



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 745**

51 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02788246 .3**
96 Fecha de presentación : **23.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1456364**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54 Título: **Mutaciones en el gen B-raf.**

30 Prioridad: **21.12.2001 GB 0130796**
24.12.2001 US 344684 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2011

73 Titular/es: **THE WELLCOME TRUST**
183 Euston Road
London NW1 2BE, GB

72 Inventor/es: **Stratton, Mike;**
Futreal, Andy;
Wooster, Richard;
Marais, Richard M. y
Marshall, Chris

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 362 745 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutaciones en el gen *B-raf*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los mutantes específicos de cáncer de los genes *B-raf* y a las utilizaciones de los mismos en la detección de células anómalas y de cáncer. Además, la invención describe procedimientos para el diagnóstico del cáncer, la detección de células cancerosas en sujetos y el desarrollo de los agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

10 **Introducción**

El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano a cualquier edad. La mayoría de los cánceres detectados en un estadio precoz son potencialmente curables; por tanto, la capacidad de examinar pacientes para detectar signos precoces de cáncer, y permitir así la intervención temprana, resulta sumamente deseable (véase, por ejemplo, the Merck Manual of Diagnosis and Therapy (1992) 16ª ed., Merck & Co).

Las células cancerosas presentan un crecimiento no regulado, una falta de diferenciación, y una capacidad para invadir tejidos locales y para metastatizar. Por tanto, las células cancerosas son células distintas de las normales, y pueden identificarse potencialmente no sólo por sus rasgos fenotípicos, sino también por sus características bioquímicas y de biología molecular. Tales características son determinadas a su vez por cambios en las células cancerosas que se producen a nivel genético en un subconjunto de genes celulares conocidos como oncogenes, que controlan directa o indirectamente el crecimiento y la diferenciación celular.

La familia de oncogenes Raf incluye tres genes altamente conservados denominados *A-*, *B-* y *C-raf* (también denominados *raf-1*). *C-Raf*, el miembro mejor caracterizado de la familia *raf*, es el homólogo celular de *v-raf*, el gen transformante del virus del sarcoma murino 3611. El oncogén *raf* viral codifica para una proteína que carece de las secuencias amino-terminales de la proteína Raf normal. Estas secuencias amino-terminales son cruciales para la regulación de la actividad serina/treonina-proteína cinasa de RAF, y su delección o sustitución da como resultado la actividad constitutiva de la proteína RAF codificada por el oncogén. Esta actividad no regulada estimula la proliferación celular, lo que da como resultado la transformación celular. Se ha afirmado que el ADN de algunos tumores contiene una actividad transformante detectable mediante la transfección de ADN de las células NIH/3T3, identificadas como derivadas de *C-raf-1* truncado. Sin embargo, es probable que estos resultados sean artefactos de la transfección ya que no se han encontrado las mismas mutaciones en los tumores de los que provenía el ADN transformante. Las mutaciones creadas de manera artificial en el gen *C-raf*, cuando se introducen en las células *in vitro* pueden inducir transformación.

El gen *b-raf* es el homólogo humano del protooncogén *c-Rmil* de aves que codifica una serina/treonina cinasa de 94 kD detectada en células de aves. Esta proteína contienen secuencias amino-terminales no encontradas en otras proteínas de la familia génica *mil/raf*. Estas secuencias están codificadas por 3 exones en el genoma aviar. Eychene *et al.* (1992) *Oncogene* 7: 1657-1660 notificaron que estos 3 exones se conservan en el gen *B-raf* humano y que codifican para una secuencia de aminoácidos similar a la del gen de aves. Se identificaron 2 loci de *B-raf* humanos: *B-raf 1*, que se mapeó en 7q34 mediante hibridación *in situ* con fluorescencia y que se demostró que codifican para el producto génico funcional, y *B-raf 2*, un pseudogén procesado inactivo ubicado en Xq13.

Al examinar una biblioteca de ADNc de ratón con una sonda de oncogén *v-raf*, Huebner *et al.* (1986) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 3934-3938 aislaron un ADNc relacionado con *raf* transformante, *A-raf*, que representó un gen distinto de *raf1*. El locus de *A-raf* individual del ratón y el locus de *A-raf1* del hombre se transcriben de manera activa en varias líneas celulares de ratón y humanas. La secuencia de 606 aminoácidos completa del oncogén *A-raf1* humano se ha deducido a partir de la secuencia de 2.453 nucleótidos del ADNc. El gen *A-raf* está ligado al cromosoma X.

Un mecanismo conocido para la conversión de protooncogenes en oncogenes es la aparición de mutaciones individuales en la secuencia de ADN, conocidas como mutaciones puntuales, que dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. Por ejemplo, los oncogenes ras no están presentes en las células normales, pero sus homólogos oncogénicos están presentes en todas las células. Las proteínas Ras de tipo natural son proteínas de unión a GTP pequeñas que están implicadas en la traducción de señales. Sin embargo, muchos oncogenes ras de virus y tumores humanos presentan una mutación puntual en el codón número 12: el codón GGC que normalmente codifica para una glicina se cambia por GTC, que codifica para una valina. Se ha informado de múltiples mutaciones en este codón, que incluyen por lo menos 5 sustituciones diferentes que se activan. Este cambio de un solo aminoácido impide la actividad GTPasa de la proteína Ras, y hace que Ras se active constitutivamente, dado que permanece unido a GTP. Los aminoácidos en las posiciones 13 y 61 también se cambian frecuentemente en los oncogenes ras de tumores humanos. La proteína Raf es una serina/treonina cinasa que está relacionada estructuralmente con la familia de la proteína cinasa C (PKC), y es esencial en el crecimiento y la diferenciación celular. Las proteínas Raf están implicadas en la transducción de señales en la activación de MAP cinasa, que está altamente conservada en organismos eucariotas. Las MAP cinasas (proteína cinasas activadas por

mitógeno), que incluyen ERK1 y ERK2, fosforilan directamente los factores de transcripción para regular los acontecimientos biológicos. Las MAPKK (MAP cinasa cinasas) y MAPKKK (MAPKK cinasas) regulan a su vez las MAP cinasas.

5 La proteínas Raf son MAPKKK y se cree que fosforilan la MAPKK MEK *in vivo* en sistemas biológicos de mamíferos. Distintos genes *raf* codifican para A-Raf, B-Raf y Raf-1 (también conocidos como c-Raf) en vertebrados (revisado en Papin *et al.*, 1998; Oncogene 12:2218-2221). Las tres proteínas no son iguales en su capacidad para activar MEK. A-Raf, el elemento peor caracterizado de la familia, parece ser un mal activador de MEK, resultando difícil la medición de su actividad (Pritchard *et al.*, 1995, Mol. Cell. Biol. 15, 6430-6442). B-Raf y Raf-1 también difieren en su capacidad para activar MEK. Mientras que Raf-1 se expresa de manera ubicua, B-Raf presenta los niveles de expresión más altos en los tejidos neurales (Barnier *et al.*, 1995, J. Biol. Chem. 270, 23381-23389). Sin embargo, se ha identificado B-Raf como el principal activador de MEK, incluso en células en las que su expresión apenas puede detectarse mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (Catling *et al.*, 1994; Jaiswal *et al.*, 1994; Reuter *et al.*, 1995; Huser *et al.*, 2001; Mikula *et al.*, 2001). Consecuentemente, B-Raf presenta una afinidad mayor por MEK-1 y MEK-2 que Raf-1 (Papin *et al.*, 1996; Papin *et al.*, 1998) y es más eficaz en la fosforilación del MAPKK MEK.

El activador anterior de B-Raf es la Ras GTPasa. Es conocido que existen varias isoformas de Ras en mamíferos; N-Ras, Ha-Ras, Ki-Ras4A y Ki-Ras4B. Otras GTPasas de la superfamilia de Ras también puede interaccionar con B-Raf. Por ejemplo Rap-1, revisado en Peysonnaux *et al.*, (2001) Biology of the Cell 93:53-62 parece que es un activador selectivo de B-Raf.

Sumario de la invención

25 En la presente memoria se describen mutaciones puntuales en los productos del gen *B-raf*. Las mutaciones puntuales descritas se identifican en tumores humanos de origen natural. Estas mutaciones puntuales están asociadas con fenotipos cancerosos y pueden utilizarse como base para el diagnóstico del cáncer, las células cancerosas o una predisposición al cáncer en sujetos humanos.

30 Dado que muchas de la(s) ruta(s) de señalización que están mediadas por la activación de la actividad cinasa de B-Raf están implicadas en el control de la proliferación celular y la transformación oncogénica, sería deseable que pudieran detectarse rápidamente cambios en el gen *B-raf* que pueden dar como resultado un carácter oncogénico.

35 Por tanto, en un primer aspecto, se proporciona un mutante asociado con cáncer que se produce de manera natural de un polipéptido B-Raf humano que comprende una o más mutaciones.

Preferentemente, el mutante asociado con cáncer se aísla de un tumor humano primario que se produce de manera natural.

40 Preferentemente, la mutación es en el dominio cinasa de B-Raf.

La presente invención proporciona varias mutaciones de este tipo, que se ha descubierto que están asociadas con un fenotipo canceroso en cánceres humanos; y por tanto establece un vínculo entre las mutaciones de B-Raf y el cáncer *in vivo*.

45 Preferentemente, la mutación es una mutación puntual. Las mutaciones pueden asimismo incluir cambios tales como inserciones, deleciones o sustituciones de uno o más de un nucleótido, preferentemente de 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos.

50 Ventajosamente, las mutaciones se ubican en el extremo C-terminal para el aminoácido 300 en B-Raf. Las posiciones preferidas son 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 y 599.

En la forma de realización más preferida, las mutaciones se seleccionan de entre el grupo constituido por V599E, V599D, G595R, G465V, G465E, G465A, G468A, G468E, E585K, F594L, G595R, L596V, L596R y G463E.

55 Preferentemente, se aísla el polipéptido.

La invención comprende además fragmentos de los polipéptidos según la invención, incluyendo dichos fragmentos la mutación tal como se describe.

60 En un segundo aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica para un polipéptido B-Raf mutante o fragmento del mismo según la presente invención. Preferentemente, el ácido nucleico comprende una o más mutaciones puntuales.

65 Preferentemente, se aísla el ácido nucleico.

Se han detectado mutaciones puntuales en los genes *B-raf* que muestran asociación con tumores. Ventajosamente, la mutación puntual se produce en una o más de las posiciones 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 y 1786 de *B-raf*. Preferentemente, la mutación puntual es G1388T, G1783C, TG1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, T1787G o C1786G en *B-raf*. La invención proporciona además el complemento de cualquier ácido nucleico descrito anteriormente.

En otra forma de realización, se proporciona un ácido nucleico que se hibrida específicamente con un ácido nucleico según la invención, tal como se describe en la presente memoria. Un ácido nucleico de este tipo puede ser, por ejemplo, un cebador que dirige la amplificación específica de un ácido nucleico mutante que codifica para B-Raf según la invención en una reacción de amplificación de ácido nucleico.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un ligando que se une selectivamente a un polipéptido B-Raf mutante según la invención.

Un ligando de este tipo es ventajosamente una inmunoglobulina, y es preferentemente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Según un cuarto aspecto, se proporciona un procedimiento para la detección de la transformación celular que comprende las etapas siguientes:

(a) aislar una muestra de material celular de un sujeto;

(b) examinar el material de ácido nucleico de por lo menos parte de uno o más genes *B-raf* en dicho material celular; y

(c) determinar si tal material de ácido nucleico comprende una o más mutaciones en una secuencia que codifica para un polipéptido B-Raf.

Ventajosamente, la mutación es una mutación puntual.

Ventajosamente, la mutación se produce en una o más de las posiciones 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 y 1786 de *B-raf*. Preferentemente, la mutación puntual es G1388T, G1783C, TG1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, T1787G o C1786G en *B-raf*.

Las mutaciones identificadas según la invención son ventajosamente mutaciones somáticas, que se han producido en tejido somático y no se transmiten a través de la línea germinal. Por tanto, la invención se refiere además a un procedimiento para la detección de la transformación celular, que comprende las etapas siguientes:

(a) aislar una primera muestra de material celular de un tejido de un sujeto que se sospecha que sea canceroso, y una segunda muestra de material celular de un tejido no canceroso del mismo sujeto;

(b) examinar el material de ácido nucleico de por lo menos parte de uno o más genes *B-raf* en ambas de dichas muestras de material celular; y

(c) determinar si tal material de ácido nucleico comprende una o más mutaciones puntuales en una secuencia que codifica para un polipéptido B-Raf; y estado dicha mutación presente en el material celular del tejido que se sospecha que es canceroso pero no presente en el material celular del tejido no canceroso.

La invención proporciona además un procedimiento para la detección de la transformación celular, que comprende las etapas siguientes:

(a) obtener una muestra de material celular de un sujeto;

(b) seleccionar dicha muestra con un ligando que se une selectivamente a un polipéptido B-Raf mutante según la invención; y

(c) detectar uno o más polipéptidos B-Raf mutantes en dicha muestra.

Todavía en otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar uno o más compuestos que presentan actividad antiproliferativa, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar uno o más polipéptidos B-Raf mutantes según la presente invención;

(b) poner en contacto dicho(s) polipéptido(s) con uno o más compuestos que van a someterse a prueba; y

(c) detectar una interacción entre dicho uno o más compuestos y dichos polipéptidos mutantes.

Preferentemente, la interacción es una interacción de unión.

Además, la invención proporciona un ensayo para identificar uno o más compuestos que presentan actividad antiproliferativa, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar uno o más polipéptidos B-Raf mutantes según la presente invención;

(b) proporcionar un sustrato posterior para el polipéptido B-Raf;

(c) detectar la modificación del sustrato en presencia del/de los compuesto(s) que va(n) a someterse a prueba.

B-Raf es una proteína cinasa, y por consiguiente los sustratos, por tanto, pueden fosforilarse o defosforilarse. Preferentemente, la acción de B-Raf mutante en el sustrato da como resultado un cambio detectable en el mismo. Ventajosamente, el sustrato es una cinasa o fosfatasa adicional, que modifica a su vez una tercera molécula en la que se produce un cambio detectable.

Por ejemplo, el sustrato puede ser MEK cinasa. La fosforilación de MEK puede detectarse directamente, o, preferentemente se detecta a través de la activación de MEK para fosforilar la MAP cinasa.

Ventajosamente, se establece una actividad de referencia de B-Raf mutante en el sustrato, y se compara la actividad en presencia y/o ausencia del/de los compuesto(s) que va(n) a someterse a prueba con el valor de referencia. Una disminución en la actividad de B-Raf mutante es indicativa de una reducción en la actividad proliferativa.

La invención proporciona además un ensayo a base de células para seleccionar compuestos para detectar su actividad antiproliferativa. En una primera forma de realización, la invención proporciona un ensayo de formación de focos de 3T3 que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar un cultivo de células NIH 3T3;

(b) transfectar dichas células con un ácido nucleico de *B-raf* mutante según la invención;

(c) exponer las células a uno o más compuesto(s) que va(n) a someterse a prueba; y

(d) determinar la diferencia en el número de focos formados entre las células transfectadas expuestas a dicho(s) compuesto(s) que van a someterse a prueba y las células transfectadas no expuestas de ese modo.

El ensayo a base de células se realiza comúnmente utilizando células NIH 3T3. Sin embargo, pueden utilizarse otros tipos de células, especialmente células de fibroblastos, en un ensayo de este tipo.

Ventajosamente, se establece una actividad de formación de focos de referencia de un gen *B-raf* mutante en las células utilizadas en el ensayo, y se compara la actividad en presencia y/o ausencia del/de los compuesto(s) que va(n) a someterse a prueba con el valor de referencia. Una disminución en la actividad de formación de focos del gen *B-raf* mutante es indicativa de una reducción en la actividad proliferativa y por tanto de la actividad antiproliferativa en el/los compuesto(s) que va(n) a someterse a prueba.

También se proporcionan procedimientos automatizados y aparatos para la detección de mutaciones según la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A: Ensayos de actividad de B-Raf. Se midió la actividad cinasa de B-Raf en un ensayo en cascada de cinasas con inmunoprecipitación, utilizando MBP como sustrato final. La actividad se muestra como el número de cuentas incorporadas en el MBP. El ensayo se realizó por triplicado y se muestra el promedio, con barras de error para representar las desviaciones de la media. Se muestran tanto la actividad cinasa basal (barras abiertas) como las actividades cinasa estimuladas por ¹²⁵I-Ras (barras sombreadas).

Figura 1B: Ensayos de actividad de B-Raf. Se midió la actividad cinasa de B-Raf en un ensayo en cascada de cinasas con inmunoprecipitación, utilizando MBP como sustrato final. La actividad se muestra como el número de cuentas incorporadas en MBP. El ensayo se realizó por triplicado y se muestra el promedio, con barras de error para representar las desviaciones de la media. Se muestran tanto la actividad cinasa basal (barras abiertas) como las actividades cinasa estimuladas por ¹²⁵I-Ras.

Figura 2: Transformación de células NIH3T3 por B-Raf y mutantes activantes. Se transfectaron las células con los constructos indicados y se determinó el número de colonias. Los resultados son el promedio de por lo menos tres ensayos. Se muestra el número de colonias en relación con el número inducido por B-Raf.

Figura 3A. V599D es una mutación activante en BRAF. Se expresaron BRAF o ^{V599}DBRAF solos, o junto con Ras oncogénico tal como se indica. Se determinó la actividad de las proteínas BRAF utilizando un ensayo en cascada de cinasas con inmunoprecipitación en el que se utiliza BRAF inmunoprecipitado para activar secuencialmente MEK y ERK. Se determina la activación de ERK utilizando proteína básica de mielina y [³²P]-γATP como sustratos.

Figura 3B. Inhibición de ERK en líneas celulares de melanoma utilizando reactivos farmacológicos. Se trataron células WM266.4 o A375P con U0126 10 μM, BAY 43-9006 10 μM o DMSO como control. Se resolvieron cantidades equivalentes de proteínas celulares en geles de SDS y se determinaron los niveles de ERK activa utilizando el anticuerpo antipERK.

Figura 4. Inhibición del crecimiento celular por agentes farmacológicos. Se incubaron células WM-266.4 en presencia de U0126 (10 μM) o BAY 43-9006 (10 μM) o el control de vehículo (DMSO). Tras 48 horas, se determinó la síntesis de ADN incubando las células con [³H]-timidina y se determinaron los niveles de timidina incorporada en el ADN celular.

Figura 5A. La expresión de CRAF se suprime con ARNip. Se trataron células WM-266.4, Colo 829 o BE con una sonda de ARNip específica para CRAF (CRAF), la sonda de ARNip mezclada (mezclada), oligofectamina (oligo) o sin tratar (control). Se incubaron las células durante 24 horas y se determinaron los niveles de proteína CRAF mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Figura 5B. La expresión de BRAF se suprime con ARNip. Se trataron células WM-266.4, Colo 829 o BE con una sonda de ARNip específica para BRAF, la sonda de ARNip mezclada, o se dejaron sin tratar tal como se muestra. Se incubaron las células durante 24 horas y se sometieron a prueba los niveles de actividad de BRAF utilizando un ensayo de MEK y ERK cinasas con inmunoprecipitación como ensayos secuenciales. Se determinó la actividad de ERK utilizando MBP y [³²P]-γATP como sustratos.

Figura 6. La eliminación de BRAF, pero no de CRAF bloquea la actividad de ERK en células de melanoma. Se trataron células WM-266.4 o Colo 829 con una sonda de ARNip específica para BRAF (BRAF), o el control mezclado (sBRAF), o una sonda específica para CRAF (CRAF), o su control mezclado (sCRAF), u oligofectamina (oligo) o se dejaron sin tratar (control) tal como se indica. Se incubaron las células las veces indicadas, y se trataron células Colo 829 durante 24 horas. Se determinaron los niveles de actividad de ERK en cantidades equivalentes de extracto celular mediante inmunotransferencia de tipo Western con el anticuerpo antipERK.

Figura 7. La eliminación de BRAF, pero no de CRAF induce apoptosis en células de melanoma. Se trataron células WM-266.4 con una sonda de ARNip específica para BRAF (BRAF), o el control mezclado (sBRAF), o una sonda de ARNip específica para CRAF (CRAF), o U0126, o DMSO (oligo) o se dejaron sin tratar (control) tal como se indica. Se incubaron las células durante 96 horas y se analizó el perfil del ciclo celular mediante FACS, o se examinó la expresión de PARP mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Figura 8. Validación de la actividad de B-Raf y GST-MKK1. Ensayo realizado utilizando lisado de B-Raf en WTS 1 (Lote A), GST-MKK1 (6,5 μg/ml) y ERK2 (cinasa competente, 100 μg/ml) para medir la incorporación de ³³P-γ-fosfato en MBP (0,3 mg/ml). Los datos representados son la media ± DE de determinaciones por triplicado.

Figura 9. Evaluación de la placa de filtro y plataforma de ensayo radiométrico con FlashPlate. Ensayo realizado utilizando lisado de B-Raf en WTS1 (lote A) y GST-MKK1 (6,5 μg/ml) para medir la incorporación de ³³P-γ-fosfato en GST-kdERK2 (100 μg/ml). Los datos representados son la media ± DE de determinaciones por triplicado.

Figura 10. Evaluación de plataforma de ensayo no radiométrica DELFIA. Se unieron previamente 100 ng de GST-kdERK2 a cada pocillo seguido por la adición del lisado de B-Raf (Lote A), GST-MKK1 (6,5 μg/ml) y ATP (500 μM). Los datos representados son la media ± DE de determinaciones por triplicado.

Figura 11. Valoración de antifosfo-ERK2 en un ensayo DELFIA. Se unieron previamente 100 ng de GST-kdERK2 al pocillo seguido por la adición del lisado de B-Raf (Lote A), GST-MKK1 (6,5 μg/ml) y ATP (500 μM). Los datos representados son la media de determinaciones por duplicado.

Figura 12. Valoración del anticuerpo secundario marcado con europio en un ensayo DELFIA. Se unieron previamente 100 ng de GST-kdERK2 al pocillo seguido por la adición del lisado de B-Raf (Lote A), GST-MKK1 (6,5 μg/ml) y ATP (500 μM). Los datos representados son la media de determinaciones por duplicado.

Figura 13. Evaluación del protocolo de ensayo homogéneo. Se realizó el ensayo homogéneo en una placa de 96 pocillos utilizando un volumen de reacción de 50 μl que contenía un lisado de B-Raf (Lote B), GST-MKK1 6,5 μg/ml, GST-kdERK2 80 μg/ml y ATP 500 μM. Los datos representados son la media ± DE de determinaciones por triplicado.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado apreciado comúnmente por un experto ordinario en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Las técnicas convencionales se utilizan para procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos. Véanse, generalmente, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc.; así 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 Volumen 1, Oxford University Press, (1991), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2ª Ed. (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. Nueva York, N.Y.), y Gene Transfer and Expression Protocols, págs. 109-128, ed. E. J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.).

Definiciones

La presente solicitud describe mutantes de polipéptido B-Raf. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polipéptido RAF" se utiliza para indicar un polipéptido de la familia RAF. RAF fue el primero identificado en un virus único de tipo C de ratón de replicación defectuosa sumamente transformante clonado, que contenía un oncogén *v-raf* (Rapp, *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. 80: 4218-4222, 1983). El homólogo celular, *c-raf*, está presente en el ADN de mamífero. Posteriormente se han descubierto otros homólogos en seres humanos y aves, en los que se ha mostrado que *raf* es el homólogo del oncogén aviar *mil*. B-Raf está relacionado con RAF, pero presenta tres exones N-terminales. Por tanto, el término "B-Raf" comprende todos los homólogos y las variantes de B-Raf humano conocidos, así como otros polipéptidos que muestran suficiente homología con B-Raf para ser identificados como homólogos de B-Raf. El término no incluye ARAF, CRAF o RAF1. Preferentemente, se identifica B-Raf como polipéptido que presenta la secuencia mostrada en el n.º de registro NP_004324, n.º de registro de ácido nucleico NM_004333. El término "B-Raf" comprende preferentemente polipéptidos que son homólogos en un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% con NP_004324. Las comparaciones de homología pueden realizarse a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias disponibles fácilmente. Estos programas informáticos comercializados pueden calcular la homología en porcentaje (%) entre dos o más secuencias.

Puede calcularse el porcentaje de homología en secuencias contiguas, es decir se alinea una secuencia con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina una alineación "sin huecos". Normalmente, se realizan tales alineaciones sin huecos sólo en un número relativamente corto de residuos (por ejemplo menos de 50 aminoácidos contiguos).

Aunque se trata de un procedimiento muy sencillo y compatible, no considera que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o deleción provocará que los siguientes residuos de aminoácido se coloquen fuera de alineación, dando así potencialmente como resultado una gran reducción en el % de homología cuando se realiza una alineación global. Por consiguiente, la mayoría de procedimientos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que consideran posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se logra insertando "huecos" en la alineación de la secuencia para tratar de aumentar al máximo la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan una "penalización de hueco" a cada hueco que se produce en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con el menor número de huecos posible, lo que refleja una relación superior entre las dos secuencias comparadas, logrará una puntuación superior que una con muchos huecos. Normalmente se utilizan los "costes por afinidad de hueco" que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalización inferior para cada residuo posterior en el hueco. Esto es el sistema de puntuación de hueco más utilizado comúnmente. De hecho, altas penalizaciones de hueco producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten que se modifiquen las penalizaciones de hueco. Sin embargo, resulta preferido utilizar los valores por defecto cuando se utiliza un software de este tipo para comparaciones de secuencia. Por ejemplo, cuando se utiliza el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase más adelante) la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

Por tanto, el cálculo del % de homología máximo requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, considerando las penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo una alineación de este tipo es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Los ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias comprenden de manera no limitativa el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* - Capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda en línea y fuera de línea (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, páginas de 7-58 a 7-60). Sin embargo, resulta preferido utilizar el programa GCG Bestfit.

Aunque puede medirse el % de homología final en términos de identidad, el propio proceso de alineación no se basa normalmente en una comparación por pares de todo o nada. En cambio, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basada en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo utilizada comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin utilizan generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministra (véase el manual del usuario para detalles adicionales). Resulta preferido utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El software realiza normalmente esto como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Un "fragmento" de un polipéptido según la invención es un fragmento de polipéptido que comprende el/los aminoácido(s) mutante(s) descrito(s) según la invención. El fragmento puede ser de cualquier longitud hasta la longitud completa del polipéptido B-Raf; por tanto comprende los polipéptidos B-Raf que se han truncado en algunos aminoácidos, así como unos fragmentos más cortos. Ventajosamente, los fragmentos presentan entre aproximadamente 764 y aproximadamente 5 aminoácidos de longitud; preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud; ventajosamente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Los fragmentos según la invención son útiles, entre otras cosas, para la inmunización de animales para producir anticuerpos. Por tanto, los fragmentos de polipéptidos según la invención comprenden ventajosamente por lo menos un determinante antigénico (epítipo) característico de B-Raf mutante tal como se describe en la presente memoria. Puede determinarse fácilmente si un fragmento de polipéptido particular conserva tales propiedades antigénicas mediante procedimientos de rutina conocidos en la técnica. Se descubre que los péptidos compuestos por sólo seis residuos de aminoácido a menudo provocan una respuesta inmunitaria.

Un "ácido nucleico" de la presente invención es un ácido nucleico que codifica para un polipéptido B-Raf humano tal como se describió anteriormente. La expresión incluye además los polinucleótidos que pueden hibridarse, en condiciones de hibridación rigurosas, con los ácidos nucleicos que se producen de manera natural identificados anteriormente, o el complemento de los mismos. "Condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a una incubación durante la noche a 42°C en una disolución que comprende formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado 20 pg/ml, seguido por lavado de los filtros en SSC 0,1x a aproximadamente 65°C.

Aunque los ácidos nucleicos, tal como se denominan en la presente memoria, generalmente son ácidos nucleicos naturales encontrados en la naturaleza, la expresión puede incluir dentro de su alcance modificado, ácidos nucleicos artificiales que presentan estructuras principales o bases modificadas, tal como se conocen en la técnica.

Un ácido nucleico que codifica para un fragmento según la invención puede ser el resultado de la amplificación del ácido nucleico de una región específica de un gen *B-raf*, que incorpora una mutación según la presente invención.

Un polipéptido o ácido nucleico "aislado", tal como se denomina en la presente memoria, se refiere a un material retirado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural en el que se produce en la naturaleza), y por tanto alterado por la mano del hombre con respecto a su estado original. Por ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o una composición de materia, o podría estar contenido dentro de una célula, y todavía ser "aislado" porque este vector, esta composición de materia, o célula particular no es el entorno original del polinucleótido. Preferentemente, el término "aislado" no se refiere a bibliotecas genómicas o de ADNc, células completas totales o preparaciones de ARNm, preparaciones de ADN genómico (incluyendo las separadas mediante electroforesis y transferidas sobre inmunotransferencias), preparaciones de ADN genómico cortado de células completas u otras composiciones en las que la técnica no demuestra ninguna características de distinción de los polipéptidos/ácidos nucleicos de la presente invención.

Los polipéptidos según la invención comprenden una o más mutaciones. Las "mutaciones" incluyen adición, delección o sustitución de aminoácidos; ventajosamente, se refiere a sustituciones de aminoácidos. Tales mutaciones a nivel de polipéptido se reflejan a nivel de ácido nucleico por la adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos. Generalmente, tales mutaciones no alteran el marco de lectura del ácido nucleico. Ventajosamente, los cambios a nivel de ácido nucleico son mutaciones puntuales, en las que se sustituye un solo nucleótido por otro, alterando el codón del cual forma parte para especificar un aminoácido diferente.

Las mutaciones en B-Raf identificadas en la presente invención se producen de manera natural, y no se han inducido intencionadamente en las células o tejido mediante la aplicación de carcinógenos u otros factores tumorigénicos. Por tanto, las mutaciones identificadas en la presente memoria reflejan de manera precisa la tumorigénesis natural en tejidos humanos *in vivo*. Su detección constituye, por tanto, una base mucho mejor para el diagnóstico que la detección de mutaciones identificadas en roedores tras la inducción química artificial de tumores.

Una mutación “somática” es una mutación que no se transmite a través de la línea germinal de un organismo, y se produce en tejidos somáticos del mismo. Ventajosamente, una mutación somática es una determinada como somática mediante el análisis de muestras en parejas de tumor/normal.

Toda la numeración de ácidos nucleicos y nucleótidos utilizada en la presente memoria comienza en el aminoácido +1 del polipéptido B-Raf o en el primer ATG de la secuencia de nucleótido que lo codifica.

Las reacciones de “amplificación” son reacciones de ácido nucleico que dan como resultado la amplificación específica de ácidos nucleicos diana con respecto a ácidos nucleicos que no son diana. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción de amplificación bien conocida.

Una “inmunoglobulina” es una de una familia de polipéptidos que conserva la característica de plegamiento de las inmunoglobulinas de las moléculas de inmunoglobulina (anticuerpo), que contiene dos láminas β y, habitualmente, un puente disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas están implicados en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo papeles muy extendidos en el sistema inmunitario (por ejemplo, anticuerpos, moléculas de receptor de células T y similares), implicación en la adhesión celular (por ejemplo las moléculas de ICAM) y la señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como el receptor de PDGF). La presente invención puede aplicarse preferentemente a anticuerpos, que pueden unirse a antígenos diana con alta especificidad.

Los “anticuerpos” pueden ser anticuerpos completos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, la invención incluye fragmentos tales como Fv y Fab, así como Fab' y F(ab')₂, y variantes de anticuerpos tales como scFv, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos Dab y otras moléculas basadas en anticuerpos de unión a antígenos.

“Cáncer” se utiliza en la presente memoria para hacer referencia al crecimiento neoplásico que surge de la transformación celular a un fenotipo neoplásico. Tal transformación celular implica a menudo mutación genética; en el contexto de la presente invención, la transformación implica mutación genética mediante la alteración de uno o más genes *B-raf* tal como se describe en la presente memoria.

Procedimientos de detección de ácidos nucleicos

Puede utilizarse la detección de ácidos nucleicos mutantes que codifican para B-Raf, en el contexto de la presente invención, para diagnosticar la presencia o la predisposición a la transformación celular y el cáncer. Puesto que las mutaciones en genes *B-raf* se producen generalmente a nivel del ADN, los procedimientos de la invención pueden basarse en la detección de mutaciones en ADN genómico, así como en los propios transcritos y proteínas. Puede desearse confirmar las mutaciones en el ADN genómico mediante el análisis de los transcritos y/o polipéptidos, con el fin de garantizar que la mutación detectada se exprese, en efecto, en el sujeto.

Las mutaciones en el ácido nucleico genómico se detectan ventajosamente mediante técnicas basadas en el cambio de movilidad en fragmentos de ácido nucleico amplificados. Por ejemplo, Chen *et al.*, Anal Biochem 1996 Jul 15;239(1):61-9, describen la detección de mutaciones de una sola base mediante un ensayo competitivo de cambio de movilidad. Además, los ensayos basados en la técnica de Marcelino *et al.*, BioTechniques 26(6): 1134-1148 (Junio de 1999) están comercializados.

En un ejemplo preferido, puede utilizarse el análisis de heterodúplex por capilaridad para detectar la presencia de mutaciones basándose en el cambio de movilidad de ácidos nucleicos dúplex en sistemas capilares como resultado de la presencia de apareamientos erróneos.

La generación de ácidos nucleicos para el análisis de muestras requiere generalmente la amplificación del ácido nucleico. Muchos procedimientos de amplificación se basan en la reacción en cadena enzimática (tal como una reacción en cadena de la polimerasa, una reacción en cadena de la ligasa, o una replicación de secuencia autosostenida) o en la replicación de todo o parte del vector en el que se ha clonado. Preferentemente, la amplificación según la invención es una amplificación exponencial, tal como se presenta mediante, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa.

Muchos procedimientos de amplificación de señales y dianas se han descrito en la bibliografía, por ejemplo, revisiones generales de estos procedimientos en Landegren, U., *et al.*, Science 242:229-237 (1988) y Lewis, R., Genetic Engineering News 10:1, 54-55 (1990). Estos procedimientos de amplificación pueden utilizarse en los procedimientos de la invención, e incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR *in situ*, reacción de amplificación con ligasa (LAR), hibridación con ligasa, replicasa de bacteriófago Qbeta, sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), amplificación genómica con secuenciación de transcritos (GAWTS), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) e hibridación *in situ*. Pueden prepararse cebadores adecuados para su utilización en diversas técnicas de amplificación según procedimientos conocidos en la técnica.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos descrito entre otros en las patentes US nº 4.683.195 y nº 4.683.202. La PCR consiste en ciclos repetidos de reacciones de extensión con cebador generadas por ADN polimerasa. El ADN diana se desnatura por calor y se hibridan dos oligonucleótidos, que agrupan la secuencia diana en las cadenas opuestas del ADN que va amplificarse. Estos oligonucleótidos se convierten en los cebadores para su utilización con la ADN polimerasa. El ADN se copia mediante la extensión del cebador para hacer una segunda copia de ambas cadenas. Al repetir el ciclo de desnaturalización por calor, hibridación y extensión del cebador, puede amplificarse el ADN diana un millón de veces o más en aproximadamente de dos a cuatro horas. La PCR es una herramienta de la biología molecular, que debe utilizarse conjuntamente con una técnica de detección para determinar los resultados de la amplificación. Una ventaja de la PCR es que aumenta su sensibilidad amplificando la cantidad de ADN diana en de 1 millón a 1 billón de veces en aproximadamente 4 horas. La PCR puede utilizarse para amplificar cualquier ácido nucleico conocido en el contexto del diagnóstico (Mok *et al.*, (1994), *Gynaecologic Oncology*, 52: 247-252).

Replicación de secuencia autosostenida (3SR)

La replicación de secuencia autosostenida (3SR) es una variación de TAS, que implica la amplificación isotérmica de un molde de ácido nucleico mediante rondas secuenciales de transcriptasa inversa (RT), actividades polimerasa y nucleasa que están mediadas por una cóctel de enzimas y cebadores de oligonucleótidos apropiados (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874). Se utiliza la degradación enzimática del ARN del heterodúplex ARN/ADN en vez de la desnaturalización por calor. Se añaden ARNasa H y todas las otras enzimas a la reacción y se producen todas las etapas a la misma temperatura y sin adiciones de reactivos adicionales. Siguiendo este procedimiento, se han logrado amplificaciones de 10^6 a 10^9 en una hora a 42 °C.

Amplificación por ligamiento (LAR/LAS)

La reacción de amplificación por ligamiento o el sistema de amplificación por ligamiento utiliza ADN ligasa y cuatro oligonucleótidos, dos por cadena diana. Esta técnica se describe en Wu, D. Y. y Wallace, R. B. (1989) *Genomics* 4:560. Los oligonucleótidos se hibridan con dos secuencias adyacentes en el ADN diana y se unen por la ligasa. La reacción se desnatura por calor y se repite el ciclo.

Replicasa de Q β

En esta técnica, se utiliza ARN replicasa para el bacteriófago Q β , que replica ARN monocatenario, para amplificar el ADN diana, tal como se describe en Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197. En primer lugar, el ADN diana se hibrida con un cebador que incluyen un promotor de T7 y una región de la secuencia en 5' de Q β . Utilizando este cebador, la transcriptasa inversa genera un ADNc que conecta el cebador en su extremo 5' en el procedimiento. Estas dos etapas son similares a las del protocolo de TAS. El heterodúplex resultante se desnatura por calor. A continuación, se utiliza un segundo cebador que contiene una región de secuencia en 3' de Q β para iniciar una segunda ronda de síntesis de ADNc. Esto da como resultado un ADN bicatenario que contienen los extremos tanto 5' como 3' del bacteriófago Q β así como un sitio de unión a la ARN polimerasa de T7 activo. Entonces, la ARN polimerasa de T7 transcribe el ADN bicatenario para dar un ARN nuevo, que imita la Q β . Tras lavado intenso para retirar cualquier sonda sin hibridar, se eluye en ARN nuevo de la diana y se replica con replicasa de Q β . Esta última reacción crea una amplificación de 10^7 veces en aproximadamente 20 minutos.

En la presente invención puede explotarse una tecnología de amplificación alternativa. Por ejemplo, la amplificación por círculo rodante (Lizardi *et al.*, (1998) *Nat Genet* 19:225) es una tecnología de amplificación comercializada (RCAT™) que se acciona mediante la ADN polimerasa y puede replicar sondas de oligonucleótidos circulares con cinéticas o bien lineales o bien geométricas en condiciones isotérmicas.

En presencia de dos cebadores diseñados adecuadamente, se produce una amplificación geométrica mediante el desplazamiento y la hiperramificación de la cadena de ADN para genera 10^{12} o más copias de cada círculo en 1 hora.

Sí se utiliza un solo cebador, RCAT genera en pocos minutos una cadena lineal de miles de copias de ADN unidas en tándem de una diana unida covalentemente a esa diana.

Una técnica adicional, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; Walker *et al.*, (1992) *PNAS (USA)* 80:392) comienza con una secuencia específicamente definida única para una diana específica. Pero a diferencia de otras técnicas que se basan en el ciclado térmico, la SDA es un proceso isotérmico que utiliza una serie de cebadores, ADN polimerasa y una enzima de restricción para amplificar exponencialmente la secuencia de ácido nucleico única.

La SDA comprende tanto una fase de generación de diana como una fase amplificación exponencial.

En la generación de diana, el ADN bicatenario se desnaturaliza por calor creando dos copias de cadenas individuales. Una serie de cebadores especialmente producidos se combinan con ADN polimerasa (cebadores de amplificación para copiar la secuencia de bases y cebadores de protección (*bumper primers*) para desplazar las cadenas recién creadas) para formar dianas alteradas que pueden amplificarse exponencialmente.

5 El proceso de amplificación exponencial comienza con dianas alteradas (cadenas de ADN parciales monocatenarias con sitios de reconocimiento de enzimas de restricción) de la fase de generación de diana.

10 Un cebador de amplificación se une a cada cadena en su secuencia de ADN complementaria. Entonces, la ADN polimerasa utiliza el cebador para identificar una ubicación para extender el cebador desde su extremo 3', utilizando la diana alterada como molde para añadir nucleótidos individuales. El cebador extendido, por tanto, forma un segmento de ADN bicatenario que contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción completo en cada extremo.

15 Entonces, se une una enzima de restricción al segmento de ADN bicatenario en su sitio de reconocimiento. La enzima de restricción se disocia del sitio de reconocimiento tras haber escindido sólo una cadena del segmento de dos lados, formando un corte. La ADN polimerasa reconoce el corte y extiende la cadena desde el sitio, desplazando la cadena creada anteriormente. El sitio de reconocimiento por tanto, se corta y restaura repetidamente por la enzima de restricción y la ADN polimerasa con desplazamiento continuo de las cadenas de ADN que contienen el segmento diana.

20 Entonces, cada cadena desplazada está disponible para hibridar con los cebadores de amplificación tal como se expuso anteriormente. El proceso continúa con corte, extensión y desplazamiento repetidos de las nuevas cadenas de ADN, lo que da como resultado la amplificación exponencial de la diana de ADN original.

25 Una vez que se ha amplificado el ácido nucleico, se dispone de varias técnicas para la detección de mutaciones de pares de bases individuales. Una técnica de este tipo es el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP). La detección por SCCP se basa en la migración aberrante del ADN mutado monocatenario en comparación con el ADN de referencia durante la electroforesis. La mutación produce un cambio conformacional en el ADN monocatenario, lo que da como resultado cambio de la movilidad. El SCCP fluorescente utiliza cebadores marcados con fluorescencia para ayudar a la detección. Por tanto, el ADN de referencia y mutante se amplifican utilizando cebadores marcados con fluorescencia. El ADN amplificado se desnaturaliza y se enfría rápidamente para producir moléculas de ADN monocatenario, que se examinan mediante electroforesis en gel no desnaturalizante.

30 La escisión química por apareamiento erróneo (CMC) se basa en el reconocimiento y la escisión de pares de bases con apareamiento erróneo de ADN mediante una combinación de hidroxilamina, tetróxido de osmio y piperidina. Por tanto, se amplifican tanto el ADN de referencia como el ADN mutante con cebadores marcados con fluorescencia. Se hibridan los amplicones y luego se someten a escisión utilizando tetróxido de osmio, que se une a una base de T con apareamiento erróneo, o hidroxilamina, que se une a una base con apareamiento erróneo, seguido por piperidina que escinde en el sitio de una base modificada. Entonces, se detectan los fragmentos escindidos por electroforesis.

35 También pueden utilizarse técnicas basadas en los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP). Aunque muchos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) no permiten el análisis por RFLP convencional, puede utilizarse la PCR con análisis de restricción inducida por cebador (PIRA-PCR) para introducir sitios de restricción utilizando cebadores de PCR de una manera dependiente de SNP. Los cebadores para PIRA-PCR que introducen sitios de restricción adecuados, pueden diseñarse mediante análisis computacional, por ejemplo tal como se describe en Xiaiyi *et al.*, (2001) *Bioinformatics* 17:838-839.

40 En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona la detección de la expresión génica a nivel de ARN. Los formatos de ensayo típicos que utilizan hibridación de ácido nucleico incluyen ensayos de transcripción nuclear (*nuclear run on assays*), RT-PCR y ensayos de protección de ARNasa (Melton *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:7035). Los procedimientos para la detección que pueden utilizarse incluyen marcadores radiactivos, marcadores enzimáticos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores fluorescentes y otros marcadores adecuados.

45 Se utiliza la RT-PCR para amplificar dianas de ARN. En este procedimiento, se utiliza la enzima transcriptasa inversa para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), que entonces puede amplificarse utilizando PCR. Este procedimiento ha resultado ser útil para la detección de virus de ARN. Su aplicación es, en cualquier caso, como para la PCR, descrita anteriormente.

50 Procedimientos para la detección de polipéptidos

55 La invención proporciona un procedimiento en el que se detecta una proteína codificada por un gen *B-raf* mutante. Las proteínas pueden detectarse mediante un ensayo en gel de proteínas, ensayo de unión de anticuerpos, u otros procedimientos de detección conocidos en la técnica.

Por ejemplo, por tanto, pueden detectarse polipéptidos B-Raf mutante mediante movilidad diferencial en geles de proteína, o mediante otras técnicas de análisis por tamaño tales como espectrometría de masas, en las que puede determinarse la presencia de aminoácidos mutantes según el peso molecular. Los péptidos derivados de polipéptidos B-Raf mutantes, en particular, son susceptibles de diferenciación mediante análisis por tamaño.

Ventajosamente, los medios de detección son específicos de secuencia, de manera que puede identificarse una mutación puntual particular de manera precisa en el polipéptido B-Raf mutante. Por ejemplo, pueden desarrollarse el polipéptido o moléculas de ARN que reconocen específicamente el polipéptido B-Raf mutante *in vivo* o *in vitro*.

Por ejemplo, pueden producirse aptámeros de ARN mediante SELEX. La SELEX es un procedimiento para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana. Se describe, por ejemplo, en las patentes US nº 5654151, nº 5503978, nº 5567588 y nº 5270163, así como en la publicación PCT WO 96/38579.

El procedimiento SELEX implica la selección de aptámeros de ácido nucleico, ácidos nucleicos monocatenarios que pueden unirse a una diana deseada, a partir de una biblioteca de oligonucleótidos. Partiendo de una biblioteca de ácidos nucleicos, que comprende preferentemente un segmento de secuencia aleatorizada, el procedimiento SELEX incluye las etapas que consisten en poner en contacto la biblioteca con la diana en condiciones favorables para la unión, dividir los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente a las moléculas diana, disociar los complejos de ácido nucleico-diana, amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana para proporcionar una biblioteca enriquecida con ligandos de ácidos nucleicos, entonces repetir las etapas de unir dividir, disociar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para producir ligandos de alta afinidad, altamente específicos para la molécula diana.

La SELEX se basa en el principio de que dentro de una biblioteca de ácidos nucleicos que contiene un gran número de posibles secuencias y estructuras, existe una amplia variedad de afinidades de unión para una diana dada. Una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende, por ejemplo un segmento aleatorizado de 20 nucleótidos puede presentar 4²⁰ posibilidades estructurales. Se considera que los que presentan las constantes de afinidad mayores para la diana que son los que presentan más probabilidad de unión. El procedimiento de división, disociación y amplificación genera una segunda biblioteca de ácidos nucleicos, enriquecida para los candidatos de mayor afinidad de unión. Las rondas adicionales de selección favorecen progresivamente los mejores ligandos hasta que la biblioteca resultante esté compuesta predominantemente por sólo una o unas pocas secuencias. Entonces, éstas pueden clonarse, secuenciarse y someterse a prueba de manera individual para detectar la afinidad de unión como ligandos puros.

Se repiten los ciclos de selección y amplificación hasta que se consigue el objetivo deseado. En el caso más general, se continúa la selección/amplificación hasta que no se consiga ninguna mejora significativa en la fuerza de unión en la repetición del ciclo. El procedimiento de selección/amplificación iterativas es suficientemente sensible para permitir el aislamiento de una variante de secuencia individual en una biblioteca que contiene por lo menos 10¹⁴ secuencias. El procedimiento podría, en principio, utilizarse para tomar como muestra hasta aproximadamente 10¹⁸ especies de ácido nucleico diferentes. Los ácidos nucleicos de la biblioteca incluyen preferentemente una parte de secuencia aleatorizada así como secuencias conservadas necesarias para la amplificación eficaz. Las variantes de secuencias de ácidos nucleicos pueden producirse de varias formas incluyendo la síntesis de secuencias de ácido nucleico aleatorizadas y selección por tamaño de ácidos nucleicos celulares escindidos de manera aleatoria. La parte variable de la secuencia puede contener una secuencia completa o parcialmente aleatoria; también puede contener subpartes de secuencia conservada incorporada con la secuencia aleatorizada. La variación de la secuencia en los ácidos nucleicos sometidos a prueba puede introducirse o aumentarse mediante mutagénesis antes o durante las iteraciones de selección/amplificación y mediante la modificación específica de aptámeros clonados.

Anticuerpos

Los polipéptidos B-Raf o péptidos derivados de los mismos pueden utilizarse para generar anticuerpos para su utilización en la presente invención. Los péptidos B-Raf utilizados comprenden preferentemente un epítipo que es específico para un polipéptido B-Raf mutante según la invención. Los fragmentos de polipéptido que actúan como epítipos pueden producirse mediante cualquier medio convencional (véase, por ejemplo, el documento US 4.631.211). En la presente invención, los epítipos antigénicos contienen preferentemente una secuencia de por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, más preferentemente por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50 y, lo más preferentemente, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Los polipéptidos preferidos que comprenden epítipos inmunogénicos o antigénicos presentan por lo menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 residuos de aminoácido de longitud.

Los anticuerpos pueden generarse utilizando epítomos antigénicos de polipéptidos B-Raf según la invención inmunizando animales, tales como conejos o ratones, con péptidos o bien libres o bien acoplados a portador, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 µg de péptido o proteína transportadora y adyuvante de Freund o cualquier otro adyuvante conocido por estimular una respuesta inmunitaria. Pueden necesitarse varias inyecciones de refuerzo, por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar un título útil de anticuerpo antipéptido que puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo de ELISA que utiliza un péptido libre adsorbido a una superficie sólida. El título de anticuerpos antipéptido en suero de un animal inmunizado puede aumentarse mediante la selección de anticuerpos antipéptido, por ejemplo, mediante adsorción del péptido en un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados según procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los polipéptidos B-Raf de la presente invención, y los fragmentos de epítomo inmunogénico y/o antigénico de los mismos pueden fusionarse con otras secuencias de polipéptido. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse con dominios de inmunoglobulina. Se ha demostrado que proteínas quiméricas que consisten en los primeros dos dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas de mamífero presentan propiedades ventajosas *in vivo* (véanse, por ejemplo, el documento EP 0394827; Trauneker *et al.*, (1988) *Nature*, 331: 84-86). Se ha demostrado el paso aumentado de un antígeno a través de la barrera epitelial al sistema inmunitario para antígenos (tales como insulina) conjugados con una pareja de unión a FcRn tal como IgG o fragmentos de Fc (véase, por ejemplo, los documentos WO 96/22024 y WO 99/04813).

Además, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En las formas de realización preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de las cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina permite la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra etiqueta de péptido útil para la purificación, la etiqueta "HA", corresponde a un epítomo derivado de la proteína hemaglutinina del virus *Influenza* (Wilson *et al.*, (1984) *Cell* 37: 767). Por tanto, cualquiera de estas fusiones anteriores puede obtenerse por ingeniería genética utilizando los ácidos nucleicos o los polipéptidos de la presente invención.

En una forma de realización preferida, la invención proporciona anticuerpos que reconocen específicamente mutantes de B-Raf tal como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos tal como se describe en la presente memoria están especialmente indicados para aplicaciones de diagnóstico. Por lo tanto, pueden ser anticuerpos alterados que comprenden una proteína efectora tal como un marcador. Resultan especialmente preferidos marcadores que permitan la obtención de imágenes de la distribución del anticuerpo *in vivo*. Tales marcadores pueden ser marcadores radioactivos o marcadores radiopacos, tales como partículas metálicas, que pueden visualizarse fácilmente dentro del cuerpo de un paciente. Además, pueden ser marcadores fluorescentes u otros marcadores que puede visualizarse en el tejido.

Puede utilizarse la tecnología del ADN recombinante para mejorar los anticuerpos de la invención. Por tanto, pueden construirse anticuerpos quiméricos con el fin de disminuir la inmunogenicidad de los mismos en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Además, puede minimizarse la inmunogenicidad humanizando los anticuerpos mediante el injerto de CDR [véase la solicitud de patente europea 0 239 400 (Winter)] y, opcionalmente, la modificación de la región de entramado [documento EP 0 239 400; Riechmann, L. *et al.*, *Nature*, 332, 323-327, 1988; Verhoeven M. *et al.*, *Science*, 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. *et al.*, *Protein Engng.*, 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; y, Sato, K. *et al.*, *Cancer Res.*, 53, 851-856, 1993].

Los anticuerpos tal como se describen en la presente memoria pueden producirse en cultivo celular. La tecnología del ADN recombinante puede utilizarse para producir anticuerpos según el procedimiento establecido, en cultivo celular bacteriano o preferentemente de mamífero. El sistema de cultivo celular seleccionado secreta opcionalmente el producto de anticuerpo, aunque los productos de anticuerpo pueden aislarse de células no secretoras.

Por tanto, la presente invención incluye un procedimiento para la producción de un anticuerpo según la invención que comprende hacer crecer en cultivo un huésped, por ejemplo *E. coli*, una célula de insecto o una célula de mamífero, que se han transformado con un vector híbrido que comprende un casete de expresión que comprende un promotor unido funcionalmente a una primera secuencia de ADN que codifica para un péptido señal unido en el marco de lectura apropiado a una segunda secuencia de ADN que codifica para dicha proteína de anticuerpo, y aislar dicha proteína.

La multiplicación de las células de hibridoma o células huésped de mamífero *in vitro* se lleva a cabo en medios de cultivo adecuados, que son los medios de cultivo convencionales habituales, por ejemplo medio Eagle modificado

por Dulbecco (DMEM) o medio RPMI 1640, repuestos opcionalmente con un suero de mamífero, por ejemplo, suero bovino fetal, o elementos traza y suplementos de ayuda al crecimiento, por ejemplo células alimentadoras tales como células normales de exudado peritoneal de ratón, esplenocitos, macrófagos de médula ósea, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico, o similares. La multiplicación de células huéspedes que son células bacterianas o células de levadura se llevan a cabo asimismo en los medios de cultivo adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo para bacterias en medio LB, NZCYM, NZYM, NZM, Terrific Broth, SOB, SOC, 2 x YT, o medio mínimo M9, y para levadura en medio YPD, YEPD, medio mínimo, o medio *dropout* mínimo completo.

La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpos relativamente puros y permite el aumento a escala para producir grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Las técnicas para el cultivo de células bacterianas, levaduras o células de mamífero se conocen en la técnica e incluyen el cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor con aireación o en un reactor con agitación continua, o el cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos.

También pueden obtenerse grandes cantidades de los anticuerpos deseados multiplicando las células de mamífero *in vivo*. Para este fin, se inyectan las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados en mamíferos histocompatibles para provocar el crecimiento de tumores productores de anticuerpos. Opcionalmente, se sensibiliza a los animales con un compuesto hidrocarbonado, especialmente con aceites minerales tales como pristano (tetrametil-pentadecano), antes de la inyección. Después de una a tres semanas, se aíslan los anticuerpos de los líquidos corporales de estos mamíferos. Por ejemplo, se inyectan células de hibridoma obtenidas por fusión de células de mieloma adecuadas con esplenocitos productores de anticuerpo de ratones Balb/c, o células transfectadas derivadas de la línea celular de hibridoma Sp2/0 que producen los anticuerpos deseados, por vía intraperitoneal en ratones Balb/c pretratados opcionalmente con pristano, y, tras una a dos semanas, se extrae el líquido ascítico de los animales.

Las técnicas anteriores y otras técnicas se dan a conocer en, por ejemplo, Kohler y Milstein, (1975) Nature 256: 495-497; patente US nº 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor. Las técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinante se describen en las referencias anteriores y también, por ejemplo, en los documentos EP 0623679; EP 0368684 y EP 0436597.

Se examinan los sobrenadantes de cultivo celular para detectar los anticuerpos deseados, preferentemente mediante un inmunoensayo enzimático, por ejemplo un ensayo de tipo sándwich o un ensayo de transferencia, o un radioinmunoensayo.

Para el aislamiento de los anticuerpos, pueden concentrarse las inmunoglobulinas en los sobrenadantes de cultivo o en el líquido ascítico, por ejemplo mediante precipitación con sulfato de amonio, diálisis contra material higroscópico tal como polietilenglicol, filtración a través de membranas selectivas, o similares. Si es necesario y/o se desea, se purifican los anticuerpos mediante procedimientos cromatográficos habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno-)afinidad, por ejemplo cromatografía de afinidad con el antígeno diana, o con proteína-A.

La invención se refiere además a células de hibridoma que secretan los anticuerpos monoclonales de la invención. Las células de hibridoma preferidas de la invención son estables genéticamente, secretan los anticuerpos monoclonales de la invención de la especificidad deseada y pueden activarse a partir de cultivos ultracongelados mediante descongelamiento y nueva clonación.

La invención, en una forma de realización preferida, se refiere a la producción de anticuerpos antiB-Raf mutante. Por tanto, la invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de una línea celular de hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales según la invención, caracterizado porque un mamífero adecuado, por ejemplo un ratón Balb/c, se inmuniza con uno o más polipéptidos PDGF o fragmentos antigénicos de los mismos, o un portador antigénico que contiene un polipéptido B-Raf mutante; se fusionan las células productoras de anticuerpos del mamífero inmunizado con células de una línea celular de mieloma adecuado, se clonan las células híbridas obtenidas en la fusión, y se seleccionan los clones celulares que secretan los anticuerpos deseados. Por ejemplo, se fusionan esplenocitos de ratones Balb/c inmunizados con B-Raf mutante con células de la línea celular de mieloma PAI o la línea celular de mieloma Sp2/0-Ag14, se examinan las células híbridas obtenidas para detectar la secreción de los anticuerpos deseados, y se clonan las células positivas para hibridoma.

Resulta preferido un procedimiento para la preparación de una línea celular de hibridoma, caracterizado porque se inmunizan ratones Balb/c inyectando por vía subcutánea y/o intraperitoneal entre 1 y 100 µg de B-Raf mutante y un adyuvante adecuado, tal como adyuvante de Freund, varias veces, por ejemplo de cuatro a seis veces, durante varios meses, por ejemplo entre dos y cuatro meses, y se extraen los esplenocitos de los ratones inmunizados de dos a cuatro días tras la última inyección y se fusionan con las células de la línea celular de mieloma PAI en presencia de un promotor de fusión, preferentemente polietilenglicol. Preferentemente se fusionan las células de mieloma con un exceso de tres a veinte veces de esplenocitos de los ratones inmunizados en una disolución que contiene de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 50% de polietilenglicol de un peso molecular de aproximadamente 4000. Tras la fusión, las células se expanden en medios de cultivo adecuados tal como se

describió en la presente memoria anteriormente, complementados con un medio de selección, por ejemplo medio HAT, a intervalos regulares con el fin de impedir que las células de mieloma normales crezcan más que las células de hibridoma deseadas.

5 La invención también se refiere a ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o para un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos dirigidos frente a B-Raf mutante tal como se describió anteriormente en la presente memoria. Por definición, tales ADN comprenden ADN monocatenarios codificantes, ADN bicatenarios que consisten en dichos ADN codificantes y ADN complementarios a los mismos, o estos mismos ADN complementarios (monocatenarios).

10 Además, el ADN que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o para un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos dirigidos frente a B-Raf mutante puede ser ADN sintetizado enzimática o químicamente que presenta la secuencia de ADN auténtica que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o para el dominio variable de cadena ligera, o un mutante del mismo. Un mutante del ADN auténtico es un ADN que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos mencionados anteriormente en el que uno o más aminoácidos se delecionan o intercambian con uno o más de otros aminoácidos. Preferentemente, dicha(s) modificación/modificaciones están fuera de las CDR del dominio variable de cadena pesada y/o del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo. Un ADN mutante de este tipo también se pretende que sea un mutante silencioso en el que uno o más nucleótidos se sustituyen por otros nucleótidos con los nuevos codones que codifican para el/los mismo(s) aminoácido(s). Una secuencia mutante de este tipo también es una secuencia degenerada. Las secuencias degeneradas están degeneradas dentro del significado del código genético porque un número ilimitado de nucleótidos se sustituye por otros nucleótidos sin dar como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos codificada originariamente. Tales secuencias degeneradas puede ser útiles debido a sus diferentes sitios de restricción y/o frecuencia de codones particulares que el huésped particular prefiere, particularmente *E. coli*, para obtener una expresión óptima del dominio variable murino de cadena pesada y/o un dominio variable murino de cadena ligera.

25 En este contexto, el término mutante pretende incluir un ADN mutante obtenido por mutagénesis *in vitro* del ADN auténtico según procedimientos conocidos en la técnica.

30 Para el ensamblaje de moléculas de inmunoglobulina tetraméricas completas y la expresión de anticuerpos quiméricos, se fusionan los insertos de ADN recombinante que codifican para dominios variables de cadena pesada y ligera con los ADN correspondientes que codifican para dominios constantes de cadena pesada y ligera, entonces se transfieren a células huésped apropiadas, por ejemplo tras la incorporación en vectores híbridos.

35 La invención por tanto también se refiere a ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica para un dominio variable murino de cadena pesada de un anticuerpo antiB-Raf mutante fusionado con un dominio constante humano γ por ejemplo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ o $\gamma 4$, preferentemente $\gamma 1$ o $\gamma 4$. Asimismo, la invención se refiere a ADN recombinantes que comprenden un inserto que codifica para un dominio variable murino de cadena ligera de un anticuerpo antiB-Raf mutante dirigido frente a B-Raf mutante fusionado con un dominio constante humano κ o γ , preferentemente κ .

40 En otra forma de realización, la invención se refiere a ADN recombinantes que codifican para un polipéptido recombinante en los que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se unen por medio de un grupo espaciador, que comprende opcionalmente una secuencia señal que facilita el procesamiento del anticuerpo en la célula huésped y/o un ADN que codifica para un péptido que facilita la purificación del anticuerpo y/o un sitio de escisión y/o un espaciador peptídico y/o una molécula efectora.

45 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo según la invención son útiles en diagnóstico. Por lo tanto, la invención proporciona una composición para el diagnóstico que comprende un anticuerpo según la invención.

50 En el caso de una composición de diagnóstico, el anticuerpo se proporciona preferentemente junto con unos medios para detectar el anticuerpo, que pueden ser medios enzimáticos, fluorescentes o radioisotópicos u otros. El anticuerpo y los medios de detección pueden proporcionarse para su utilización simultánea, simultánea separada o secuencial, en un kit de diagnóstico destinado para el diagnóstico.

55 Los anticuerpos de la invención pueden someterse a ensayo para su unión inespecífica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden utilizarse comprenden de manera no limitativa sistemas de ensayo competitivo y no competitivo utilizando técnica tales como inmunotransferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo sándwich, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A. Tales ensayos son rutinarios en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Los inmunoensayos a título de ejemplo se describen brevemente a continuación.

65

- Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden generalmente lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (NP-40 o Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, Trasylol al 1%) complementado con proteína fosfatasa y/o inhibidores de proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4°C, añadir perlas de Sepharose con proteína A y/o proteína G al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4°C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en SDS/tampón de muestra. Puede evaluarse la capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular mediante, por ejemplo, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western.
- El análisis de inmunotransferencia de tipo Western comprende generalmente preparar muestras de proteína, someter a electroforesis las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE al 8%-20% dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en disolución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA o leche desnatada al 3%), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), exponer la membrana a un anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, exponer la membrana a un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-ser humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o una molécula radioactiva (por ejemplo, ^{32}P o ^{125}I) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, y detectar la presencia del antígeno.
- Los ELISA comprenden preparar el antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA, el anticuerpo de interés no ha de conjugarse con un compuesto detectable; en cambio, puede añadirse un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable al pocillo. Además, en vez de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede recubrir el pocillo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable tras la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto.
- La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, con ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno particular y las tasas de disociación de unión pueden determinarse a partir de los datos mediante el análisis de representación gráfica de Scatchard. La competencia con un segundo anticuerpo también puede determinarse utilizando radioinmunoensayos. En este caso, se incuba el antígeno con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, con ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.
- Preparación de polipéptidos B-Raf mutantes**
- Los polipéptidos B-Raf mutantes según la presente invención pueden producirse mediante cualquier técnica deseada, incluyendo síntesis química, aislamiento de muestras biológicas y expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de este tipo. Los ácidos nucleicos, a su vez, pueden sintetizarse o aislarse de fuentes biológicas de B-Raf mutante.
- Por tanto, la invención se refiere a vectores que codifican para un polipéptido según la invención, o un fragmento del mismo. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector viral o retroviral.
- Los ácidos nucleicos según la invención puede ser parte de un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado con fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* utilizando una línea celular de empaquetamiento apropiada y entonces transducirse en las células huésped.
- El inserto de ácido nucleico está unido operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, el lac de *E. coli*, los promotores *trp*, *phoA* y *tac*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTS retrovirales. Los expertos en la materia conocen otros promotores adecuados. Los constructos de expresión contienen además sitios para el inicio y la terminación de la transcripción, y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos expresados por los constructos incluye preferentemente un codón de iniciación de la traducción en el comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) ubicado apropiadamente al final del polipéptido que va traducirse.
- Tal como se indica, los vectores de expresión preferentemente incluyen por lo menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418 o genes de resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias.

Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados comprenden de manera no limitativa células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*); células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células de animales tales como CHO, COS, 293, y células de melanoma de Bowes; y células vegetales.

Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente son conocidos en la técnica y están comercializados.

Entre los vectores preferidos para su utilización en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK2233, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores de eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Los vectores de expresión preferidos para su utilización en sistemas de levaduras comprenden de manera no limitativa pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, y PA0815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA).

La introducción del constructo en las células huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros procedimientos. Tales procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook *et al.*, referido anteriormente.

Un polipéptido según la invención puede recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatita y cromatografía con lectina. Todavía más preferentemente para la purificación se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC").

Los polipéptidos según la presente invención también pueden recuperarse de fuentes biológicas, que incluyen líquidos corporales, tejidos y células, especialmente células derivadas de tejido tumoral o tejidos que se sospecha que son tumorales de un sujeto.

Además, los polipéptidos según la invención pueden sintetizarse químicamente utilizando técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, véanse Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N. Y., y Hunkapiller *et al.*, *Nature*, 310: 105-111 (1984)). Por ejemplo, un polipéptido correspondiente a un fragmento de un polipéptido B-Raf mutante puede sintetizarse mediante la utilización de un sintetizador de péptidos.

Mutaciones en B-Raf

Las mutaciones en B-Raf se han identificado en células tumorales humanas. La tabla 1 describe la ubicación de estas mutaciones y los tumores en los que se identificaron. Las mutaciones están en el dominio cinasa de B-Raf. La mayoría de las mutaciones pueden confirmarse como somáticas, lo que indica que se sometió a prueba una muestra de un par normal/tumoral y se encontró la mutación sólo en la muestra tumoral.

Tabla 1

Gen	N.º de registro de ADNc	N.º de registro de proteína	Mutación de ácido nucleico	Mutación de proteína	Tumor	Tipo de tumor	Somático
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	A101D	Melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	A2058	Melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	EP004324	T1796A	V599E	A375	Melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	A673	Sarcoma (Ewings)	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	C32	Melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	COLO-205	colorrectal	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	COLO-679	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	COLO-741	colorrectal	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	COLO-800	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Colo829	melanoma maligno	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Colo-829	Par de línea celular de melanoma	Si
				bucle p	Colon		
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	DBTRG-05MG	glioma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	DU-4475	Cáncer de mama	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	DU-4475	Mama	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Duke Mel 103	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V99E	Duke Mel 104	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	G1394C	G465A	Duke Mel 105	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Duke Mel 108	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Duke Mel 110	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Duke Mel 111	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Duke Mel 113	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Duke Mel 115	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Duke Mel 114	melanoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	G-361	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	GCT	Sarcoma (GCT/histocitoma)	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	HT-144	Melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	HT29	Cáncer colorrectal	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	HT29	colorrectal	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	G1388A	G463E	Hx62-26	Ovario/vejiga?	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	HxLL	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP 004324	T1796A	V599E	KG-1-C	glioma	N/d
B-Raf	NM004333	NP 004324	T1796A	V599E	LS-411N	colorrectal	N/d
				bucle p	Pulmón		
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Malmme-3M	Melanoma maligno	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Malmme-3M	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	G1388T	G463V	MDA-MB-231	Mama	N/d

B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	MDA-MB-435	Cáncer de mama	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	MDA-MB-435	Mama	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	G1403C	G468A	NCI-H1395	CPCNP	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	G1394T	G465V	NCI-H1666	CPCNP	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	G1403C	G468A	NCI-H1755	CPCNP	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	C1786G	L596V	NCI-H2087	CPCNP	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	C1786G	L596V	NCI-H2087	CPCNP	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	G1783C	G595R	NCI-H508	colorrectal	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	NMC-G1	glioma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1795A	V599E	Ov-90-93	Cáncer de ovario	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	PT-18-92-T	Cáncer de ovario	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	G1753A	E585K	PT-52-91-T	Cáncer de ovario	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1787G	L596R	PT-66-91-T	Cáncer de ovario	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	PT-93-13956-T	Cáncer de colon, hk	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	PT-93-7014T	Cáncer de colon, HK	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	PT-93-7014-T	Cáncer de colon, HK	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1782G	F594L	PT-97-51-T	Adenocarcinoma de colon, Duke	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	C1786G	L596V	PT-97-51-T	Adenocarcinoma de colon, Duke	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	PT-97-93-T	Cáncer de ovario	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	RPMI-7951	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	RUCH2-DH	Rabdomiosarcoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	Sarcoma 24	Histiocitoma	Si
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	SH-4	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	S86-5261	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	S93-11360	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	S94-6209	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	S95-10334	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	S99-11631	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	SK-HEP-1	hepatocelular	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	SK-MEL-24	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	SK-MEL-28	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	SK-MEL-3	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	SW1417	colorrectal	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	SW872	Sarcoma (liposarcoma)	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	TE-159-T	Rabdomiosarcoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T1796A	V599E	AM-38	glioma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	TG1796-97AT	V599E	WM-266-4/WM-115	melanoma	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	G2041A	R681Q	HEC-1-A	Útero	N/d
B-Raf	NM004333	NP004324	T974C	I325T	ZR-75-30	Mama	N/d

Ensayo de compuestos

5 Según la presente invención, se utiliza B-Raf mutante como diana para identificar compuestos, por ejemplo compuestos de partida para productos farmacéuticos, que pueden modular la actividad proliferativa de B-Raf mutante. Por consiguiente, la invención se refiere a un ensayo y proporciona un procedimiento para identificar un compuesto o compuestos que pueda(n) modular, directa o indirectamente, la actividad de B-Raf mutante, que comprende las etapas siguientes:

- 10 (a) incubar B-Raf mutante con el compuesto o los compuestos que va(n) a evaluarse; e
- (b) identificar los compuestos que influyen en la actividad de B-Raf mutante.

15 B-Raf mutante es tal como se define en el contexto de la presente invención.

Según una primera forma de realización de este aspecto de la invención, el ensayo se configura para detectar polipéptidos que se unen directamente a B-Raf mutante.

20 La invención por tanto proporciona un procedimiento para identificar un modulador de la proliferación celular, que comprende las etapas siguientes:

- (a) incubar B-Raf mutante con el compuesto o los compuestos que va(n) a evaluarse; e
- 25 (b) identificar los compuestos que se unen a B-Raf mutante.

Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa que consiste en:

- 30 (c) evaluar los compuestos que se unen a B-Raf mutante para determinar su capacidad para modular la proliferación celular en un ensayo a base de células.

35 La unión a B-Raf mutante puede evaluarse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Los ejemplos de ensayos adecuados incluyen el sistema de ensayo de dos híbridos, que mide las interacciones *in vivo*, ensayos de cromatografía de afinidad, por ejemplo que implican la unión a polipéptidos inmovilizados en una columna, ensayos de fluorescencia en los que se asocia la unión del/de los compuesto(s) y B-Raf mutante con un cambio en la fluorescencia de uno o ambos componentes en una parejas de unión, y similares. Resultan preferidos los ensayos realizados *in vivo* en células, tales como el ensayo de dos híbridos.

40 En un aspecto preferido de esta forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para identificar un compuesto de partida para un producto farmacéutico útil en el tratamiento de una enfermedad que implica o utiliza la proliferación celular, que comprende incubar un compuesto o compuestos que va(n) a someterse a prueba con B-Raf mutante, en condiciones en las que, a excepción de la presencia del compuesto o compuestos que va(n) a someterse a prueba, B-Raf se asocia con RAS con una afinidad de referencia;

45 determinar la afinidad de unión de B-Raf mutante por RAS en presencia del compuesto o compuestos que va(n) a someterse a prueba; y

50 seleccionar los compuestos que modulan la afinidad de unión de B-Raf mutante por RAS con respecto a la afinidad de unión de referencia.

Preferentemente, por tanto, el ensayo según la invención se calibra en ausencia del compuesto o compuestos que va(n) a someterse a prueba, o en presencia de un compuesto de referencia cuya actividad en la unión a B-Raf mutante se conoce y en cualquier caso es deseable como valor de referencia. Por ejemplo, en un sistema de dos híbridos, puede obtenerse un valor de referencia en ausencia de cualquier compuesto. La adición de un compuesto o compuestos que aumenta(n) la afinidad de unión de B-Raf mutante por una diana, aumenta la lectura del ensayo por encima del nivel de referencia, mientras que la adición de un compuesto o compuestos que disminuye(n) esta afinidad da como resultado una disminución de la lectura del ensayo por debajo del nivel de referencia.

60 En una segunda forma de realización, la invención puede configurarse para detectar interacciones funcionales entre un compuesto o compuestos y B-Raf mutante. Tales interacciones se producirán o bien a nivel de la regulación de B-Raf mutante, de manera que esta cinasa se active o inactive por sí misma, por ejemplo por RAS, en respuesta al compuesto o los compuestos que va(n) a someterse a prueba, o bien a nivel de la modulación del efecto biológico de B-Raf mutante en las dianas posteriores tales como MEK. Tal como se utiliza en la presente memoria, "activación" e "inactivación" incluyen modulación de la actividad, enzimática y de otro tipo, de un compuesto, así como la modulación de la tasa de producción del mismo, por ejemplo mediante la activación o represión de la

expresión de un polipéptido en una célula. Los términos incluyen la acción directa en la transcripción génica con el fin de modular la expresión de un producto génico.

5 Los ensayos que detectan la modulación de la interacción funcional entre B-Raf mutante y sus parejas anterior o posterior en una ruta de señalización son preferentemente ensayos a base de células. Por ejemplo, pueden basarse en una evaluación del grado de fosforilación de MAPK, que es indicativo del grado de activación de MEK, que resulta de la activación de B-Raf mutante.

10 En las formas de realización preferidas, un ácido nucleico que codifica para B-Raf mutante se liga en un vector, y se introduce en células huésped adecuadas para producir líneas celulares transformadas que expresan B-Raf mutante. Las líneas celulares resultantes pueden producirse, entonces, para el análisis cualitativo y/o cuantitativo reproducible del/de los efecto(s) de posibles compuestos que afectan la función de B-Raf mutante. Por tanto, las células que expresan B-Raf mutante pueden emplearse para la identificación de compuestos, particularmente compuestos de bajo peso molecular, que modulan la función de B-Raf mutante. Por tanto, las células huésped que expresan B-Raf mutante son útiles para seleccionar fármacos y es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para identificar compuestos que modulan la actividad de B-Raf mutante, comprendiendo dicho procedimiento exponer células que contienen ADN heterólogo que codifica para B-Raf mutante, en el que dichas células producen B-Raf mutante funcional, a por lo menos un compuesto o una mezcla de compuestos o una señal cuya capacidad para modular la actividad de dicho B-Raf mutante se busca determinar, y después monitorizar dichas células para detectar los cambios provocados por dicha modulación. Un ensayo de este tipo permite la identificación de moduladores, tales como moduladores agonistas, antagonistas y alostéricos, de B-Raf mutante. Tal como se utiliza en la presente memoria, un compuesto o una señal que modula la actividad de B-Raf mutante se refiere a un compuesto que altera la actividad de B-Raf mutante de tal manera que la actividad de B-Raf mutante en una diana del mismo, tal como MEK, es diferente en presencia del compuesto o de la señal (en comparación con la ausencia de dicho compuesto o dicha señal).

25 Los ensayos de detección a base de células pueden diseñarse construyendo líneas celulares en las que la expresión de una proteína indicadora, es decir una proteína que puede someterse a ensayo fácilmente, tal como β -galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) o luciferasa, es dependiente de la activación de un sustrato de B-Raf mutante. Por ejemplo, un gen indicador que codifica para uno de los polipéptidos anteriores puede ponerse bajo el control de un elemento de respuesta que se activa específicamente por MEK o MAPK. Un ensayo de este tipo permite la detección de compuestos que modulan directamente la función de B-Raf mutante, tal como compuestos que antagonizan la fosforilación de MEK por B-Raf mutante, o compuestos que inhiben o potencian otras funciones celulares requeridas para la actividad de B-Raf mutante. Las células en las que está presente B-Raf no mutante de tipo natural proporcionan controles adecuados.

30 Los formatos de ensayo alternativos incluyen ensayos que evalúan directamente respuestas proliferativas en un sistema biológico. La expresión constitutiva de B-Raf mutante no regulado da como resultado un fenotipo proliferativo en células de animales. Los sistemas a base de células, tales como fibroblastos 3T3, pueden utilizarse para evaluar la actividad de posibles reguladores de B-Raf mutante.

35 En un aspecto preferido de esta forma de realización de la invención, se proporciona un procedimiento para identificar un compuesto de partida para un producto farmacéutico útil en el tratamiento de una enfermedad que implica o utiliza una respuesta inflamatoria, que comprende:

40 incubar un compuesto o compuestos que va(n) a someterse a prueba con B-Raf mutante y MEK, en condiciones en las que, a excepción del compuesto o compuestos que va(n) a someterse a prueba, B-Raf mutante provoca directa o indirectamente la fosforilación de MEK con una eficacia de fosforilación de referencia;

45 determinar la capacidad de B-Raf mutante para provocar la fosforilación, directa o indirectamente, de MEK en presencia del compuesto o compuestos que va(n) a someterse a prueba; y

50 seleccionar los compuestos que modulan la capacidad de B-Raf mutante para fosforilar MEK con respecto a la eficacia de fosforilación de referencia.

55 En un aspecto preferido adicional, la invención se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto de partida para un producto farmacéutico, que comprende las etapas siguientes:

60 proporcionar una molécula de B-Raf mutante purificada;

incubar la molécula de B-Raf mutante con un sustrato conocido que va a fosforilarse mediante B-Raf mutante y un compuesto o compuestos de prueba; e

65 identificar el compuesto o compuestos de prueba que puede(n) modular la fosforilación del sustrato.

Un sustrato para la fosforilación de B-Raf mutante es MEK. Por tanto, preferentemente, se utiliza MEK como sustrato para monitorizar compuestos que pueden modular la actividad cinasa de B-Raf mutante. Esto permite que el experto en la materia seleccione directamente los moduladores de cinasa. Preferentemente, los moduladores de cinasa son inhibidores (B-Raf mutante) de cinasa.

En una forma de realización preferida, la actividad de B-Raf puede medirse según el siguiente protocolo:

1. Se solubilizan las células en tampón de lisis (NaCl 150 mM, HEPES 25 mM [pH 7,3], ortovanadato de sodio 1 mM, Triton X-100 al 1%, inhibidores de proteasa, ditiotreitól 0,5 mM).

2. Se incuba el lisado en hielo durante 10 min. y se centrifuga a 14.000 g durante 10 min., y se incuba el sobrenadante con anticuerpo policlonal antiB-Raf y luego con proteína G-Sepharose a 4°C durante 1 h.

3. Se lavan los inmunoprecipitados dos veces con tampón de lisis, y se lleva a cabo la reacción de cinasa a 30°C durante 10 min. en tampón cinasa (ATP 0,2 mM, MgCl₂ 30 mM, MnCl₂ 2 mM, β-glicerofosfato de sodio 40 mM, ortovanadato de sodio 0,2 mM, ácido okadaico 2 mM, β-mercaptoetanol al 0,2%) con 1 mg de MEK1 recombinante purificado añadido como sustrato.

4. Tras la activación de MEK1, se añadieron 15 mCi de [³²P]ATP y 1 mg de Erk (K52R) defectuoso en cinasa como sustrato durante 2 min. adicionales. La reacción se termina mediante la adición de tampón de muestra, se hierve la muestra durante 5 min., y se separan las proteínas mediante SDS-PAGE.

5. Se transfieren las proteínas del gel a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno), en la que se cuantifica la cantidad de K52R Erk radiomarcado mediante un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad.

6. Para los cálculos de la actividad de B-Raf, se determina la cantidad de la proteína B-Raf en la misma membrana explorando con sondas la membrana con anticuerpo IgG de cabra antirratón marcado con ¹²⁵I tras inmunotransferencia de anticuerpo monoclonal antiB-Raf de ratón.

7. El ensayo puede repetirse en presencia o ausencia del/de los compuesto(s) que va(n) a someterse a prueba.

Opcionalmente, el/los compuesto(s) de prueba identificado(s) puede(n) entonces someterse a pruebas *in vivo* para determinar sus efectos sobre una ruta de señalización de B-Raf mutante, por ejemplo tal como se expone en la forma de realización anterior.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la "actividad de B-Raf mutante" puede referirse a cualquier actividad de B-Raf mutante, incluyendo su actividad de unión, pero en particular se refiere a la actividad de fosforilación de B-Raf mutante. Por lo tanto, la invención puede configurarse para detectar la fosforilación de compuestos diana por B-Raf mutante, y la modulación de esta actividad por posibles agentes terapéuticos.

Los ejemplos de compuestos que modulan la actividad de fosforilación de B-Raf mutante incluyen mutantes negativos dominantes del propio B-Raf. Tales compuestos pueden competir por la diana de B-Raf mutante, reduciendo así la actividad de B-Raf mutante en un sistema biológico o artificial. Por tanto, la invención se refiere además a compuestos que pueden modular la actividad de fosforilación de B-Raf mutante.

Los compuestos que influyen en la actividad de B-Raf mutante pueden ser de casi cualquier descripción general, incluyendo compuestos de bajo peso molecular, que incluyen compuestos orgánicos que puede ser lineales, cíclicos, policíclicos o una combinación de los mismos, péptidos, polipéptidos incluyendo anticuerpos, o proteínas. En general, tal como se utiliza en la presente memoria, "péptidos", "polipéptidos" y "proteínas" se consideran equivalentes.

Muchos compuestos según la presente invención pueden ser compuestos de partida útiles para el desarrollo de fármacos. Los compuestos de partida útiles son especialmente anticuerpos y péptidos, y particularmente anticuerpos intracelulares expresados dentro de la células en un contexto de terapia génica, que pueden utilizarse como modelos para el desarrollo del péptido o agentes terapéuticos de bajo peso molecular. En un aspecto preferido de la invención, los compuestos de partida y B-Raf mutante u otros péptidos diana pueden cristalizarse conjuntamente con el fin de facilitar el diseño de compuestos de bajo peso molecular adecuados que imitan la interacción observada con el compuesto de partida.

La cristalización implica la preparación de un tampón de cristalización, por ejemplo mezclando una disolución del péptido o complejo peptídico con un "tampón de reserva", preferentemente en una razón de 1:1, con una concentración inferior del agente de precipitación necesario para la formación de cristales. Para la formación de cristales, se aumenta la concentración del agente de precipitación, por ejemplo mediante la adición del agente de precipitación, por ejemplo mediante titulación, o dejando que la concentración del agente de precipitación se equilibre mediante difusión entre el tampón de cristalización y un tampón de reserva. En condiciones adecuadas, tal difusión del agente de precipitación se produce a lo largo del gradiente del agente de precipitación, por ejemplo del

tampón de reserva que presenta una concentración superior de agente de precipitación al tampón de cristalización que presenta una concentración inferior de agente de precipitación. La difusión puede lograrse por ejemplo mediante técnicas de difusión en fase de vapor que permiten la difusión en fase gaseosa común. Las técnicas conocidas son, por ejemplo, métodos de difusión en fase de vapor, tales como el método de "gota pendiente" (*hanging drop*) o de "gota posada" (*sitting drop*). En el método de difusión en fase de vapor, una gota del tampón de cristalización que contiene la proteína pende por encima o se posa al lado de una fuente mucho más grande de tampón de reserva. Alternativamente, el equilibrio del agente de precipitación puede lograrse a través de una membrana semipermeable que separa el tampón de cristalización del tampón de reserva e impide la dilución de la proteína en el tampón de reserva.

En el tampón de cristalización, el péptido o el complejo péptido/pareja de unión presenta preferentemente una concentración de hasta 30 mg/ml, preferentemente desde aproximadamente 2 mg/ml hasta aproximadamente 4 mg/ml.

La formación de cristales puede lograrse en diversas condiciones que se determinan esencialmente por los siguientes parámetros: pH, presencia de sales y aditivos, agente de precipitación, concentración de proteína y temperatura. El pH puede oscilar entre aproximadamente 4,0 y 9,0. La concentración y el tipo de tampón no importan mucho, y por tanto son variables, por ejemplo dependiendo del pH deseado. Los sistemas tampón adecuados incluyen tampón fosfato, acetato, citrato, Tris, MES y HEPES. Las sales y aditivos útiles incluyen, por ejemplo, cloruros, sulfatos y otras sales conocidas por los expertos en la materia. El tampón contiene un agente de precipitación seleccionado de entre el grupo constituido por disolvente orgánico miscible en agua, preferentemente polietilenglicol que presenta un peso molecular de entre 100 y 20.000, preferentemente entre 4.000 y 10.000, o una sal adecuada, tal como un sulfato, particularmente sulfato de amonio, un cloruro, un citrato o un tartrato.

Un cristal de un péptido o complejo de péptido/pareja de unión según la invención puede modificarse químicamente, por ejemplo mediante la derivatización de átomos pesados. En resumen, tal derivatización puede conseguirse sumergiendo un cristal en una disolución que contienen sales de átomos de metal pesado, o un compuesto organometálico, por ejemplo cloruro de plomo, tiomolato de oro, timerosal o acetato de uranilo, que puede difundir a través del cristal y unirse a la superficie de la proteína. La(s) ubicación/ubicaciones del/de los átomo(s) de metal pesado unido puede(n) determinarse mediante análisis de difracción de rayos x del cristal sumergido, cuya información puede utilizarse por ejemplo para construir un modelo tridimensional del péptido.

Puede obtenerse un modelo tridimensional, por ejemplo, a partir de un derivado de átomo pesado y/o a partir de todo o parte de los datos estructurales proporcionados por la cristalización. Preferentemente la construcción de tal modelo implica el modelado por homología y/o la sustitución molecular.

El modelo de homología preliminar puede crearse mediante una combinación de alineación de secuencias con cualquier RAF cinasa cuya estructura se conoce, la predicción de la estructura secundaria y el examen de bibliotecas estructurales. Por ejemplo, las secuencias de B-Raf mutante y un péptido candidato pueden alinearse utilizando a programa de software adecuado.

También puede utilizarse el software computacional para predecir la estructura secundaria del péptido o complejo de péptido. La secuencia del péptido puede incorporarse en la estructura de B-Raf mutante. Las incoherencias estructurales, por ejemplo fragmentos estructurales alrededor de inserciones/deleciones pueden moldearse examinando una biblioteca estructural para buscar péptidos de la longitud deseada y con una conformación adecuada. Para la predicción de la conformación de la cadena lateral, puede utilizarse una biblioteca de rotámeros de cadena lateral.

El modelo de homología final se utiliza para resolver la estructura cristalina del péptido mediante sustitución molecular utilizando un software informático adecuado. El modelo de homología se posiciona según los resultados de la sustitución molecular, y se somete a refinado adicional que comprende cálculos de la dinámica molecular y el modelado del inhibidor utilizado para la cristalización en la densidad de electrones.

Estudios de activación de cinasas

Los mutantes de cinasa constitutivamente activos son herramientas de investigación valiosas en la elucidación de las rutas de señalización y el desarrollo de agentes terapéuticos que modulan tales rutas. Según la invención se ha examinado la actividad de cinco de los mutantes. Estos son G463V, G468A, G595R, L596V y V599E. Para examinar la actividad de los mutantes, se expresan de manera transitoria versiones etiquetadas de epítipo myc de B-Raf en células COS. Para examinar la actividad de esta B-Raf expresada de manera exógena, la proteína se inmunoprecipita utilizando la etiqueta myc y se examina en un ensayo en cascada de cinasas, utilizando GST-MEK, GST-ERK y proteína básica de mielina (MBP) producidos de forma bacteriana como sustratos secuenciales (Marais *et al* (1997); J. Biol. Chem. 272: 4378-83). B-Raf presenta altos niveles de actividad cinasa basal, siendo significativamente más activo en ausencia de activadores de o bien Raf-1 o bien A-Raf (Marais *et al* (1997); J. Biol. Chem. 272: 4378-83). Además, mientras que Raf-1 y A-Raf requieren tanto Ras oncogénico (^{V12}Ras) como Src activado para estimular la actividad completa, B-Raf se activa completamente por la coexpresión con ^{V12}Ras solo.

Por tanto se somete a ensayo el efecto que estas mutaciones presentan tanto en la actividad basal de B-Raf como en la actividad estimulada por ^{V12}Ras. Comparado con B-Raf de tipo natural, ^{G463V}B-Raf, ^{G468A}B-Raf, ^{L596V}B-Raf y ^{V599E}B-Raf presentan todos actividad cinasa basal elevada (figura 1A, 1B). En comparación, ^{G595R}B-Raf presenta actividad basal reducida comparada con la proteína de tipo natural (figura 1A). Se observaron resultados similares *in vivo*. Los cinco mutantes se estimulan mediante Ras oncogénico (^{V12}Ras). Sin embargo, la activación del plegamiento para cada uno de los mutantes se reduce en comparación con B-Raf de tipo natural (véanse las figuras 1A, B) y es particularmente pequeña en el caso de ^{V599E}B-Raf. Sin embargo, puesto que la actividad basal de cada uno de ^{G463V}B-Raf, ^{G468A}B-Raf, ^{L596V}B-Raf y ^{V599E}B-Raf es superior a la de la proteína de tipo natural, entonces los niveles de actividad absolutos observados son superiores en cada caso en presencia de ^{V12}Ras que para la proteína de tipo natural. Resulta interesante que ^{G595R}B-Raf también se estimula por ^{V12}Ras, pero la activación era muy débil, probablemente debido a los bajos niveles de partida.

También se examina la capacidad de cada uno de los mutantes activados de transformar células NIH3T3. En este ensayo, B-Raf de tipo natural transforma células a muy baja eficiencia (~0,02% del número de colonias observadas con ^{V12}Ras). Sin embargo, tal como se muestra en la figura 2, cada uno de los mutantes activados transforma las células NIH3T3 de 40 a 85 veces más de manera más eficaz que B-Raf de tipo natural.

Se investiga el grado de dependencia del crecimiento de las células que contiene los mutantes de B-Raf en la ruta de Ras/MEK. Para estos estudios, se utilizan dos ensayos. El primero es someter a prueba si su crecimiento se suprime mediante la microinyección del anticuerpo monoclonal Y13-259, un anticuerpo que neutraliza la actividad del Ras celular. Los resultados se muestran en la tabla 2. Los datos se dividen en tres grupos. El primer grupo presenta B-Raf de tipo natural y su crecimiento se inhibe (40-100%) por Y13-259. El segundo grupo presenta mutaciones activantes en B-Raf y su crecimiento no se inhibió (<15%) por Y13-259. El tercer grupo (sólo un caso) contiene una célula que presenta un Ras activante y una mutación de B-Raf activante. Curiosamente, el crecimiento de esta línea celular se inhibió por Y13-259, pero esto puede ser porque el crecimiento depende tanto de Ras como de B-Raf.

El segundo enfoque es examinar los efectos del compuesto U0126, un inhibidor de MEK1/2, los únicos sustratos conocidos para B-Raf. Estos resultados demuestran que el tratamiento de las células que presentan mutaciones activantes en B-Raf dan como resultado la supresión de la proliferación celular cuando se suprime la actividad de MEK lo que indica que la activación de la señalización celular por mutantes activados de B-Raf es una diana terapéutica. Véase la tabla 3. En conjunto, los datos anteriores demuestran que

1. Existen dos clases de mutación de B-Raf en los tumores humanos, las mutaciones activantes y las inactivantes.
2. Las versiones activantes de B-Raf pueden transformar las células NIH3T3 y entonces pueden definirse como oncogenes.
3. Las líneas celulares tumorales humanas que expresan proteína B-Raf activada no son sensibles a Y13-259, un anticuerpo que neutraliza Ras, lo que indica que su crecimiento no depende de las proteínas Ras y por tanto es poco probable que responda a compuestos que seleccionan como diana las proteínas Ras. Esto indica que los mutantes activantes pueden superar la necesidad de señales de Ras en células tumorales.
4. Sin embargo, su actividad se suprime por el compuesto U0126, lo que indica que su crecimiento depende de la actividad de esta ruta y por tanto probablemente responda a agentes terapéuticos que seleccionan como diana la actividad de B-Raf.
5. Dado que algunas de las mutaciones están en un bucle de unión a fosfato del dominio cinasa (G463, G465, G468) y estos aminoácidos están conservados en todas las cinasas, estas mutaciones representan un mecanismo global y conveniente para activar cinasas. Esto presenta implicaciones importantes para la selección de agentes terapéuticos.

Por lo tanto, la invención proporciona una cinasa activa constitutivamente que comprende una mutación en el bucle de unión a fosfato de la misma seleccionada de entre el grupo constituido por mutaciones en una o más posiciones correspondiente a las posiciones 463, 465 y 468 de B-Raf.

Preferentemente, la mutación es en una o más de las posiciones 463 y 468.

Las más preferidas son G463V y G468A.

Se ha identificado que muchas cinasas están asociadas con una enfermedad específica, pero sus mecanismos de activación no siempre pueden entenderse completamente. Los mutantes activados constitutivamente de las mismas tal como se describe en la presente memoria proporcionan un reactivo que puede utilizarse para seleccionar inhibidores sin tener que elucidar en primer lugar su mecanismo de activación.

Las cinasas a título de ejemplo incluyen otras cinasas en la ruta de las MAP cinasas, tales como MEK y ERK y otras rutas de MAP cinasas, tales como p38, JNK y sus cinasas anteriores. Aunque algo se sabe acerca de sus mecanismos de activación, para algunas se desconoce cómo activarlas mediante mutación directa. La presente invención proporciona mutantes activados para dichos fines de selección de cinasas. Además, también pueden activarse cinasas posteriores a las MAP cinasas, tales como p90Rsk, mnk, etc. Aunque se desconocen los mecanismos de activación alternativos, la mutación puede ser una ruta preferida en los ensayos de selección.

La invención también engloba determinadas cinasas conocidas que no presentan ningún mecanismo de activación conocido, tal como Lkb1, que está implicada en el síndrome de Putz-jegers; y PDK1 cinasa que puede estar activa constitutivamente, pero que puede activarse adicionalmente para la selección de fármacos. Esta cinasa está implicada en la señalización de la insulina, por lo que puede ser una diana útil para la diabetes. También implicada en la diabetes tipo II es la cinasa activada por AMP, que se activa de nuevo mediante fosforilación y por tanto es sensible a la activación mediante la mutación.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para seleccionar uno o más compuestos para un efecto inhibitor en una cinasa, que comprende

(a) preparar una cinasa mutante que comprende una sustitución, deleción o inserción de aminoácido en una o más de las posiciones 463, 465 ó 468 tal como se detalló anteriormente;

(b) exponer la cinasa mutante a dicho uno o más compuestos en presencia de un sustrato de cinasa; y

(d) determinar la capacidad de la cinasa para fosforilar el sustrato en presencia de uno o más compuestos.

La actividad de fosforilación de la cinasa en presencia del/de los compuesto(s) de prueba se compara ventajosamente con su actividad en ausencia del/de los compuesto(s); una reducción en la actividad basal de la cinasa mutante es indicativo de la inhibición de la cinasa por el/los compuesto(s) Para múltiples ensayos, puede determinarse un nivel de referencia de fosforilación para un ensayo particular, y utilizarse como una base para su comparación.

Preferentemente, la cinasa es una Raf proteína cinasa; ventajosamente, es B-Raf.

Por el contrario, mutantes reprimidos constitutivamente tales como G595R de B-Raf son útiles en la selección de activadores de una cinasa.

Validación de bRAF como diana farmacológica.

Con el fin de validar BRAF como diana en el cáncer, en primer lugar se sometió a prueba si el crecimiento de las células que expresan formas mutantes activadas de BRAF requería la ruta de señalización de RAF-MEK-ERK para su crecimiento. Para este fin, se trataron líneas celulares de melanoma y colorrectales que alojan mutaciones en el gen de BRAF con agentes farmacológicos que bloquean la señalización a través de esta ruta. Se someten a prueba dos compuestos. Uno es el compuesto U0126, que es un inhibidor de MEK y que, por tanto, desacopla la señalización de RAF-ERK en las células (Sebolt-Leopold *et al.*, 1999). También se sometió a prueba BAY 43-9006. Este es un inhibidor de las proteínas RAF (Lyons *et al.*, 2001). La capacidad de estos compuestos para bloquear la actividad de ERK se sometió a prueba en la línea celular de melanoma WM266.4, que presenta sustitución de un ácido aspártico por valina en la posición 599 del gen de BRAF. Esta es una mutación activante (figura 3A). Estas células también presentan actividad cinasa basal elevada tal como se evaluó utilizando un anticuerpo (antippERK) que sólo se une a la versión de ERK activada, dos veces fosforilada. Cuando el anticuerpo antippERK se utiliza para someter a inmunotransferencia de tipo Western las células WM266.4, se observa una señal fuerte en la región de 42-44 kDa, lo que indica que ERK presenta actividad cinasa basal elevada en estas células (figura 3B). Sin embargo, cuando las células se tratan con U0126, o Bay 43-9006, la actividad ERK se suprime fuertemente (figura 3B). Se obtuvieron resultados similares utilizando células A375, una línea celular de melanoma que aloja una mutación V599E en el gen de BRAF (Davies *et al.*, 2002). Estos datos demuestran que se requiere esta señalización de RAF y MEK para el mantenimiento de la actividad ERK elevada en estas células.

A continuación, se sometió a prueba qué efecto presentaba BAY 43-9002 en el crecimiento de las células WM266.4 y se descubrió que este compuesto bloqueaba el crecimiento de estas células con un CI_{50} de $\sim 6,1 \mu M$ (tabla 4). BAY 43-9006 también bloqueó el crecimiento de las células colo 829 y de las células BE en el intervalo micromolar bajo (tabla 4). Las células Colo 829 son una línea celular de melanoma que alberga una mutación V599E en el gen de BRAF y las células BE son una línea celular colorrectal que alberga una mutación G463 en el gen BRAF (Davies *et al.*, 2002). Tal como se ha presentado, ambas mutaciones son activantes (Davies *et al.*, 2002). Finalmente, se sometieron a prueba los efectos de estos inhibidores en la síntesis del ADN. La incubación de células WM-266.4 con U0126 $10 \mu M$ o BAY 43-9006 $10 \mu M$ suprimió fuertemente la síntesis de ADN en estas células (figura 4). Estos datos demuestran que la activación de ERK y la proliferación en células que albergan mutaciones activantes en el gen de BRAF dependen de las actividades de RAF y MEK.

Existen tres genes de RAF en células de mamífero, CRAF (también denominado RAF-1), ARAF y BRAF. U0126 es un inhibidor de MEK y por tanto no podrá distinguir la señalización de CRAF de la de BRAF o ARAF. De manera similar, BAY 43-9006 puede inhibir tanto CRAF como BRAF, de modo que no distinguirá entre las diferentes isoformas de RAF. Por tanto, con el fin de determinar qué isoforma de RAF se realizó la señalización de ERK en WM266.4, se trataron células con sondas de ARN de interferencia pequeño (ARNip) que son selectivas para las isoformas de RAF individuales. Se trataron las células WM266.4 con sondas de ARNip diseñadas para ser específicas para detectar BRAF, o CRAF, o un control mezclado que no debe reconocer ninguna isoforma. La eficacia del reconocimiento de CRAF se determinó mediante inmunotransferencia de tipo Western. El tratamiento de las células WM266.4 con una sonda de ARNip específica para CRAF dio como resultado una supresión fuerte de la expresión de CRAF (figura 5A). Se observaron resultados similares en las células Colo 829 y células BE (figura 5A). Cuando las células WM-266.4 se trataron con una sonda de ARNip específica para BRAF, la actividad de BRAF en las células se suprimió fuertemente, pero no se observó la supresión cuando se trataron las células con el control mezclado (figura 5B). Se observaron resultados similares en las células Colo 829 y BE (figura 5B).

Los datos anteriores muestran que ARNip puede utilizarse para suprimir selectivamente la expresión de las proteínas BRAF y CRAF. Por tanto, se examinó cómo afectaba la eliminación de cada una de estas proteínas a la actividad de ERK en estas células. Cuando se utilizó ARNip para eliminar la expresión de la proteína BRAF en WM-266.4, se suprimió la actividad de ERK de una manera dependiente del tiempo (figura 6). Por el contrario, la eliminación de la expresión de CRAF o el tratamiento con las sondas de ARNip mezcladas no afectó a la actividad de ERK (figura 6). Se obtuvieron resultados similares en células Colo 829 (figura 6). Estos resultados demuestran que BRAF es la principal isoforma que realiza la señalización para ERK en células de melanoma que expresan proteínas BRAF activadas. CRAF parece que no realiza la señalización para la actividad de ERK basal en estas células.

Finalmente, se examinó cómo afectaba la eliminación de BRAF al crecimiento celular, examinando los efectos de la apoptosis en las células WM-266.4. Para estos estudios, se fijaron las células en etanol al 70%, se tiñeron con yoduro de propidio y se examinaron sus perfiles de ciclo celular mediante citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Utilizando este análisis, las células apoptóticas aparecen en el pico de sub-G1. En estas células, la apoptosis espontánea es muy baja, con menos del 1% de la célula.

Validación de reactivos que aparecen en el pico de sub-G1 (figura 7, tabla 5). Cuando se tratan las células con U0126, la proporción de las células en el pico de sub-G1 aumenta significativamente (~3,5%; figura 7, tabla 5). De manera similar, la eliminación de la expresión de BRAF mediante la utilización de ARNip también aumenta el número de células en el pico de sub-G1, mientras que la eliminación de CRAF o el tratamiento con el control mezclado no lo hacen. También se examinó la escisión de PARP, un marcador de la inducción de apoptosis. El tratamiento de las células con ARNip de BRAF indujo la escisión de PARP, mientras que el control mezclado no lo hizo. Estos datos demuestran que cuando se elimina la proteína BRAF mutante en las líneas celulares de melanoma, se induce la apoptosis.

En resumen, estos resultados demuestran que en líneas celulares de melanoma que expresan mutantes activados de BRAF, se requiere la señalización a través de RAF y MEK para la activación de ERK y para el crecimiento celular. BRAF, en vez de CRAF parece ser la principal isoforma de RAF que estimula la actividad de ERK, y parece proteger las células de la apoptosis. Estos datos sugieren que BRAF es una diana terapéutica importante en las células que se basan en la señalización de BRAF para el crecimiento y la protección frente a la apoptosis.

Desarrollo de ensayos de selección de alto rendimiento

Se ha desarrollado un ensayo HTS para el mutante de B-raf V599E. Con el fin de validar los resultados, se comprobó la actividad del lisado que expresa -Raf y los reactivos de GST-MKK1 llevando a cabo un ensayo acoplado convencional que emplea GST-ERK2 (cinasa competente) y mide la incorporación de ³³P-γ-fosfato en proteína básica de mielina (MBP). Tal como se muestra en la figura 8, en presencia del lisado de B-Raf se observó un aumento de 16 veces de la señal en comparación con el lisado control (que no expresa).

Validación de la plataforma de ensayo

Opción 1: Ensayo de cinasa acoplada en placas FlashPlate con glutatión

Principio de la plataforma: Se captura sustrato etiquetado con GST (ERK-2) sobre paredes embebidas en líquido de centelleo de una placa Flashplate mediante un recubrimiento de glutatión. La incorporación de ³³P-γ-fosfato en el sustrato debe dar como resultado una señal de centello medible.

Se evaluó la posibilidad de medir la incorporación de ³³P-γ-fosfato en GST-ERK2 sin actividad cinasa (GST-kdERK2) como el rendimiento de la actividad de B-Raf en un ensayo con placa Flashplate con glutatión. La figura 9 demuestra que, utilizando las condiciones transferidas del ejercicio de validación de reactivos, no se pudo detectar la incorporación dependiente de B-Raf de ³³P en GST-kdERK2 utilizando esta plataforma. Un ensayo con placa de filtro p81 convencional también resultó insatisfactorio. Como consecuencia de las características de amplificación de este

ensayo en cascada, el mantenimiento de una señal de ensayo en ausencia de la etapa de ensayo final (es decir, la fosforilación con ERK2 de MBP) requeriría más probablemente niveles significativamente aumentados de cada uno de los componentes restantes. Por tanto, se considera apropiado evaluar la plataforma basada en anticuerpos antes de emprender el ejercicio con reactivos más costoso de las titulaciones de B-Raf, MKK1 y ERK2 en esta plataforma radiométrica.

Opción 2: Ensayo con cinasas acopladas en formato DELFIA

El ensayo DELFIA (Inmunoensayo de fluorescencia de disociación aumentada por lantánidos) implica la medición de la fosforilación de ERK2 a través de la unión de un anticuerpo fosfoespecífico. El ensayo de cinasas acopladas B-Raf/GST-MKK1/GSTkdERK2 genera GST-kdERK2 fosforilada. Se utiliza una placa recubierta con antiGST para capturar GST-kdERK2. Se añade un anticuerpo primario que detecta específicamente ERK2 fosforilada en treonina y tirosina. Entonces, se añade un anticuerpo secundario marcado con europio {Eu}. En presencia de una disolución intensificadora, el marcador de Eu se disocia del anticuerpo que se absorbe a 335 nm y que permite la detección fluorométrica a una longitud de onda de emisión de 620 nm.

Se evaluó el ensayo de B-Raf en esta plataforma que utiliza una combinación de condiciones de ensayo de cinasa del ejercicio de validación de reactivos y condiciones del ensayo DELFIA convencional. La figura 10 muestra que en presencia del lisado de B-Raf se observó un aumento de 12,2 veces en la señal en comparación con el lisado control (que no expresa). La señal observada fue completamente dependiente de la presencia de los tres componentes enzima/sustrato.

Basándose en experimentos preliminares, se seleccionó la plataforma DELFIA para su desarrollo.

Desarrollo del ensayo con cinasas

Lisado de B-Raf

Se han utilizado tres lotes de lisado de B-Raf en todo el procedimiento. Se utilizó el lote A para establecer la plataforma de ensayo DELFIA. El lote B se ha utilizado durante el desarrollo del ensayo. Para los lotes B y C, una relación lineal aproximada entre la cantidad de lisado y el nivel de señal conseguido fue evidente entre 0,025 y 0,1 μ l por pocillo. Las cantidades finales seleccionadas de cada lote se basaron en conseguir una ventana de señal suficiente dentro del intervalo lineal. Como resultado de estas evaluaciones, se utilizó el lote A a 1 μ l/pocillo [96 pocillos] y los lotes B y C (selección) se han utilizado a 0,1 μ l/pocillo [96 pocillos] y 0,05 μ l/pocillo [384 pocillos].

Optimización de los niveles de anticuerpo

Preocupaciones iniciales en lo que se refiere a la posible competencia de ERK2 y MKK1 (ambos etiquetados con GST) para los sitios de unión a glutatión dieron como resultado ensayos de desarrollo tempranos que se llevaron a cabo utilizando un protocolo de "preunión".

Estas condiciones fueron las siguientes:

- Preunión de 100 ng/pocillo de GST-kdERK2 a placas recubiertas con glutatión de 96 pocillos.
- Adición del lisado de B-Raf (lote A), MKK1 (6,5 μ g/ml) y ATP (500 μ M) en un volumen final de DKB 50 μ M (véase el apéndice I) e incubación a 30°C durante 1 hora.

Se utilizó este protocolo para optimizar y economizar la carga de anticuerpos del sistema de detección. Se llevaron a cabo titulaciones tanto de anticuerpos primarios como secundarios para evaluar la posibilidad de reducir los niveles de anticuerpo mientras se mantenía una señal para razones de fondo $\geq 10,1$. Las figuras 4 y 5 indican que 1:3000 y 1:1000 fueron las concentraciones más bajas aceptables para anticuerpos marcados con Eu y fosfoERK2, respectivamente. Por tanto, todos los ensayos posteriores se realizaron utilizando estas concentraciones de anticuerpo.

Optimización de los niveles de MKK1 y ERK2

Se investigó la capacidad para obtener el componente enzimático de este ensayo "en disolución" sin una etapa de preunión para permitir la titulación de concentraciones definidas tanto de MKK1 como de ERK2. Además, la reducción de este ensayo a una mezcla en una sola etapa (homogéneo) de reactivos implicados en la cinasa lo haría más sensible a HTS. La figura 13 ilustra que el ensayo homogéneo y el protocolo de preunión proporcionan datos equivalentes. Todos los ensayos posteriores se realizaron utilizando el protocolo "homogéneo".

La titulación de ERK-2 mientras que se mantienen los niveles de MKK1 indicó que se consiguió la señal máxima a una razón de $\sim 12: 1$ (ERK2:MKK1). En un intento por economizar reactivos, se realizó una titulación de matriz de estos componentes. Utilizando 0,1 μ l de B-Raf (lote B), la combinación de GST-MKK1 6,5 μ g/ml y GST-kdERK2 80

5 $\mu\text{g/ml}$ proporcionó la señal máxima y aunque fue posible alguna reducción en la carga de Raf/MKK1 se consideró apropiado mantener la razón original. Esta decisión se tomó con el conocimiento de que alteraciones adicionales en los parámetros de ensayo (por ejemplo transferencia a 384; reducción de la carga de ATP, transferencia a automatización) pueden reducir la ventana de señales adicional. Todos los ensayos posteriores, por tanto, se realizaron utilizando GST-MKK1 6,5 $\mu\text{g/ml}$ y GST-kdERK2 80 $\mu\text{g/ml}$.

Efecto de la temperatura

10 La capacidad para ejecutar este ensayo a temperatura ambiente simplificaría significativamente el proceso de HST eventual. Por tanto, se investigó la señal de ensayo a temperatura ambiente y a 30°C. Basándose en los resultados obtenidos, la razón de la señal con respecto al fondo fue aceptable a temperatura ambiente y todos los ensayos posteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Evaluación del ensayo en formato de placa de 384 pocillos

15 En un intento por potenciar la producción y minimizar la utilización de reactivos durante la selección, se evaluó el rendimiento del formato de ensayo de 384 pocillos. En este formato, el ensayo realizado por pocillo y tanto los ensayos de volumen patrón (final de 50 μl) como de volumen de reactivo reducido (25 μl) presentaron de nuevo razones de señal con respecto a fondo altamente aceptables. Todos los experimentos de desarrollo posteriores se realizaron en el formato de 384 pocillos utilizando volúmenes de reacción de 25 μl .

Optimización de la concentración de ATP

25 La concentración de ATP de un ensayo de selección de cinasas presenta el potencial de influir en el número y la naturaleza de los compuestos inhibidores identificados. La definición de los niveles de ATP de un ensayo de este tipo es un equilibrio de las siguientes consideraciones:

- emplear niveles de ATP que permitan una ventana medible, constante de señal de ensayo
- emplear niveles de ATP lo suficientemente bajos para permitir la identificación de inhibidores competitivos de ATP
- emplear niveles de ATP lo suficientemente altos de manera que los agentes competitivos de ATP débiles sean ineficaces en el contexto de que sea menos probable que se detecte el ATP celular.

35 Los ensayos de selección de cinasas se realizan habitualmente a una concentración de ATP con respecto a Km. La derivación de los valores de Km para B-Raf y MKK1 necesita el desarrollo de ensayos individuales para cada enzima en vez del ensayo acoplado desarrollado en la presente memoria. El desarrollo de tales ensayos facilitará sin duda un entendimiento futuro del modo de acción de cualquier compuesto inhibidor identificado en el ensayo de selección.

40 Para la definición de la carga de ATP del ensayo de selección, se determinó la dependencia de la concentración del ensayo acoplado. La señal generada es máxima y la mitad de la máxima con ATP $\sim 200 \mu\text{M}$ y $\sim 18 \mu\text{M}$ respectivamente. Los estudios adicionales indicaron que 50 μM fue la concentración de ATP más baja a la que se observó la señal robusta del ensayo día a día (por ejemplo señal: 8000, CV del 2%). Los niveles de ATP inferiores (10 μM) dieron como resultado una variación relativa superior en la señal del ensayo (por ejemplo señal: 2500, CV del 10%). La concentración de ATP final del ensayo de selección se definió como 50 μM para proporcionar una ventana de señal lo suficientemente grande para soportar cualquier desgaste durante la transferencia del ensayo a automatización.

Transcurso de tiempo del ensayo de selección.

50 Resulta crítico que un ensayo de selección se realice dentro de su periodo de linealidad. Para determinar la duración de la fase lineal del ensayo acoplado, se planteó un transcurso de tiempo de hasta 75 minutos. La reacción fue lineal entre 5 y 45 minutos. El periodo de "latencia" observado es característico de este formato de ensayo y refleja el tiempo requerido para acumular niveles detectables del producto de reacción. Basándose en este estudio, se definió un periodo de incubación de 45 minutos a temperatura ambiente.

Condiciones finalizadas para el ensayo DELFIA de B-Rafv599e

Las condiciones de selección finales resumen para el ensayo fueron las siguientes:

Reacción enzimática:

- Placa recubierta con glutatión de 384 pocillos
- Lisado de B-Raf 0,05 μl
- GST-MKK1 6,5 $\mu\text{g/ml}$
- GST-kdERK2 80 $\mu\text{g/ml}$

- ATP 50 μ M
- Incubación a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- Volumen final de 25 μ l

5 **Condiciones de detección:**

- Anticuerpo antifosfoERK2 1 :3000
- Anticuerpo antirratón marcado con Eu 1: 1000

10 *Desarrollo de la automatización y control de calidad*

Validación de reactivos del lote de selección

15 Utilizando las condiciones descritas anteriormente, se realizaron ensayos para comparar los lotes de desarrollo de ensayo y de selección de B-Raf, MKK1 y ERK-2. En todos los casos, se llevó a cabo de forma equivalente el lote de selección de los reactivos en comparación con los utilizados para el desarrollo del ensayo.

Miniserías del ensayo DELFIA de B-RafV599E automatizado.

20 En la preparación para la selección, se diseñó para el ensayo una estrategia de manipulación de líquidos automatizada. Con el fin de someter a prueba este sistema, se realizaron "miniserías" del ensayo de B-Raf automatizado utilizando placas de selección simulada (es decir sin compuesto pero conteniendo columnas de control patrón). Los datos derivados de estos experimentos representan tanto una medida de la robustez del ensayo biológico como la precisión y la consistencia del proceso de automatización implicado.

25 En resumen, cada placa contenía reacciones de B-Raf cinasa en todos los pocillos de las columnas 1-22 y las columnas 23-24 contenían las reacciones control. Con el fin de definir la calidad de los datos generados por el ensayo automatizado, se realizaron 4 miniserías en placa utilizando este formato en dos días separados. Dentro de cada "miniserie" se utilizó una placa para definir los valores de CI_{50} para algunos inhibidores previstos de este ensayo. Los inhibidores cubrían un intervalo de modos de acción: estaurosporina (inhibidor de cinasa competitivo con ATP), SB203580 (inhibidor de RAF competitivo con ATP) y U0126 (inhibidor de MKK1 competitivo sin ATP).

30 El ensayo demuestra buena consistencia, tanto dentro de las placas como entre días. Los datos obtenidos muestran que el ensayo automatizado logra los criterios definidos para un ensayo de HTS *in vitro* con formato de 384 pocillos:

- Señal con respecto al fondo de por lo menos 10:1
- Z' >0,4
- CV de fila y columna <15%

40 Los inhibidores utilizados validaron adicionalmente el ensayo generando la inhibición dependiente de la concentración de la actividad de Raf/MKK1. De importancia particular es el hecho de que los inhibidores convencionales devolvían valores de CI_{50} dentro de un intervalo de 2 veces en días separados. Estos datos también indican que estos compuestos se habrían identificado como resultados positivos cuando se sometieron a prueba a ~ 30 μ m (10 μ g/ml) en este ensayo de detección.

45 **Protocolo finalizado para DELFIA de B-Raf V599E automatizado**

Cóctel enzimático (volumen final 12 μ l):

50 Lisado de Raf 0,05 μ l

GST-MKK1 0,0325 μ l

55 GST-kdERK2 0,065 μ l

1. 3 μ l de compuesto de prueba colocado en placas previamente en placas de 384 pocillos recubiertas con glutatión.

2. 12 μ l de cóctel enzimático añadido mediante PlateMatePlus.

60 3. 10 μ l de ATP añadido mediante Asys.

4. Placa agitada a TA durante 45 min.

65 5. Placa lavada con 3x80 μ l/pocillo de tampón de lavado de DELFIA (DWB) utilizando dispositivo de lavado de placas ELX405.

6. 25 μ l de antifosfoERK2 añadido mediante Multidrop.
- 5 7. Placa agitada a TA durante 1h
8. Placa lavada con 3x80 μ l/pocillo de DWB.
9. 25 μ l de anticuerpo antirrátón marcado con Eu añadido mediante Multidrop.
- 10 10. Placa agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Placa lavada con 3x80 μ l/pocillo de DWB.
- 15 12. 25 μ l de disolución intensificadora de DELFIA añadida mediante Multidrop.
13. Placa incubada a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos.
14. Placa leída en dispositivo FUSION.

Tabla 2. Esta tabla presenta la inhibición del crecimiento de diversas líneas celulares con mutaciones de B-Raf. La proporción de inhibición (como porcentaje del número de células que no incorporan BrdU) se presenta en la última columna.

Nombre de la célula	Tejido	Mutación de Ras	Mutación de B-Raf	Fase S de Y13-259	Inhibición
SW620	Colorrectal	onc	tipo natural	inhibida	92%
SK-Mel2	Melanoma		tipo natural	inhibida	70%
HMV11-Riken	Melanoma		tipo natural	inhibida	100%
DLD1	Colorrectal	K13Asp/tipo natural	tipo natural	inhibida	40%
SW480	Colorrectal	K12	tipo natural	inhibida	57%
LS174T	Colorrectal	K12Asp/tipo natural	tipo natural	inhibida	84%
JW2	Colorrectal	K12	tipo natural	inhibida	79%
CaCO2	Colorrectal	Tipo natural	tipo natural	inhibida	60%
HCT-116	Colorrectal	K13 Asp	tipo natural	inhibida	95%
colo741	Colorrectal		V599E	no	0%
SK-MEL-28	Melanoma	B	V599E	no	4%
WM-266-4WM-115	Melanoma	B	V599D	no	10%
A2058	Melanoma		V599E	no	0%
Malme	Melanoma		V599E	no	0%
LS411 N	Colorrectal		V599E	no	0%, 0%
HT29	Colorrectal	tipo natural	V599E	no	15%
colo205	colorrectal	tipo natural	V599E	no	?3%
Mawi	Colorrectal	tipo natural	V599E	no	5%
NCI-H2087	Par de línea celular de CPCNP	onc	V599E L596V	no inhibida	77%

Tabla 3. Esta tabla presenta la inhibición del crecimiento celular en células tratadas con el inhibidor de MEK U0126.

Nombre de la célula	Tejido	Mutación de Ras	Mutación de B-Raf	U0 inhibe S	UO/ERK-inhib
SW620	Colorrectal	onc	tipo natural	92%	>90%
CHL	Melanoma		tipo natural	51%	90%
colo741	Colorrectal		V599E	76%	>90%
SK-MEL-28	Melanoma	b	V599E	98%	>90%
WM-266-4/WM-115	Melanoma	b	V599D	>99%	>90%
A2058	Melanoma		V599E	68%	80%
NCI-H2087	Par de línea celular de CPCNP	onc	L596V	56%	>90%
Mawi	Colorrectal	tipo natural	V599E	80%	>90%

Tabla 4. Inhibición del crecimiento celular por BAY 43-9006.

Línea celular	IC ₅₀ μM
WM266.4	6,1
Colo 829	5,1
BE	5,4

Se incubaron las líneas celulares en presencia de niveles crecientes de BAY 43-9006 y se determinaron los niveles de crecimiento celular mediante tinción con sulforrodamina B. Se determinaron los valores de IC₅₀ mediante el análisis de regresión no lineal y se indican.

Tabla 5. Análisis del ciclo celular.

Línea celular	No tratada	U0126	Proporción de acontecimientos (%)		
			DMSO	ARNip BRAF	ARNip CRAF
Sub-G1	0,8	3,5	0,1	2,9	0,6
G1	87,8	87,5	87,8	86,6	86,3
S	4,8	1,3	4,5	3,6	7,8
G2/M	6,7	7,8	7,5	7	5,4

Se trataron las células WM-266.4 con U0126, DMSO, ARNip para BRAF, ARNip para CRAF o el control de ARNip mezclado. Se incubaron las células durante 96 horas y se fijaron las células y se tñieron con yoduro de propidio para el análisis del ciclo celular mediante FACS. Se presenta la proporción de las células en cada fase del ciclo celular.

Aspectos computacionales de la detección

5 La detección del polipéptido B-Raf mutante y/o los ácidos nucleicos de *B-raf* mutantes puede automatizarse para proporcionar la selección paralela de forma masiva rápida de poblaciones de muestras. Se conocen en la técnica procedimientos computerizados para la detección de mutaciones, y generalmente implicarán la combinación de un dispositivo de secuenciación, u otros dispositivo que puede detectar la variación de la secuencia en polipéptidos o ácidos nucleicos, una unidad de procesamiento de datos y un dispositivo de salida que puede presentar el resultado de una forma interpretable por un técnico o médico.

10 En un aspecto preferido, por tanto, la invención proporciona un procedimiento automatizado para detectar una mutación en una posición de la secuencia diana en un ácido nucleico derivado de tumor humano primario que se produce de manera natural que codifica para un polipéptido B-Raf, que comprende:

15 secuenciar una muestra de un producto de amplificación del ácido nucleico a partir del tumor humano primario que se produce de manera natural para proporcionar un conjunto de datos de muestra que especifican una pluralidad de datos de identificación de pares de bases medidos en un dominio diana que se extiende desde una posición de la secuencia de inicio hasta una posición de la secuencia final;

20 determinar la presencia o ausencia de la mutación en la muestra condicionado a si el dato de identificación de pares de bases medido para la posición de la secuencia diana corresponde a un dato de referencia de pares de bases para la posición de la secuencia diana; y

25 generar una salida que indique la presencia o ausencia de la mutación en la muestra tal como se estableció en la etapa de determinación.

30 Procedimientos para la secuenciación y para la detección de mutaciones en las secuencias se establecieron anteriormente y se conocen generalmente en la técnica. La invención utiliza tales procedimientos al proporcionar un aparato para llevar a cabo el procedimiento de la invención, comprendiendo el aparato:

35 un dispositivo de lectura de secuencias operativo para determinar la secuencia de una muestra de ácido nucleico para proporcionar un conjunto de datos de muestra que especifica datos de identificación de pares de bases medidos en un dominio diana que se extiende desde una posición de la secuencia de inicio hasta una posición de la secuencia final; y

40 una unidad de análisis de datos conectada para recibir el conjunto de datos de muestra del dispositivo de secuenciación y operativa para determinar la presencia o ausencia de la mutación en la muestra condicionado a si el dato de identificación de pares de bases medido para la posición de la secuencia diana corresponde a un dato de referencia de pares de bases para la posición de la secuencia diana.

45 Los dispositivos de lectura de secuencias adecuados incluyen secuenciadores automatizados, analizadores de RFLP y aparatos de análisis de cambio de la movilidad. Ventajosamente, se analiza la secuencia de un producto de amplificación del ácido nucleico diana, y el aparato incluye además un dispositivo de amplificación tal como una máquina de PCR.

50 Preferentemente, el aparato comprende también un dispositivo de salida operativo para generar una salida que indica la presencia o ausencia de la mutación en la muestra determinada por la unidad de análisis de datos. Por ejemplo, el dispositivo de salida puede comprender por lo menos uno de una interfaz de usuario gráfica; una interfaz de usuario audible; una impresora; un medio de almacenamiento legible por ordenador; y un medio de soporte que puede interpretarse por ordenador.

55 La invención puede configurarse además para detectar la propia proteína B-Raf mutante. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento automatizado para detectar una mutación de un solo aminoácido en un polipéptido B-Raf de un tumor humano primario que se produce de manera natural, que comprende:

60 aplicar un marcador a uno o más aminoácidos diana en una muestra del polipéptido B-Raf;

65 leer la muestra tras aplicar el marcador para determinar la presencia o ausencia del marcador en la muestra, para indicar de ese modo la presencia o ausencia de la mutación de un solo aminoácido en la muestra; y

70 generar una salida que indica la presencia o ausencia de la mutación de un solo aminoácido en la muestra tal como se determina en la etapa de lectura.

El marcador comprende preferentemente un ligando que se une de manera diferencial a un polipéptido *B-raf* de tipo natural sin mutación de un solo aminoácido y a un polipéptido B-Raf mutante con la mutación. Es posible la unión preferida a cualquier forma de B-Raf en el contexto de la invención.

5 La invención proporciona además un aparato para detectar una mutación de aminoácido en un polipéptido B-Raf, que comprende:

un dispositivo marcador de proteínas cargado con un marcador y operativo para aplicar un marcador a uno o más aminoácidos diana en una muestra del polipéptido B-Raf; y

10 un dispositivo lector de marcador operativo para determinar la presencia o ausencia del marcador en la muestra, para indicar de ese modo la presencia o ausencia de la mutación de un solo aminoácido en la muestra.

15 El marcador utilizado puede ser un anticuerpo, y el dispositivo marcador de proteínas puede configurarse para implementar un procedimiento de ELISA.

Ventajosamente, el dispositivo marcador de proteínas comprende un dispositivo de creación de micromatrices que se configura preferentemente para leer la muestra de manera óptica.

20 Preferentemente, el aparato comprende un dispositivo de salida operativo para generar una salida que indica la presencia o ausencia de la mutación de un solo aminoácido en las muestra tal como se determina mediante el dispositivo lector de marcador. Los dispositivos de salida adecuados comprenden por lo menos uno de: una interfaz de usuario gráfica; una interfaz de usuario audible; una impresora; un medio de almacenamiento legible por ordenador; y un medio de soporte que puede interpretarse por ordenador.

Utilizaciones de la invención

30 La presente invención proporciona mutantes nuevos de polipéptidos B-Raf que son útiles en la detección de estados neoplásicos, y en la determinación de pronósticos para sujetos que padecen de tales estados. En general, la presencia de una mutación en B-Raf tal como se describe en la presente memoria está asociada con la presencia de neoplasia.

35 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar células o tejido canceroso (tal como melanoma maligno, cáncer colorrectal, cáncer de mama o CPCNP), o de identificación de células o tejido que está predispuesto a desarrollar un fenotipo neoplásico, que comprende: amplificar por lo menos parte de un gen *B-raf* de las células o tejido; analizar el producto de amplificación para detectar una mutación en el gen *B-raf* tal como se describe en la presente memoria; en el que una célula o tejido que presenta una o más mutaciones de *B-raf* se clasifica como canceroso o con riesgo aumentado de desarrollar un estado canceroso. Los medios de amplificación adecuados incluyen PCR y clonación.

40 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar un pronóstico de un sujeto que padece cáncer (tal como melanoma maligno, cáncer colorrectal, cáncer de mama o CPCNP). El procedimiento comprende: amplificar la región del gen *B-raf* tal como se describió anteriormente; analizar los productos de amplificación como prueba de la mutación tal como se describió anteriormente; y clasificar un sujeto que no presenta ninguna mutación en el gen *B-raf* como que es menos probable de padecer una recidiva de la enfermedad tras la terapia y/o cirugía, o que presenta aumento de la probabilidad de supervivencia que un paciente que presenta una o más mutaciones en la región.

45 Las técnicas de la invención también pueden emplearse para determinar el curso de la terapia a la que debe exponerse un sujeto, basándose en el pronóstico tal como se expuso anteriormente; un sujeto que presenta un mal pronóstico se trata ventajosamente utilizando una terapia más agresiva que un sujeto que presenta un buen pronóstico.

50 Las técnicas según la invención pueden automatizarse, según se requiera para el examen rápido de muestras para la identificación de estados potencialmente cancerosos. Generalmente, un procedimiento automatizado comprenderá la amplificación automatizada del ácido nucleico a partir de una muestra de tejido o célula, la detección de mutaciones en el ácido nucleico amplificado, tal como mediante la detección fluorescente, y/o la presentación de la presencia de mutaciones. A continuación se describen las formas de realización automatizadas a título de ejemplo.

55 La identificación de B-Raf mutante según la invención puede utilizarse, por tanto, para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades, trastornos y/o estados asociados con la expresión de B-Raf mutante. En particular, la invención se refiere a la detección, diagnóstico y/o monitorización de cánceres asociados con B-Raf mutante tal como se expone en la presente memoria.

65

La invención proporciona un ensayo de diagnóstico para diagnosticar cáncer, que comprende (a) someter a ensayo la expresión de B-Raf mutante en células o líquido corporal de un individuo utilizando uno o más anticuerpos específicos para el mutante de B-Raf tal como se define en la presente memoria. La presencia de transcritos de B-raf mutante en tejido de biopsia de un individuo puede indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad, o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo permite que los profesionales de la salud utilicen medidas preventivas o un tratamiento agresivo más temprano impidiendo de ese modo el desarrollo o la evolución adicional del cáncer.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para someter a ensayo niveles de proteína en una muestra biológica utilizando procedimientos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, véanse Jalkanen, *et al.*, (1985) J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen, *et al.*, (1987) J. Cell. Biol. 105:3087-3096). Otros procedimientos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Además, las mutaciones en B-raf pueden detectarse mediante el análisis de los ácidos nucleicos, tal como se expone en la presente memoria. Por ejemplo, la presencia de mutaciones puede detectarse mediante secuenciación, o mediante análisis de SCCP.

La presente invención proporciona además kits que pueden utilizarse en los procedimientos anteriores. En una forma de realización, un kit comprende un anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo purificado, en un o más recipientes. En una forma de realización específica, los kits de la presente invención contienen un polipéptido sustancialmente aislado que comprende un epítopo que es inmunorreactivo específicamente con un anticuerpo incluido en el kit. Preferentemente, los kits de la presente invención comprenden además un anticuerpo control que no reacciona con el polipéptido de interés. En otra forma de realización específica, los kits de la presente invención contienen unos medios para detectar la unión de un anticuerpo a un polipéptido de interés (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un sustrato tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o puede conjugarse un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo con un sustrato detectable).

En otra forma de realización específica de la presente invención, el kit es un kit de diagnóstico para su utilización en la selección de sueros que contienen anticuerpos específicos para los polipéptidos B-Raf mutantes tal como se describe en la presente memoria. Un kit de este tipo puede incluir un anticuerpo control que no reacciona con el polipéptido B-Raf mutante. Un kit de este tipo puede incluir un antígeno de polipéptido sustancialmente aislado que comprende un epítopo que es inmunorreactivo específicamente con por lo menos un anticuerpo antiB-Raf. Además, un kit de este tipo incluye unos medios para detectar la unión de dicho anticuerpo al antígeno (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un compuesto fluorescente tal como fluoresceína o rodamina que puede detectarse mediante citometría de flujo). En las formas de realización específicas, el kit puede incluir un antígeno de polipéptido producido de manera recombinante o sintetizado de manera química. El antígeno de polipéptido del kit también puede unirse a un soporte sólido.

En otra forma de realización, la invención incluye un kit de diagnóstico para su utilización en la selección de sueros que contienen antígenos del polipéptido B-Raf mutante de la invención. El kit de diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente aislado específicamente inmunorreactivo con antígenos de polipéptido o polinucleótido, y unos medios para la detección de la unión del antígeno de polinucleótido o polipéptido al anticuerpo. En una realización, el anticuerpo se une a un soporte sólido. En una realización específica, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. Los medios de detección del kit pueden incluir un segundo anticuerpo monoclonal marcado. Alternativamente, o además, los medios de detección pueden incluir un antígeno de competencia, marcado.

Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y del sistema de la invención descritos resultarán evidentes para los expertos en la materia sin apartarse del alcance y del espíritu de la invención. Aunque se ha descrito la invención haciendo referencia a las formas de realización específicas preferidas, debe apreciarse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas formas de realización específicas. En efecto, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos de puesta en práctica de la invención que resultan evidentes para el experto en biología molecular y campos relacionados estén comprendidas en el alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido B-Raf humano mutante que se produce de manera natural aislado que comprende una o más mutaciones somáticas de aminoácidos asociadas al cáncer, en el que las mutaciones de aminoácidos se producen en una o más de las posiciones 463, 465, 468, 585, 594, 595, 596 y 599 en B-Raf que presenta la secuencia:

5

```

. 1 MAALSGGGGG GAEPGQALFN GDMEPEAGAG RPAASSAADP AIPEEVWNIK QMIKLTQEHI
61 EALLDKFGGE HNPPSIYLEA YEEYTSK LDA LQREQQLLE SLGNGTDFSV SSSASMDTVT
121 SSSSSSLSVL PSSLSVFQNP TDVARSNPKS POKPIVRVFL PNKQRTVVPA RCGVTVRDSL
181 KKALMMRGLI PECCAVYRIQ DGEKKPIGW DTDISWLTGEE LHVEVLENV LTTNHFVRKT
241 FFTLAFCDFC RKLLEQGFRC QTCGYKFHQR CSTEVPMLCV NYDQLDLLFV SKFFEHHPIP
301 QEEASLAETA LTSGSSPSAP ASDSIGPQIL TSPSPSKSIP IPQPFRRPADE DHRNQFGQRD
361 RSSSAPNVHI NTIEPVNIDD LIRDQGFGRD GGSTTGLSAT PPASLPGSLT NVKALQKSPG
421 PQRERKSSSS SEDRNRMKTL GRRDSSDDWE IPDGQITVGQ RIGSGSFGTV YKGKWHGDVA
481 VKMLNVTAPT PQQLQAFKNE VGVLRKTRHV NILLFMGYST KPQLAIVTQW CEGSSLYHHL
541 HIIETKFEMI KLIDIARQTA QGMDYLHAKS IIHRDLKSNN IFLHEDLTVK IGDFGLATVK
601 SRWSGSHQFE QLSGSILWMA PEVIRMQDKN PYSFQSDVYA FGIIVLYELMT GQLPYSNINN
661 RDQIIFMVGR GYLSPDLKSV RSNCPKAMKR LMAECLKKKR DERPLFPQIL ASIELLARSL
721 PKIHRSASEP SLNRAGFQTE DFSLYACASP KTIQAGGYG AFPVH
    
```

2. Mutante según la reivindicación 1, en el que las mutaciones de un solo aminoácido se seleccionan de entre el grupo constituido por V599E, V599D, G595R, G465V, G465E, G465A, G468A, G468E, E585K, F594L, G595R, L596V, L596R y G463E.

10

3. Complemento de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por:

15

un ácido nucleico que codifica un polipéptido B-Raf según la reivindicación 1 ó 2; un ácido nucleico que codifica un polipéptido B-Raf según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido nucleico comprende una o más mutaciones puntuales; y un ácido nucleico que codifica un polipéptido B-Raf según la reivindicación 1 ó 2 que comprende una o más mutaciones puntuales, en el que dicha mutación puntual se produce en una o más de las posiciones 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 y 1786 de B-raf; y un ácido nucleico que codifica un polipéptido B-Raf según la reivindicación 1 ó 2, que comprende una o más mutaciones puntuales, en el que dicha mutación puntual es G1388T, G1783C, TG1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, T1787G o C1786G en B-raf; en el que B-raf presenta la secuencia:

20

```

atggcggcgc tgagcgggtg cggtggtggc ggcgcggagc cgggccaggc tctgttcaac 60
ggggacatgg agcccaggc cggcgcggc cggcccggc cctcttcggc tgcggaccct 120
gccattccgg aggaggtgtg gaatatcaaa caaatgatta agttgacaca ggaacatata 180
gaggccctat tggacaaatt tgggtgggag cataatccac catcaatata tctggaggcc 240
tatgaagaat acaccagcaa gctagatgca ctccaacaaa gagaacaaca gttattggaa 300
tctctgggga acggaactga ttttctgtt tctagctctg catcaatgga taccgttaca 360
tcttctcct cttctagcct ttcagtgcta cttcatctc tttcagttt tcaaaatccc 420
acagatgtgg cacggagcaa cccaagtca ccacaaaac ctatcgtag agtcttctg 480
cccaacaaac agaggacagt ggtacctgca aggtgtggag ttacagtccg agacagtcta 540
aagaaagcac tgatgatgag aggtctaata ccagagtgct gtgctgttta cagaattcag 600
gatggagaga agaaaccaat tgggtgggac actgatattt cctggcttac tggagaagaa 660
ttgcatgtgg aagtgttggg gaattgtcca cttacaacac acaactttgt acgaaaaacg 720
ttttcacct tagcattttg tgacttttgc cgaaagctgc tttccaggg tttccgctgt 780
caaacatgtg gttataaatt tcaccagcgt tgtagtacag aagttccact gatgtgtgtt 840
aattatgacc aacttgattt gctgtttgtc tccaagttct ttgaacacca cccaatacca 900
caggaagagg cgtccttagc agagactgcc ctaacatctg gatcatcccc ttcgcgaccc 960
gcctcggact ctattgggcc ccaaattctc accagtccgt ctccttcaaa atccattcca 1020
    
```

```

attccacagc ccttccgacc agcagatgaa gatcatcgaa atcaatttgg gcaacgagac 1080
cgatcctcat cagctcccaa tgtgcatata aacacaatag aacctgtcaa tattgatgac 1140
ttgattagag accaaggatt tcgtggatgat ggaggatcaa ccacagggtt gtctgtctacc 1200
ccccctgcct cttaccctgg ctactaact aacgtgaaag ccttacagaa atctccagga 1260
cctcagcgag aaaggaagtc atcttcatcc tcagaagaca ggaatcgaat gaaaacactt 1320
ggtagacggg actcgagtga tgattgggag attcctgatg ggcagattac agtgggacaa 1380
agaattggat ctggatcatt tggaacagtc tacaaggaa agtggcatgg tgatgtggca 1440
gtgaaaatgt tgaatgtgac agcacctaca cctcagcagt tacaagcctt caaaaatgaa 1500
gtaggagtac tcaggaaaac acgacatgtg aatatactac tcttcatggg ctattccaca 1560
aagccacaac tggctattgt taccagtggt tgtgagggct ccagcttcta tcaccatctc 1620
catatcattg agaccaaatt tgagatgatc aaacttatag atattgcacg acagactgca 1680
cagggcatgg attacttaca cgccaagtca atcatccaca gagacctcaa gagtaataat 1740
atatttcttc atgaagacct cacagtaaaa ataggtgatt ttggtctagc tacagtgaaa 1800
tctcagatga gtgggtccca tcagtttgaa cagttgtctg gatccatttt gtggatggca 1860
ccagaagtca tcagaatgca agataaaaaat ccatacagct ttcagtcaga tgtatatgca 1920
tttgggattg ttctgtatga attgatgact ggacagttac cttattcaaa catcaacaac 1980
agggaccaga taatttttat ggtgggacga ggatacctgt ctccagatct cagtaaggta 2040
cggagtaact gtccaaaagc catgaagaga ttaatggcag agtgcctcaa aaagaaaaga 2100

gatgagagac cactctttcc ccaaattctc gcctctattg agctgctggc ccgctcattg 2160
ccaaaaattc accgcagtgc atcagaaccc tccttgaatc gggctggttt ccaaacagag 2220
gatttttagtc tatatgcttg tgcttctcca aaacaccca tccaggcagg gggatatggt 2280
gcgtttcctg tccactgaaa caaatgagtg agagagttca ggagagtagc acaaaaagga 2340
aaataaatga acatatgttt gcttatatgt taaattgaat aaaatactct cttttttttt 2400
aaggtggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaacc 2449

```

- 5 4. Ácido nucleico que se hibrida específicamente con un ácido nucleico mutante seleccionado de entre el grupo constituido por: un ácido nucleico mutante que codifica un polipéptido B-Raf según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido nucleico se hibrida específicamente con una o más mutaciones puntuales en el ácido nucleico mutante, en el que dicha mutación puntual se produce en una o más de las posiciones 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 y 1786 de *B-raf* que presenta la secuencia definida en la reivindicación 3; y un ácido nucleico mutante que codifica un polipéptido B-Raf según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido nucleico se hibrida específicamente con una o más mutaciones puntuales en el ácido nucleico mutante, en el que dicha mutación puntual es G1388T, G1783C, TG1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, T1787G o C1786G en *B-raf* que presenta la secuencia definida en la reivindicación 3.
- 10
- 15 5. Ligando que se une selectivamente a un epítipo mutante del polipéptido B-Raf según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el epítipo mutante una mutación de aminoácido tal como se define en la reivindicación 1.
- 20 6. Ligando según la reivindicación 5, que es una inmunoglobulina.
7. Ligando según la reivindicación 6, que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
8. Procedimiento para la detección de las mutaciones oncogénicas, que comprende las etapas siguientes:
- (a) proporcionar una muestra de material celular que se produce de manera natural de un sujeto humano;
- 25 (b) examinar el material de ácido nucleico de por lo menos parte de uno o más genes *B-raf* en dicho material celular; y
- (c) determinar si tal material de ácido nucleico comprende una o más mutaciones puntuales en una secuencia que codifica un polipéptido B-Raf,
- 30 en el que dicha mutación puntual se produce en una o más de las posiciones 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 y 1786 de *B-raf* que presenta la secuencia definida en la reivindicación 3.
9. Procedimiento para la detección de las mutaciones oncogénicas, que comprende las etapas que consisten en:

- (a) proporcionar una primera muestra de material celular obtenida de un tejido que se produce de manera natural de un sujeto que se sospecha que es canceroso, y una segunda muestra de material celular de un tejido no canceroso del mismo sujeto;
- 5 (b) examinar el material de ácido nucleico de por lo menos parte de uno o más genes *B-raf* en ambas de dichas muestras de material celular; y
- (c) determinar si tal material de ácido nucleico comprende una o más mutaciones puntuales en una secuencia que codifica un polipéptido B-RAF; y estando dicha mutación presente en el material celular que se produce de manera natural del tejido que se sospecha que es canceroso pero no presente en el material celular del tejido no canceroso, en el que dicha mutación puntual se produce en una o más de las posiciones 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 y 1786 de *B-raf* que presenta la secuencia definida en la reivindicación 3.
- 10
- 15 10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que dicha mutación puntual es G1388T, G1783C, TG1796-97AT, G1394T, G1394A, G1394C, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1388A, T1796A, T1787G o C1786G en *B-raf* que presenta la secuencia definida en la reivindicación 3.
- 20 11. Procedimiento para la detección de mutaciones oncogénicas, que comprende las etapas que consisten en:
- (a) obtener una muestra de material celular de un sujeto;
- (b) cribar dicha muestra con un ligando según las reivindicaciones 5 a 7; y
- 25 (c) detectar uno o más polipéptidos B-Raf mutantes tal como se define en la reivindicación 1 ó 2 en dicha muestra.
12. Procedimiento automatizado para detectar una mutación en una posición de la secuencia diana en un ácido nucleico que codifica un polipéptido B-Raf, que comprende:
- 30 secuenciar una muestra de un producto de amplificación del ácido nucleico para proporcionar un conjunto de datos de muestra que especifica los datos de identificación de pares de bases medidos en un dominio diana que se extiende desde una posición de inicio de la secuencia hasta una posición final de la secuencia;
- determinar la presencia o la ausencia de la mutación en la muestra condicionado a si el dato de identificación de pares de bases medido para la posición diana de la secuencia corresponde a un dato de pares de bases de referencia para la posición diana de la secuencia; y
- 35 generar una salida que indica la presencia o la ausencia de la mutación en la muestra tal como se establece mediante la etapa de determinación;
- 40 en el que el ácido nucleico comprende una o más mutaciones puntuales; y en el que dicha mutación puntual se produce en una o más de las posiciones 1388, 1394, 1403, 1753, 1782, 1783, 1796, 1797, 1787 y 1786 de *B-raf* que presenta la secuencia definida en la reivindicación 3.
- 45 13. Procedimiento automatizado para detectar una mutación de un solo aminoácido en un polipéptido B-Raf, que comprende:
- aplicar un marcador a uno o más aminoácidos diana en una muestra del polipéptido B-Raf;
- 50 leer la muestra tras aplicar el marcador para determinar la presencia o la ausencia del marcador en la muestra, para indicar así la presencia o la ausencia de la mutación de un solo aminoácido en la muestra, y
- generar una salida que indica la presencia o ausencia de la mutación de un solo aminoácido en la muestra tal como se determina mediante la etapa de lectura; en el que el polipéptido B-Raf comprende una o más mutaciones tal como se define en reivindicación 1.
- 55
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el marcador comprende un ligando que se une preferentemente a un polipéptido B-Raf que lleva la mutación de un solo aminoácido.
- 60 15. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el marcador comprende un ligando que se une preferentemente a un polipéptido B-Raf de un tipo natural sin la mutación de un solo aminoácido.
16. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que marcador es un anticuerpo.
- 65 17. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende un procedimiento de ELISA.

18. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el marcador se aplica utilizando un dispositivo de creación de micromatrices.

19. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la muestra se lee de manera óptica.

20. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la salida se genera utilizando un dispositivo que comprende por lo menos uno de: una interfaz de usuario gráfica; una interfaz de usuario audible, una impresora, un medio de almacenamiento legible por ordenador; y un medio de soporte que pueda interpretarse por ordenador.

21. Procedimiento para identificar uno o más compuestos que presentan actividad antiproliferativa, que comprende las etapas que consisten en:

(a) proporcionar uno o más polipéptidos B-Raf mutantes según la reivindicación 1 ó 2;

(b) poner en contacto dicho(s) polipéptido(s) con uno o más compuestos que van a someterse a prueba; y

(c) detectar una interacción entre dichos uno o más compuestos y dichos polipéptidos mutantes.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que la interacción es una interacción de unión.

23. Ensayo para identificar uno o más compuestos que presentan actividad antiproliferativa, que comprende las etapas que consisten en:

(a) proporcionar uno o más polipéptidos B-Raf mutantes según la reivindicación 1 ó 2;

(b) proporcionar un sustrato posterior para el polipéptido B-Raf;

(c) detectar la modificación del sustrato en presencia del/de los compuesto(s) que va(n) a someterse a prueba.

24. Ensayo según la reivindicación 23, en el que la modificación del sustrato se detecta directamente.

25. Ensayo según la reivindicación 24, en el que el sustrato es una enzima que modifica un segundo sustrato, pudiéndose detectar dicha segunda modificación.

26. Ensayo según la reivindicación 25, en el que el sustrato es MEK y el segundo sustrato es MAPK.

27. Procedimiento o ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 26, en el que se determina un nivel de referencia para el ensayo en ausencia del compuesto o de los compuestos que va(n) a someterse a prueba.

28. Cinasa activa de manera constitutiva que comprende una mutación en el bucle de unión al fosfato de la misma seleccionada de entre el grupo constituido por G463V y G468A de B-Raf que presenta la secuencia definida en la reivindicación 1.

29. Cinasa según la reivindicación 28, que es una B-Raf proteína cinasa.

30. Procedimiento para el cribado de uno o más compuestos para un efecto inhibitor en una cinasa, que comprende

(a) preparar una cinasa mutante que comprende una sustitución, deleción o inserción de aminoácido según cualquiera de las reivindicaciones 28 y 29;

(b) exponer la cinasa mutante a dichos uno o más compuestos en presencia de un sustrato de cinasa; y

(c) determinar la capacidad de la cinasa para fosforilar el sustrato en presencia de uno o más compuestos.

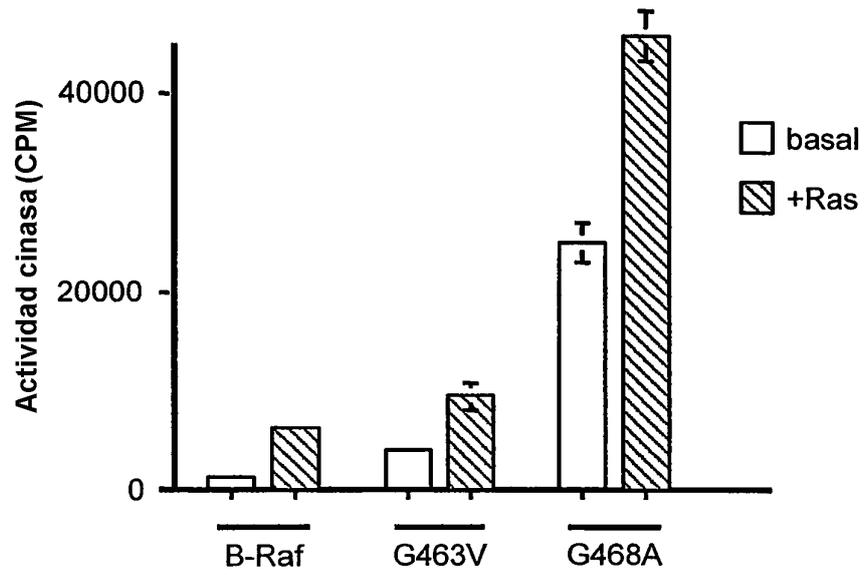


FIG. 1A

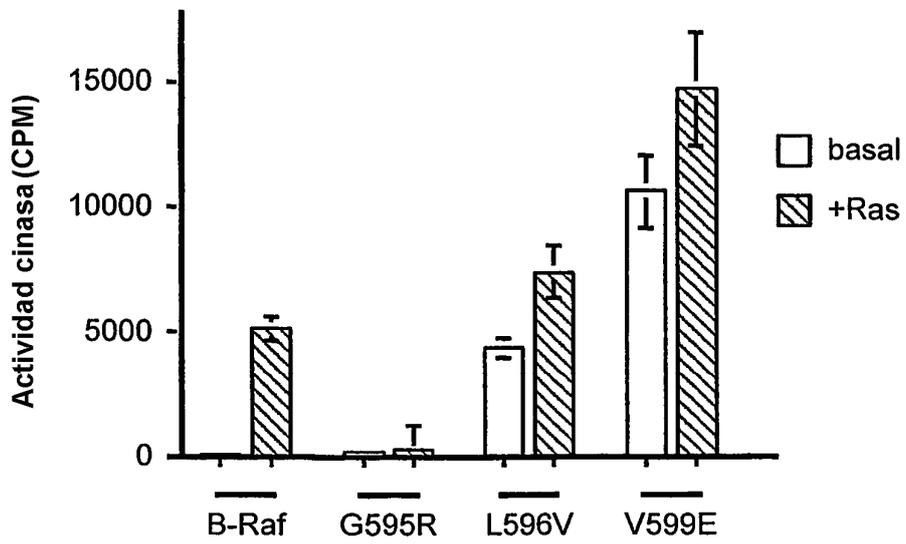


FIG. 1B

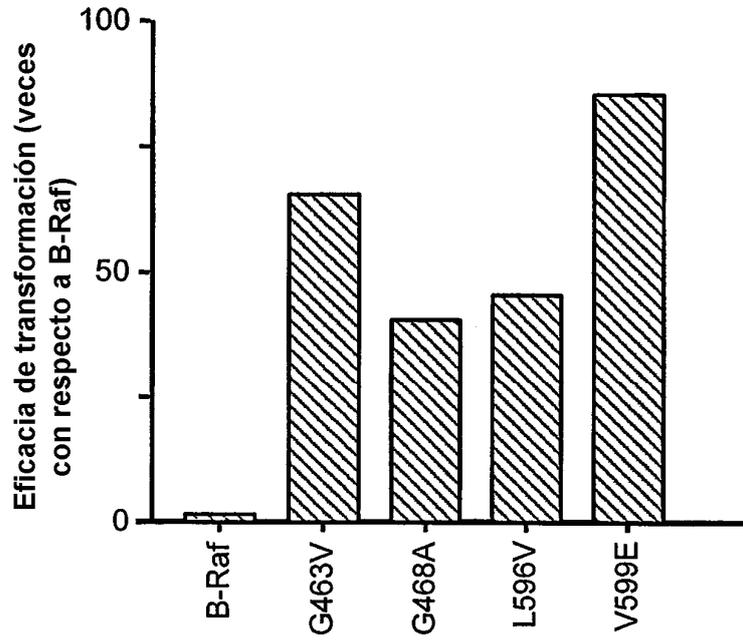


FIG. 2

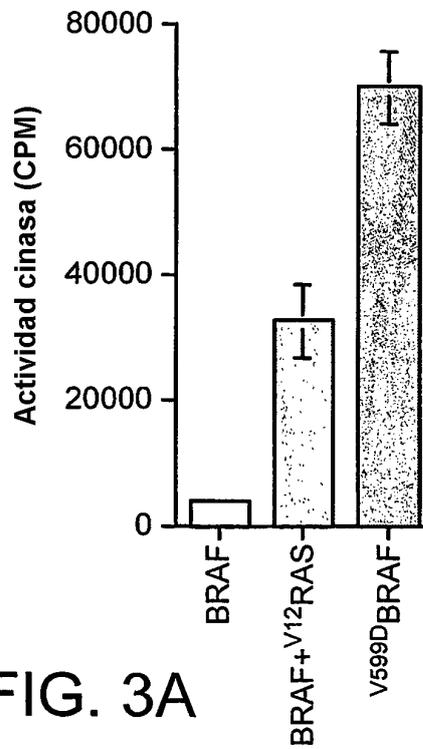


FIG. 3A

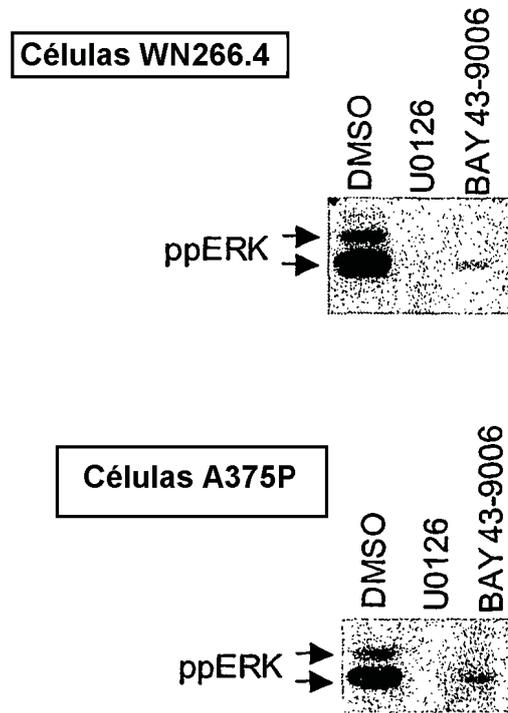


FIG. 3B

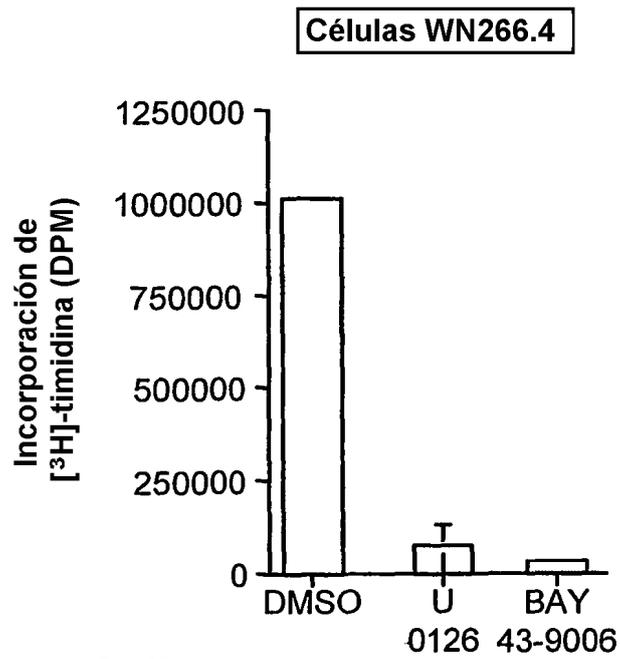


FIG. 4

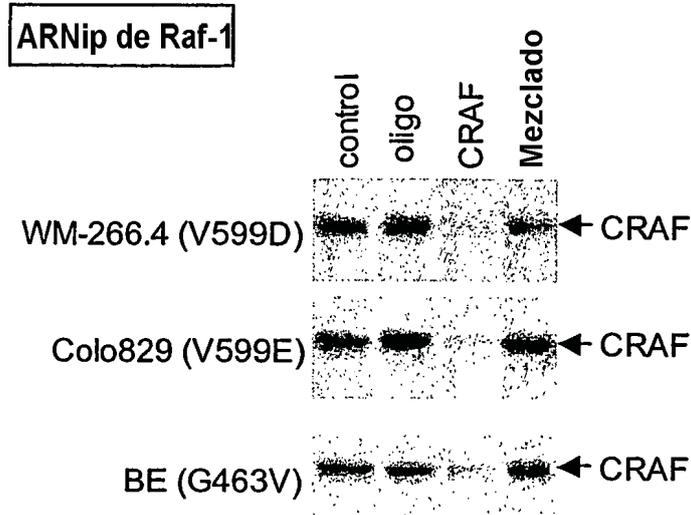


FIG. 5A

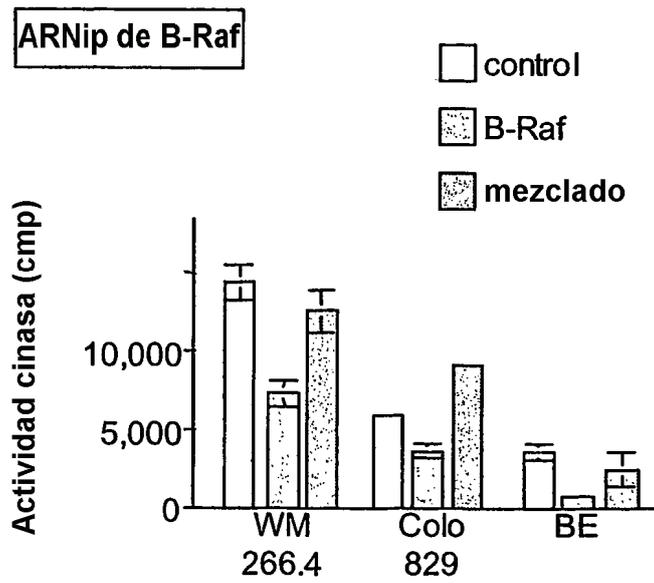


FIG. 5B

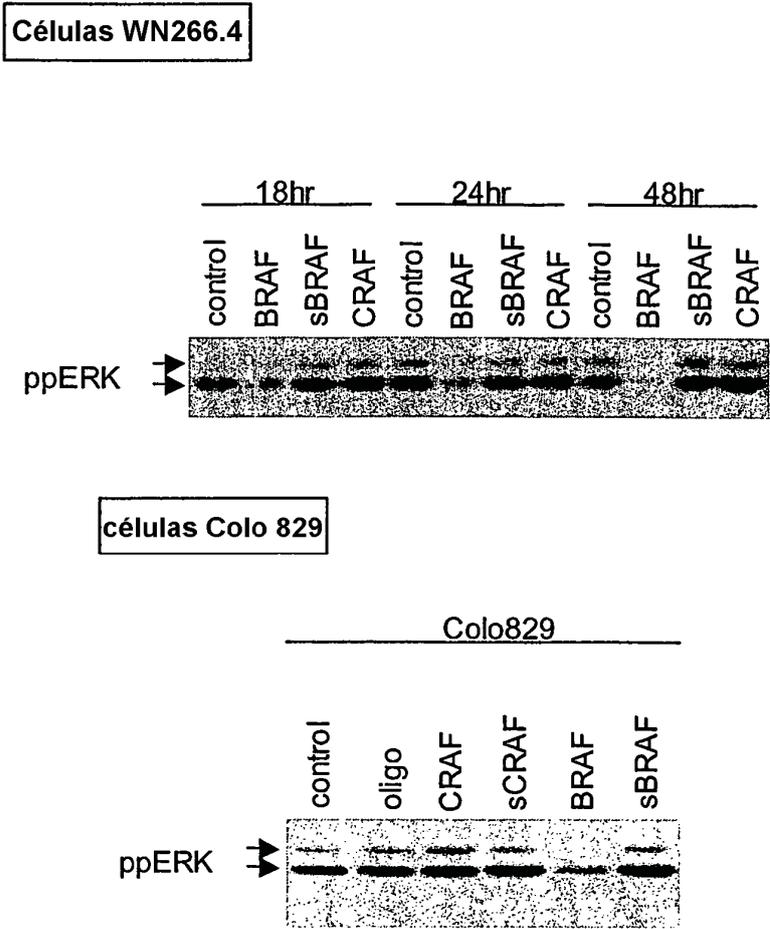


FIG. 6

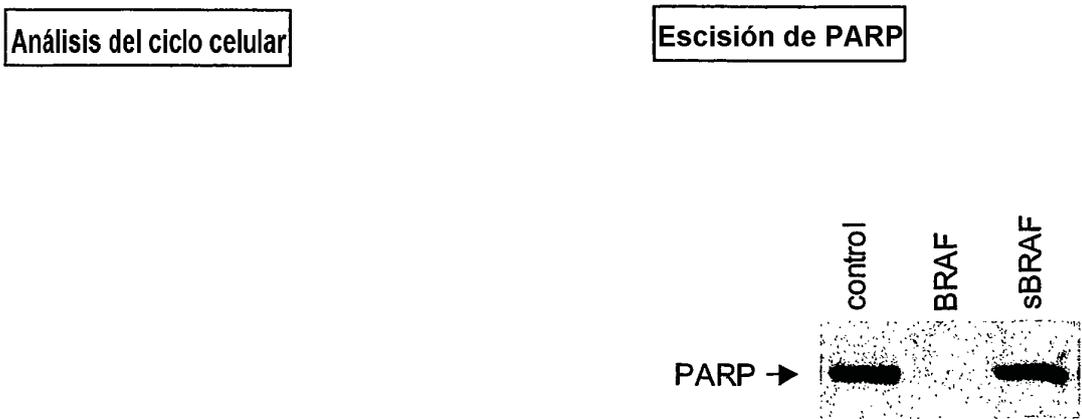


FIG. 7

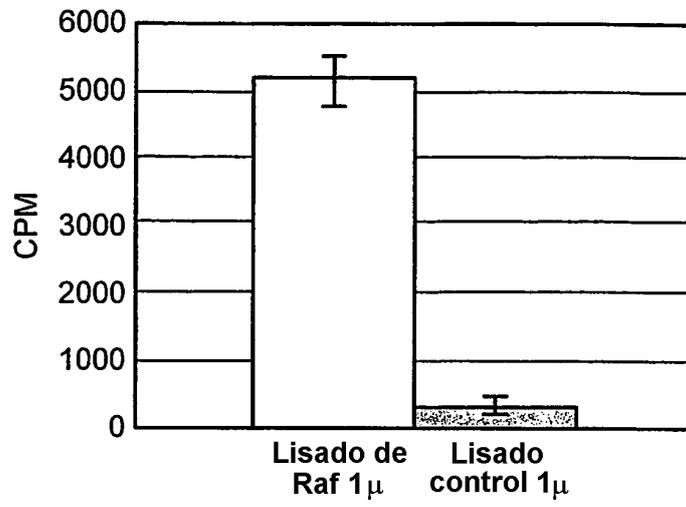


FIG. 8

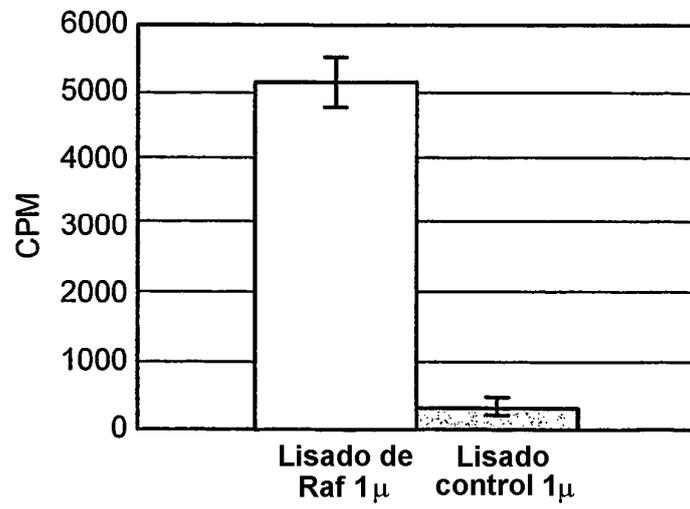


FIG. 9

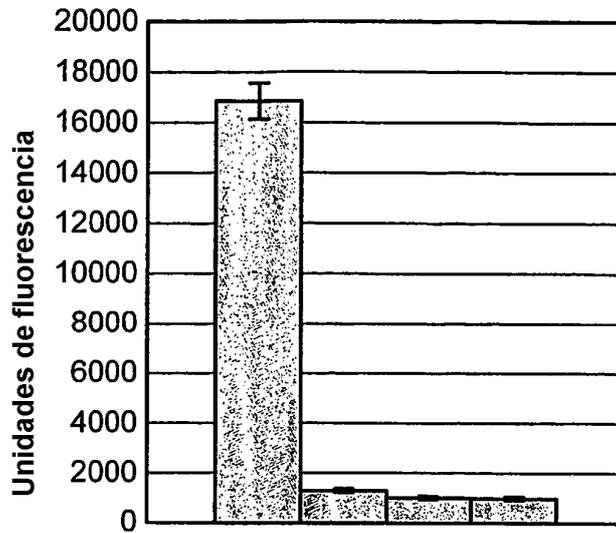


FIG. 10

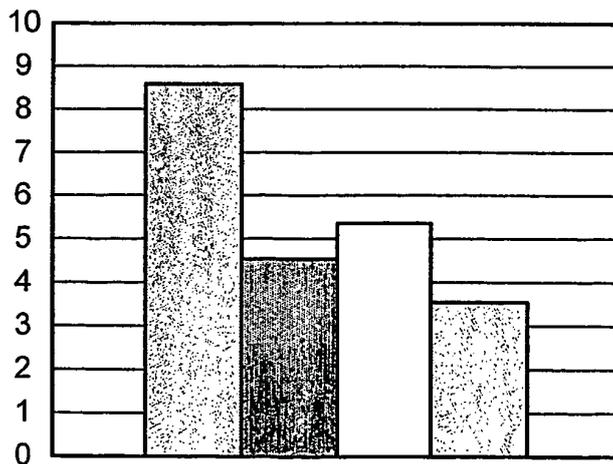


FIG. 11

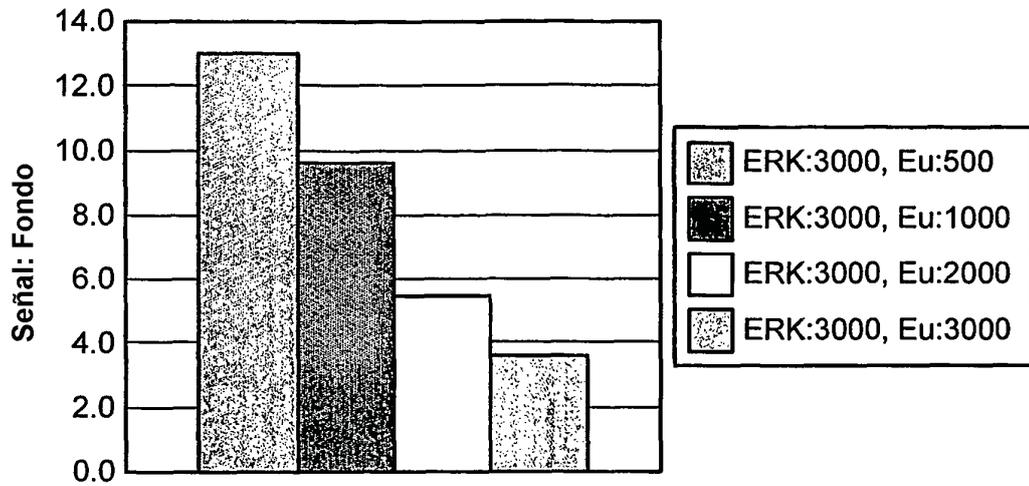


FIG. 12

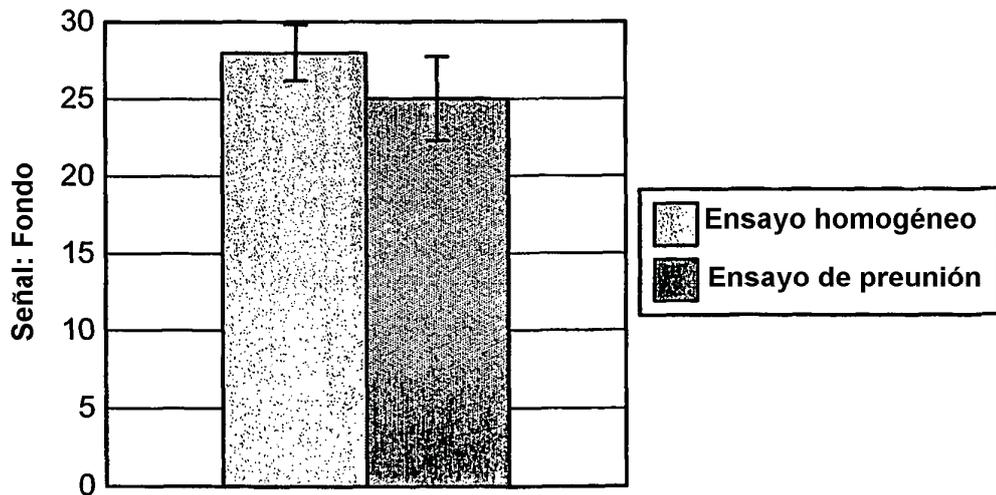


FIG. 13