

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0608564-4 A2**



(22) Data de Depósito: 24/02/2006
(43) Data da Publicação: 12/01/2010
(RPI 2036)

(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/574 (2010.01)

(54) Título: **MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS CANCEROSAS, MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PROBABILIDADE PARA METÁSTASE DE CÂNCER A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE TECIDO E MÉTODO PARA USO DE RNA HELICASE P68 FOSFORILADA PARA RASTREAR CÉLULAS CANCEROSAS PARA METÁSTASE CANCEROSA**

(30) Prioridade Unionista: 24/02/2005 US 60/655.786

(73) Titular(es): GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC.

(72) Inventor(es): ZHI-REN LIU

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2006006948 de 24/02/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/091949 de 31/08/2006

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS CANCEROSAS, MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PROBABILIDADE PARA METÁSTASE DE CÂNCER A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE TECIDO E MÉTODO PARA USO DE RNA HELICASE P68 FOSFORILADA PARA RASTREAR CÉLULAS CANCEROSAS PARA METÁSTASE CANCEROSA. Um método para determinação da presença de células cancerosas em uma amostra de tecido ou amostra de células por detecção da presença de RNA helicase p68 fosforilada na amostra. Além disso, um método para determinação da presença de células cancerosas metastáticas em uma amostra de tecido ou amostra de células por detecção do nível de RNA helicase p68 fosforilada na amostra quando comparada a células não metastáticas é uma indicação das células cancerosas metastáticas na amostra.

5

Declaração dos pedidos relacionados

10

15

Campo técnico

20

Técnica prévia

25

30

melhoram substancialmente quando o paciente foi tratado antes da metástase de câncer.

A identificação de marcadores de tumor para objetivos diagnósticos tem sido um objetivo da pesquisa sobre câncer nas últimas décadas. Marcadores produzidos em células ou tecidos têm sido procurados uma vez que tais marcadores são úteis no diagnóstico e tratamento de câncer e na identificação de metástase de câncer. A medida dos níveis de marcador de tumor pode ser útil na detecção de alguns tipos de câncer. Além disso, a quantificação do fluxo dos níveis de marcador pode ser útil na determinação ou avaliação da eficácia ou curso do tratamento. Como tal, a pesquisa por marcadores de câncer é suprema.

Na pesquisa de um marcador de tumor, o inventor investigou RNA helicase p68. RNA helicase nuclear p68 (por exemplo Id. de seqüências Nos. 1 e 2) são um membro prototípico da família DEAD-box de helicases, distinto por uma seqüência característica de núcleo de Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD). RNA helicase P86 foi fosforilada no resíduo de tirosina nas células HeLa. Yang e cols., Fosforilação of p68 RNA Helicase regulates RNA Binding by the C-terminal Domain of the Protein, *Biochem. Biophys Res Commun*, 314:622-30 (2004). Em um estudo prévio, foi mostrado que RNA helicase p68 foi superexpressa em tecidos de câncer colo-retal e linhas de células de câncer. Baseado nesses achados, o inventor insistiu em RNA helicase p68 como um potencial marcador de câncer.

Portanto, há sempre uma necessidade por melhores ferramentas de diagnósticos para câncer e metástase de câncer. Além disso, há sempre uma necessidade por métodos e

ferramentas para a determinação e avaliação da eficácia ou duração do tratamento de câncer. Além disso, tais novos métodos e ferramentas podem ser úteis para a identificação de metástase de câncer. É para essas necessidades, entre
5 outras, que a presente invenção é direcionada.

Breve sumário da invenção

Resumidamente, essa invenção envolve o uso de RNA helicase p68 fosforilada como um marcador de câncer, um marcador para metástase de câncer e um potencial alvo
10 terapêutico para células cancerosas. Embora RNA helicase p68 seja expressa em células normais bem como em células cancerosas, descobriu-se que a RNA helicase p68 é fosforilada em células cancerosas incluindo câncer metastático. De fato, o estado de fosforilação de RNA
15 helicase p68 em uma célula parece estar correlacionado com uma identificação daquela célula como cancerosa e com uma identificação daquela célula como célula de câncer metastático. Mais particularmente, RNA helicase p68 fosforilada representa um marcador de câncer que pode ser
20 usado para distinguir entre células cancerosas e células normais. Além disso, a RNA helicase p68 fosforilada pode fornecer potencial alvo terapêutico nos tratamentos de câncer.

Um método dessa invenção para determinação da presença
25 de células cancerosas em uma amostra de tecido compreende as etapas de fornecimento de uma amostra de tecido a partir de um paciente e detecção da RNA helicase p68 fosforilada na amostra. Nesse método, a detecção da RNA helicase p68 fosforilada na amostra de tecido é uma indicação de células
30 cancerosas na amostra de tecido. A amostra de tecido pode

ser de, por exemplo, bexiga, cérebro, mama, cólon, esôfago, rim, pulmão, linfonodo, ovário, pele, estômago, testículo ou útero.

O estado de fosforilação da RNA helicase p68 em seis
5 diferentes linhas de células de câncer foi comparado às
linhas de células correspondentes derivadas dos tecidos
normais. A comparação demonstrou que RNA helicase p68 foi
fosforilada nos resíduos de tirosina em todas as células
cancerosas testadas, mas não nas células normais
10 correspondentes. Mais particularmente, a RNA helicase p68
foi fosforilada nos resíduos de tirosina em seis diferentes
linhas de células de câncer, mas não em linhas de células
derivadas de tecidos normais correspondentes. De tal modo,
o estado de fosforilação da RNA helicase p68 pode ser um
15 marcador para câncer ou células cancerosas.

A presença de RNA helicase p68 fosforilada em vários
tipos de câncer demonstra que essa RNA helicase p68 pode
ter uma função endógena em células cancerosas. Sua
identificação em uma diversa escala de cânceres de
20 diferentes tipos histogenéticos e sua ausência de tecidos
normais sugere que RNA helicase p68 fosforilada é uma das
mudanças comuns de um produto de gene na malignidade. RNA
helicase P68 é ligada a sinais de crescimento celular,
especialmente o mecanismo pelo qual a RNA helicase p68
25 perde a função no processo de desenvolvimento de câncer.
Como tal, RNA helicase p68 tem um papel no desenvolvimento
e progressão do tumor e pode fornecer um alvo terapêutico
eficaz.

Breve descrição dos desenhos

30 A FIG. 1 mostra Western Blots da RNA helicase p68

imunoprecipitada a partir de células normais e a partir de células cancerosas.

A FIG. 2A mostra Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de diferentes células cancerosas.

A FIG. 2B mostra Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de células cancerosas de mama.

A FIG. 3A mostra Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de células tratadas com um medicamento anticâncer.

A FIG. 3B mostra Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de células tratadas com piceatannol.

A FIG. 3C mostra Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de células tratadas com etoposide.

A FIG. 3D mostra Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de diferentes células cancerosas antes e depois do tratamento com vários medicamentos anticâncer.

A FIG. 4A mostra Western Blots de RNA helicase p68 imunoprecipitada fosforilada a partir de células cancerosas.

A FIG. 4B mostra Western Blots de RNA helicase p68 fosforilada celular imunoprecipitada a partir de linhas de células derivadas de tecidos de câncer metastático ou não metastático ou amostras de tecidos de pacientes com câncer.

A FIG. 4C mostra um gráfico que ilustra o nível relativo de RNA helicase p68 fosforilada de tecido normal,

adenocarcinoma e metastático.

Descrição detalhada das modalidades preferidas

Modalidades ilustrativas da presente invenção relacionam-se ao uso de RNA helicase p68 fosforilada como um marcador de câncer. Embora RNA helicase p68 seja expressa em células normais e células cancerosas, RNA helicase p68 é fosforilada em células cancerosas e em células cancerosas metastáticas. A fosforilação de RNA helicase p68 em uma célula parece estar correlacionada com uma identificação daquela célula como cancerosa ou como metastática. Como tal, a fosforilação de RNA helicase p68 em um paciente pode ser indicativa de câncer e o nível ou local da fosforilação pode ser indicativo de metástase de câncer.

Mais particularmente nessa invenção, RNA helicase p68 foi fosforilada em diferentes tipos de cânceres que se desenvolveram em uma ampla escala de diferentes localizações anatômicas. Por exemplo, RNA helicase p68 é fosforilada em todas as células cancerosas de pulmões, cólons, fígados, mamas, rins e linfócitos. A RNA helicase p68 nuclear é tirosil fosforilada em seis diferentes linhas de câncer, mas não nas linhas de células derivadas de cada tecido normal correspondente. Portanto, a correlação próxima entre tirosil fosforilação(s) de RNA helicase p68 e câncer e metástase de câncer pode ser um marcador diagnóstico útil para câncer.

Em uma modalidade, RNA helicase p68 fosforilada representa um marcador de câncer que pode ser usado para distinguir entre células cancerosas ou células metastáticas e células normais. Em uma modalidade preferida, a

imunorreatividade de RNA helicase p68 fosforilada correlaciona-se bem com células cancerosas. Em contraste, células não cancerosas ou normais não mostraram imunorreatividade para RNA helicase p68 fosforilada.

5 Além disso, RNA helicase p68 fosforilada representa um marcador de câncer que pode ser usado para refletir os estágios de câncer. Descobriu-se que o nível de fosforilação de RNA helicase p68 correspondeu a diferentes estágios de progressão de câncer. Especificamente, maiores
10 níveis de RNA helicase p68 fosforilada foram encontrados em câncer metastático, enquanto menores níveis foram encontrados para se correlacionar com células de adenocarcinoma não metastático (adenoCA). Em vários casos, o nível de fosforilação de RNA helicase p68 em células
15 metastáticas foi substancialmente (por exemplo, acima de duas vezes) maior que em tecido canceroso não metastático. A correlação próxima entre o nível de fosforilação de RNA helicase p68 e câncer metastático é útil na avaliação do estadiamento de câncer in pacientes.

20 Um método preferido de uso de RNA helicase p68 fosforilada para rastrear células cancerosas inclui as etapas de:

(1) obtenção de uma amostra de tecido ou célula para ser testada a presença de células cancerosas;

25 (2) preparação da amostra para rastreamento;

(3) teste da amostra com um agente de reconhecimento, como um anticorpo, que reage com RNA helicase p68 fosforilada humana; e

(4) detecção da presença da RNA helicase p68
30 fosforilada por detecção da ligação do agente de

reconhecimento à RNA helicase p68 fosforilada, se presente, na amostra preparada. As amostras de tecido ou célula podem ser extraídas de órgãos como a bexiga, cérebro, mama, cólon, esôfago, rim, pulmão, linfonodo, ovário, pele, estômago, testículo ou útero. Em uma modalidade, a amostra de tecido é extraída de um ser humano ou de um ser humano que tem câncer.

O agente de reconhecimento pode ser um anticorpo, uma vez que esse tipo de agente de reconhecimento é tipicamente mais útil no rastreamento em laboratórios. Em tal modalidade, fragmentos de domínio de ligação de antígeno de anticorpos podem ser os fragmentos Fab. Além disso, RNA aptômeros podem ser usados com essa invenção. Anticorpos adequados para essa invenção incluem anticorpos policlonais ou monoclonais. Opcionalmente, o anticorpo pode ser produzido por um método de modo que os anticorpos reconhecem um epitopo pré-selecionado de uma RNA helicase p68 fosforilada.

Anticorpos podem ser comercialmente disponíveis, ou podem ser preparados por métodos padrão na técnica. Em uma modalidade, anticorpo policlonal para RNA helicase p68 fosforilada é preparado por injeção de RNA helicase p68 fosforilada suplementada com um adjuvante que usa métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, anticorpos policlonais são uma população heterogênea de moléculas de anticorpo derivada do soro de animais imunizados com o antígeno de interesse. Adjuvantes como de Freund (completo e incompleto), peptídeos, emulsões oleosas, lisolecitina, polióis, poliânions e outros podem ser usados para aumentar a resposta imune. Uma pessoa de habilidade comum na técnica

é capaz de construir um anticorpo adequado ou agente de reconhecimento sem experimentação adicional.

Em uma modalidade, análise de Western Blot foi usada para detectar a presença de RNA helicase p68 fosforilada em uma amostra. Análise de Western blot requer o uso de eletroforese de gel de dodecil sulfato-poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE) e imunoblotting. Para preparar a amostra, a amostra pode ser homogeneizada e os extratos de proteína podem ser feitos a partir de amostra homogeneizada.

A imunorreatividade ou fosforilação tumor-específica de RNA helicase p68 também pode ser útil no diagnóstico e tratamento de câncer. Por exemplo, procedimentos e rastreamentos diagnósticos podem ser desenvolvidos baseados na presença de RNA helicase p68 fosforilada em células da amostra. Além disso, a fosforilação de RNA helicase p68 em células de tumor fornece um alvo molecular para o desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer que são seletivamente ativados por RNA helicase p68 fosforilada em células de tumor.

Depois da RNA helicase p68 (fosforilada ou não) ser separada da amostra por imunoprecipitação usando anticorpos contra RNA helicase p68, o nível de fosforilação de RNA helicase p68 então pode ser determinado por SDS-PAGE seguido por Western Blot com anticorpo contra fosfortirosina. A intensidade do sinal de Western Blot corresponde ao nível de fosforilação de RNA helicase p68. Isso é um método indireto de detecção da presença de RNA helicase p68 fosforilada.

Numerosos procedimentos para uso de imunohistoquímica e ELISA para detectar ou testar RNA helicase p68

fosforilada em uma amostra biológica são conhecidos por pessoas com habilidade comum na técnica ou podem ser encontrados facilmente na literatura por aqueles com habilidade comum na técnica. Um método preferido é o uso de Western Blots. Imunoensaios como ensaios de captura de anticorpo, ensaios sanduíche de dois anticorpos e ensaios de captura de antígeno também podem ser usados na presente invenção. Preparações de amostra para imunoensaios incluem fixação de tecido ou homogeneização e preparações de extratos de proteínas. Imunoensaios permitem que grandes números de amostras sejam testados de modo relativamente eficiente e eles oferecem precisão quantitativa. Princípios e prática de imunohistoquímica, análise de Western Blot e outros imunoensaios são bem conhecidos na técnica.

Além disso, uma estratégia para o tratamento de câncer pode ser o alvo de uma RNA helicase p68 fosforilada na célula ou tecido. Baseado nas observações de que (1) RNA helicase p68 foi fosforilada em resíduos de tirosina em células cancerosas e tecido de câncer e (2) RNA helicase p68 não foi fosforilada em células normais e tecido normal, um tratamento para câncer envolve o direcionamento para RNA helicase p68 fosforilada. Por exemplo, é possível que tal estratégia de visar a RNA helicase p68 fosforilada deve incluir a introdução de um polipeptídeo competidor fosforilado que transpõe uma região de uma RNA helicase p68 fosforilada particular.

Mais particularmente, esse polipeptídeo competidor pode conter três partes funcionais. Primeiramente, no N-terminal, pode haver 10-12 aminoácidos hidrofóbicos que podem funcionar como uma sequência permeável a célula para

direcionar o peptídeo nas células. Segundo, no meio do peptídeo, pode haver um Sinal de Localização Nuclear (NLS). Terceiro, no C-terminal do peptídeo, pode haver cerca de 16 – 22 aminoácidos de uma RNA helicase p68 que transpõe o
5 sítio ou sítios de fosforilação. O peptídeo pode então ser fosforilado *in vitro*.

Depois do peptídeo competidor fosforilado ser purificado, o peptídeo competidor pode ser usado para tratar as células cancerosas ou tecido. A introdução de tal
10 proteína competidora em células ou tecidos cancerosos pode resultar em mudanças na morfologia da célula, proliferação de células, adesão de células, invasão de células cancerosas e migração de células cancerosas. Tal tratamento pode ser capaz de regredir o crescimento do tumor e
15 metástase de câncer.

Embora o papel funcional da tirosil RNA helicase p68 fosforilada em células cancerosas seja uma questão em aberto, medicamentos podem ser projetados, ou analisados, para metabolismo específico por RNA helicase p68
20 fosforilada em tumores. Embora a proteína de RNA helicase p68 seja expressa em todos os tipos de tecidos, RNA helicase p68 não foi fosforilada nos resíduos de tirosina em células derivadas de todos os tecidos normais. Portanto, é claro que RNA helicase p68 fosforilada é um marcador para
25 câncer e que o nível de RNA helicase p68 fosforilada está correlacionado com metástase de câncer.

Os conceitos da invenção abrangidos por essa invenção são ilustrados nos exemplos a seguir.

Exemplos

30 1. Procedimento de Exemplo

Preparação de Anticorpos

Exemplos podem usar um anticorpo que reconhece epitopos de RNA helicase p68 fosforilada humana. O anticorpo policlonal PAbp68 e anticorpo monoclonal p68-rgg para RNA helicase p68 foi produzido contra o segmento C-terminal de RNA helicase p68 recombinante em coelhos e camundongos respectivamente. O anticorpo p-tyr-100 para tirosina fosfato e 14B3 para treonina fosfato pode ser obtido a partir de uma fonte comercial.

10 Método de rastreamento

A presença de RNA helicase p68 fosforilada em células ou amostras de tecidos cultivadas foi examinada com o uso de imunoprecipitação seguida por Western Blots. *Imunoblotting* também foi realizado com um anticorpo monoclonal contra RNA helicase p68 para mostrar as quantidades iguais ou níveis de p68 (fosforilada e não fosforilada) carregadas no *western blotting*. Tais Western Blots incluem o uso de anticorpos para RNA helicase p68 fosforilada e eletroforese de gel de sódio dodecil sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE). *Imunoblotting* também foi realizado com um anticorpo monoclonal contra RNA helicase p68 para mostrar a presença de uma proteína de controle positivo em amostras de tumor e normais e para indicar que não havia evidência de degradação da proteína em qualquer uma das amostras de tecidos.

Depois da amostra de tecidos ter sido homogeneizada, os extratos de proteína foram feitos a partir da amostra homogeneizada. O tecido foi analisado para RNA helicase p68 fosforilada em duas etapas. Na primeira etapa, o anticorpo policlonal PAbp68 foi usado para isolar RNA helicase p68

dos extratos. Na segunda etapa, o anticorpo p-tyr-100 foi usado para detectar a RNA helicase p68 fosforilada da RNA helicase p68 total isolada pelo Western Blot. A intensidade do sinal de Western Blot pelo anticorpo p-tyr-100, na
5 segunda etapa, corresponde ao nível de RNA helicase p68 fosforilada em uma amostra.

Um sistema de gel de poliacrilamida foi empregado para separação de proteínas. Os extratos nucleares de células (80 µl) foram diluídos a 200 µl com tampão RIPA (160 mM
10 NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1 mM vanadato de sódio e 1 mM PMSF). O anticorpo PAbp68 foi então adicionado à mistura. A solução foi subsequentemente incubada a 4°C por 4 horas. Mistura de glóbulo de proteína
15 A agarose (40 µl) foi então adicionado e a mistura foi submetida à rotação. Os glóbulos foram recuperados e lavados com 5x600 µl de tampão RIPA com 0,08% SDS. As proteínas precipitadas foram analisadas por SDS-PAGE seguido por Western Blot.

20 A análise de Western Blot foi realizada com um kit ECL de Western Blot e kit de detecção comercialmente disponíveis (Amersham Biosciences). O sobrenadante do meio de cultura de células de hibridoma P68-rgg foi usado nos experimentos de blotting em uma diluição de 5:1. O anticorpo
25 policlonal PAbp68 foi usado em uma diluição de 1:3000. Os anticorpos, PY100 e 14B3 foram usados com diluição de 1:2000.

2. Rastreamento de exemplo

Seis linhas de câncer e sete linhas de células não
30 cancerosas de vários locais anatômicos foram rastreados

usando imunoensaaios para demonstrar que a presença da RNA helicase p68 fosforilada em uma célula é capaz de identificar se a célula é cancerosa. Essas seis linhas de células cancerosas incluem células de carcinoma pulmonar (A549), células de tumor de cólon (Caco-2), células de carcinoma hepatocelular (HepG2), células de leucemia (K562), células cancerosas de mama (MCF-7) e células de carcinoma de cérvix (HeLa S3). As sete linhas de células ou tecidos normais incluem tecido pulmonar normal humano, células pulmonares embriônicas humanas (HEL299), células de fibroblasto de cólon humanas (CCD-112CoN), tecido hepático humano normal, células de mama normais humanas (Hs578Bst), células de linfócito B humanas B isoladas de sangue periférico (RPM1788) e células renais embriônicas humanas (HEK293). As linhas de células ou tecidos são listadas na Tabela 1.

A fosforilação de RNA helicase p68 foi investigada com o uso de células HeLa S3, A549, HEL299, CCD-112CoN, HepG2 e MCF-7. As células HeLa S3 e A549 cresceram em meio de Ham F12K suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células HEL299, CCD-112CoN, HepG2 e MCF-7 foram mantidas em meio essencial mínimo suplementado com 10% de soro bovino fetal. O meio de cultura continha 2 mM L-glutamina e Earle's BSS ajustado para conter 1,5 g/l de bicarbonato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1,0 mM de piruvato de sódio. As células Caco-2 cresceram em uma condição de meio similar àquela das células HEL299 mas suplementado com 20% de soro bovino fetal. As células RPMI 1788 e K562 cresceram em meio de Dulbecco modificado por Iscove suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células HEK293 e Hs 578Bst

cresceram em meio de Dulbecco modificado contendo 10% de soro bovino fetal. Todos os meios de cultura de células continham penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As células cresceram a 90% de confluência antes da
5 realização de qualquer experimento.

A Tabela 1 mostra as linhas de células ou amostras de tecidos usadas no rastreamento. A RNA helicase p68 celular foi primeiramente imunoprecipitada de extratos nucleares frescos usando um anticorpo policlonal PAbp68 que surgiu
10 contra C-terminal de RNA helicase p68.

TABELA 1: células cancerosas e células/tecidos normais correspondentes usados no rastreamento

	Pulmão	Cólon	Fígado	Linfó- cito	Mama	Rim	Cérvix
Câncer	A549	Caco-2	HepG2	K562	MCF-7		Hela- S3
Normal	HEL299	CCD- 12CoN		RPMI 1788	Hs578 Bst	HEK293	
Amostras de tecido	Normal		Normal				

3. Fosforilação de RNA Helicase P68 Tirosil e Câncer

A correlação entre a fosforilação de RNA helicase p68
15 e câncer foi investigada com o uso de um anticorpo monoclonal contra tirosina fosforilada (p-tyr-100).

A FIG. 1 mostra a RNA helicase p68 imunoprecipitada de células normais e cancerosas analisadas com o uso de um anticorpo monoclonal contra fosfor-tirosina (p-tyr-100).
20 P68 RNA helicases precipitadas de extratos nucleares foram preparadas de todas as seis linhas de células de câncer e foram reconhecidas pelo anticorpo p-tyr-100 (painel

superior, linhas 3, 5, 7, 9, 11, e 13). P-tyr-100 não reconhece RNA helicase p68 imunoprecipitada de extratos nucleares preparados a partir de células ou tecidos normais correspondentes (painel inferior, linhas 1, 2, 4, 6, 8, 10, e 12). A fosforilação de tirosina em células cancerosas foi também confirmada por um outro anticorpo monoclonal contra tirosina fosforilada, PY20 (dados não mostrados). Acima de tudo, esses dados indicam que a fosforilação de RNA helicase p68 nos resíduos de tirosina está correlacionada com o desenvolvimento de câncer.

Esses experimentos anteriores demonstram que há uma correlação entre fosforilação de RNA helicase p68 tirosil e câncer.

4. RNA Helicase P68 e agentes anticâncer

O efeito de agentes anticâncer sobre a fosforilação de RNA helicase p68 foi investigado por exposição das células cancerosas a agentes anticâncer STI-571 (Novartis), piceatanol (Sigma), etoposide (Calbiochem) e TAXOL® (USB). Entre eles, STI-571 e piceatanol são duas diferentes classes de inibidores de proteína tirosina quinase (PTK). O etoposide é um inibidor de DNA topoisomerase e TAXOL® é um medicamento antitumor que interage com microtúbulos. Tratamento das seis diferentes linhas de células de câncer com STI-571, um inibidor de BCR-Abl PTK, levou à desfosforilação de RNA helicase p68 nos resíduos de tirosina (FIG. 2A, painel inferior, linhas 2, 4, 6, 8). A exceção foi MCF-7, células cancerosas de mama, em que foram observadas diminuições no nível de fosforilação de tirosina em vez de completa desfosforilação em células MCF-7 (FIG. 2A, painel inferior, linha 10).

As fosforizações de RNA helicase p68 responderam diferentemente a diferentes tratamentos anticâncer. Tirosil fosforilação de RNA helicase p68 em células HeLa pode ser desfosforilada com tratamento com fator alfa de necrose tumoral (TNF- α). TNF- α induz sinal celular que desperta a apoptose da célula cancerosa. Desfosforilação de tirosina de RNA helicase p68 pode ser um marcador apoptótico de células cancerosas em resposta a agentes que induzem apoptose. As respostas de desfosforilação de tirosina de RNA helicase p68 em todas as seis linhas de células de câncer a tratamentos com TNF- α (Peprotech) e Ligante Indutor de Apoptose Relacionado a TNF (TRAIL) sugerem que a desfosforilação de tirosina de RNA helicase p68 pode ser um marcador de apoptose. A fosforilação nos resíduos de tirosina sob tratamento com TNF- α e TRAIL foi monitorada pelo mesmo procedimento de imunoprecipitação e Western Blot.

As FIGs. 2A e 2B mostram Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de diferentes células cancerosas (indicadas). Os imuno-blots foram realizados usando anticorpo p68-rgg (FIG. 2, painel superior em A e B), anticorpo p-tyr-100 (painel médio em A e B) e anticorpo 14B3 (FIG. 2, painel inferior em A e B). Os + e - representam com ou sem tratamentos com TNF- α ou TRAIL. Desfosforilação de tirosina e fosforilação de treonina de RNA helicase p68 era presente em células cancerosas sob os tratamentos de painel (A) TNF- α ou painel (B) TRAIL.

Como também mostrado nas FIGs. 2A e 2B (painel médio, linhas 2, 4, 6, 8 e 10), tratamento de todas as seis linhas de células de câncer com TNF- α ou TRAIL levou à

desfosforilação de p68 nos resíduos de tirosina. De modo interessante, tratamento de toda as seis diferentes células cancerosas com TNF- α ou TRAIL também resultou na fosforilação de p68 em treonina (FIGs.2A e 2B, painel inferior, linha 2, 4, 6, 8, e 10).

Desfosforilação nos resíduos de tirosina e fosforilação nos resíduos de treonina ocorreu em um estágio muito precoce de tratamentos com TNF- α ou TRAIL (nos primeiros 10 minutos, dados não mostrados). A fosforilação de treonina foi rapidamente desfosforilada novamente com tratamento (30 minutos) com TNF- α ou TRAIL por um maior período de tempo (dados não mostrados).

As FIGs. 3A-3D mostram Western Blots de RNA helicase p68 imunoprecipitada celular de células tratadas com os medicamentos anticâncer STI-571, picetanol, epotoside e TAXOL® sobre a fosforilação de tirosil de RNA helicase p68. Os Western Blots foram realizados usando anticorpo p68-rgg (painel superior na FIG. 3A-3D) e anticorpo p-tyr-100 (painel inferior nas FIGs. 3A-3D). A RNA helicase p68 foi imunoprecipitada por anticorpo PAbp68. As FIGs. 3A-3D mostram Western Blots de RNA helicase p68 celular imunoprecipitada a partir de diferentes células cancerosas (indicadas no topo) antes (-) e depois (+) de tratadas com os medicamentos anticâncer. Foram observadas diminuições no nível de fosforilação de tirosina em vez de desfosforilação completa em células MCF-7 (FIG. 3A, painel inferior, linha 10).

As FIGs. 3B-3D mostram que a desfosforilação de tirosil não foi observada quando as células cancerosas foram tratadas com piceatanol, um inibidor de syk PTK,

(FIG. 3B, painel inferior, linhas 2, 4, 6, 8, e 10), etoposide (FIG. 3C, painel inferior, linhas 2, 4, 6, 8, e 10) e TAXOL® (FIG. 3D, painel inferior, linhas 2, 4, 6, 8, e 10). A fosforilação de treonina não foi detectada com o
5 tratamento com piceatanol, etoposide e TAXOL® como observado com tratamento com TNF- α e TRAIL (ligante de indução de apoptose relacionado a TNF) (dados não mostrados). Esses dados demonstram que a fosforilação de
10 tirosina específica de célula cancerosa de RNA helicase p68 responde diferentemente a diferentes tratamentos anticâncer.

Portanto, a fosforilação de RNA helicase p68 nuclear pode ser útil no monitoramento do tratamento de câncer. A resposta de desfosforilação nos resíduos de tirosina ocorre
15 com o tratamento de medicamentos TNF- α , TRAIL ou STI-571. a desfosforilação nos resíduos de tirosina que resulta do tratamento com o medicamento anticâncer é útil no monitoramento da eficácia dos tratamentos com medicamento anticâncer.

20 5. Níveis de RNA Helicase P68 Fosforilada e Câncer metastático

Tecido ou células cancerosas e não cancerosas de várias localizações anatômicas foram examinadas usando imunoensaios para demonstrar que o nível de RNA helicase
25 p68 fosforilada na célula ou tecido é capaz de identificar se as células ou tecidos são cancerosos ou metastáticos. Células pulmonares, células do cólon e células ovarianas foram examinadas em diferentes estágios de câncer. Em cada um desses casos, as células ou tecidos normais, células ou
30 tecido de adenocarcinoma (adenoCA) e células ou tecidos

metastáticos foram examinados para a presença e níveis de RNA helicase p68 fosforilada.

A FIG. 4A mostra Western Blots de RNA helicase p68 fosforilada imunoprecipitada (na tirosina) de células cancerosas derivadas de câncer primário ("pri") ou câncer metastático usando p68-rgg ou p-Tyr-100. Linhas de células de carcinoma, H292 e H146, são um par de linhas de células de câncer derivadas de câncer pulmonar de pequenas células. H292 é derivada de câncer primário e H146 é derivada de câncer pulmonar de pequenas células (metástase de medula óssea). Linhas de células de adenocarcinoma, SW480 e SW620, são um par de linhas de células de câncer derivadas de adenocarcinoma de cólon. SW480 é derivada de câncer primário e SW620 é derivada de câncer de cólon (metástase de linfonodos). Linhas de células de melanoma, WM115 e WM-266-4, são um par de linhas de células de câncer derivadas de câncer de pele. WM115 é derivada de câncer primário, enquanto WM266-4 é derivada de câncer metastático.

O nível de RNA helicase p68 fosforilada aumenta substancialmente à medida que o câncer progride de um carcinoma primário para metástase. As células cancerosas primárias, que indicam câncer não metastático, mostram um baixo nível de RNA helicase p68 fosforilada. Células metastáticas cancerosas mostram um maior nível de RNA helicase p68 fosforilada que nas linhas de células de câncer primário. O nível de RNA helicase p68 fosforilada nas células cancerosas metastáticas é substancialmente maior que aquele de células cancerosas não metastáticas. Portanto, há uma clara correlação entre o nível de RNA helicase p68 fosforilada no tecido e o estágio de metástase

de câncer.

A FIG. 4B mostra Western Blots de RNA helicase p68 fosforilada imunoprecipitada de amostras de tecidos normais, de adenocarcinoma não metastático e metastático de
5 vários locais anatômicos incluindo o cólon, ovário e pulmão. Especificamente, o tecido normal e o tecido de adenoCA foram derivados de amostras de tecidos de adenocarcinoma não metastático e o tecido metastático ("Met para" fígado, cólon ou mama) foi derivado dos locais de
10 tecido de câncer metastático secundário. A RNA helicase p68 fosforilada no resíduo de tirosina em cada amostra foi examinada usando uma combinação de anticorpos p68-rgg e p-Tyr-100. Os tecidos examinados originam-se de diferentes pacientes com câncer.

15 Os resultados dos exames mostram que RNA helicase p68 fosforilada pode ser um marcador para metástase de câncer. Como pode ser observado, o tecido normal em cada linha é negativo para RNA helicase p68 fosforilada. Em contraste, o tecido metastático mostra uma RNA helicase p68 fosforilada
20 muito forte. Como esperado, o tecido de adenoCA tem menos RNA helicase p68 fosforilada que o tecido metastático, mas reflete claramente a presença de RNA helicase p68 fosforilada.

A FIG. 4C mostra um gráfico da quantidade de RNA
25 helicase p68 fosforilada em cada uma das amostras de tecido mostradas na FIG. 4B. Como pode ser observado, o nível de RNA helicase p68 fosforilada é substancialmente diferente de tecido de adenocarcinoma e de tecido metastático. Em cada um dos casos, o nível de RNA helicase p68 fosforilada
30 aumenta em pelo menos duas vezes. Portanto, o nível de RNA

helicase p68 fosforilada em um tecido está correlacionado com os estágios do câncer.

A descrição detalhada antecedente das modalidades preferidas e as figuras em apêndice foram apresentadas apenas para objetivos ilustrativos e descritivos. Elas não pretendem ser exaustivas e não pretendem limitar o escopo e conceito inventivo da invenção. As modalidades foram selecionadas e descritas, mas melhor explicar os princípios da invenção e suas aplicações práticas. Uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá que podem ser feitas muitas variações à invenção revelada nessa especificação sem fugir do escopo e conceito inventivo da invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Liu, Zhi-Ren
 <120> RNA HELICASE P68 FOSFORILADA COMO UM MARCADOR PARA CÂNCER E METÁSTASE DE CÂNCER
 <130> 148483.00601
 <140> N/A
 <141> 2006-02-24
 <150> 60655786
 <151> 2005-02-24
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1845
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 atgtcgggtt attcgagtga ccgagaccgc ggccgggacc gagggtttgg tgcacctcga 60
 tttggaggaa gtagggcagg gcccttatct ggaaagaagt ttggaaaccc tggggagaaa 120
 ttagttaaaa agaagtggaa tcttgatgag ctgcctaaat ttgagaagaa tttttatcaa 180
 gagcaccctg atttggttag gcgcacagca caagaggtag aaacatacag aagaagcaag 240
 gaaattacag ttagagggtca caactgcccg aagccagttc taaattttta tgaagccaat 300
 ttccctgcaa atgtcatgga tgttattgca agacagaatt tcaactgaacc cactgctatt 360
 caagctcagg gatggccagt tgctctaagt ggattggata tggttggagt ggcacagacg 420
 ggatctggga aaacattgtc ttatttgctt cctgccattg tccacatcaa tcatcagcca 480
 ttcttagaga gaggcgatgg gcctatttgt ttggtgctgg caccaactcg ggaactggcc 540
 caacaggtgc agcaagtagc tgctgaatat ttagagcat gtcgcttgaa gtctacttgt 600
 atctacggtg tgcttcctaa gggaccacaa atacgtgatt tggagagagg tgtggaaatc 660
 tgtattgcaa cacctggaag actgattgac tttttagagt gtggaaaaac caatctgaga 720
 agaacaacct acctgtcct tgatgaagca gatagaatgc ttgatatggg ctttgaaccc 780
 caaataagga agattgtgga tcaaataaga cctgataggc aaactctaata gtggagtgcg 840
 acttggccaa aagaagtaag acagcttgct gaagatttcc tgaaagacta tattcatata 900
 aacattggtg cacttgaact gagtgcaaac cacaacattc ttcagattgt ggatgtgtgt 960
 catgacgtag aaaaggatga aaaacttatt cgtctaattg aagagatcat gagtgagaag 1020
 gagaataaaa ccattgtttt tgtggaaacc aaaagaagat gtgatgagct taccagaaaa 1080
 atgaggagag atgggtggcc tgccatgggt atccatgggt acaagagtca acaagagcgt 1140
 gactgggttc taaatgaatt caaacatgga aaagctccta ttctgattgc tacagatgtg 1200
 gcctccagag ggctagatgt ggaagatgtg aaatttgtca tcaattatga ctaccctaac 1260
 tcctcagagg attatattca tcgaattgga agaactgctc gcagtaccaa aacaggcaca 1320
 gcatacactt tctttacacc taataacata aagcaagtga gcgaccttat ctctgtgctt 1380
 cgtgaagcta atcaagcaat taatcccaag ttgcttcagt tggctgaaga cagaggttca 1440

```

ggtcggttcca ggggtagagg aggcatagaag gatgaccgtc gggacagata ctctgcgggc 1500
aaaaggggtg gatttaatac ctttagagac agggaaaatt atgacagagg ttactctagc 1560
ctgcttaaaa gagatttttg ggcaaaaact cagaatggtg ttacagtgc tgcaaattac 1620
accaatggga gctttggaag taattttgtg tctgctggtg tacagaccag ttttaggact 1680
ggtaatccaa cagggactta ccagaatggt tatgatagca ctcagcaata cggaagtaat 1740
gttccaaata tgcacaatgg tatgaaccaa caggcatatg catatcctgc tactgcagct 1800
gcacctatga ttggttatcc aatgccaaca ggatattccc aataa 1845

```

```

<210> 2
<211> 613
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 2
```

```

Met Ser Gly Tyr Ser Ser Asp Arg Asp Arg Gly Arg Asp Arg Gly Phe
1          5          10          15

```

```

Gly Ala Pro Arg Phe Gly Gly Ser Arg Ala Gly Pro Leu Ser Gly Lys
          20          25          30

```

```

Lys Phe Gly Asn Pro Gly Glu Lys Leu Val Lys Lys Lys Trp Asn Leu
          35          40          45

```

```

Asp Glu Leu Pro Lys Phe Glu Lys Asn Phe Tyr Gln Glu His Pro Asp
          50          55          60

```

```

Leu Ala Arg Arg Thr Ala Gln Glu Val Glu Thr Tyr Arg Arg Ser Lys
          65          70          75          80

```

```

Glu Ile Thr Val Arg Gly His Asn Cys Pro Lys Pro Val Leu Asn Phe
          85          90          95

```

```

Tyr Glu Ala Asn Phe Pro Ala Asn Val Met Asp Val Ile Ala Arg Gln
          100          105          110

```

```

Asn Phe Thr Glu Pro Thr Ala Ile Gln Ala Gln Gly Trp Pro Val Ala
          115          120          125

```

```

Leu Ser Gly Leu Asp Met Val Gly Val Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys
          130          135          140

```

```

Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile Asn His Gln Pro
          145          150          155          160

```

```

Phe Leu Glu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Cys Leu Val Leu Ala Pro Thr
          165          170          175

```

Arg Glu Leu Ala Gln Gln Val Gln Gln Val Ala Ala Glu Tyr Cys Arg
 180 185 190
 Ala Cys Arg Leu Lys Ser Thr Cys Ile Tyr Gly Gly Ala Pro Lys Gly
 195 200 205
 Pro Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Val Glu Ile Cys Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Glu Cys Gly Lys Thr Asn Leu Arg
 225 230 235 240
 Arg Thr Thr Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met Leu Asp Met
 245 250 255
 Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Lys Ile Val Asp Gln Ile Arg Pro Asp
 260 265 270
 Arg Gln Thr Leu Met Trp Ser Ala Thr Trp Pro Lys Glu Val Arg Gln
 275 280 285
 Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Asp Tyr Ile His Ile Asn Ile Gly Ala
 290 295 300
 Leu Glu Leu Ser Ala Asn His Asn Ile Leu Gln Ile Val Asp Val Cys
 305 310 315 320
 His Asp Val Glu Lys Asp Glu Lys Leu Ile Arg Leu Met Glu Glu Ile
 325 330 335
 Met Ser Glu Lys Glu Asn Lys Thr Ile Val Phe Val Glu Thr Lys Arg
 340 345 350
 Arg Cys Asp Glu Leu Thr Arg Lys Met Arg Arg Asp Gly Trp Pro Ala
 355 360 365
 Met Gly Ile His Gly Asp Lys Ser Gln Gln Glu Arg Asp Trp Val Leu
 370 375 380
 Asn Glu Phe Lys His Gly Lys Ala Pro Ile Leu Ile Ala Thr Asp Val
 385 390 395 400
 Ala Ser Arg Gly Leu Asp Val Glu Asp Val Lys Phe Val Ile Asn Tyr
 405 410 415
 Asp Tyr Pro Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Ile His Arg Ile Gly Arg Thr
 420 425 430

Ala Arg Ser Thr Lys Thr Gly Thr Ala Tyr Thr Phe Phe Thr Pro Asn
 435 440 445

Asn Ile Lys Gln Val Ser Asp Leu Ile Ser Val Leu Arg Glu Ala Asn
 450 455 460

Gln Ala Ile Asn Pro Lys Leu Leu Gln Leu Val Glu Asp Arg Gly Ser
 465 470 475 480

Gly Arg Ser Arg Gly Arg Gly Gly Met Lys Asp Asp Arg Arg Asp Arg
 485 490 495

Tyr Ser Ala Gly Lys Arg Gly Gly Asn Thr Phe Arg Asp Arg Glu Asn
 500 505 510

Tyr Asp Arg Gly Tyr Ser Ser Leu Leu Lys Arg Asp Phe Gly Ala Lys
 515 520 525

Thr Gln Asn Gly Val Tyr Ser Ala Ala Asn Tyr Thr Asn Gly Ser Phe
 530 535 540

Gly Ser Asn Phe Val Ser Ala Gly Ile Gln Thr Ser Phe Arg Thr Gly
 545 550 555 560

Asn Pro Thr Gly Thr Tyr Gln Asn Gly Tyr Asp Ser Thr Gln Gln Tyr
 565 570 575

Gly Ser Asn Val Pro Asn Met His Asn Gly Met Asn Gln Gln Ala Tyr
 580 585 590

Ala Tyr Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Met Ile Gly Tyr Pro Met Pro
 595 600 605

Thr Gly Tyr Ser Gln
 610



PI0608564-4

1/5

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinação da presença de células cancerosas caracterizado por compreender as etapas de:

(a) fornecimento de uma amostra de tecido;

5 (b) detecção de RNA helicase p68 fosforilada presente na amostra de tecido, em que a detecção da RNA helicase p68 fosforilada na amostra de tecido é uma indicação de células cancerosas na amostra de tecido.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, 10 caracterizado pelo fato de que a RNA helicase p68 fosforilada é detectada com o uso de um anticorpo.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado do grupo que consiste em anticorpos monoclonais, anticorpos 15 policlonais e combinações destes.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a RNA helicase p68 fosforilada é detectada por um método que compreende:

(i) a isolamento de RNA helicase p68 da amostra de 20 tecido; e

(ii) detecção da RNA helicase p68 fosforilada na RNA helicase p68 isolada.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a RNA helicase p68 é isolada 25 com o uso de um anticorpo com especificidade para a RNA helicase p68.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a RNA helicase p68 fosforilada é detectada por um anticorpo capaz de se ligar 30 a um grupo fosfato.

7. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a ligação do anticorpo à RNA helicase p68 fosforilada é detectada com o uso de técnicas de *Western Blot*.

5 8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por também compreender as etapas de extração da amostra de tecido de um paciente.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que um nível elevado de RNA helicase p68 fosforilada na amostra de tecido em relação a um nível de controle de RNA helicase p68 fosforilada, determinado em células não metastáticas, indica uma maior probabilidade para metástase de câncer.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a detecção da RNA helicase p68 fosforilada indica a presença de metástase de câncer.

11. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que RNA helicase p68 fosforilada elevada na amostra de tecido quando comparada a um controle não metastático indica um risco de desenvolvimento de doença metastática.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a detecção de um maior nível da RNA helicase p68 fosforilada na amostra de tecido quando comparada a um nível de RNA helicase p68 fosforilada em pelo menos uma amostra de tecido não metastática é uma indicação da presença de células cancerosas metastáticas na amostra de tecido.

13. Método para determinação da probabilidade para metástase de câncer a partir de uma amostra de tecido

caracterizado por compreender as etapas de:

(a) detecção do nível de RNA helicase p68 fosforilada na amostra de tecido; e

(b) comparação do nível de RNA helicase p68 fosforilada em uma amostra de controle não metastática com o nível da RNA helicase p68 fosforilada na amostra de tecido, em que um nível elevado de RNA helicase p68 fosforilada na amostra em relação à amostra de controle não metastática indica uma maior probabilidade para metástase de câncer.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por também compreender a etapa de:

(c) determinação e comparação do nível de RNA helicase p68 fosforilada expressa em células não metastáticas para uso como o padrão de controle.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a RNA helicase p68 fosforilada é detectada por um método que compreende:

(i) a isolamento de RNA helicase p68 a partir da amostra de tecido; e

(ii) detecção da RNA helicase p68 fosforilada na RNA helicase p68 isolada.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o nível de RNA helicase p68 fosforilada na amostra de tecido está correlacionado com a probabilidade de que a amostra de tecido contenha células cancerosas metastáticas.

17. Método para uso de RNA helicase p68 fosforilada para rastrear células cancerosas para metástase cancerosa caracterizado por compreender as etapas de:

(a) fornecimento de uma amostra de tecido para ser rastreada para células metastáticas;

(b) preparação da amostra de tecido para rastreamento;

(c) rastreamento da amostra de tecido com um agente de
5 reconhecimento que reage com RNA helicase p68 fosforilada humana; e

(d) detecção da presença da RNA helicase p68 fosforilada por detecção da reação do agente de reconhecimento à RNA helicase p68 fosforilada na amostra de
10 tecido preparada, em que a detecção de um maior nível da ligação do agente à RNA helicase p68 fosforilada humana na amostra preparada quando comparada à amostra de tecido não metastática é uma indicação da presença de células cancerosas metastáticas na amostra de tecido.

15 18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a RNA helicase p68 fosforilada é detectada por um método que compreende:

(i) a isolamento de RNA helicase p68 a partir da amostra de tecido com o uso de um anticorpo para RNA helicase p68;
20 e

(ii) detecção da RNA helicase p68 fosforilada na RNA helicase p68 isolada com o uso de um anticorpo para grupos fosfato.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por também compreender a etapa de:
25

(c) determinação e comparação dos níveis de RNA helicase p68 fosforilada expressa em células não metastáticas para uso como o padrão de controle.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o nível de RNA helicase p68
30

fosforilada detectado em comparação com os controles que compreendem níveis conhecidos de RNA helicase p68 fosforilada.

FIG. 1

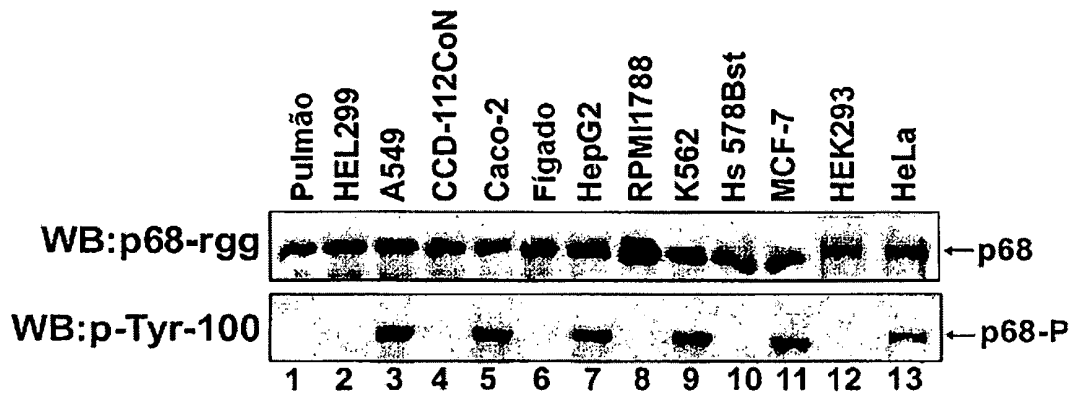


FIG. 2A

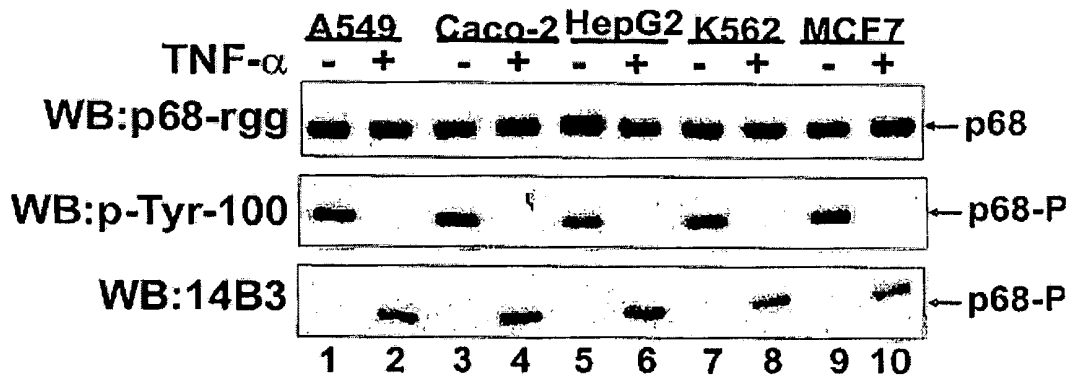


FIG. 2B

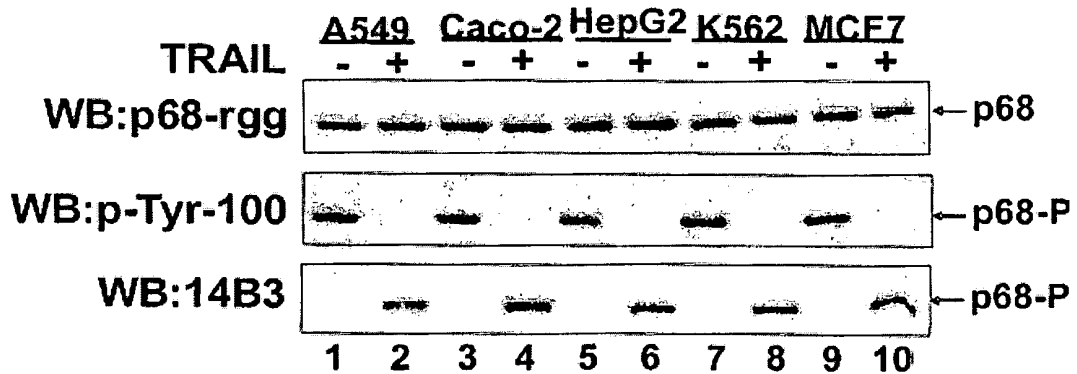


FIG. 3A

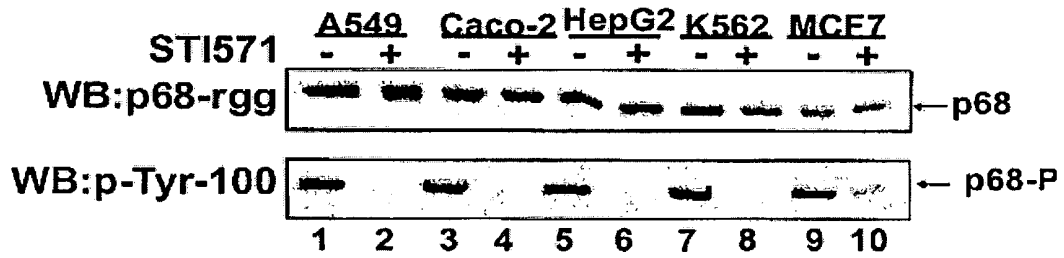


FIG. 3B

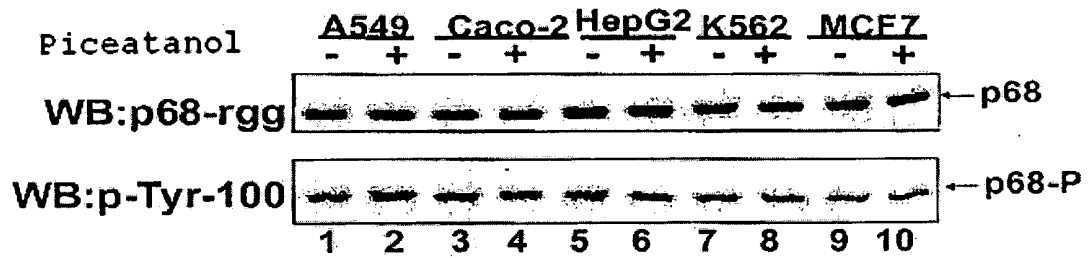


FIG. 3C

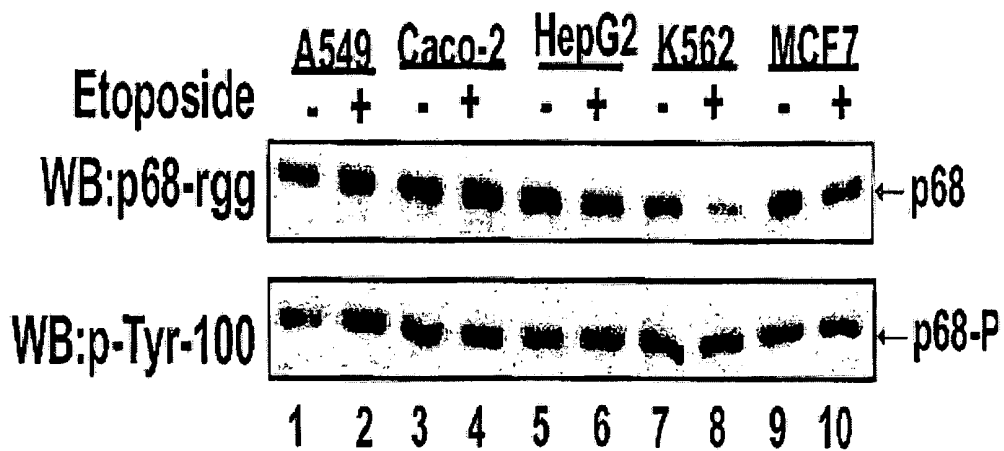


FIG. 3D

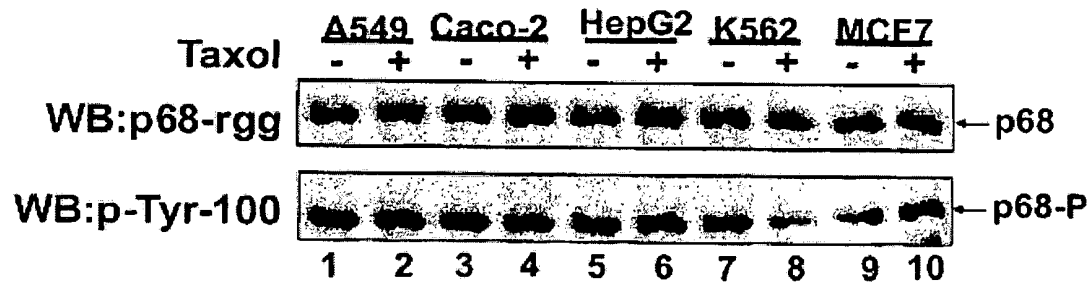


FIG. 4A

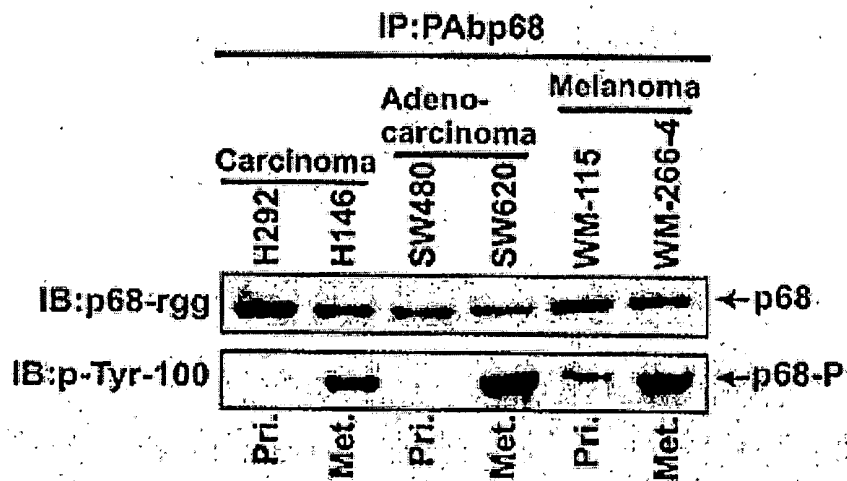


FIG. 4B

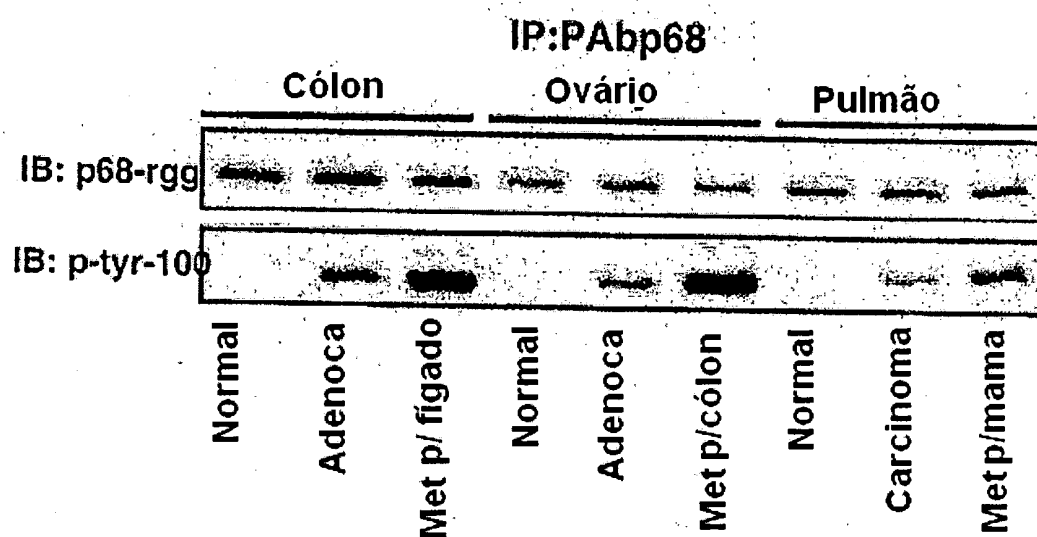
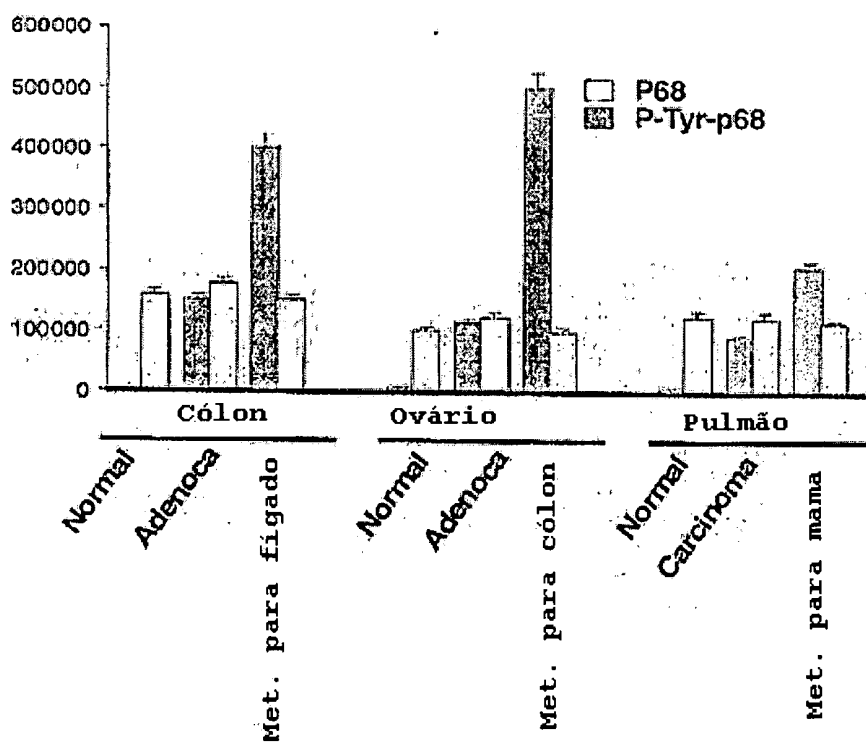


FIG. 4C



5 CANCEROSAS PARA METÁSTASE CANCEROSA

Um método para determinação da presença de células cancerosas em uma amostra de tecido ou amostra de células por detecção da presença de RNA helicase p68 fosforilada na amostra. Além disso, um método para determinação da presença de células cancerosas metastáticas em uma amostra de tecido ou amostra de células por detecção do nível de RNA helicase p68 fosforilada na amostra de modo que um maior nível da proteína fosforilada na amostra quando comparada a células não metastáticas é uma indicação das células cancerosas metastáticas na amostra.