado B-RAF foram usados por todo o procedimento. O lote A foi empregado para estabelecer a plataforma do ensaio DELFIA. O lote B foi usado durante o desenvolvimento do ensaio. Para lotes B e C uma relação linear

aproximada entre a quantidade do lisado e nível do sinal obtido ficou evidente entre 0,025 a 0,1 µl /reservatório. As quantidades finais selecionadas para cada lote foram baseadas na obtenção de uma abertura suficiente do sinal na faixa linear. Como resultado dessas avaliações, o Lote A foi usado a 1 µl/reservatório (96 reservatórios) e Lotes B e C (Exame) foram usados a 0,1 µl/reservatório (96 reservatórios) e 0,05 µl/reservatórios [384 reservatórios].

Otimização dos Níveis de Anticorpo

[00225] Considerações iniciais a respeito da possível competição de ERK2 e MKKI (ambos GST-rotulados) para sítios de ligação de glutathione resultaram em ensaios de desenvolvimento primário realizados usando um “protocolo pré-ligação”.

Essas condições foram a seguir:

- Pré-ligação de 100 ng/reservatório de GST-kdERK2 a placas revestidas com Glutathione de 96 reservatórios.
- Adição de lisado B-RAF (Lote A), MKKI (6,5 µg/ml) e ATP 500 µM num volume final de 50 µl DKB (ver Apêndice I) e incubação a 30°C por 1 hora.

[00226] Este protocolo foi empregado para otimizar e economizar a carga do anticorpo do sistema de detecção. Titulações de ambos os anticorpos primário e secundário foram realizadas para avaliar a possibilidade de reduzir níveis do anticorpo enquanto mantendo um sinal para relação de segundo plano de $\geq 10:1$. Figuras 4 e 5 indicam que 1:3000 e 1:1000 foram as menores concentrações aceitáveis para fosfoERK2 e anticorpos rotulados com Eu respectivamente. Todos os ensaios subsequentes foram portanto, realizados usando essas concentrações de anticorpos.

Otimização de Níveis MKKL e ERK2

[00227] A capacidade de realizar o componente enzimático desta ensaio “em solução” sem uma etapa de pré-ligação, foi investigada para permitir a titulação de concentrações definidas de ambos MKKL e ERK2. Além disso, a redução deste

ensaio numa misturação de única etapa (homogênea) dos reagentes envolvida na quinase o tornaria mais acessível a HTS. A figura 13 ilustra que o ensaio homogêneo e o protocolo de pré-ligação deram dados equivalentes. Todos os ensaio subseqüentes foram realizados usando o protocolo “homogêneo”.

[00228] A titulação de ERK-2, embora mantendo níveis de MKKL indicou que, o sinal máximo foi obtido a uma relação de ~12:1 (ERK2:MKKL). Num tentativa em economizar reagentes uma titulação matriz desses componentes foi realizada. Usando 0,1 µl de B-Raf (lote B), a combinação de 6,5 µg/ml GST-MKKL e 80 µg/ml de GST-kdERK2 deu o sinal máximo e embora alguma redução na carga Raf/MKKL fosse possível, considerou-se apropriado manter a relação original. Esta decisão foi tomada com o conhecimento que outras alterações no parâmetro de ensaio (por exemplo, transferir para 384, redução na carga ATP, transferir para automação) pode reduzir mais ainda a janela do sinal. Todos os ensaios subseqüentes foram portanto, realizados usando 6,5 µg/ml GST-MKKL e 80 µg/ml de GST-kdERK2.

Efeito da Temperatura

[00229] A capacidade de realizar este ensaio a temperatura ambiente simplificaria de modo significativo o eventual processo HTS. O sinal de ensaio a temperatura ambiente e 30°C foi, portanto, investigado. Com base nos resultados obtidos, relação sinal-para-segundo plano foi aceitável a temperatura ambiente e todos os ensaios subseqüentes foram realizados a temperatura ambiente.

Avaliação do Ensaio em Formato de Placa de 384 reservatórios

[00230] Numa tentativa de intensificar a produtividade e minimizar uso de reagentes durante a seleção, foi avaliado o desempenho do ensaio em formato de 384 reservatórios. Neste formato, o ensaio foi bem realizado e, ambos os ensaios padrão (final de 50 µl) e volume de reagente reduzido (25 µl) devolveram um sinal altamente aceitável para relações de fundo. Todos os experimentos de

desenvolvimento subsequente foram realizados em formato de 384 usando volumes de reação de 25 μ l.

Otimização de Concentração ATP

[00231] A concentração ATP de um ensaio de seleção quinase tem o potencial de influenciar o número e a natureza dos compostos inibidores identificados. A definição dos níveis ATP de um tal ensaio é um equilíbrio das seguintes considerações:

- emprego de níveis ATP que permitam uma janela mensurável, consistente de sinal de ensaio
- emprego de níveis ATP baixos o bastante para permitir a identificação de inibidores competitivos para ATP
- emprego de níveis ATP suficientemente altos, tais que agentes competitivos para ATP prováveis de serem ineficazes no contexto de ATP celular, sejam menos prováveis de detecção.

[00232] Ensaios de seleção quinase são normalmente realizados a uma concentração de ATP relativa a K_m . A derivação de valores K_m para B-Raf e MKKL necessita o desenvolvimento de ensaios individuais para cada enzima, ao invés do ensaio acoplado aí desenvolvido. O desenvolvimento de tais ensaios facilitaram, sem dúvida, um futuro entendimento do modo de ação de quaisquer compostos inibidores identificados no ensaio de seleção.

[00233] Para fins de definição da carga ATP do ensaio de seleção, a dependência da concentração do ensaio acoplado foi determinada. O sinal gerado é máximo e metade Máximo a $\sim 200 \mu$ M e $\sim 18 \mu$ M ATP, respectivamente. Mais estudos indicaram que, 50μ M era a mais baixa concentração de ATP à qual, um sinal de ensaio dia-a-dia robusto fosse observado (por exemplo, sinal: 8000, 2% CV). Níveis ATP abaixo disto (10μ M) resultaram numa variação relativa maior no sinal de ensaio (ou seja, sinal: 2500, 10% CV). A concentração final de ATP do

ensaio de seleção foi definida como 50 μM para dar uma janela de sinal grande o bastante, para suportar qualquer atrito durante a transferência do ensaio para automação.

Curso de Tempo do Ensaio de Seleção

[00234] É crítico que, um ensaio de seleção seja realizado dentro de seu período de linearidade. Para determinar a extensão da fase linear do ensaio acoplado, um decurso de tempo foi realizado em até 75 minutos. A reação foi linear entre 4 e 45 minutos. O período de “atraso” observado é característico deste ensaio e reflete o tempo necessário para acumular níveis detectáveis do produto de reação. Com base neste estudo, um período de incubação de 45 minutos a temperatura ambiente foi indicado.

Condições finalizadas para Ensaio B-RafV599E DELFIA

O resumo das condições de seleção final para o ensaio foram a seguir:

Reação enzimática:

- placa de 384 reservatórios revestida com glutaciona
- lisado B-Raf 0,05 μl
- GST-MKKL 6,5 $\mu\text{g/ml}$
- GST-kdERK2 80 $\mu\text{g/ml}$
- ATP 50 μM
- incubação a temperatura ambiente por 45 minutos
- Volume final de 25 μl

Condições de detecção:

- anticorpos anti-fosfoERK2 1:3000
- anticorpos anti-camundongo rotulado co Eu 1:100

Desenvolvimento da Automação e controle de Qualidade

Confirmação dos Reagentes do Lote de Seleção

[00235] Usando as condições descritas acima, os ensaios foram realizados para comparar os lotes de desenvolvimento de seleção e ensaio de B-Raf, MKKI e ERK-2. Em todos os casos, o lote de seleção de reagentes realizou de modo equivalente quando comparado com os usados para desenvolvimento do ensaio.

Mini-testes de Ensaio B-RafV599E DELFIA Automatizados

[00236] Na preparação para seleção, uma estratégia de manuseio de líquido automatizada foi planejada para o ensaio. De modo a testar este sistema, 'mini-testes' do ensaio B-Raf automatizado foram realizados usando placas de seleção falsas (ou seja, nenhum composto, mas contendo colunas de controle padrão). Os dados derivados desses experimentos representam, tanto uma medição do vigor do ensaio biológico, como também da precisão e consistência dos processos de automação envolvidos.

[00237] Em resumo, cada placa continha reações B-Raf quinase em todos os reservatórios das Colunas 1-22 e colunas 23-24 contidas nas reações de controle. De modo a definir a qualidade dos dados gerados pelo ensaio automatizado, 4 mini-testes de placa usando este formato foram realizados em dois dias deferentes. Dentro de cada 'mini-teste uma placa foi usada para definir valores IC50 para alguns inibidores previstos deste ensaio. Os inibidor cobriram uma faixa de modos de ação: Staurosporina (inibidor de quinase ATP-competitivo), SB203580 (inibidor de Raf ATP competitivo) e U0126 (inibidor de MKKL não competitivo para ATP).

[00238] O ensaio demonstra boa consistência, mas dentro das placas e entre dias. Os dados obtidos demonstram que, o ensaio automatizado consegue os critérios definidos para um ensaio HTS *in vitro* de formato 384:

- Sinal para segundo plano de pelo menos 10:1

- Z'de >0,4
- Fileira e coluna CVs de <15%

[00239] Os inibidores empregado ainda tornam válido o ensaio gerando inibição dependente da concentração da atividade Raf/MKKI. de importância particular, é o fato de que os inibidores padrão retornaram os valores IC50 dentro de uma faixa dupla em dias separados. Esses dados também indicam que, esses compostos seriam identificados como sucessos quando testados a ~30 μm (10 $\mu\text{g/ml}$) nesta ensaio de seleção.

Protocolo Final para B-Raf V599E DELFIA automatizado

Coquetel enzimático (volume final 12 l:

0,05 μl de lisado RAf

0,0325 μ de GST-MKKI

0,065 μl de GST-kdERK2

1. 3 μl do composto de teste de pré-colocação em placa em 384 placas revestidas com glutatona.
2. 12 μl de coquetel enzimático adicionado por PlateMatePlu.
3. 10 μl de ATP adicionado pr Asys.
4. Placa agitada a temperatura ambiente por 45 minutos.
5. Placa lavada com 3 x 80 μl de tampão de lavagem DELFIA (DWB) usando lavadora de placa ELX405.
6. 25 μl de anti-fosfoERK2 adicionado por Multidrop.
7. Placa agitada a temperatura ambiente por 1 hora.
8. Placa lavada com DWB 3 x 80 μl .
9. 25 μl de anticorpos anti-camundongo rotulado com Eu adicionado por Multidrop.
10. Placa agitada pr 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Placa lavada com DWB a 3 x 80 μl .

12. Solução de incremento DELFIA a 25 µl adicionada por Multidrop.
13. Placa incubada a temperatura ambiente no escuro por 30 minutos.
14. Placa lida em FUSION.

TABELA 2

<u>nome da célula</u>	<u>tecido</u>	<u>mutação Ras</u>	<u>mutação B-Raf</u>	<u>Y13-259 S-phase</u>	<u>Inibição</u>
SW620	colo-retal	Onc	peso	inibido	92%
SK-Mel2	melanoma		peso	inibido	70%
HMV11-Riken	melanoma		peso	inibido	100%
DLD1	colo-retal	K13Asp/peso	peso	inibido	40%
SW480	colo-retal	K12	peso	inibido	57%
LS174T	colo-retal	K12Asp/peso	peso	inibido	84%
JW2	colo-retal	K12	peso	inibido	79%
CaCO2	colo-retal	peso	peso	inibido	60%
HCT-116	colo-retal	K13Asp	peso	inibido	95%
colo741	colo-retal		V599E	não	0%
SK-MEL-28	melanoma	b	V599E	não	4%
WM-266-4/WM-115	melanoma	b	V599D	não	10%
A2058	melanoma		V599E	não	0%
Malme	melanoma		V599E	não	0%
LS411N	colo-retal		V599E	não	0%, 0%
HT29	colo-retal	peso	V599E	não	15%
colo205	colo-retal	peso	V599E	não	?3%
Mawi	colo-retal	peso	V599E	não	5%
NCI-H2087	NSCLC par de linha celular	onc	L596V	inibido	77%

Esta tabela demonstra a inibição do crescimento de várias linhas de célula com mutações B-Raf. A proporção de inibição (como uma porcentagem do numero de células que não incorporam BrdU) está mostrada na última coluna

TABELA 3

<u>Nome da célula</u>	<u>tecido</u>	<u>mutação Ras</u>	<u>mutação B-Raf</u>	<u>UO inibição S</u>	<u>Inibição UO/ERK</u>
SW620	colo-retal	onc	peso	92%	
CHL	melanoma		peso	51%	>90%
colo741	colo-retal		V599E	76%	90%
SK-MEL-28	melanoma	b	V599Epeso	98%	>90%
WM-266-4/WM-115	melanoma	b	V599D	>99%	>90%
A2058	melanoma		V599E	68%	80%
NCI-H2087	NSCLC par de linha celular	onc	L596V	56%	>90%
Mawi	colo-retal	peso	V599E	80%	>90%

Esta tabela demonstra a inibição do crescimento celular em células tratadas com o inibidor MEK U0126

TABELA 4

Inibição do crescimento celular por BAY 43-9006.

Linha celular	IC ₅₀ (μM)
WM266,4	6,1
Colo 829	5,1
BE	5,4

Linhas celulares foram incubadas na presença de níveis aumentados de BAY 43-9006 e os níveis do crescimento celular foram determinadas por manchamento com sulforodamina B. Os valores IC₅₀ foram determinados por análise de regressão não-linear e estão indicados.

TABELA 5

Análise do ciclo celular

linha celular	Proporção de eventos (%)					
	não tratado	U0126	DMSO	BRAF siRNA	CRAF siRNA	siRNA competitivo
Sub-G1	0,8	3,5	0,1	2,9	0,6	0,3
G1	87,8	87,5	87,8	86,6	86,3	90,1
S	4,8	1,3	4,5	3,6	7,8	3,6
G2/M	6,7	7,8	7,5	7	5,4	6,1

Células WM-266,4 foram tratadas com U0126, DMSO, siRNA para BRAF, siRNA para CRAF ou o controle siRNA competitivo. As células foram incubadas por 96 horas e as células foram fixadas e manchadas com iodeto de proprídio para análise do ciclo celular por FACS. A proporção de células em cada fase do ciclo celular está demonstrada.

Aspectos computacionais de detecção

[00240] A detecção dos polipeptídeo B-Raf mutantes e/ou ácidos nucléicos B-*raf* mutantes pode ser automatizada para dar uma seleção compacta paralela e rápida das populações de amostra. Métodos computadorizados para detecção da mutação são conhecidos na técnica, e irão geralmente envolver a combinação de um dispositivo de seqüenciamento, ou outro dispositivo capaz de detectar variação na seqüência em polipeptídeos ou ácidos nucléicos, uma unidade de processamento de dados e um dispositivo de saída capaz de apresentar o resultado numa forma interpretável por um técnico ou físico.

[00241] Num aspecto preferido, portanto, a invenção providencia um método automatizado para detectar uma mutação em uma posição da seqüência alvo num ácido nucléico derivado de um tumor humano primário de ocorrência natural codificando um polipeptídeo B-Raf compreendendo:

seqüenciamento de uma amostra de um produto de amplificação do ácido nucléico de tumor humano primário de ocorrência natural para dar um conjunto de dados da amostra especificando uma série de dados de identificação de pares de base medidos num domínio alvo que se estende de uma posição a seqüência inicial para uma posição da seqüência final,

determinar a presença ou ausência da mutação na amostra com a condição de os dados de identificação de pares de base medidos para a posição da seqüência alvo correspondem com os dados de pares de base de referência para a posição da seqüência alvo, e

gerar uma saída indicando a presença ou ausência da mutação na amostra conforme indicado pela etapa determinante.

[00242] Métodos para seqüenciamento e detecção de mutações em seqüência são dados acima e geralmente são conhecidos da técnica. A invenção faz

uso de tais métodos na provisão de um aparelho para realizar o processo da invenção, aparelho que compreende:

um dispositivo de leitura de seqüência operável para determinar a seqüência de uma amostra de um ácido nucléico para dar um conjunto de dados da amostra especificando dados de identificação de pares de base medidos num domínio alvo que se estende de uma posição na seqüência inicial a uma posição na seqüência final e

uma unidade de análise de dados para receber o conjunto de dados da amostra do dispositivo de seqüência-mento e operável para determinar quanto a presença ou ausência da mutação na amostra com a condição de que os dados de identificação do par de base medido para a posição da seqüência alvo, correspondem com os dados de pares de base de referencia para a posição da seqüência alvo.

[00243] Dispositivos de leitura da seqüência adequados incluem seqüenciadores automatizados, RFLP-analisadores e aparelhos de análise de desvio da mobilidade. Vantajosamente a seqüência de um produto de amplificação do ácido nucléico alvo é analisado, e o aparelho, além disso, inclui um dispositivo de amplificação como uma máquina de PCR (reação em cadeia da polimerase)

[00244] De preferência, o aparelho também compreende um dispositivo de saída operável para gerar uma saída indicando a presença ou ausência da mutação na amostra determinado pela unidade de análise de dados. Por exemplo, o dispositivo de saída pode compreender pelo menos um dentre: uma interface do usuário gráfica, uma interface do usuário audível, uma impressora, um meio de armazenagem para leitura por computador, e um meio e veículo de interpretação por computador.

[00245] A invenção pode, além disso ser configurada para detectar a própria proteína B-Raf. Assim, num aspecto ulterior, a invenção refere-se a um método

automatizado para detectar uma única mutação de aminoácidos num polipeptídeo B-Raf de um tumor humano primário de ocorrência natural, compreendendo:

aplicar um marcador a um ou mais aminoácidos alvo numa amostra o polipeptídeo B-Raf,

ler a amostra após aplicação do marcador para determinar quanto à presença ou ausência do marcador na amostra, para assim indicar a presença ou ausência da mutação de aminoácidos simples na amostra, e

gerar uma saída indicando a presença ou ausência da mutação de aminoácido única na amostra conforme determinado pela etapa de leitura.

[00246] O marcador, de preferência, compreende um ligante que se liga diferencialmente a um polipeptídeo B-Raf do tipo selvagem sem mutação de aminoácidos simples e a um polipeptídeo B-Raf mutante com a mutação. Ligação preferencial para quaisquer formas de B-Raf é possível no contexto da invenção.

[00247] A invenção além disso, providencia um aparelho para detectar uma mutação de aminoácidos num polipeptídeo B-Raf compreendendo:

um dispositivo marcador de proteína carregado com um marcador e operável para aplicar um marcador a um ou mais aminoácidos alvo numa amostra do polipeptídeo B-Raf, e

um dispositivo de leitura do marcador operável para determinar a presença ou ausência do marcador na amostra, indicando assim, a presença ou ausência da mutação de aminoácidos única na amostra.

[00248] O marcador usado pode ser um anticorpo, e o dispositivo marcador de proteína pode ser configurado para implemento num processo ELISA.

[00249] Vantajosamente, o dispositivo marcador de proteína compreende um microdispositivo que é de preferência configurado para ler a amostra opticamente.

[00250] De preferência, o aparelho compreende um dispositivo de saída operável para gerar uma saída indicando a presença ou ausência da mutação de

aminoácidos simples na amostra conforme determinado pelo dispositivo de leitura do marcador. Dispositivos de saída adequados compreendem pelo menos um dentre: uma interface do usuário gráfica, uma interface do usuário audível, uma impressora, um meio de armazenagem para leitura por computador, e um meio de veículo de interpretação por computador.

Utilizações da Invenção

[00251] A presente invenção provê novos mutantes de polipeptídeos B-Raf os quais são úteis na detecção de condições neoplásticas, e a determinação de prognósticos par indivíduos sofrendo de tais condições. Em geral, a presença de uma mutação em B-Raf como aqui descrito está associada com a presença de neoplasia.

[00252] Em um aspecto, a presente invenção providencia um método para identificar células cancerosas ou tecido (tal como melanoma maligno, câncer colo-retal, câncer de mama ou NSCVLC) ou de células ou tecido identificáveis que estão predispostos a desenvolver um fenótipo neoplástico, compreendendo: amplificação de pelo menos parte de um gene *B-raf* de células ou de tecido, análise do produto de amplificação para detectar uma mutação no gene *B-raf* conforme aqui descrito, onde uma célula ou tecido com uma ou mais mutações *B-raf* é categorizada como cancerosa ou estando em um risco crescente de desenvolver uma condição cancerosa. Meios de amplificação adequados incluem PCR e clonagem.

[00253] Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método para determinar um prognóstico num indivíduo sofrendo de câncer (tal como melanoma maligno, câncer colo-retal, câncer de mama ou NSCLC). O método compreende: amplificação da região do gene *B-raf* como descrito acima, análise dos produtos de amplificação para evidência da mutação como descrito acima, e classificação de um indivíduo sem mutações no gene *B-raf* como estando menos provável de sofrer uma recaída da doença após terapia e/ou cirurgia ou com uma

chance aumentada de sobrevivência do que um paciente com uma ou mais mutações na região.

[00254] As técnicas da invenção também podem ser empregadas para determinar o curso da terapia à qual um indivíduo deve ser exposto, com base no prognóstico como estabelecido acima, um indivíduo com um fraco prognóstico, é vantajosamente manipulado usando uma terapia mais agressiva do que um indivíduo com um bom prognóstico.

[00255] As técnicas de acordo com a invenção podem ser automatizadas como necessário, para exame rápido das amostras na identificação de condições potencialmente cancerosas. Geralmente, um processo automatizado irá compreender amplificação automatizada de ácido nucléico de amostras de tecido ou célula, detecção de mutações em ácido nucléico amplificado, tal como detecção fluorescente, e/ou revelando a presença de mutações. Modalidades automatizadas exemplares são descritas acima.

[00256] A identificação do mutante B-Raf de acordo com a invenção pode assim, ser usada para fins diagnósticos para detectar diagnosticar ou monitorar doenças, distúrbios, e/ou condições associadas com a expressão do mutante B-Raf. Em particular, a invenção refere-se a detecção, diagnose e/ou monitoração de cânceres associados com mutante B-Raf como aqui descrito.

[00257] A invenção providencia um ensaio de diagnóstico para diagnosticar câncer, compreendendo (a) ensaio da expressão de mutante B-Raf em células ou fluido corporal de um indivíduo usando um ou mais anticorpos específicos para o mutante B-Raf como aqui indicado. A presença do transcrito *B-raf* mutante no tecido de biópsia de um indivíduo pode indicar a predisposição para o desenvolvimento da doença, ou pode dar um meio para detectar a doença antes da aparição dos reais sintomas clínicos. Uma diagnose mais definitiva deste tipo permite aos profissionais

da saúde empregar medidas preventivas ou tratamento agressivo logo no início, prevenindo assim, o desenvolvimento do progresso do câncer.

[00258] Anticorpos da invenção podem ser usados para ensaio dos níveis de proteína numa amostra biológica usando métodos imuno-histológicos clássicos conhecidos dos versados na técnica (por exemplo, ver Jalkanen, *et al.*, (1985) J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen *et al.*, (1987) J. Cell Biol. 105:3087-3096). Outros métodos com base em anticorpos, úteis para detectar a expressão do gene de proteína incluem imunoenaios tais como ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e o rádioimunoensaio (RIA). Rótulos de ensaio de anticorpo adequados são conhecidos na técnica e incluem rótulos enzimáticos, como glicose oxidase, radioisótopos, tais como iodo (I^{125} , I^{121}), carbono (C^{14}), enxofre (S^{35}), trítio (H^3), índio (In^{112}) e tecnécio (TC^{99}); rótulos luminescentes, como luminol e rótulos fluorescentes como fluoresceína e rodamina e biotina.

[00259] Além disso, mutações em *B-raf* podem ser detectadas por análise de ácidos nucleicos como aqui indicado. Por exemplo, a presença de mutações pode ser detectada por seqüenciamento ou por análise SCCP.

[00260] A presente invenção além disso providencia kits que podem ser usados nos métodos supra. Em uma modalidade um kit compreende um anticorpos da invenção, de preferência um anticorpos purificado, em um ou mais recipientes. Numa modalidade específica, os kits da presente invenção contém um polipeptídeo substancialmente isolado, compreendendo um epitopo o qual é especificamente imunoreativo com um anticorpo incluído no kit. De preferência, os kits da presente invenção compreendem ainda um anticorpo de controle que não reage com o polipeptídeo de interesse. Em uma outra modalidade específica, os kits da presente invenção contém um meio para detectar a ligação de um anticorpos a um polipeptídeo de interesse (por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado a um substrato detectável como um composto fluorescente, um substrato enzimático, um

composto radioativo ou um composto luminescente, ou um segundo anticorpo, que reconhece o primeiro anticorpo pode ser conjugado a um substrato detectável).

[00261] Em uma outra modalidade específica da presente invenção, o lit é um kit de diagnóstico para uso em soro de pesquisa contendo anticorpos específicos para polipeptídeos B-Raf mutantes como aqui descrito. Um tal kit pode incluir um anticorpo de controle que não reage com o polipeptídeo B-RAF mutante. Um tal kit pode incluir um antígeno polipeptídico substancialmente isolado compreendendo um epítipo que é especificamente imunoreativo com pelo menos um anticorpo anti-B-Raf. Além disso, um tal kit inclui meios para detectar a ligação do anticorpo ao antígeno por exemplo, o anticorpos pode ser conjugado a um composto fluorescente tal como fluoresceína ou rodamina que pode ser detectado por citometria de fluxo). Em modalidades específicas, o kit pode incluir um antígeno polipeptídico recombinantemente produzido ou quimicamente sintetizado. O antígeno polipeptídico do kit também pode ser ligado a um suporte sólido.

[00262] Numa modalidade adicional, a invenção inclui um kit de diagnóstico para uso na pesquisa de soro contendo antígenos do polipeptídeo B-RAF mutante da invenção. O kit diagnóstico inclui um anticorpo substancialmente isolado imunoreativo com polipeptídeo ou antígenos de polinucleotídeo e meios para detectar a ligação do antígeno de polinucleotídeo ou polipeptídeo ao anticorpo. Em uma modalidade, o anticorpo é ligado a um suporte sólido. Numa modalidade específica, o anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal. O meio de detecção do kit pode incluir um segundo anticorpo monoclonal rotulado. Alternativamente, ou além disso, os meios de detecção podem incluir um antígeno de competição rotulado.

[00263] Todas as publicações mencionadas no relatório supra estão ora incorporadas por referência. Várias modificações e variações dos métodos descritos e sistema da invenção tornar-se-ão evidentes aos versados na técnica sem se afastar do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em

conexão com modalidades preferidas específicas, deve ficar entendido que a invenção conforme reivindicada, não deve ficar indevidamente limitada a tais modalidades específica. De fato, várias modificações dos modos descritos para realização da invenção evidentes aos versados na biologia molecular ou campos relacionados, destinam-se a estar incluídos no escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção de mutações oncogênicas humanas, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer uma amostra de material celular de ocorrência natural obtida de um indivíduo humano;

(b) examinar o material de ácido nucleico de pelo menos parte de um ou mais genes *B-raf* no dito material celular; e

(c) determinar se tal material de ácido nucleico compreende uma ou mais mutações de ponto em uma sequência codificando um polipeptídeo B-Raf,

em que a dita mutação de ponto ocorre em uma ou mais das posições 13881394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 e 1786 de *B-raf* tendo a sequência na SEQ ID NO: 2.

2. Método para a detecção de mutações oncogênicas humanas, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer uma primeira amostra de material celular obtido a partir de um tecido de ocorrência natural de um indivíduo que se suspeita ser canceroso, e uma segunda amostra de material celular de um tecido não-canceroso do mesmo indivíduo;

(b) examinar o material de ácido nucleico de pelo menos parte de um ou mais genes *B-raf* em ambas as ditas amostras de material celular; e

(c) determinar se tal material de ácido nucleico compreende uma ou mais mutações de ponto em uma sequência codificando um polipeptídeo B-RAF; e a dita mutação estando presente no material celular de ocorrência natural do tecido suspeito de ser canceroso, mas não presente no material celular do tecido não canceroso, em que a dita mutação de ponto ocorre em uma ou mais das posições 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 e 1786 de *B-raf* tendo a sequência na SEQ ID NO: 2.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita mutação de ponto é G1388T, G1783C, TG1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, T1787G ou C1786G em *B-raf* que tem a sequência na SEQ ID NO: 2.

4. Método para a detecção de mutações oncogênicas humanas, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

- (a) obter uma amostra de material celular de um indivíduo;
- (b) examinar (*screening*) a dita amostra com um ligante que se liga seletivamente a um epítipo mutante do polipeptídeo B-Raf, em que o polipeptídeo B-Raf mutante tem uma mutação de aminoácido em uma ou mais das posições 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 e 599 em B-Raf tendo a sequência na SEQ ID NO: 1; e
- (c) detectar um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes que tem uma mutação de aminoácido em uma ou mais das posições 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 e 599 em B-Raf tendo a sequência na SEQ ID NO: 1, na dita amostra.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo B-Raf mutante tem uma mutação de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em V599E, V599D, G595R, G465V, G465E, G465A, G468A, G468E, E585K, F594L, G595R, L596V, L596R e G463E.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante é uma imunoglobulina.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

8. Método automatizado para detectar uma mutação humana em uma posição da sequência alvo em um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo B-Raf, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

sequenciar uma amostra de um produto de amplificação do ácido nucleico, para fornecer um conjunto de dados da amostra especificando uma série de dados de identificação de pares de base medidos em um domínio alvo que se estende de uma posição da sequência inicial para uma posição da sequência final;

determinar a presença ou ausência da mutação na amostra com a condição de se os dados de identificação de pares de base medidos para a posição da sequência alvo corresponderem aos dados de pares de base de referência para a posição da sequência alvo; e

gerar uma saída (*output*) indicando a presença ou ausência da mutação na amostra como estabelecido pela etapa de determinar;

em que o ácido nucleico compreende uma ou mais mutações de ponto; e em que a dita mutação de ponto ocorre em uma ou mais das posições 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 e 1786 de B-raf tendo a sequência na SEQ ID NO: 2.

9. Método automatizado para detectar uma mutação de aminoácido única humana em um polipeptídeo B-Raf, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

aplicar um marcador a um ou mais aminoácidos alvo em uma amostra do polipeptídeo B-Raf;

ler a amostra após aplicação do marcador para determinar a presença ou ausência do marcador na amostra, para assim indicar a presença ou ausência da mutação de aminoácido única na amostra; e

gerar uma saída (*output*) indicando a presença ou ausência da mutação de aminoácido única na amostra conforme determinado pela etapa de leitura; em que o polipeptídeo B-Raf compreende uma ou mais mutações nas posições 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 e 599 em B-Raf tendo a sequência na SEQ ID NO: 1.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o marcador compreende um ligante que se liga preferencialmente a um polipeptídeo B-Raf portador da mutação de aminoácido única.

11. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o marcador compreende um ligante que se liga preferencialmente a um polipeptídeo B-Raf de um tipo selvagem sem a mutação de aminoácido única.

12. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o marcador é um anticorpo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um processo de ELISA.

14. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o marcador é aplicado usando um *microarrayer*.

15. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra é lida opticamente.

16. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a saída (*output*) é gerada usando um dispositivo que compreende pelo menos um dentre: uma interface gráfica do usuário; uma interface audível do usuário; uma impressora; um meio de armazenamento legível por computador; e um meio portador interpretável por computador.

17. Método para identificar um ou mais compostos tendo atividade anti-proliferativa, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes, em que o um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes têm uma mutação de aminoácido em uma ou mais das posições 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 e 599 em B-Raf tendo a sequência na SEQ ID NO: 1;

(b) colocar em contato o(s) dito(s) polipeptídeo(s) com um ou mais compostos a serem testados; e

(c) detectar uma interação entre o dito um ou mais compostos e os ditos polipeptídeos mutantes.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes têm uma mutação de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em V599E, V599D, G595R, G465V, G465E, G465A, G468A, G468E, E585K, F594L, G595R, L596V, L596R e G463E.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17 ou 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a interação é uma interação de ligação.

20. Ensaio para identificação de um ou mais compostos tendo atividade anti-proliferativa, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes, em que o um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes têm uma mutação de aminoácido em uma ou mais das posições 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 e 599 em B-Raf tendo a sequência na SEQ ID NO: 1;

(b) providenciar um substrato abaixo (*downstream*) para o polipeptídeo B-Raf;

(c) detectar a modificação do substrato na presença do(s) composto(s) a ser(em) testado(s).

21. Ensaio, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o um ou mais polipeptídeos B-Raf mutantes têm uma mutação de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em V599E, V599D, G595R, G465V, G465E, G465A, G468A, G468E, E585K, F594L, G595R, L596V, L596R e G463E.

22. Ensaio, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação do substrato é detectada diretamente.

23. Ensaio, de acordo com a reivindicação 22, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o substrato é uma enzima que modifica um segundo substrato, cuja segunda modificação é detectável.

24. Ensaio, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o substrato é MEK e o segundo substrato é MAPK.

25. Método ou ensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 24, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que um nível de referência é determinado para o ensaio na ausência do composto ou compostos a serem testados.

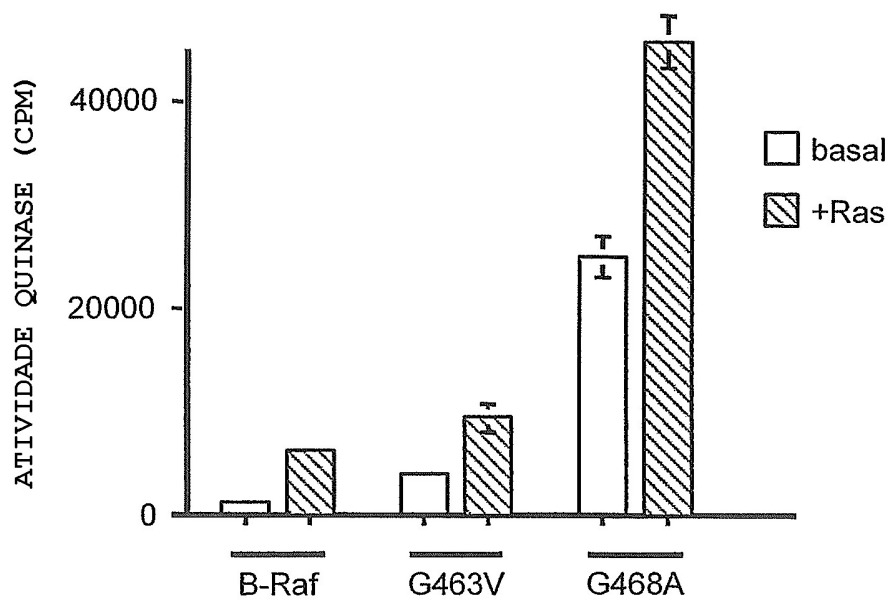


FIG. 1A

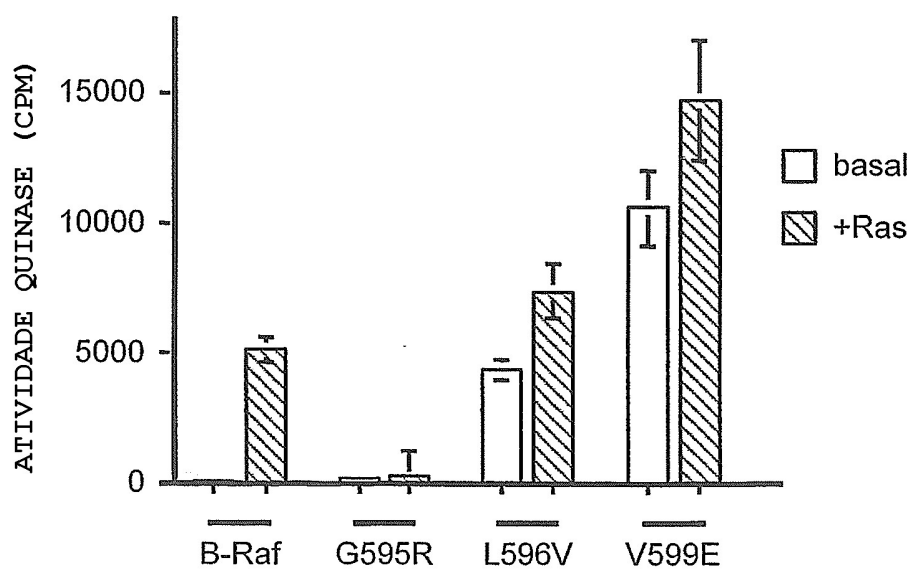


FIG. 1B

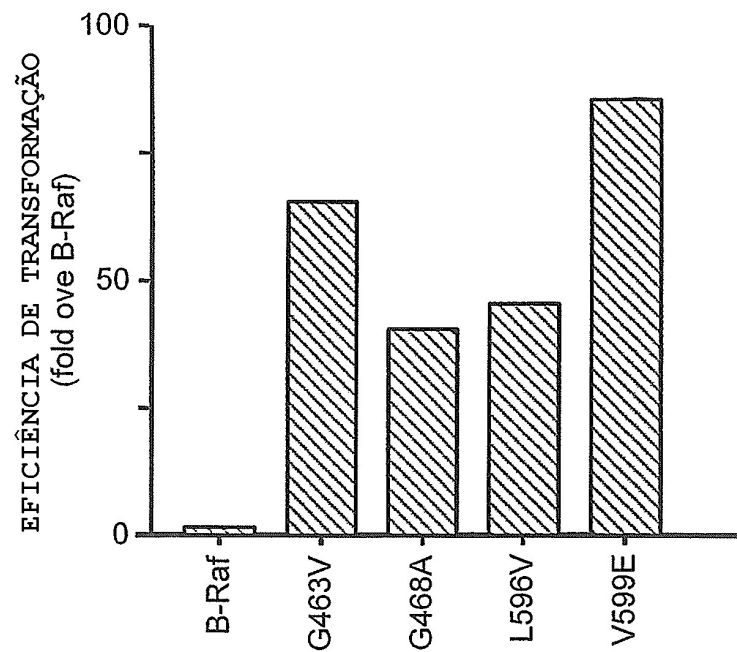


FIG. 2

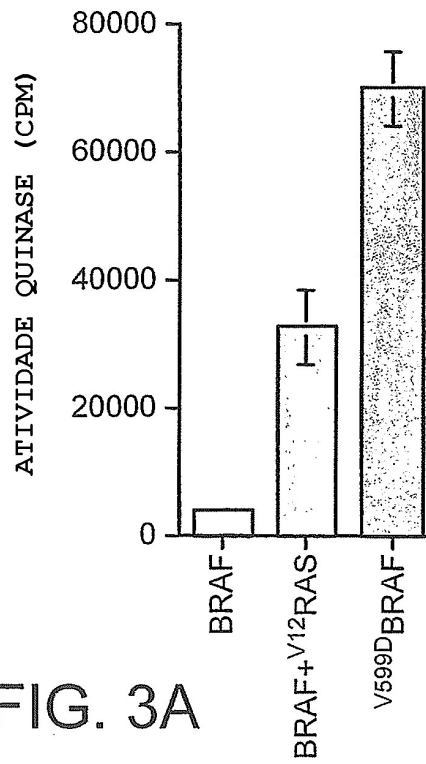


FIG. 3A

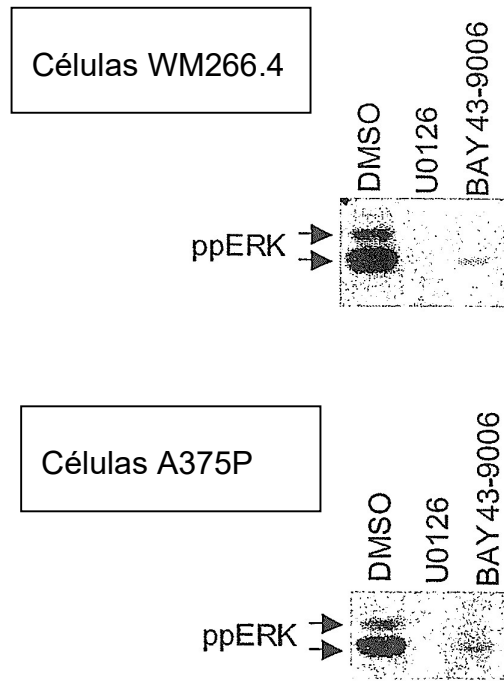


FIG. 3B

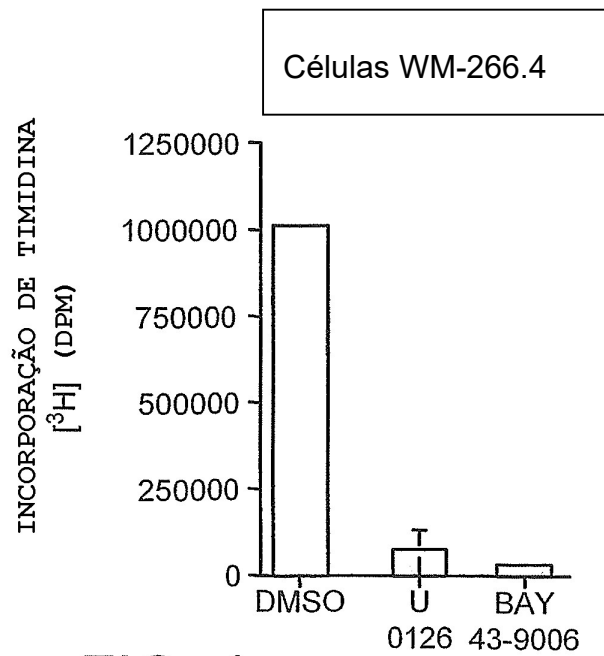


FIG. 4

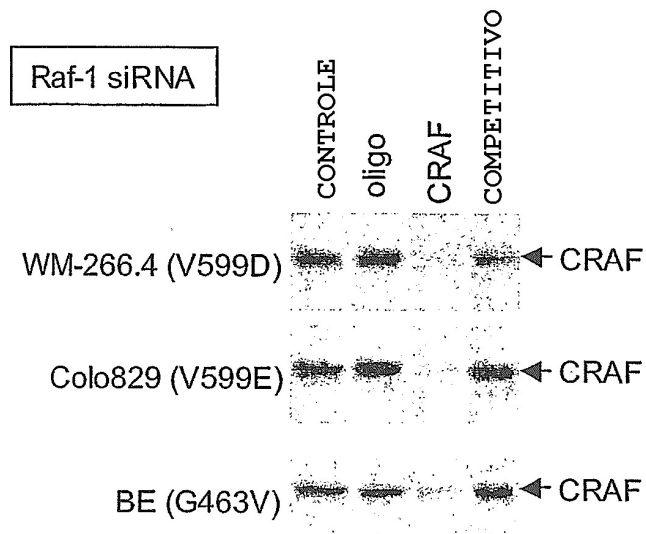


FIG. 5A

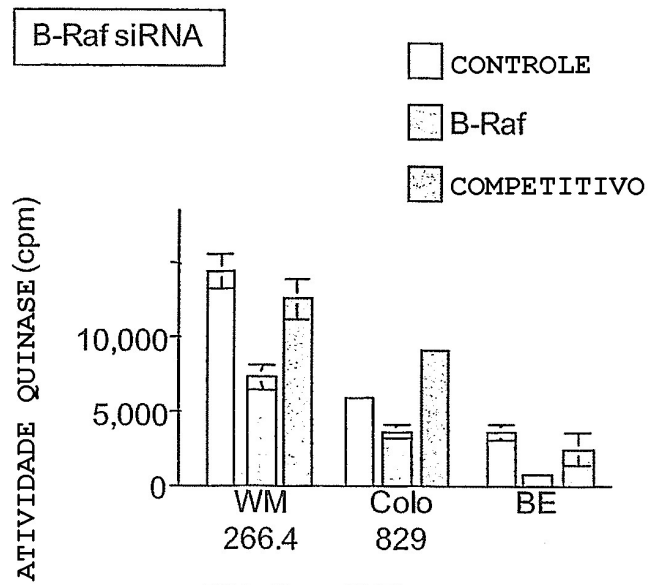
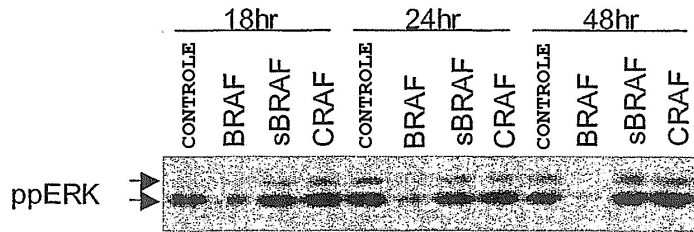


FIG. 5B

Células WM-266.4



Células Colo 829



FIG. 6

ANÁLISE DE CICLO DE CELULA

CLINAGEM PARP

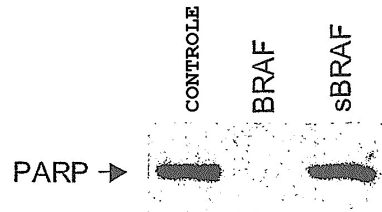


FIG. 7

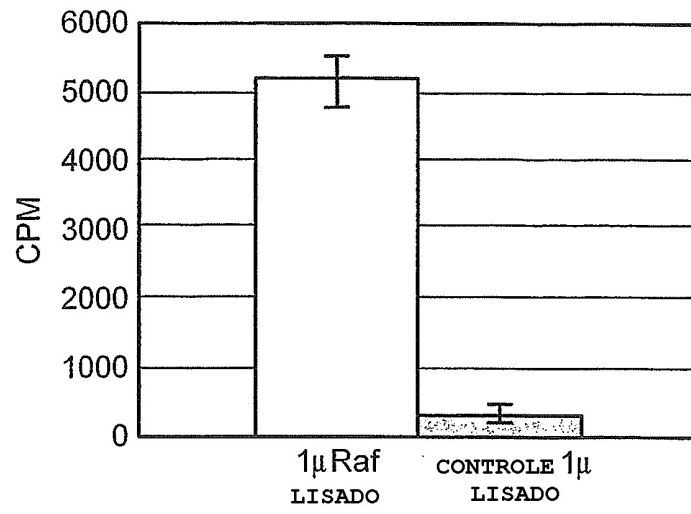


FIG. 8

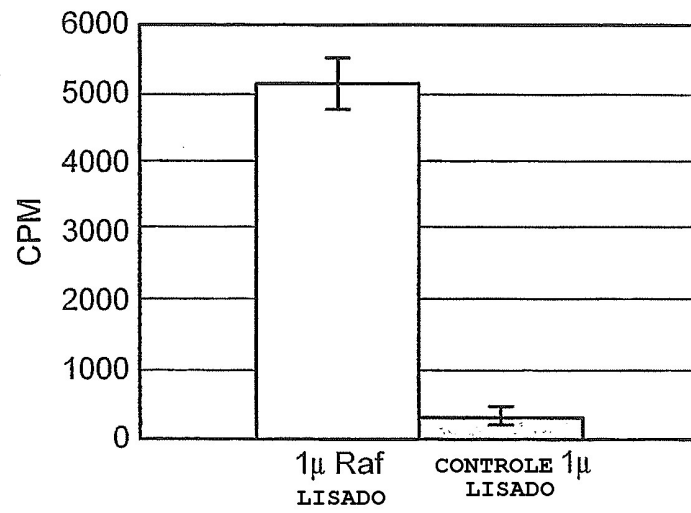


FIG. 9

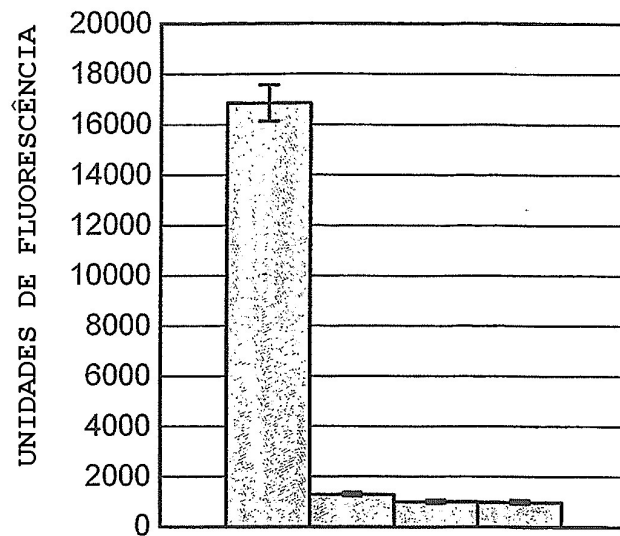


FIG. 10



FIG. 11

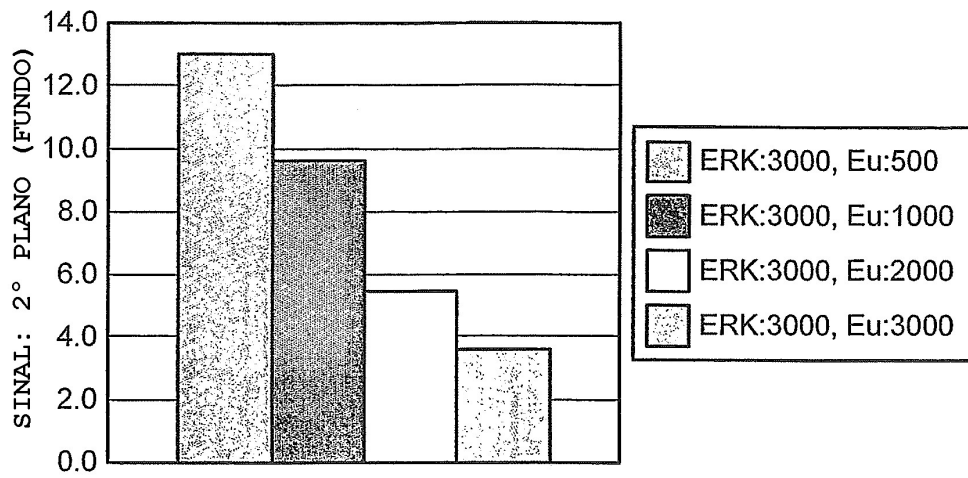


FIG. 12

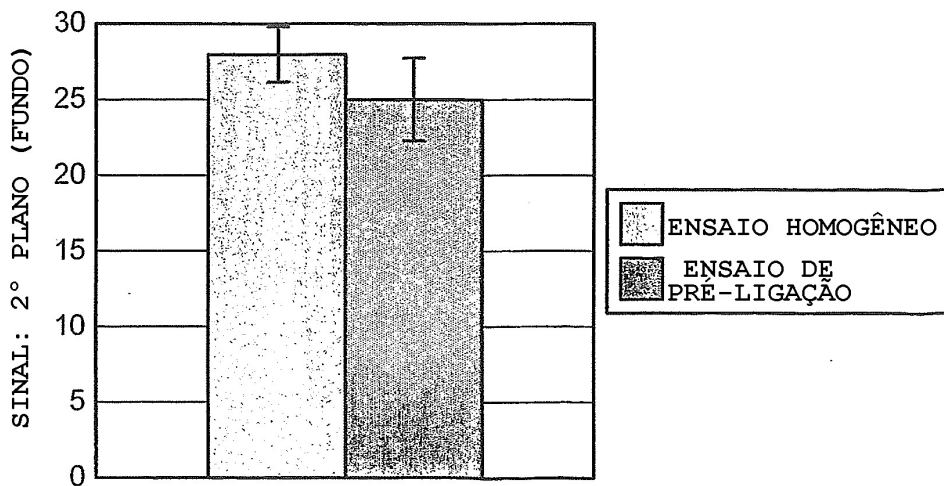


FIG. 13