

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1

SOLICITUD DE:

☐

Corrección de Error Material.

☒

Modificación a una Solicitud.

2

SOLICITANTE

Nombre: **THE PENN STATE RESEARCH
FOUNDATION**

Dirección: **304 Old Main, University Park, PA
10802-1504, Estados Unidos de América**

Nacionalidad o Domicilio: **Estados Unidos de
América**

Lugar de Constitución: **Estados Unidos de
América**

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

Dirección: **Cra. 7 No. 71-21 Torre B - Piso 4**

Teléfono: **744-2200**

Fax: **742-2200**

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número **80.410.337 TP 57492**

4 Número de expediente:

06 094.108

5 Descripción de la corrección o modificación solicitada Estamos presentando nueva copia de la descripción, la cual reemplaza la inicialmente presentada, donde se han realizado algunas modificaciones, las cuales precisan el objetivo de la solicitud y no afectan en ningún sentido el alcance de la invención; así mismo, estamos adicionando un nuevo inventor, ARANI SHARMA, tal como consta en el documento de cesión y en la Forma PCT/IB/306.

6 Comprobante de pago No. 07-526

Fecha 19 de Enero, 2007

7 Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa por \$99.000

☐ Poderes, si fuere el caso.

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

☒ Nueva Copia de la Descripción.

8

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO **FIRMA:** Juan Pablo Cadena

C.C. 80.410.337 de Usaquén T.P. 57492 del C.S.J.

A= 101.95x

350

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 326
FECHA : ENERO 3 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-084108-00003-0000
Fec: 2007-01-22 15:18:31 Dep. 2000 NUECREACIONES
TOL. 11 PATENTENYII
Ene: 870 FASENACIONALJ
Ael 928 CTORINFORMACION Pabec: 158

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	35053109	03/01/2007	64,370,000.00

CONCEPTO

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50003-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEHAS COMERCIALES	99,000.00
	TOTAL :	\$ 99,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**TÍTULO: MÉTODOS COMBINATORIOS Y COMPOSICIONES
PARA EL TRATAMIENTO DE MELANOMA**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad bajo 35 U.S.C. § 119 de una solicitud provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/554, 509 presentada el 19 de marzo de 2004, solicitud que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

REFERENCIA DE LA DONACIÓN

Esta solicitud está patrocinada por The Foreman Foundation for Melanoma Research and American Cancer Society (RSG-04-053-01-GMC).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

De las tres principales formas de cáncer de piel, el melanoma maligno conlleva el riesgo más alto de mortalidad por metástasis (Schalick et al., Blackwell Science, Inc. Maiden, MA 180- 348(1998); Jemal et al., J. Nat. Cancer Inst. 93:678-683(2001); y Jemal et al., Ca: a Cancer Journal for Clinicians 52:23-47(2002)). El pronóstico para pacientes en las últimas fases de esta enfermedad sigue siendo muy deficiente con una supervivencia promedio de seis a diez meses. (Jemal et al., Ca: A Cancer Journal for Clinicians 52:23-47 (2002); y Soengas et al., Oncogen 22:3138-3151(2003)). En la actualidad no existe un tratamiento efectivo a largo plazo para pacientes que sufren de las fases avanzadas de este cáncer a pesar de muchos estudios clínicos para probar la eficacia de una amplia variedad de medidas terapéuticas que van desde la cirugía a inmunoterapia, radioterapia y quimioterapia (Soengas et al., Oncogen 22:3138-3151(2003); Serrone et al., Melanoma Res 9:51-58(1999); Grossman et al., Cancer

Metastasis Rev 20:3-11(2001); Helmbach et al., Int J Cancer 93:617-622 (2001); Ballo et al., Surgical Clinics North Am 83:323-342 (2003); y Hersey, P., Int Med J 33:33-43(2003)). La falta de regímenes terapéuticos efectivos se debe, en parte, a la falta de información sobre los genes predominantes genes alterados durante la evolución del melanoma, y terapias específicamente direccionadas para corregir estos defectos (Serrone et al., J Exp Clin Cancer Res 19:21-34 (2000); y Atkins et al., Nature Rev. Drug Dis 1:491-492 (2002)).

Pacientes con melanoma maligno metastásico (fase IV) tienen un supervivencia media de aproximadamente un año (Balch et al., 1993; Koh, 1991). El tratamiento estándar actual consiste de una quimioterapia de combinación con agentes tales como cisplatino, DTIC, y BCNU, con o sin citocinas tales como interleucina-2 (IL-2) o interferón- α (IFN- α) (Balch et al., 1993; Koh, 1991; Legha and Buzaid, 1993). Se han informado tasas de respuesta a la quimioterapia tan elevadas como 60%, si bien sólo aproximadamente 5% de los pacientes experimentan supervivencia a largo plazo, independientemente del régimen terapéutico empleado. La quimioterapia convencional apunta a controlar el crecimiento del cáncer reconociendo ("*by targeting*") células que crecen rápidamente. No obstante, esta función no es específica, ya que muchas células normales, tales como las de la médula ósea y el epitelio intestinal, poseen asimismo un nivel básico de proliferación. Por lo tanto, muchas células normales del cuerpo son también susceptibles a los efectos tóxicos de la quimioterapia, y la quimioterapia convencional puede impartir un grado sustancial de morbilidad al paciente. Claramente, se necesitan nuevos enfoques al tratamiento de melanoma metastásico.

La familia de la proteína cinasa Akt consta de tres miembros, Akt1/PKB α , Akt2/PKB β y Akt3/PKB γ , que comparten un alto grado de similitud estructural (Brazil et al., Cell 111:293-303 (2002); y Nicholson et

✓ 363

al., *Cell Signal* 14:381-395(2002)). Los miembros de la familia comparten una similitud estructural amplia entre sí, exhibiendo más del 80% de homología en el nivel de aminoácidos (Nicholson KM, Anderson NG. *Cell Signal*. 14(5):381-95 (2002), Datta SR et al. *Genes Dev*. 13(22):2905-27(1999).). Todas las isoformas Akt comparten características estructurales importantes, con tres dominios funcionales distintos (Testa JR, Bellacosa A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(20):10983-5 (2001), Nicholson KM, Anderson NG. *Cell Signal*. 14(5):381-95 (2002), Scheid MP, Woodgett JR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(10):760-8 (2001), Scheid MP, Woodgett JR. *FEBS Lett*. 546(1):108-12 (2003), Bellacosa A et al. *Cancer Biol Ther*. 3(3):268-75. Epub 2004 (2004), Brazil DP et al. *Trends Biochem Sci*. 29(5):233-42 (2004), Brazil, D.P. et al. *Cell* 111:293-303 (2002), Brazil DP, Hemmings BA. *Trends Biochem Sci*. 26(11):657-64 (2001), Datta SR et al. *Genes Dev*. 13(22):2905-27(1999).). Uno es un dominio de homología pleckstrin (PH) amino-terminal que media interacciones proteína-proteína y proteína-lípido. Este dominio consta de aproximadamente cien aminoácidos, se asemeja a los tres dominios de unión de fosfoinosítidos en otras moléculas de señalización (Lietzke SE et al. *Mol Cell*. 6(2):385-94 (2000), Ferguson KM et al. *Mol Cell*. 6(2):373-84(2000).). El segundo dominio es una región catalítica de cinasa carboxi-terminal que media la fosforilación de proteínas de sustrato. Muestra un alto grado de similitud con los de la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC) (Jones PF et al. *Cell Regul*. 2(12):1001-9(1991)., Andjelkovic M, Jones PF, Grossniklaus U, Cron P, Schier AF, Dick M, Bilbe G, Hemmings BA. Developmental regulation of expression and activity of multiple forms of the *Drosophila* RAC protein kinase. *J Biol Chem*. 270(8):4066-75(1995).). El tercer dominio es una región de cola con un papel regulador importante. Esta región se denomina a veces la cola o el dominio regulador. Dentro de las últimas regiones hay residuos de serina y treonina cuya fosforilación se

364

requiere para la activación de Akt. Los sitios varían ligeramente dependiendo de la isoforma Akt particular. El primer sitio en todas las tres isoformas es una treonina en la posición de aminoácidos 308/309/305 y en Akt1/2/3 respectivamente. El segundo sitio es una serina que ocurre dentro de la cola C-terminal hidrófoba en posiciones de aminoácidos 473/474/472 en Akt 1/2/3 respectivamente. La fosforilación en ambos sitios, que ocurre en respuesta a factores de crecimiento u otros estímulos extracelulares, es esencial para la activación Akt máxima (Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J. 15(23):6541-51(1996).). La Akt puede fosforilarse asimismo en otros residuos; sin embargo, la importancia funcional de esta fosforilación es un área de continua investigación (Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J. 15(23):6541-51(1996).). Además, aunque se han identificado variantes de empalme de Akt3 que carecen del sitio de fosforilación 472 de serina, el papel celular de esta variante permanece incierto (Brodbeck D, Hill MM, Hemmings BA. J Biol Chem. 276(31):29550-8. Epub 2001 (2001).). Se desconoce asimismo si esta variante está presente o ejerce algún papel en las células de melanoma.

Aunque todas las isoformas pueden expresarse en un tipo de célula particular, sólo ciertas isoformas pueden ser activas. Parece además que cada isoforma puede realizar funciones únicas así como comunes en las células (Brazil et al., Cell 111:293-303(2002); y Nicholson et al., Cell Signal 14:381-395(2002); Chen et al., Genes Dev 15:2203-2208 (2001); y Cho et al., Science 292:1728-1731 (2001)). Ratones con un gen específico inactivado en laboratorio ("*knockout mice*") que carecen de Akt1 presentan retardo de crecimiento y tienen mayores tasas de apoptosis espontánea en los testículo y el timo (Chen et al., Genes Dev 15:2203-

X 365

2208(2001); Cho et al., J Biol Chem 276: 38349-38352 (2001); Peng et al., Genes Dev 17:1352-1365 (2003)). En contraste, ratones con un gen específico inactivado en laboratorio, con carencia de Akt2, presentan una regulación alterada a la insulina y, en consecuencia, tienen una capacidad defectuosa de reducir los niveles de glucosa sanguínea, debido a deficiencias en la acción de la insulina sobre el hígado y el músculo esquelético (Cho et al., Science 292:1728-1731 (2001); Peng et al., Genes Dev 17:1352-1365 (2003)). Actualmente, no existe un informe publicado que describa el fenotipo asociado con un ratón con un gen específico inactivado en laboratorio, que carece de Akt3; por consiguiente, se conoce muy poco acerca de las funciones específicas de Akt3 o su papel en el cáncer humano.

Se ha descrito amplificación genética que aumenta la expresión de Akt1 ó Akt2 en neoplasias malignas del estómago, ovario, páncreas y mama (Staal, S.P., Proc Nat Acad Sciences ISA 84:5034-5037(1987); Cheng et al., Proc Nat Acad Sciences USA 89:9267-9271(1992); Cheng et al., Proc Nat Acad Sciences USA 93:3636-3641(1996); Lu et al., Chung-Hua I Haueh Tsa Chih [Chinese Medical Journal] 75:679-682 (1995); Bellacosa et al., Int J Cancer 64:280-285 (1995); y van Dekken et al., Cancer Res 59:749-752(1999)). Aunque no se han identificado mutaciones activadoras de Akt en melanomas (Waldmann et al., Arch Dermatol Res 293:368-372(2001); Waldmann et al., Melanoma Res 12:45-50 (2002)), bloquear la función Akt total reconociendo P13K (con los inhibidores P13K wortmannina o LY-294002) inhibe la proliferación celular y reduce la sensibilidad de las células de melanoma a radiación UV (Krasilnikov et al., Mol Carcinogenesis 24:64-69 (1999)). Se ha medido igualmente la actividad Akt total en melanomas usando inmunohistoquímica para demostrar niveles incrementados de Akt fosforilada total en lunares seriamente displásicos y melanomas metastásicos comparados con lunares normales o benignamente

X 366

displásicos (Dhawan et al., Cancer Res 62:7335-7342(2002)). Sin embargo, se desconoce el papel ejercido en melanoma por isoformas Akt individuales y mecanismos que llevan a la desregulación de isoformas Akt particulares. Recientemente, se descubrió que la vía de señalización fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K)/Akt juega un papel crítico en la tumorigénesis de melanoma (Stahl et al., Cancer Res 63:2891-2897(2003)). Se descubrió que la actividad Akt desregulada por la pérdida de la PTEN fosfatasa, un regulador negativo de la señalización PI3K/Akt, disminuye la capacidad apoptótica de células de melanoma y, así, regula la tumorigénesis del melanoma (Stahl et al., Cancer Res 63:2891-2897 (2003)).

La familia de proteína serina/treonina cinasa Raf consta de tres miembros, A-Raf, B-Raf, y C-Raf. (Mercer et al., Biochim Biophys Acta 1653:25-40 (2003)). Los miembros de la familia Raf son moléculas intermedias en la vía MAPK (Ras/Raf/MAPK cinasa (MEK)/cinasa regulada por señal extracelular (ERK), que es una vía de transducción de señales que transmite señales extracelulares de la membrana celular al núcleo mediante una serie ordenada de eventos de fosforilación consecutiva (Mercer et al., Biochim Biophys Acta 1653:25-40 (2003), Smalley. Int J Cancer 104:527-32 (2003)). Típicamente, un ligando extracelular se une a su receptor de tirosina cinasa, llevando a la activación de Ras y a la iniciación de una cascada de eventos de fosforilación (Mercer et al., Biochim Biophys Acta 1653:25-40 (2003), Smalley. Int J Cancer 104: 527-32 (2003)). El Ras activado produce la fosforilación y la activación de Raf el cual, a su vez, fosforila y activa MEK1 MEK2. Las cinasas MEK fosforilan y activan a su vez ERK1 y ERK2 (Chong et al, Cell Signal 15:163-69 (2003)), que fosforilan varias dianas nucleares y citoplásmicas que en última instancia llevan a la expresión de proteínas que juegan papeles importantes en el crecimiento y la supervivencia celulares (Chang et al., Int J Oncol 22:469-80 (2003)).

9 305

Mutaciones que llevan a la activación de B-Raf se han encontrado en la mayoría de melanomas esporádicos, principalmente B-RAF, gen más mutado en melanomas con una tasa de mutación que varía de 60 a 90% (Davies et al., Nature 417:949-54 (2002); Pollock et al., Nat Genet 33:19-20 (2003); Brose et al., Cancer Res 62:6997-7000 (2002); y Yazdi et al., J Invest Dermatol 121:1160-62 (2003)). La mayoría de las mutaciones B-RAF ocurren como resultado de una sustitución de aminoácido de una sola base ("*a single base missense substitution*") que convierte T en A en el nucleótido 1796 el cual sustituye una valina por un ácido glutámico en el codón 599 (V599E) en el exón 15 (Davies et al., Nature 417:949-54 (2002)). Esta mutación incrementa la actividad cinasa básica de B-Raf, resultando en hiperactividad de la vía MAPK evidenciada por niveles constitutivamente elevados de cinasas corriente abajo MEK y ERK (Davies et al., Nature 417:949-54 (2002)). Las mutaciones B-RAF son eventos adquiridos, somáticos, pos-cigóticos que no se han identificado en melanomas familiares (Langet al. Hum Mutat 21:327-30 (2003); Laud et al, Cancer Res 63:3061-65 (2003); y Meyer et al, Int J Cancer 106:78-80 (2003)).

La interferencia por ARN (ARNi) es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos de secuencia de polinucleótidos efectuado por ARN bicatenario que resulta en degradación de un ARN mensajero específico (ARNm), reduciendo en esa forma la expresión de un polipéptido diana deseado codificado por el ARNm (véase, por ejemplo, WO 99/32619; WO 01/75164; Patente de los Estados Unidos No. 6,506,559; Fire et al., Nature 391:806-11 (1998); Sharp, Genes Dev. 13:139-41 (1999); Elbashir et al. Nature 411:494-98 (2001); Harborth et al., J. Cell Sci. 114:4557-65 (2001)). ARNi está mediado por polinucleótidos bicatenarios tal como se describe también aquí más adelante, por ejemplo, ARN bicatenario (ARNbc), con secuencias que corresponden a secuencias

X 208

exónicas que codifican porciones de los polipéptidos cuya expresión está comprometida. Según se afirma, ARNi no se efectúa por polinucleótidos de ARN bicatenario que comparten identidad de secuencias con secuencias intrónicas o promotoras (Elbashir et al., 2001). Las vías de ARNi se han caracterizado en la mejor forma en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*, aunque también se han considerado polinucleótidos de "ARN interferente pequeño" (ARNip) que interfieren la expresión de polipéptidos en eucariotas mayores, tales como mamíferos (incluidos humanos) (por ejemplo, Tuschl, 2001 *Chembiochem.* 2:239-245; Sharp, 2001 *Genes Dev.* 15:485; Bernstein et al., 2001 *RNA* 7:1509; Zamore, 2002 *Science* 296:1265; Plasterk, 2002 *Science* 296:1263; Zamore 2001 *Nat. Struct. Biol.* 8:746; Matzke et al., 2001 *Science* 293:1080; Scadden et al., 2001 *EMBO Rep.* 2:1107).

De acuerdo con un modelo actual no limitante, la vía ARNi se inicia por segmentación progresiva, dependiente de ATP, de ARNbc largo en fragmentos bicatenarios de alrededor de 18-27 (por ejemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, etc.) pares de bases de nucleótidos de longitud, denominados ARNS interferentes pequeños (ARNip) (véase reseña por Hutvagner et al., *Curr. Opin. Gen. Dev.* 12:225-32(2002); Elbashir et al., 2001; Nyknen et al., *Cell* 107:309-21 (2001); Bass, *Cell* 101:235-38(2000)); Zamore et al., *Cell* 101:25-33(2000)). En *Drosophila*, una enzima conocida como "Dicer" segmenta el ARN bicatenario más largo en ARNip; Dicer pertenece a la familia ribonucleasa III de endonucleasa específica de ARNbc (WO 01/68836; Bernstein et al., *Nature* 409:363-66(2001)). Además, de acuerdo con este modelo no limitante, los bicatenarios ARNip se incorporan en un complejo de proteínas, seguido por el desenrollamiento, dependiente de ATP, del ARNip, que genera entonces un complejo silenciador inducido por ARN (RISC)(WO 01/68836). El complejo reconoce y segmenta una ARN

X 369

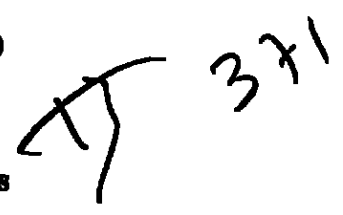
diana que es complementario a la cadena guía del ARNip, interfiriendo en esa forma la expresión de una proteína específica (Hutvagner et al., supra).

En *C. elegans* y *Drosophila*, ARNi puede estar mediada por polinucleótidos de ARN bicatenario largo (WO 99/32619; WO 01/75164; Fire et al., 1998; Clemens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6499-6503 (2000); Kisielow et al., Biochem. J. 363:1-5(2002); véase también WO 01/92513 (silenciamiento mediado por ARNi en levadura)). En células mamíferas, sin embargo, transfección con polinucleótidos de ARNbc largo (es decir, mayor a 30 pares de bases) lleva a la activación de una respuesta de secuencia no específica que bloquea globalmente la iniciación de la síntesis de proteínas y ocasiona la degradación del ARNm (Bass, Nature 411:428-29 (2001)). La transfección de células humanas y otras células mamíferas con ARN bicatenarios de alrededor de 18-27 pares de bases de nucleótidos de longitud interfiere en una manera específica de secuencia la expresión de polipéptidos particulares codificados por ARN mensajeros (ARNm) que contienen secuencias de nucleótidos correspondientes (WO 01/75164; Elbashir et al., 2001; Elbashir et al., Genes Dev. 15:188-200 (2001)); Harborth et al., J. Cell Sci. 114:4557-65(2001); Carthew et al., Curr. Opin. Cell Biol. 13:244-48(2001); Mailand et al., Nature Cell Biol. Advance Online Publication (Mar. 18, 2002); Mailand et al. 2002 Nature Cell Biol. 4:317).

Los polinucleótidos de ARNip pueden ofrecer ciertas ventajas sobre otros polinucleótidos conocidos en el arte para uso en alteración, específica de secuencia, o modulación de la expresión génica para proporcionar niveles alterados de un producto polipéptido codificado. Estas ventajas incluyen concentraciones más bajas de polinucleótidos de ARNip efectivo, estabilidad mejorada de polinucleótidos de ARNip, y longitudes más cortas de oligonucleótidos de polinucleótidos de ARNip relativas a tales otros polinucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos complementarios, ribozima o

2300

tricatenarios). A modo de un breve antecedente, polinucleótidos "complementarios" se unen en una manera específica de secuencia a ácidos nucleicos dianas, tales como ARNm o ADN, para prevenir la transcripción de ADN o traducción del ARNm (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,168,053; Patente de los Estados Unidos No. 5,190,931; Patente de los Estados Unidos No. 5,135,917; Patente de los Estados Unidos No. 5,087,617; véase igualmente, por ejemplo, Clusel et al., 1993 Nucl. Acids Res. 21:3405-11, que describe oligonucleótidos complementarios "dumbbell"). Los polinucleótidos "ribozima" pueden direccionarse a cualquier transcrito de ARN y son capaces de segmentar catalíticamente tales transcritos, alterando así la traducción de ARNm (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,272,262; Patente de los Estados Unidos No. 5,144,019; y Patentes de los Estados Unidos No. 5,168,053, 5,180,818, 5,116,742 y 5,093,246; U.S. 2002/193579). Moléculas de ADN "tricatenario" se refieren a hebras de ADN monocatenarios que se unen a ADN bicatenario para formar una molécula tricatenaria colineal, previniendo así la transcripción (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,176,996, que describe métodos de fabricar oligonucleótidos sintéticos que se unen a sitios diana en ADN bicatenario). Tales estructuras tricatenarias son inestables y se forman sólo transitoriamente bajo condiciones fisiológicas. Debido a que los polinucleótidos monocatenarios no se difunden fácilmente en las células y, por lo tanto, son susceptibles de digestión con nucleasa, el desarrollo de ADN monocatenario para tecnologías complementarias o tricatenarias requiere a menudo nucleótidos químicamente modificados, para mejorar la estabilidad y absorción por las células. Por contraste, los ARNip se absorben fácilmente por células intactas, son efectivas en interferir la expresión de polipéptidos específicos con concentraciones que son varios órdenes de magnitud menores que las requeridas para polinucleótidos



complementarios o de ribozima, y no requieren el uso de nucleótidos químicamente modificados.

El melanoma maligno es el cáncer de piel con el impacto más significativo en el hombre, ya que comporta el riesgo más alto de muerte por metástasis. Las tasas de incidencia y mortalidad continúan creciendo cada año, sin un tratamiento efectivo a largo plazo en el horizonte. En parte, esto refleja la falta de identificación de genes críticos involucrados y terapias específicas dirigidas a corregir estos defectos. Por consiguiente, existe una necesidad en el arte para la identificación de genes críticos involucrados y terapias específicas dirigidas a corregir estos defectos, y una reducción dirigida del gen (genes) identificado(s) como claves en las vías de señalización PI3K/Akt y MEK/ERK. Identificar un gen como una diana selectiva ofrece nuevas oportunidades terapéuticas para pacientes con melanoma.

Por consiguiente, es un objeto primario, característica, o ventaja de la presente invención mejorar lo último en tecnología en este campo científico.

Es un objeto adicional, característica, o ventaja de la presente invención proveer un método para reducir la actividad Akt3 en una célula cancerosa, restableciendo así la sensibilidad apoptótica normal a una célula cancerosa.

Es un objeto adicional, característica, o ventaja de la presente invención proveer un método para inducir apoptosis en una célula cancerosa con un agente que reduce la actividad Akt3.

Es un objeto adicional, característica, o ventaja de la presente invención proveer un método combinatorio de tratar melanomas restableciendo la sensibilidad apoptótica normal a una célula tumoral de melanoma, disminuyendo la proliferación y el crecimiento celular de la

LK 372

célula tumoral de melanoma, e inhibiendo la vascularización de la célula tumoral de melanoma.

Es un objeto adicional, característica, o ventaja de la presente invención proveer un método de tratar melanomas, el cual reduce el tamaño del tumor más eficientemente que los métodos convencionales.

Es un objeto adicional, característica, o ventaja de la presente invención proveer un método de tratar melanomas, el cual requiere una concentración menor de quimioterapia a utilizarse, disminuyendo así la toxicidad al paciente.

Éstos y otros objetos, características, o ventajas se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención provee una base razonable para combinar terapias dirigidas junto con quimioterapias seleccionadas, que no existen actualmente para el tratamiento de melanoma. La presente invención se basa en descubrimiento de los actuales inventores de que la Akt3 regula la apoptosis y que V599EB-Raf regula el crecimiento y desarrollo vascular en melanoma. Los inventores son los primeros en reconocer una sustancia terapéutica dirigida combinada, efectiva para tratar melanoma. En una incorporación, la invención provee un método para inducir apoptosis en una célula tumoral de melanoma reduciendo la actividad Akt3. En todavía otra incorporación, la invención provee un método para inducir apoptosis en una célula tumoral de melanoma, el cual comprende contactar una célula tumoral de melanoma con un agente que reduce la actividad Akt3. En consecuencia, el método contemplado restablece la sensibilidad apoptótica normal a una célula tumoral de melanoma, permitiendo así la administración de una menor concentración de agentes quimioterapéuticos, lo que se traduce en una toxicidad reducida a un paciente.

✓ 373

Los presentes inventores contemplan un método para tratar un tumor de melanoma en un mamífero, que comprende: administrar a un tumor de melanoma una cantidad efectiva de un agente para inducir apoptosis; y administrar a un tumor de melanoma una cantidad efectiva de un agente para reducir angiogénesis y proliferación celular.

Asimismo se divulga aquí un método para tratar un melanoma en un mamífero, que comprende: administrar a un tumor de melanoma en un mamífero una cantidad efectiva de un agente que reduce la actividad Akt3; administrar a un tumor de melanoma en un mamífero una cantidad efectiva de un agente que reduce la actividad V599EB-Raf, tratando así un tumor de melanoma.

En otro aspecto, la invención provee una composición farmacéutica para tratar un tumor de melanoma que comprende: un agente que reduce la actividad Akt3; y un excipiente.

Éstas y otras incorporaciones de la invención se harán evidentes con referencia a la siguiente Descripción Detallada. Todas las referencias divulgadas aquí se incorporan por este medio por referencia en su totalidad, como si cada una se incorporara individualmente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 muestra la identificación de la implicación de Akt3 en melanoma maligno. A. Una actividad Akt en la estirpe celular de melanoma UACC 903 está regulada por PTEN. Análisis *Western blot* muestra la expresión de Akt fosforilada, Akt total, PTEN y α -enolasa (control de carga). Las estirpes celulares 36A, 29A y 37A son estirpes celulares genéticamente relacionadas creadas a partir de la estirpe celular parental UACC 903 que expresa PTEN. Estirpes celulares revertientes oncogénicas derivadas de la estirpe celular 36A se consideran isogénicas, difiriendo únicamente en la expresión de PTEN. Los melanocitos sirven

X 374

como control de células normales. El gráfico representa exploraciones densitométricas de 3 *Western blot* separados para demostrar cuantitativamente el nivel de Akt fosforilada a Akt total en cada estirpe celular; barras, $\pm$ SEM; estadística, ANOVA de una sola variable dependiente cuantitativa, seguida por Comparaciones Múltiples de Dunnet versus el control melanocito, $*P<0.5$. B. ARNip para cada una de las isoformas Akt demuestra especificidad de la inactivación de cada isoforma Akt ectópicamente expresada en la estirpe celular UACC 903. Constructos que expresan HA-Akt1, HA-Akt2 o HA-Akt3 marcadas se co-nucleofectaron junto con ARNip específico de Akt1, Akt2 o Akt3 en células UACC 903. Los controles eran células no-nucleofectadas o células nucleofectadas únicamente en el vector. Se sondearon *Western blots* con anticuerpos a HA para detectar la proteína ectópicamente expresada, así como para α -enolasa, que sirvió como un control de carga. C. Akt3 fosforilada se reduce cuando la proteína PTEN está presente en el modelo oncogénico UACC 903 (PTEN). Akt3 y Akt2 se inmunoprecipitaron de estirpes celulares en el modelo oncogénico UACC 903 (PTEN) y se analizaron por *Western blotting* por un anticuerpo que reconoce Akt fosforilada. Las estirpes celulares que expresan PTEN 36A, 29A y 37A se derivaron de las estirpes celulares parentales UACC 903 que carece de la proteína PTEN. Las dos líneas de célula tumorigénicas revertantes se derivaron de las estirpes celulares 36^a y ya no expresan PTEN. Un control de antígeno negativo se muestra con controles positivos y negativos para Akt3 y Akt2. Controles para Akt3 y Akt2 fueron células HEK 298T o LNCaP respectivamente, no tratadas (positivos) o tratados con LY-294002 (negativo), un inhibidor de P13K. D. Inactivación mediada por ARNip de Akt3, pero no de Akt1 o Akt2, altera el nivel de Akt fosforilada (actividad) en las estirpes celulares de melanoma UACC 903, WM1 15 y SK-MEL-24. Análisis *Western blot* que muestra la expresión de Akt1 fosforilada, Akt3,

375

Akt2 y α -enolasa luego de la nucleofección con 50 (izquierda) o 100 pmoles (derecha) para cada ARNip respectivo. Los controles eran células no-nucleofectadas o células nucleofectadas con ARNip mezclado ("*scrambled siRNA*"). Los datos son representativos de un mínimo de 2 experimentos separados. El control de carga para estos experimentos fue α -enolasa. E. La actividad Akt3 se reduce en la presencia de PTEN en el modelo oncogénico UACC 903 (PTEN). Akt3 inmunoprecipitada se empleó en un análisis de cinasa *in vitro* en el cual Crosstide se fosforiló por Akt3 para calcular la actividad. El gráfico muestra actividad luego de la sustracción del control no antígeno; barras, $\pm$ SEM; estadística, ANOVA de una sola variable dependiente cuantitativa, seguida por Comparaciones Múltiples de Dunnet versus el control melanocito, * $P < 0.05$.

Figura 2 muestra una expresión Akt3 incrementada y actividad que ocurren durante la evolución del tumor de melanoma. A. Un aumento en el nivel de Akt fosforilada (activa) ocurre durante la fase de crecimiento radial en el modelo de evolución del tumor de melanoma. *Western blot* que compara la cantidad de Akt fosforilada en melanocitos con estirpes celulares de melanoma de paso bajo establecidas de tumores primarios en las fases radial (WM35 y WM3211) y vertical (WM115, WM98.1 y WM278) de crecimiento. Akt total se muestra como control. B. Comparación de la expresión Akt3 versus Akt2 en el modelo de evolución del tumor de melanoma. *Western blots* que muestran los niveles de expresión de Akt3 y Akt2 se muestran junto con α -enolasa como control de carga. C. Akt3 se activa preferencialmente en estirpes celulares del modelo de evolución del tumor de melanoma comparada con Akt2. Akt3 o Akt2 se inmunoprecipitó de cada estirpe celular y se sometió a análisis de *Western blot* para medir la cantidad de Akt fosforilada en el inmunoprecipitado. E. La expresión y la actividad de Akt3, pero no Akt2, aumenta en tumores de pacientes con melanoma comparadas con melanocitos. La actividad se

1/8 376

determinó por inmunoprecipitación de Akt3 y Akt2 seguida por análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce Akt fosforilada para determinar el porcentaje de tumores en los cuales podría detectarse Akt3 fosforilada (activa) o Akt2; estadística, prueba *t*, **P*<0.05.

Figura 3 muestra la intensidad relativa de tinción Akt-p en lunares comunes, lunares displásicos, melanomas primarios y metástasis en pacientes de melanoma y expresión Akt y actividad. A. La expresión PTEN disminuida (actividad) aumenta específicamente la actividad Akt3 en melanocitos y: B. células WM35 de fase de crecimiento radial (fase de crecimiento radial). La reducción mediada por ARNip de PTEN se muestra sola (control) o en combinación con ARNip mezclado o con ARNip contra Akt1, Akt2 o Akt3. Análisis *Western blot* muestra la expresión de Akt fosforilada, Akt3, Akt2 y PTEN. α -enolasa sirvió como control de carga. C. La sobreexpresión de Akt3 en melanocitos humanos incrementa los niveles de Akt fosforilada. Akt3 natural, Akt3 inactivada (inactiva) o Akt3 miristoilada (activa) se nucleofectaron en melanocitos. Constructos similares para Akt2 sirvieron como controles (no se muestran los datos). La fosforilación Akt (actividad) se midió por análisis *Western blot* para medir niveles de Akt fosforilada. La punta de la flecha muestra la ubicación de Akt3 endógenamente activa mientras que la flecha indica Akt3 marcada HA activa ectópicamente expresada.

Figura 4 muestra el mecanismo que subyace a la actividad Akt3 desregulada en melanomas malignos. A. La reducción mediada por PTEN de la actividad Akt3 inhibe el desarrollo del tumor de melanoma. El tamaño de los tumores formados por células de melanoma UACC 903 parentales, la estirpe celular 36A isogénica (que retiene PTEN) y revertiente (que carece de PTEN) se midieron 10 días después de la inyección en ratones inmunitariamente desprotegidos. Los valores son medias de un mínimo de seis sitios de inyección en tres ratones por estirpe celular, barras,

XU 377

± SEM; estadística, estadística, ANOVA de una sola variable dependiente cuantitativa, seguida por Comparaciones Múltiples de Dunnet versus UACC 903, *P<0.05. B. Regulación por disminución mediada por ARNip de Akt3 reduce el potencial oncogénico de células de melanoma UACC 903. ARNip contra Akt3, Akt2 y Akt1 se nucleofectaron en células UACC 903 y, después de 48 horas, las células se inyectaron en ratones inmunitariamente desprotegidos. El tamaño de los tumores se midió 10 días después. Los controles son células UACC 903 nucleofectadas con tampón únicamente o un ARNip mezclado. Los valores son medias de un mínimo de seis sitios de inyección en tres ratones por estirpe celular; barras, ± SEM; estadística, ANOVA de una sola variable dependiente cuantitativa, seguida por Comparaciones Múltiples de Dunnet versus UACC 903, *P<0.05. C. D. E. F. La reducción mediada por PTEN o ARNip de Akt3 aumenta la apoptosis en tumores que crecen en ratones inmunitariamente desprotegidos. La cuantificación (C, D) y fotografías (E, F) de células positivas TUNEL en masas tumorales derivadas de células UACC 903 que expresan PTEN (36A) o nucleofectadas con ARNip en siAkt3 y siAkt2; barras, ± SEM; estadística, Kruskal-Wallis seguida por Comparaciones Múltiples de Dunnet versus UACC 903, *P<0.05. Los tumores se analizaron 4 días después de la inyección de células en ratones inmunitariamente desprotegidos; ampliación 200X. Los controles fueron células UACC 903 o células UACC 903 nucleofectadas con tampón únicamente. Los núcleos blancos representan células que experimentan apoptosis.

Figura 5 describe una demostración de que los liposomas solos son atóxicos a las células de melanoma. La adición de liposomas en varias concentraciones no redujeron el número de células viables. Efectivamente, aumentaron la viabilidad celular en todas las concentraciones en 48 horas. Métodos: Se evaluó la toxicidad de los liposomas en 1205 Lu usando los

20 378

análisis MTS 24, 48, y 72 horas después de la adición de liposomas en concentraciones de 6.25, 12.5, 25, y 50 μ M.

Figura 6 describe una demostración de que las células de melanoma absorben fácilmente liposomas. Métodos: Liposomas marcados (verde) se agregaron a células de melanoma UACC 903 que crecían en cultivo. Las imágenes muestran núcleos de células en la izquierda (contratinturadas con DAPI) y células que han absorbido liposomas marcados a la derecha; ampliación 40X. Aproximadamente el 99% de las células absorben liposomas.

Figura 7 describe una cuantificación de la absorción de liposomas por células de melanoma. Métodos: Liposomas marcados o liposomas que contenían ARNip marcado se agregaron a células que crecían en cultivo en una concentración de 20nM. Una hora más tarde las células se fijaron con 5% de paraformaldehído, contratinturado con DAPI y se registró el % de células que habían absorbido producto marcado.

Figura 8 representa una demostración de la uniformidad de tamaño y distribución de tamaño de los liposomas. Métodos: Arriba: Micrografía Electrónica de Barrido que muestra un tamaño uniforme de los liposomas. Abajo: Distribución del tamaño de los liposomas determinada por análisis de dispersión de luz. El gráfico muestra el rango de tamaño de los liposomas, con el tamaño promedio ocurriendo entre 70-80nm.

Figura 9 describe una demostración de liposomas que aportan grupos de ARNip a células de melanoma. Métodos: ARNip marcado con rojo y verde se agregaron a células de melanoma que crecían en cultivo. Una hora después de la absorción las células se fijaron en 4% de paraformaldehído y se contratinturaron con DAPI. La izquierda muestra los núcleos de las células teñidas de azul, seguido por ARNip rojo y ARNip verde. La última columna es la imagen fusionada, ampliación 40X.

2x 379

Figura 10 presenta una demostración de la duración de inactivación de ARNip Stealth de la expresión de proteína en células de melanoma 1205 Lu. Métodos: Se determinó que la duración de inactivación de proteína por ARNip Stealth de Invitrogen iba más allá de 8 días. ARNip se transfirió a la estirpe celular de melanoma 1205 Lu por nucleofección. El análisis *Western blot* de los niveles de proteína B-Raf se midió en intervalos de 2 días hasta el día 8. ARNip contra C-Raf sirvió como control. Además de la expresión B-Raf disminuida, la actividad de la pErk 1/2 corriente abajo en la vía de señalización disminuyó también durante 8 días. Erk-2 sirvió como control de carga de proteína.

Figura 11 describe una demostración de la inactivación de la expresión de proteína luego de inclusión mediada por liposomas de ARNip en células de melanoma. Complejos de liposomas de ARNip dirigidos a B-Raf mutante pueden inactivarse al 50% de la expresión de proteína a 200nM. Esto indica un valor de referencia; concentraciones más altas incrementarán la inactivación. Métodos: Complejos de liposomas de ARNip se agregaron a células en una concentración de 100 ó 200nM. Se recogieron lisados después de 72 horas y se analizaron por *Western blot*.

Figura 12 muestra que la reducción mediada por ARNip de ^{V599E}B-Raf mutante reduce la actividad corriente abajo de MEK y ERK en melanoma. La inactivación mediada por ARNip de B-Raf y C-Raf reduce los niveles de cada proteína respectiva 24 y 48 horas después de la nucleofección en estirpes celulares de melanoma UACC 903(A), 1205 Lu(B), y C8161(C). ARNip mezclado se utilizó como control, mientras que lamin A/C ARNip se usó como un control adicional para células UACC 903. Únicamente ARNip a B-Raf redujo los niveles de MEK y ERK activa (fosforilada) corriente abajo de B-Raf en células UACC 903 y 1205 LU que contenían ^{V599E}B-Raf mutante. ERK2 se utiliza como control de carga.

✓ 300

Figura 13 muestra que el desarrollo del tumor de melanoma se inhibió con ^{V599B}ARNip pero no ARNip a C-RAF o ARNip mezclado. La inactivación mediada por ARNip de la proteína B-Raf persiste por 6 a 8 días después de la nucleofección en estirpes celulares UACC 903(A) y 1205 Lu(B) que crecían en cultivo. Una disminución correspondiente se observó en niveles de ERK1/ERK2 fosforilada (B). ERK2 sirvió como control de carga. La reducción mediada por ARNip de B-Raf llevó un potencial oncogénico disminuido de células UACC 903(C) y 1205 Lu(D). ARNip contra B-Raf, C-Raf y ARNip mezclado se introdujeron en células UAC 903 ó 1205 Lu (flecha blanca), y 36 horas después se inyectaron células en ratones inmunitariamente desprotegidas (flecha negra). Se midió el tamaño de los tumores en intervalos de 2 días. La regulación por disminución mediada por ARNip de B-Raf redujo el potencial oncogénico de células de melanoma UACC 903 y 1205 Lu. Las células controles se nucleofectaron con tampón únicamente, un ARNip mezclado o ARNip contra C-Raf. Los valores son medias de un mínimo de 12 sitios de inyección en seis ratones con dos experimentos separados. Barras ± SE.

Figura 14 muestra que la inhibición farmacológica de la actividad B-Raf usando BAY 43-9006 inhibe el desarrollo del tumor de melanoma. A, BAY 43-9006 inhibe la actividad ^{V599B}B-Raf natural y mutante. ^{V599B}B-Raf natural marcada HA o mutante se expresaron en células HEK293T expuestas a 5 µmol/L BAY 43-9006 o vehículo DMSO. HA indica una proteína B-Raf ectópicamente expresada. La activación o inhibición de la vía MAPK se determinó incluyendo los niveles de pMEK pERK; ERK2 sirvió como control de carga; B, BAY 43-9006 disminuye los niveles de pMEK y pERK (actividad) en células de melanoma UACC 903 que contenían ^{V599B}B-Raf mutante en una manera sensible a la dosis. El análisis de *Western blot* de niveles pMEK y PERK reducidos en células UACC 903 con concentraciones crecientes de BAY 43-9006. El control de carga fue

35 331

ERK2. C, el pretratamiento de ratones con BAY 43-9006 inhibe el desarrollo de tumores de melanoma. Cuatro días antes de la inyección de 5×10^6 células UACC 903, los ratones se pretrataron dos veces i.p. con 50mg/kg BAY 43-9006 o vehículo DMSO, lo cual se continuó cada 2 días (puntas de las flechas). El tamaño del tumor se muestra en intervalos de 2 días hasta el día 22. Barras, $\pm$ SED, una proliferación de las células tumorales disminuida acompaña la inhibición mediada por ARNip del desarrollo del tumor de melanoma. Una disminución 5 a 8 veces en células positivas en bromodeoxiuridina ocurre luego de la inhibición mediada por ARNip de B-Raf pero no C-Raf o ARNip mezclado. *. $P < 0.05$. Columnas, medias de seis tumores diferentes con cuatro a seis casilla contadas por tumor; barras, $\pm$ SE.

Figura 15 muestra la inhibición de la actividad B-Raf usando BAY 43-9006 que inhibe el desarrollo del tumor de melanoma. Los efectos del tratamiento con BAY 43-9006 se muestran sobre el desarrollo del tumor UACC 903(A) y 1205 Lu(B). Las células UACC 903 y 1205 Lu se inyectaron en ratones inmunitariamente desprotegidos, y se dejó ocurrir el desarrollo del tumor el día 6, punto en el cual los ratones se inyectaron i.p. cada 2 con BAY 43-9006 disuelto en DMSO (puntas de las flechas). Las condiciones de control fueron tratamiento con DMSO únicamente. El inhibidor BAY 43-9006 de Raf cinasa reduce el potencial oncogénico de células de melanoma que contenían proteína ^{V599B}B-Raf mutante en concentraciones ≥ 50 mg/kg. C, se observó cantidad disminuida de ERK fosforilada (activa) ERK para esas células luego del tratamiento con BAY 43-9006 pero no con tratamiento con vehículo. La comparación inmunohistoquímica del número de células pERK-positivas en secciones de tumor UACC 903 tratadas con 50 mg/kg BAY 43-9006 (en DMSO) o en vehículo DMSO solo. Se detectó una diferencia de 3-veces entre células tratadas con vehículo de control y con BAY 43-9006 (D). *. $P < 0.05$.

4X 382

Columnas, medias de seis diferentes tumores con 4 a 6 casillas contadas por tumor; barras, $\pm$ SE.

Figura 16 muestra el mecanismo subyacente a la inhibición del desarrollo del tumor de melanoma luego de la inhibición farmacológica o mediada por ARNip de ^{V599E}B-Raf mutante en tumores de melanoma. La comparación del desarrollo vascular (A), apoptosis (B), y porcentajes de proliferación (C) en tumores temporal y espacialmente coincidentes expuestos a BAY 43-9006 o vehículo (DMSO). Tumores coincidentes en tamaño y en tiempo que se desarrollaban en paralelo se compararon para identificar los efectos de la inhibición B-Raf en el desarrollo del tumor. Una diferencia en el desarrollo vascular fue la primera diferencia estadísticamente significativa (*, $P < 0.05$) observada luego del tratamiento de tumores UACC 903 con BAY 43-9006, el cual fue seguido por una creciente apoptosis (*, $P < 0.05$) y proliferación celular reducida (*; $P < 0.05$). Columnas, medias de dos experimentos separados con cuatro a seis casillas analizadas de cada uno de seis tumores por experimento; barras, $\pm$ SE.

Figura 17 muestra que la inhibición por ARNip y farmacológica de ^{V599E}B-Raf reduce la secreción VEGF de células de melanoma. La secreción VEGF se midió a partir de células UACC 903 ó 1205 Lu que crecían en cultivo por análisis ELISA luego de la nucleofección con B-Raf o VEGF ARNip (A) o después del tratamiento con concentraciones crecientes de BAY 43-9006(B). C-Raf y ARNip mezclado sirvieron como. Barras, $\pm$ SD. Los efectos de la expresión VEGF reducida se muestran sobre el desarrollo de tumor UACC 903 (C) y 1205 Lu (D). El tamaño del tumor se muestra en intervalos de 2 días hasta el día 17.5. La reducción de la expresión VEGF inhibe el desarrollo del tumor de melanoma en una manera con la que ocurre luego de la reducción de la expresión de ^{V599E}B-Raf. Puntos, medias de seis diferentes tumores; barras, $\pm$ SE.

2/ 33

Figura 18: muestra la región de Akt3 que causa activación preferencial en melanoma. La activación se mide como los niveles de fosforilación; las franjas más oscuras indican una actividad más alta. Las bandas inferiores indican la actividad Akt endógena. Los dominios de Akt3 se cambian con los de Akt2, y constructos que contenían los constructos quiméricos se nucleofectaron en la estirpe celular de melanoma WM35. Akt3 y Akt2 miristoiladas sirvieron como controles positivos. Akt3 inactivada (T305A/S472A) y Akt2 (T309A/S474A) sirvieron como controles negativos. La transferencia de Akt3 natural llevó a una actividad creciente en contraste con Akt2 natural que no lo hizo. Los constructos en los cuales el dominio de homología de pleckstrin (PH) de Akt3 (aminoácidos 1-110) se cambió con los de Akt2 se usaron para identificar la región de Akt3 que lleva a la activación en células de melanoma. Nótese, sólo constructos que contenían los dominios catalítico y regulador (C/R) de Akt3 (de aminoácidos 111-497) llevaron a activación. Esto delinea la región de los aminoácidos 111-497 como crítica para la activación de Akt3 en melanomas humanos. Éste es un sitio crítico para el direccionamiento terapéutico que impediría específicamente la activación de Akt3 en melanomas. MÉTODOS: Constructos naturales marcados con HA, y constructos quiméricos PH-Akt3-C/R-Akt2 y PH-Akt2-C/R-Akt3 se prepararon cambiando los dominios de homología pleckstrin (PH) (de aminoácidos 1-110) y dominio catalítico (de aminoácidos 111-479 de Akt3 ó 481 en Akt2). Los constructos se nucleofectaron en la estirpe celular de melanoma WM35 usando el reactivo nucleofector Amara NHEM-NEO, y 48 horas después se analizaron mediante análisis de *Western blot* sondeando con un anticuerpo a ser-473 de Akt.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INCORPORACIÓN PREFERIDA

La presente invención se dirige en parte al descubrimiento que la Akt3 es una importante serina/treonina proteína cinasa, y juega un papel en la supervivencia del melanoma, de modo que las células tumorales son resistentes a la apoptosis. Un modelo de melanoma que refleja la importancia de Akt en la tumorigénesis de melanoma se utilizó para identificar Akt3 como la isoforma predominante desregulada durante la tumorigénesis de melanoma. Como se demuestra aquí la inactivación selectiva de Akt3, pero no Akt1 ó Akt2, disminuye el nivel de Akt fosforilada y baja el potencial oncogénico de las células de melanoma. Por consiguiente, Akt3 provee una diana terapéutica para el cáncer melanoma.

La presente invención se dirige igualmente en parte al descubrimiento de que V599E B-Raf juega un papel en el crecimiento y proliferación del melanoma. Se ha descubierto ahora que la inhibición o reducción de la expresión de B-Raf disminuye la proliferación de células tumorales y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Debe observarse que debido a datos de secuencia errante, la sustitución de valina (V) en ácido glutámico (E) en B-Raf corresponde actualmente al codón 600 y al nucleótido 1799 (no 1796); en la versión correcta como se muestra en la genoteca del NCBI Número de Acceso NT_007914. Kumar et al, Clinical Cancer Research, 9: 3362-3368 (2003). Sin embargo, en esta solicitud, hemos utilizado los números no corregidos de nucleótido y codón de principio a fin por razones históricas y de familiaridad.

Los presentes inventores contemplan una terapia de combinación para tratar células tumorales, que implica la inducción de apoptosis y la reducción de la proliferación celular y la angiogénesis. En una incorporación, la apoptosis se induce reduciendo la actividad Akt3, y la proliferación celular y angiogénesis se disminuyen reduciendo la actividad ^{V599E} B-Raf. Los presentes inventores contemplan asimismo que reduciendo la actividad Akt3 en una célula tumoral reduce el umbral apoptótico en

2X 385

células tumorales, especialmente en células de melanoma, permitiendo emplear dosis mucho más bajas de quimioterapia que basándose en tratamientos convencionales. Por lo tanto, los pacientes recibirán un tratamiento más efectivo y experimentarán menos efectos secundarios de medicamentos de quimioterapia tóxicos.

Para contribuir al entendimiento de la especificación y las reivindicaciones se dan las siguientes definiciones.

DEFINICIONES

Tal como se emplea aquí, el término "ARNip" significa: (i) un oligonucleótido ARN bicatenario, o polinucleótido, que tiene una longitud de 18 pares de bases, 19 pares de bases, 20 pares de bases, 21 pares de bases, 22 pares de bases, 23 pares de bases, 24 pares de bases, 25 pares de bases, 26 pares de bases, 27 pares de bases, 28 pares de bases, 29 pares de bases o 30 pares de bases y que es capaz de interferir la expresión y actividad de un polipéptido Akt3, o una variante de polipéptido Akt3, en donde una sola hebra del ARNip comprende una porción de la secuencia de polinucleótidos de ARN que codifica el polipéptido Akt3, su variante, o una secuencia complementaria ella; (ii) un oligonucleótido de una sola hebra, o polinucleótido de 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos o 30 nucleótidos de longitud y que es capaz de interferir la expresión y/o actividad de un polipéptido Akt3 diana, o una variante del polipéptido Akt3, o que se aparee con una secuencia complementaria para resultar en un ARNbc que es capaz de interferir la expresión del polipéptido diana, en donde dicho oligonucleótido monocatenario comprende una porción de una secuencia de polinucleótidos de ARN que codifica el polipéptido PTP-1B, su variante, o una secuencia complementaria a ella; o (iii) un

2/8 386

oligonucleótido, o polinucleótido, de cualquiera de los anteriores (i) o (ii) en donde tal oligonucleótido, o polinucleótido, tiene una, dos, tres o cuatro alteraciones de ácido nucleico o sustituciones en él.

"Ácido nucleico" o "polinucleótido", tal como se emplea aquí, se refiere polímeros que contienen purina y pirimidina de cualquier longitud, ya sean polirribonucleótidos o polideoxirribonucleótidos o polirribopolideoxirribonucleótidos mixtos. Esto incluye moléculas mono y bicatenarias, es decir, híbridos ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN, así como "ácidos nucleicos de proteínas" (PNA) formados conjugando bases al esqueleto de aminoácidos. Esto incluye asimismo ácidos nucleicos que contienen bases modificadas.

Un "gen" se refiere a un ensamble de nucleótidos que codifican un polipéptido, e incluye ácidos nucleicos de ADNc y ADN genómico.

Un "vector" es cualquier medio para la transferencia de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón al cual puede unirse otro segmento de ADN, con el fin de producir la replicación del segmento unido. Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, capaz de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye medios tanto víricos como no víricos para introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Los vectores víricos incluyen retrovirus, virus adenoasociados, pox, baculovirus, vacuna, herpes simplex, Epstein-Barr y vectores adenovirus. Vectores no víricos incluyen, pero no se limitan a plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos ADN-proteína, y biopolímeros. Además de un ácido nucleico, un vector puede contener asimismo una o más regiones reguladoras, y/o marcadores seleccionables útiles en seleccionar, medir, y

monitorear resultados de transferencia de ácidos nucleicos (transferencia a cuáles tejidos, duración de expresión, etc.).

Un "casete" se refiere a un segmento de ADN que puede insertarse en un vector en sitios específicos de rigurosidad. El segmento de ADN codifica un polipéptido de interés, y el casete y los sitios de rigurosidad se diseñan para garantizar la inserción del casete en el marco de lectura adecuado para transcripción y traducción.

Una célula se ha "transfectado" por ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN se ha introducido dentro de la célula. Una célula se ha "transformado" por ADN exógeno o heterólogo cuando el ADN transfectado realiza un cambio fenotípico. El ADN transformante puede integrarse (enlazarse covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula.

Una "molécula de ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o deoxirribonucleósidos (deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxitimidina, o deoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualesquiera de sus análogos, tales como fosforotioatos y tioésteres, ya sea en forma monocatenaria, o una hélice bicatenaria. Son posibles hélices bicatenarias ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. El término molécula de ácido nucleico y, en particular, molécula de ADN o ARN, se refiere únicamente a la estructura primaria o secundaria de la molécula, y no la limita a cualesquiera formas terciarias particulares. Por consiguiente, este término incluye ADN bicatenario hallado, entre otros, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de rigurosidad), plásmidos, y cromosomas. Cuando se discute la estructura de moléculas de ADN bicatenario particular, pueden describirse aquí secuencias de acuerdo con la convención normal de dar únicamente la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra con una

30 380

secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sido sometida a manipulación biológica molecular.

La presente invención contempla el aislamiento de melanoma de un gen que codifica una proteína Akt3 humana o polipéptido de la invención, incluida una forma de longitud completa, o de ocurrencia natural, de Akt3, y cualesquiera fragmentos antigénicos específicos de Akt3, humanos, de los mismos. Tal como se emplea aquí, "Akt3" se refiere a un polipéptido Akt3, y "akt3" se refiere a un gen que codifica el polipéptido Akt3.

El término "Akt3" se refiere a un ácido nucleico Akt3 (ADN y ARN), proteína (o polipéptido), sus variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos interespecie que poseen (i) homología sustancial de secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos del Número de Acceso AJ245709 (Homo sapiens ARNm para serina/treonina cinasa Akt-3 (gen Akt3) gi|5804885|emb|AJ245709.1|HSA245709[5804885]); Número de Acceso AF135794 (Homo sapiens AKT3 proteína cinasa ARNm, cds completos gi|4574743|gb|AF135794.1|AF135794[4574743]); Número de Acceso NM_005465 (Homo sapiens v-akt homólogo 3 de oncogén vírico de timoma murino (proteína cinasa B, gamma) (AKT3), variante 1 de transcrito, ARNm gi|32307164|ref|NM_005465.3|[32307164]); Número de Acceso NM_181690 (Homo sapiens v-akt homólogo 3 de oncogén vírico de timoma murino (proteína cinasa B, gamma)(AKT3), variante 2 de transcrito, ARNm gi|32307162|ref|NM_181690.1|[32307162]); Número de Acceso AY005799 (Homo sapiens proteína cinasa B gamma 1(AKT3) ARNm, cds completo, alternativamente empalmados gi|15072339|gb|AY005799.1|[15072339]); Número de Acceso AF124141 (Homo sapiens proteína cinasa B gamma ARNm, cds completos gi|4757578|gb|AF124141.1|AF124141[4757578]); o (ii) homología sustancial de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificadora

389

Número de Acceso CAB53537 (Akt-3 proteína [Homo sapiens] gi|5804886|emb|CAB53537.1|[5804886]); Número de Acceso AAD24196 (AKT3 proteína cinasa [Homo sapiens] gi|4574744|gb|AAD24196.1|AF135794_1[4574744]); Número de Acceso AAF91073 (proteína cinasa B gamma 1 [Homo sapiens] gi|15072340|gb|AAF91073.1|[15072340]); Número de Acceso AAD29089 (proteína cinasa B gamma [Homo sapiens]

gi|4757579|gb|AAD29089.1|AF124141_1[4757579]); Número de Acceso NP_005456 (v-akt isoforma 1 de homólogo 3 de oncogén vírico de timoma murino; proteína cinasa B gamma, RAC-gamma serina/treonina proteína cinasa; serina treonina proteína cinasa, Akt-3 [Homo sapiens] gi|488549|ref|NP_005456.1|[488549]); Número de Acceso NP_859029 (v-akt isoforma 2 de homólogo 3 de oncogén vírico de timoma murino; proteína cinasa B gamma; RAC-gamma serina/treonina proteína cinasa; serina treonina proteína cinasa, Akt-3 [Homo sapiens] gi|32307163|ref|NP_859029.1|[32307163]).

El término "B-Raf" se refiere a ácido nucleico B-Raf (ADN y ARN), proteína (o polipéptido), sus variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos interespecie que poseen (i) homología sustancial de secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos de B-Raf hallada en la GenBank (NM_004333) un homólogo B1 de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf Homo sapiens (BRAF), ARNm, gi|33188458|ref|NM_00433.2|[33188458]. La secuencia de proteínas afín para B-Raf es GenBank Número de Acceso P15056.

Una proteína B-Raf hallada en Genbank es M95712 Homo sapiens B-raf proteína (BRAF) ARNm, cds completos gi|41387219|gb|M95712.2|HUMBRAF[41387219].

Una "muestra de control" se refiere a una muestra de material biológico representativa de animales sanos libres de cáncer. El nivel de

32 390

Akt3 o B-Raf en una muestra de control, o el número de copia del gen correspondiente codificador, es preferiblemente típico de la población general de un sujeto normal, libre de cáncer, de la misma especie. Esta muestra o bien puede recogerse de un animal con el fin de utilizarse en los métodos descritos en la presente invención o bien puede ser cualquier material biológico representativo de animales normales, libres de cáncer, obtenido por otras razones, pero sin embargo apropiado para uso en los métodos de esta invención. De igual modo una muestra de control puede obtenerse de tejido normal del animal que tiene o del que se sospecha que tiene cáncer. Una muestra de control se puede referir también a un nivel dado de Akt3, representativa de la población libre de cáncer, que se ha establecido previamente con base en mediciones de sujetos normales, libres de cáncer. Alternativamente, una muestra de control biológico puede referirse a una muestra que se obtiene de un individuo diferente o ser un valor normalizado basado en datos de referencia obtenidos de una población. Además, una muestra de control puede definirse para edad, sexo, origen étnico u otros parámetros demográficos específicos. En algunas situaciones, el control está implícito en la medición particular. Un ejemplo de un control implícito se da donde un método de detección puede detectar únicamente Akt3, o el número de copia del gen correspondiente, cuando está presente un nivel mayor que el típico de un sujeto normal, libre de cáncer. Un nivel de control típico para un gen es dos copias por célula. Otro ejemplo se da en el contexto de un análisis inmunohistoquímico en donde se conoce el nivel de control para el análisis. Otras instancias de tales controles se hallan dentro del conocimiento del experto.

Un nivel de polipéptido Akt3 o B-Raf o polinucleótido que se "espera" en una muestra de control se refiere a un nivel que representa un muestra típica, libre de cáncer, y de la cual puede distinguirse una presencia elevada o diagnóstica de polipéptido Akt3 o polinucleótido.

27 391

Preferiblemente, un nivel "esperado" se controlará para factores tales como la edad, sexo, historia médica, etc., de un mamífero, así como para el sujeto biológico particular que se está evaluando.

El término "célula tumoral" designa una célula que es un componente de un tumor en un sujeto, o una célula de la que se determina que está destinada a convertirse en un componente de un tumor, es decir, una célula que es un componente de una lesión precancerosa en un sujeto.

"ADNc" se refiere a ADN complementario o copia producido de una plantilla de ARN por la acción de polimerasa ADN dependiente de ARN (transcriptasa reversa). Por consiguiente, un "clon de ADNc" significa una secuencia de ADN bicatenario complementaria a una molécula de ARN de interés, portada en un vector de clonación o PCR amplificada. Este término incluye genes de los cuales se han retirado las secuencias intervinientes.

"Vector de clonación" se refiere a un ADN de plásmido o fago u otra secuencia de ADN que es capaz de replicarse en una célula hospedadora. El vector de clonación se caracteriza por uno o más sitios de reconocimiento de endonucleasa en los cuales pueden cortarse tales secuencias de ADN en una forma determinable sin pérdida de una función biológica esencial del ADN, que puede contener un marcador apropiado para uso en la identificación de células transformadas.

"Vector de expresión" se refiere a un vehículo o vector similar a un vector de clonación pero que es capaz de expresar una secuencia de ácidos nucleicos que se ha clonado en ella, después de la transformación en un anfitrión. Una secuencia de ácido nucleicos se "expresa" cuando se transcribe para proporcionar una secuencia de ARNm. En la mayoría de los casos, este transcrito se traducirá para proporcionar una secuencia de aminoácidos. El gen clonado se pone usualmente bajo el control (es decir, ligado operacionalmente a) de una secuencia de control de expresión.

34 392

"Secuencia de control de expresión" o "secuencia reguladora" se refiere a una secuencia de nucleótidos que controla o regula la expresión de genes estructurales cuando se enlazan operacionalmente a esos genes. Éstos incluyen, por ejemplo, los sistemas lac, el sistema trp, las principales regiones operadoras y promotoras del fago lambda, la región de control de la cubierta proteínica fd y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas. Las secuencias de control de expresión variarán dependiendo de si el vector se diseña para expresar el gen operacionalmente en un anfitrión procariótico o eucariótico, y pueden contener elementos transcripcionales tales como elementos potenciadores, secuencias de terminación, elementos de especificidad de tejidos o sitios de iniciación traduccional y terminación.

"Operacionalmente ligado" significa que el promotor controla la iniciación de expresión del gen. Un promotor se enlaza operacionalmente a una secuencia de ADN proximal si en su introducción en una célula hospedadora el promotor determina la transcripción de la secuencia(s) de ADN proximal en una o más especies de ARN. Un promotor se enlaza operacionalmente a una secuencia de ADN si el promotor es capaz de iniciar la transcripción de esa secuencia de ADN.

"Anfitrión" significa eucariotas. El término incluye un organismo o célula que es el receptor de un vector de expresión replicable.

La introducción de ácidos nucleicos en la célula hospedadora por cualquier método conocido en el arte, incluidos los descritos aquí, se designará aquí como "transformación". Las células en las cuales se han introducido ácidos nucleicos descritos anteriormente se proponen incluir igualmente la progenie de tales células.

Ácidos nucleicos designados aquí como "aislados" son ácidos nucleicos separados de los ácidos nucleicos de ADN genómico o ARN celular de su fuente de origen (por ejemplo, como existe en células o en una

31 393

mezcla de ácidos nucleicos tal como una biblioteca), y pueden haberse sometido a procesamiento posterior. "Aislado", tal como se emplea aquí, se refiere a secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos que están por lo menos 60% libres, preferiblemente 75% libres y, muy preferiblemente 90% libres de otros componentes con los cuales se encuentran naturalmente asociados. Ácidos nucleicos "aislados" (polinucleótidos) incluyen ácidos nucleicos obtenidos por métodos descritos aquí, métodos similares u otros métodos apropiados, incluidos ácidos nucleicos esencialmente puros, ácidos nucleicos producidos por síntesis química, por combinaciones de métodos químicos y biológicos, y ácidos nucleicos recombinantes que son aislados. Los ácidos nucleicos designados aquí como "recombinantes" son ácidos nucleicos que se han producido por metodología de ADN recombinante, incluidos aquellos ácidos nucleicos que se generan por procedimientos que se basan en un método de replicación artificial, tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o clonación en un vector usando enzimas de rigurosidad. Ácidos nucleicos "recombinantes" son también aquellos que resultan de eventos de recombinación que ocurren a través de los mecanismos naturales de las células, pero se seleccionan luego de la introducción a las células de ácidos nucleicos diseñados para permitir o hacer probable un evento de recombinación deseado. Porciones de los ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos con una cierta función pueden identificarse y aislarse, por ejemplo, mediante el método de Jasin, M., et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,952,501.

Tal como se emplean aquí, los términos "proteína" y "polipéptido" son sinónimos. Los "péptidos" se definen como fragmentos o porciones de polipéptidos, preferiblemente fragmentos o porciones que tienen por lo menos una actividad funcional (por ejemplo, proteólisis, adhesión, fusión, actividad antigénica, o intracelular) como la secuencia completa de polipéptidos.

26 394

Los términos "paciente" o "sujeto" se emplean intercambiablemente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales tales como conejos, ratas, y ratones, y otros animales.

"Muestra biológica", tal como se emplea aquí, es una muestra de tejido biológico o fluido que contiene ácidos nucleicos Akt3 y/o B-Raf o polipéptidos, por ejemplo, de una proteína de cáncer melanoma, polinucleótido o transcrito. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, tejido aislado de humanos. Las muestras biológicas pueden incluir asimismo secciones de tejido tales como muestras de una biopsia y autopsia, secciones congeladas tomadas para fines histológicos, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, muco, cabello, piel, etc. Las muestras biológicas incluyen también tejidos vegetales y cultivos celulares transformados y/o primarios derivados de tejidos de pacientes. Una muestra biológica se obtiene típicamente de un organismo eucariota, preferiblemente eucariotas tales como hongos, plantas, insectos, protozoos, aves, peces, reptiles y, preferiblemente, un mamífero tal como rata, ratones, vaca, perro, conejillo de Indias, o conejo y, muy preferiblemente un primate, tal como chimpancés o humanos.

"Cáncer" o "malignidad" se emplean como términos sinónimos y se refieren a cualquiera de un número de enfermedades que se caracterizan por una proliferación anormal, incontrolada, de las células, la capacidad de células afectadas de diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo (es decir, hacer metástasis), así como cualquiera de un número de rasgos moleculares y/o estructurales característicos. Una "célula cancerosa" o "maligna" se entiende como una célula que posee propiedades estructurales específicas, que carece de diferenciación y es capaz de invasión y metástasis. Ejemplos de neoplasias malignas son cáncer de piel, riñón, colon, mama, próstata e

37 345

hígado, (véase DeVita, V. et al. (eds.), 2001, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 6th. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.; esta referencia se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos).

El término "apoptosis" y "muerte celular programada" (PCD) se emplean como términos sinónimos y describen los procesos morfológicos y celulares que llevan a la autodestrucción celular controlada (véase, por ejemplo, Kerr J. F. R. et al., 1972, *Br J Cancer*. 26:239-257). La muerte celular apoptótica puede inducirse por una variedad de estímulos, tales como ligamiento de receptores de la superficie celular, inanición, privación del factor de supervivencia/factor de crecimiento, choque térmico, hipoxia, daño del ADN, infección vírica, y agentes citotóxicos/quimioterapéuticos. El proceso apoptótico está involucrado en la embriogénesis, diferenciación, proliferación/homeostasis, retiro de células defectuosas y, por lo tanto, dañinas y, especialmente, en la regulación y función del sistema inmunitario. Por consiguiente, la disfunción o desregulación del programa apoptótico está implicada en una variedad de estados patológicos, tales como inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neurodegenerativas, y cáncer. Las células apoptóticas pueden reconocerse por cambios morfológicos estereotípicos: la célula se contrae, muestra deformación y pierde contacto con sus células vecinas. Su cromatina se condensa y, finalmente, la célula se fragmenta en estructuras compactas encerradas por la membrana, llamadas "cuerpos apoptóticos" que contienen citosol, la cromatina condensada, y organelos. Los cuerpos apoptóticos son engullidos por macrófagos y, así, se eliminan del tejido sin causar una respuesta inflamatoria. Esto se da en contraste con el modo necrótico de muerte celular, caso en el cual las células sufren un daño mayor, resultante en la pérdida de la integridad de la membrana, hinchamiento y rompimiento de las células. Durante la necrosis, los contenidos de las células se liberan

396

sin control en el entorno de la célula, lo cual se traduce en el daño de células circundantes y en una fuerte respuesta inflamatoria en el tejido correspondiente. Véase, por ejemplo, Tomei L. D. y Cope F.O., eds., 1991, *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, Plainville, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Isaacs J.T., 1993, *Environ Health Perspect.* 101(suppl 5):27-33; cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los efectos. Una variedad de análisis de apoptosis es bien conocida por el experto en el arte (por ejemplo, análisis de fragmentación de ADN, análisis de proliferación radioactivos, análisis de escalonamiento de ADN para células tratadas, microscopía de fluorescencia de análisis de células teñidas con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (API), y similares).

"Variantes conservadoramente modificadas" se aplica a secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, variantes conservadoramente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticos o esencialmente idénticos, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, y AGG todos codifican el aminoácido arginina. Por consiguiente, en cada posición donde una arginina se especifica por un codón, el codón puede alterarse en cualquiera de los codones correspondientes descritos, sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "sustituciones silenciosas" o "variaciones silenciosas", que son una especie "de variaciones conservadoramente modificadas". Cada secuencia de polinucleótidos descrita aquí que codifica un polipéptido describe también una posible

39 397

variación silenciosa, a menos que se anote otra cosa. Por lo tanto, las sustituciones silenciosas son una característica implícita de cada secuencia de ácidos nucleicos que codifica un aminoácido. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina) puede modificarse para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica por técnicas estándar. En algunas incorporaciones, las secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas se optimizan preferiblemente para expresión en una célula hospedadora particular (por ejemplo, levadura, mamífera, vegetal, fúngica, y similares) usada para producir las enzimas.

En lo que respecta a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones individuales, eliminaciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteínas que altera, agrega o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservadoramente modificada", en donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustitución conservadora que proveen aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology" Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1994). Tales variantes conservadoramente modificadas son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos cada uno contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras unas con otras: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7)

40 398

Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, 1984, Proteins).

Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, alrededor de 70% de identidad, preferiblemente 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o identidad mayor sobre una región especificada (por ejemplo, la secuencia del gen Akt3 asociado con melanoma), cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada), medida usando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados descritas más adelante, o mediante alineamiento manual e inspección visual. Se dice entonces que tales secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición se refiere asimismo al cumplimiento de una secuencia de prueba. La definición incluye además secuencias que tienen eliminaciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Como se describe más adelante, los algoritmos preferidos pueden representar vacíos y similares. Preferiblemente, la identidad existe sobre una región que tiene por lo menos una longitud de alrededor de 25 aminoácidos o nucleótidos o, más preferiblemente, sobre una región que tiene una longitud de 50-100 aminoácidos o nucleótidos.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan secuencias de prueba. Cuando se emplea un algoritmo de comparación de secuencias, secuencias de prueba y referencia se ingresan en un computador, se designan coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmos de secuencias. Pueden utilizarse

4/ 399

parámetros del programa predeterminados, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces identidades de secuencias porcentuales para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", tal como se emplea aquí, incluye referencia a un segmento de una cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo conformado por 20 a 600, usualmente alrededor de 50 a alrededor de 200, más usualmente alrededor de 100 a alrededor de 150 en las cuales puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias. Métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en el arte. La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, 1991, Adv. Appi. Math. 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement).

Otro ejemplo de algoritmo que es apropiado para determinar la identidad porcentual de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 y Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST se

42 400

encuentra a disposición de público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero parejas de secuencias con altos puntajes (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que correspondan o satisfagan algún puntaje umbral de valoración positiva T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se designa como el umbral de puntaje de palabra vecina (Altschul et al., supra). Estos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largas que las contienen. Los aciertos de palabra se amplían en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta el punto en que pueda aumentarse el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de premio para una pareja de residuo de coincidencia; siempre >0) y N (puntaje de sanción para un residuo de no coincidencia; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se emplea una matriz de puntajes para calcular el puntaje acumulativo. La ampliación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene si: el puntaje de alineación acumulativa cae en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntaje negativo; o se alcanza el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T , y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra de 3, y una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, 1989 Proc.

43 401

Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alineaciones (B) de 50, esperanza (E) de 10 $M=5$, $N=4$, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST realiza asimismo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, 1993, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma mínima ($P(N)$), que provee una indicación de la probabilidad con la cual ocurrirá por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma mínima en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menos de alrededor de 0.2, más preferiblemente menos de alrededor de 0.01 y, muy preferiblemente menos de alrededor de 0.001.

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es reactivo en forma inmunológicamente cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por consiguiente, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren únicamente por sustituciones conservadores. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Todavía otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden utilizarse para amplificar la secuencia.

La expresión "se hibrida selectivamente (o específicamente) a" se refiere a la unión, duplicación, o hibridación de una molécula únicamente a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones de hibridación

44 402

rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total o biblioteca):

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará a su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no a otras secuencias. Condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas se hibridan específicamente con temperaturas más elevadas. Una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, 1993, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" in *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que estén alrededor de 5-10° C por debajo del punto de fusión térmica (T_M) para la secuencia específica con un pH de concentración iónica definido. La T_M es la temperatura (bajo concentración iónica definida, pH, y concentración nucleica) a la cual 50% de las sondas complementarias a la diana se hibrida a la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a T_M , 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Condiciones rigurosas serán aquellas en las cuales la concentración salina es menos de alrededor de 1.0M ión de sodio, típicamente alrededor de 0.01 a 1.0M concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH 7.0 a 8.3 y la temperatura es por lo menos alrededor de 30° C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos alrededor de 60 C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Condiciones rigurosas pueden lograrse asimismo con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es por lo menos dos veces la hibridación no específica ("*background hybridization*"), opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Condiciones ejemplares de hibridación rigurosas

41 453

pueden ser las siguientes: 50% formamida, 5X SSC, y 1% SDS, incubando a 42° C., o, 5X SSC, 1% SDS, incubando a 65° C., con lavado en 0.2X SSC, y 0.1% SDS a 65° C. Tales lavados pueden realizarse durante 5, 15, 30, 60, 120, o más minutos. Para PCR, una temperatura de alrededor de 36° C es típica para amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre alrededor de 32° C y 48° C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación de PCR de alta rigurosidad, es típica una temperatura de alrededor de 62°C, aunque temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar desde alrededor de 50°C a alrededor de 65°C., dependiendo de la longitud del cebador y la especificidad. Condiciones típicas de ciclo para amplificaciones de rigurosidad alta y baja incluyen una fase de desnaturalización de 90°C – 95°C durante 30 segundos - 2 minutos, una fase de hibridación con una duración de 30 segundos - 2 minutos, y una fase de extensión de alrededor de 72° C durante 1-2 minutos.

Ácidos nucleico que no hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas son aún sustancialmente idénticos si los polipéptidos que ellos codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos hibridan típicamente bajo condición de hibridación moderadamente rigurosas. "Condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" ejemplares incluyen una hibridación en tampón 40% formamida, 1M NaCl, 1% SDS a 37° C., y un lavado en 1X SSC a 45° C. Tales lavados pueden llevarse a cabo durante 5, 15, 30, 60, 120, o más minutos. Una hibridación es por lo menos dos veces hibridación de fondo. Las personas de habilidad ordinaria reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones alternativas de hibridación y lavado para proporcionar condiciones similares de rigurosidad.

46 401

Trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de la tecnología de ADN recombinante incluyen J. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; P.B. Kaufman et al., (eds), 1995, *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton; M. J. McPherson (ed), 1991, *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; J. Jones, 1992, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford Science Publications, Oxford; B.M. Austen and O.M.R. Westwood, 1991, *Protein Targeting and Secretion*, IRL Press, Oxford; D. N Glover (ed), 1985, *DNA Cloning*, Volumes I and II; M. J. Gait (ed), 1984, *Oligonucleotide Synthesis*; B.D. Hames and S.J. Higgins (eds), 1984, *Nucleic Acid Hybridization*; Wu and Grossman (eds), *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), Vol. 154 and Vol. 155; Quirke and Taylor (eds), 1991, *PCR-A Practical Approach*; Hames and Higgins (eds), 1984, *Transcription and Translation*; R.I. Freshney (ed), 1986, *Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes*, 1986, IRL Press; Perbal, 1984, *A Practical Guide to Molecular Cloning*; J.H. Miller and M.P. Calos (eds), 1987, *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; M.J. Bishop (ed), 1998, *Guide to Human Genome Computing*, 2d Ed., Academic Press, San Diego, Calif.; L.F. Peruski and A.H. Peruski, 1997, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.

El término "reduce la actividad Akt3" se emplea aquí para referirse a una disminución de alrededor de 25% a alrededor de 100% en la actividad Akt3. La invención contempla la inhibición de Akt3 mediante cualquier (a) agente que reduzca el nivel de Akt3 ARNm o el nivel de Akt3 proteína producida por la célula cuando el agente se administra a la célula o (b) cualquier agente que afecte el nivel de Akt3 ARNm o proteína mediante la

44 405

vía de transducción de señales PI3K/Akt que resulta en una reducción en el nivel de Akt3 ARNm o el nivel de Akt3 proteína producida por la célula cuando el agente se administra a la célula, o (c) cualquier agente que disminuya la actividad de Akt3, tal como a través de la fosforilación o desfosforilación. Agentes que disminuyen la actividad de vías corriente abajo, que eliminan productos de la actividad Akt3, y disminuyen la actividad de vías corriente arriba, proveyendo reactivos para Akt3, se encuentran también dentro del ámbito de esta invención. Una disminución o cambio en la actividad Akt3 puede medirse por cualquier método conocido incluidos, pero no limitados a, análisis de cinasas, estado de fosforilación en *Western blots*, o niveles de expresión de proteínas.

El término "reduce la actividad V599E B-Raf" se emplea aquí para referirse a una disminución de alrededor de 25% a alrededor de 100% en la actividad B-Raf. La invención contempla la inhibición de B-Raf mediante cualquier (a) agente que reduzca el nivel de V599E B-Raf ARNm o el nivel de V599E proteína producida por la célula cuando el agente se administra a la célula o (b) cualquier agente que afecte el nivel de B-Raf ARNm o proteína mediante la vía de transducción de señales MAPK o ERK resultante en una reducción en el nivel de V599E B-Raf ARNm o el nivel de V599E proteína producida por la célula cuando el agente se administra a la célula, o (c) cualquier agente que disminuya la actividad de B-Raf, tal como a través de la fosforilación o desfosforilación. Agentes que disminuyen la actividad de vías corriente abajo que eliminan productos de actividad V599E B-Raf y disminuyen la actividad de vías corriente arriba proveyendo reactivos para V599E B-Raf se encuentran asimismo dentro del ámbito de este término. Una disminución o cambio en la actividad B-Raf puede medirse por cualquier método conocido incluidos, pero no limitados a, análisis de cinasas, estado de fosforilación en inmunotransferencias, o niveles de expresión de proteínas.

406 406

El término "tratar un melanoma" se refiere a prohibir, aliviar, mejorar, detener, restringir, desacelerar o revertir la evolución, o reducir el desarrollo de un tumor en mamíferos e incrementar los porcentajes de apoptosis o inducir la apoptosis en una célula tumoral.

Tal como se emplea aquí, el término "angiogénesis", cuando se emplea aquí en referencia a reducir la vascularización, significa que la cantidad de formación de nuevos vasos sanguíneos, que ocurre en la presencia de un agente, disminuye por debajo de la cantidad de formación de vasos sanguíneos que ocurre en la ausencia de un agente adicionado exógenamente. Métodos para determinar una cantidad de formación de vasos sanguíneos en un tejido, incluidos los métodos inmunohistoquímicos, son bien conocidos en el arte, cuantificando el número de vasos que marcan positivo para el antígeno CD-31 o área en el tumor ocupada por vasos positivos CD-31.

Detección de Ácidos Nucleicos de Akt3 y/o B-Raf

En algunas incorporaciones de la presente invención, se usarán ácidos nucleicos que codifican un polipéptido Akt3 o B-Raf, incluida una proteína Akt3 o B-Raf de longitud completa, o cualquier derivado, variante, homólogo, o fragmento de los mismos, derivados de una célula de melanoma. Tales ácidos nucleicos son útiles para cualquiera de un número de aplicaciones, inclusive para la producción de proteína Akt3 o B-Raf, para análisis diagnósticos, para aplicaciones terapéuticas, para sondas específicas de Akt3 o específicas de B-Raf, para análisis de compuestos de unión o modulación de Akt3 o B-Raf, para identificar y/o aislar homólogos de Akt3 o B-Raf de otras especies o de ratones, y otras aplicaciones.

A. Métodos Generales de ADN Recombinante

44 407

Numerosas aplicaciones de la presente invención involucran la clonación, síntesis, mantenimiento, mutagénesis, y otras manipulaciones de secuencias de ácidos nucleicos, que pueden llevarse a cabo usando técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Textos básicos que divulgan los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (2nd Ed. 1989); Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression: a Laboratory Manual*; and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, (Ausubel et al., eds.).

Para los ácidos nucleicos, los tamaños se dan ya sea en kilobases (kb) o pares de bases (bp). Éstos son cálculos derivados de electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, de ácidos nucleicos secuenciados, o de secuencias publicadas de ADN. Para las proteínas, los tamaños se dan en kilodaltons (kDa) o números de residuo de aminoácidos. Los tamaños de las proteínas se calculan de electroforesis en gel, de proteínas secuenciadas, de secuencias de aminoácidos derivadas, o de secuencias de proteínas publicadas.

Oligonucleótidos que no se obtienen comercialmente pueden sintetizarse químicamente de acuerdo con el método de triéster de fosforamidita de fase sólida, descrito por primera vez por Beaucage & Caruthers, 1981, *Tetrahedron Letts.* 22:1859-1862, usando un sintetizador automatizado, como se describe en Van Devanter et al., 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168. La purificación de oligonucleótidos se lleva a cabo ya sea por electroforesis en gel de acrilamida nativa o por HPLC de intercambio iónico como se describe en Pearson & Reanier, 1983, *J. Chrom.* 255: 137-149.

La secuencia de los genes clonados y oligonucleótidos sintéticos puede verificarse después de la clonación usando, por ejemplo, el método de terminación en cadena para secuenciar plantillas bicatenarias de Wallace et al., 1981, *Gene* 16:21-26.

B. Aislamiento y Detección de Secuencias de Nucleótidos Akt3 y/o B-Raf

En algunas incorporaciones de la presente invención, ácidos nucleicos de Akt3 y/o B-Raf se aislarán y clonarán usando métodos recombinantes. Tales incorporaciones se utilizan, por ejemplo, para aislar polinucleótidos de Akt3 y/o B-Raf para expresión de proteínas o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión, u otras secuencias derivadas de Akt3 y/o B-Raf, para monitorear la expresión génica de Akt3 y/o B-Raf, para la determinación de secuencias de Akt3 y/o B-Raf en varias especies, para propósitos diagnósticos en un paciente, es decir, para detectar mutaciones en Akt3 y/o B-Raf, o para genotipo y/o aplicaciones forenses.

Variantes polimórficas, alelos, y homólogos interespecies y ácidos nucleicos que son sustancialmente idénticos al gen Akt3 o B-Raf pueden aislarse usando sondas de ácidos nucleicos de Akt3 o B-Raf, y oligonucleótidos cribando bibliotecas bajo condiciones rigurosas de hibridación. Alternativamente, pueden emplearse bibliotecas de expresión para clonar proteínas de Akt3 o B-Raf, variantes polimórficas, alelos, y homólogos interespecies, detectando homólogos expresados inmunológicamente con antisueros o anticuerpos purificados elaborados contra un polipéptidos de Akt3 o B-Raf, que también reconocen y se unen selectivamente al homólogo de Akt3 o B-Raf.

Para conformar una biblioteca de ADNc Akt3, se debería elegir una fuente que sea rica en ARN Akt3. Para conformar una biblioteca de ADNc B-Raf, se debería seleccionar una fuente que sea rica en ARN B-Raf. A continuación el ARNm se convierte en ADNc usando transcriptasa inversa, ligada en un vector recombinante, y transfectada en un anfitrión recombinante para propagación, cribado y clonación. Métodos para conformar y cribar bibliotecas de ADNc son bien conocidas (véase, por

2/ 409

ejemplo, Gubler & Hoffman, 1983, Gene 25:263-269; Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra).

Para una genoteca de ADNg ("*a genomic library*"), el ADN se extrae del tejido y se corta mecánicamente o se digiere enzimáticamente para proporcionar fragmentos de alrededor de 12-20kb. Los fragmentos se separan entonces por centrifugación de gradiente de tamaños indeseados y se construyen en vectores lambda de bacteriófago. Estos vectores y fago se empaquetan *in vitro*. Fagos recombinantes se analizan por hibridación de placas como se describe en Benton & Davis, 1977, Science 196:180-182. La hibridación de colonias se lleva a cabo como se describe generalmente en Grunstein et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72:3961-3965.

Homólogos de Akt3 o B-Raf más distantemente relacionados pueden identificarse usando cualquiera de un número de técnicas bien conocidas, inclusive hibridando una sonda de Akt3 o una sonda de B-Raf con una genoteca de ADNg o ADNc empelando condiciones moderadamente rigurosas, o bajo condiciones de baja rigurosidad utilizando sondas de regiones que son selectivas para Akt3 o B-Raf, por ejemplo, sondas específicas generadas para el dominio C-terminal. Asimismo, un homólogo distante puede amplificarse de una biblioteca de ácidos nucleicos usando conjuntos de cebadores degenerados, es decir, cebadores que incorporan todos los codones posibles que codifican una secuencia dada de aminoácidos, en particular basada en un tramo de aminoácidos altamente conservados. Tales cebadores son bien conocidos por las personas expertas, y se dispone de numerosos programas, por ejemplo, en la Internet, para el diseño de cebadores degenerados.

En ciertas incorporaciones, polinucleótidos Akt3 o B-Raf se detectarán usando métodos basados en hibridación para determinar, por ejemplo, niveles de ARN de Akt3 o B-Raf o para detectar secuencias particulares de ADN, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Por ejemplo,

32 410

la expresión génica de Akt3 y/o B-Raf puede analizarse mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, *Northern blotting*, transcripción inversa y amplificación PCR de ARNm, incluido análisis PCR cuantitativo de niveles de ARNm con procedimientos de PCR en tiempo real (por ejemplo, amplificación TAQMAN™ - transcriptasa inversa), detección mediante *dot blotting*, hibridación *in situ*, protección de ribonucleasa, arreglos con microchips de ADN de sondeo, y similares.

En otra incorporación, tecnología de análisis de oligonucleótidos de alta densidad (por ejemplo, GeneChip™) puede usarse para identificar ortólogos, alelos, variantes conservadoramente modificadas, y variantes polimórficas de Akt3 y/o B-Raf, o para monitorear niveles de ARNm Akt3 y/o B-Raf. En el caso en donde homólogos se vinculan a una enfermedad conocida, por ejemplo, melanoma, éstos pueden emplearse con GeneChip™ como herramienta de diagnóstico en detectar melanoma en una muestra biológica, véase, por ejemplo, Gunthard et al., 1998, AIDS Res. Hum. Retroviruses 14:869-876; Kozal et al., 1996, Nat. Med. 2:753-759; Matson et al., 1995, Anal. Biochem. 224:110-106; Lockhart et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14:1675-1680; Gingeras et al., 1998, Genome Res. 8:435-448; Hacia et al., 1998, Nucleic Acids Res. 26:3865-3866.

La detección de polinucleótidos de Akt3 y/o B-Raf y polipéptidos pueden involucrar detección cuantitativa o cualitativa del polipéptido o polinucleótido, y pueden involucrar una comparación actual con un valor de control o, alternativamente, puede realizarse de tal modo que la detección misma indique inherentemente un nivel creciente de Akt3 y/o B-Raf.

En ciertas incorporaciones, por ejemplo, diagnóstico de cáncer melanoma, se cuantificará el nivel de actividad de polinucleótido Akt3 y/o B-Raf, polipéptido, o proteína. En tales incorporaciones, la diferencia entre un nivel elevado de Akt3 y/o B-Raf y un nivel de control normal será preferiblemente estadísticamente significativa. Típicamente, una presencia

3 411

diagnóstica, es decir, sobreexpresión o un aumento de polipéptido Akt3 y/o B-Raf o ácido nucleico, representa por lo menos un aumento de alrededor de 1.5, 2, 3, 5, 10 veces, o más en el nivel de polipéptido Akt3 y/o B-Raf o polinucleótido en la muestra biológica, comparado con un nivel esperado en una muestra no cancerosa. La detección de Akt3 y/o B-Raf puede realizarse *in vitro*, es decir, en células en una muestra biológica tomada del paciente, o *in vivo*. En una incorporación un nivel incrementado de Akt3 y/o B-Raf se utiliza como un marcador diagnóstico de Akt3 y/o B-Raf respectivamente. Tal como se emplea aquí, una "presencia diagnóstica" indica cualquier nivel de Akt3 o B-Raf que es superior al esperado en una muestra no cancerosa. En una incorporación, los análisis para detectar un polipéptido Akt3 o B-Raf o polinucleótido en una muestra biológica se conducen bajo condiciones en donde no se detectaría un nivel normal de polipéptido Akt3 o B-Raf o polinucleótido, es decir, un nivel típico de una muestra no cancerosa, es decir, libre de cáncer. En tales análisis, por lo tanto, la detección de cualquier polipéptido Akt3 y/o B-Raf o ácido nucleico en la muestra biológica indica una presencia diagnóstica, o nivel incrementado.

Tal como se describe más adelante, puede emplearse cualquiera de un número de métodos para detectar Akt3 y/o B-Raf. Un nivel de polinucleótido Akt3 y/o B-Raf puede detectarse detectando cualquier ADN o ARN de Akt3 o B-Raf afin, incluido ADN genómico Akt3, ARNm, y ADNc.

Un polipéptido Akt3 o B-Raf puede detectarse detectando un polipéptido Akt3 y/o B-Raf mismo, o detectando la actividad de proteína Akt3 y/o B-Raf. La detección puede implicar la cuantificación del nivel de Akt3 y/o B-Raf (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, o nivel de proteína, o actividad de proteína) o, alternativamente, puede ser una evaluación cualitativa del nivel, o de la presencia o ausencia, de Akt3 y/o

B-Raf, en particular en comparación con un nivel de control. Puede emplearse cualquiera de un número de métodos para detectar cualquiera de los anteriores, como se describe más adelante. Tales métodos incluyen, por ejemplo, hibridación, amplificación, y otros análisis.

En ciertas incorporaciones, la capacidad de detectar un nivel incrementado, o presencia diagnóstica, en una célula se utiliza como marcador de células cancerosas, es decir, para monitorear el número o localización de células cancerosas en un paciente, detectado *in vivo* o *in vitro*.

Típicamente, los polinucleótidos Akt3 o polipéptidos detectados aquí serán idénticos por lo menos en alrededor de 70%, y preferiblemente idénticos en 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, sobre una región de por lo menos alrededor de 50, 100, 200, o más nucleótidos, o 20, 50, 100, o más aminoácidos, al gen Akt3 de ocurrencia natural. Tales polinucleótidos o polipéptidos pueden representar formas funcionales o no funcionales de Akt3, o cualquier variante, derivado, o fragmento de los mismos.

1. Detección de un Número de Copias

En una incorporación, por ejemplo, para el diagnóstico de la presencia de cáncer, se evalúa el número de copias, es decir, el número de genes Akt3 en una célula. Generalmente para un gen autosómico dado, un animal tiene dos copias de cada gen. El número de copias puede aumentarse, sin embargo, mediante amplificación o duplicación génica, por ejemplo, en células cancerosas, o reducirse por eliminación. Métodos de evaluar el número de copias de un gen particular son bien conocidos por los expertos en el arte, e incluyen, entre otros, análisis basados en hibridación y amplificación.

a) Análisis Basados en Hibridación

Xf 413

Cualquiera de un número de análisis basados en hibridación puede usarse para detectar el gen Akt3 o el número de copias de genes Akt3 en las células de una muestra biológica. Un método tal es el *Southern blot*. En un *Southern blot*, ADN genómico se fragmenta típicamente, se separa electroforéticamente, se transfiere a una membrana y, posteriormente, se hibrida a una sonda específica de Akt3. Para la determinación del número de copias, la comparación de la intensidad de la señal de hibridación de la sonda para la región de interés con una señal de una sonda de control para una región de ADN genómico normal (por ejemplo, una porción no amplificada de la misma o una célula relacionada, tejido, órgano, y similares) provee un estimativo del número de copias relativo de Akt3. El análisis Southern blot es bien conocida en el arte y se describe, por ejemplo, en Ausubel et al., o Sambrook et al., supra.

Un medio alternativo para determinar el número de copias de genes Akt3 en una muestra es mediante hibridación *in situ*, por ejemplo, hibridación *in situ* con fluorescencia, o FISH. Los análisis de hibridación *in situ* son bien conocidos (por ejemplo, Angerer, 1987, Meth. Enzymol 152:649). Generalmente, la hibridación *in situ* comprende los siguientes pasos principales: (1) fijación de tejido o estructura biológica a analizarse; (2) tratamiento de prehibridación de la estructura biológica para aumentar la accesibilidad del ADN de interés, y para reducir la unión no específica; (3) hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos al ácido nucleico en la estructura biológica o tejido; (4) lavados pos-hibridación para eliminar fragmentos de ácidos nucleicos no unidos en la hibridación; y (5) detección de los fragmentos de ácidos nucleicos hibridados.

Típicamente, las ondas utilizadas en tales aplicaciones se marcan, por ejemplo, con radioisótopos o reporteros fluorescentes. Sondas preferidas son suficientemente largas, por ejemplo, desde alrededor de 50, 100, o 200 nucleótidos a alrededor de 1.000 o más nucleótidos, de manera

27 414

que hibriden específicamente con el ácido(s) nucleico de interés bajo condiciones rigurosas.

La presente invención contempla métodos de "sonda comparativa", tales como hibridación genómica comparativa (CGH), que se usan para detectar amplificación del gen Akt3. En métodos de hibridación genómica comparativa, una colección de "prueba" de ácidos nucleicos se marca con un primer marcador, mientras que una segunda colección (por ejemplo, de una célula sana o tejido) se marca con un segundo marcador. La proporción de hibridación de los ácidos nucleicos se determina por la proporción de la unión de los marcadores primero y segundo a cada fibra en el arreglo. Se detectan las diferencias en la proporción de las señales de los dos marcadores, por ejemplo, debidas a la amplificación de los genes en la colección de prueba, y la proporción ofrece una medida del número de copias del gen Akt3.

Protocolos de hibridación apropiados para uso con los métodos de la invención se describen, por ejemplo, en Albertson, 1984, EMBO J. 3:1227-1234; Pinkel, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142; EPO Pub. No. 430, 402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Choo, Ed., 1994, Humana Press, Totowa, N.J., y similares.

b) Análisis Basados en Amplificación

En otra incorporación, análisis basados en amplificación se usan para detectar Akt3 o para medir el número de copias de genes Akt3. En tales análisis, las secuencias de ácidos nucleicos Akt3 actúan como una plantilla en una reacción de amplificación (por ejemplo, Reacción en Cadena de Polimerasa, o PCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad del producto de amplificación será proporcional a la cantidad de plantilla en la muestra original. La comparación con controles apropiados

415

ofrece una medida del número de copias del gen Akt3. Métodos de amplificación cuantitativa son bien conocidos por las personas expertas en el arte. Protocolos detallados para PCR cuantitativa PCR se proveen, por ejemplo, en Innis et al., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.). La secuencia de ácidos nucleicos para Akt3 es suficiente para permitir a alguien experto seleccionar rutinariamente para amplificar cualquier porción del gen.

En algunas incorporaciones, un análisis basado en TaqMan se emplea para cuantificar polinucleótidos Akt3. Análisis basados en TaqMan utilizan un oligonucleótido fluorogénico que contiene un tinte fluorescente 5' y un agente extinguidor 3'. La sonda se hibrida a un producto PCR, pero no puede ampliarse ella misma debido a un agente bloqueador en el extremo 3'. Cuando el producto PCR se amplifica en ciclos subsiguientes, la actividad nucleasa 5' de la polimerasa, por ejemplo, AmpliTaq, resulta en la segmentación de la sonda TaqMan. Esta segmentación separa el tinte fluorescente 5' y el agente extinguidor 3', traduciendo así en un incremento en la fluorescencia como una función de la amplificación (véase, por ejemplo, la literatura provista por Perkin-Elmer, por ejemplo, www.perkin-elmer.com).

Otros métodos apropiados de amplificación, que se contemplan por la invención, incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace, 1989, Genomics 4:560, Landegren et al., 1988, Science 241:1077, y Barringer et al., 1990, Gene 89:117), amplificación de transcripción (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173), replicación de secuencia auto-sostenida (Guatelli et al., 1990, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:1874), dot PCR, y PCR de adaptador enlazante PCR, etc.

2. Detección de Expresión de Akt3 y/o B-Raf

a) Análisis Basados en Hibridación Directa

Métodos de detectar y/o cuantificar el nivel transcritos del gen Akt3 y/o B-Raf (ARNm o ADNc elaborados de ellos) usando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en el arte (véase, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2D Ed., Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, NewYork).

Por ejemplo, un método para evaluar la presencia, ausencia, o cantidad de ADNc Akt3 involucra un análisis *Northern blot*. En síntesis, en una incorporación típica, ARNm se aísla de una muestra biológica dada, sometida a electroforesis para separar la especie ARNm, y se transfiere del gel a una membrana de nitrocelulosa. Sondas marcadas de Akt3 se hibridan entonces a la membrana para identificar y/o cuantificar el ARNm.

b) Análisis Basados en Amplificación

En otra incorporación, un transcrito de Akt3 y/o B-Raf (por ejemplo, ARNm Akt3) se detecta usando métodos basados en amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Métodos RT-PCR son bien conocidos por lo expertos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., supra). Preferiblemente, se utiliza RT-PCR cuantitativa, permitiendo así la comparación del nivel de ARNm en una muestra con una muestra de control o valor.

3. Detección de la Expresión de Polipéptido Akt3 y/o B-Raf

Además de la detección de genes Akt3 y/o B-Raf y la expresión de genes usando tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, pueden detectarse y/o cuantificarse niveles de Akt3 y/o B-Raf detectando o cuantificando el polipéptido. Los polipéptidos Akt3 o B-Raf se detectan y cuantifican por cualquiera de un número de medios bien conocidos por los expertos en el arte. Tales medios incluyen métodos bioquímicos analíticos tales como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos

de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, y similares, o varios métodos inmunológicos tales como reacción de precipitación en líquido o gel, inmunodifusión (simple o doble), inmunolectroforesis, radioinmunoanálisis (RIA), inmunoanálisis ligados a enzimas (ELISAs), análisis inmunofluorescentes, análisis *Western blotting*, y similares. La detección de polipéptidos Akt3 se discute más adelante.

C. Expresión Procariotas y Eucariotas

En algunas incorporaciones, es deseable producir polipéptidos Akt3 y/o B-Raf usando tecnología recombinante. Para obtener expresión de alto nivel de un gen clonado o ácido nucleico, tal como un ADNc que codifica un polipéptido Akt3 o B-Raf, una secuencia Akt3 o B-Raf se subclona típicamente en un vector de expresión, que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción y, si para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión a ribosoma para iniciación traduccional. Promotores bacterianos apropiados son bien conocidos en el arte y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. y Ausubel et al. Sistemas de expresión bacteriana para expresar la proteína Akt3 se encuentran disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus* sp., y *Salmonella* (Palva et al., 1983, *Gene* 22:229-235; Mosbach et al., 1983, *Nature* 302:543-545. En el comercio se encuentran disponibles kits para tales sistemas de expresión. Sistemas de expresión eucariótica para células mamíferas, levadura, y células de insectos son bien conocidos en el arte y se encuentran también disponibles en el comercio. En una incorporación, el vector de expresión eucariótica es un vector adenovírico, un vector adeno-asociado, o un vector retrovírico.

Para aplicaciones terapéuticas, ácidos nucleicos Akt3 y/o B-Raf se introducen en una células, *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*, usando cualquiera de

~~40~~ 418

un gran número de métodos incluidos, pero no limitados a, infección con vectores víricos, métodos basados en liposomas, aceleración biolística de partículas (el acelerador de partículas - "*gene gun*"), e inyección de ADN purificado. Tales ácidos nucleicos terapéuticamente útiles incluyen, pero no se limitan a, secuencias codificadoras para Akt3 o B-Raf de longitud total, secuencias codificadoras para un fragmento de Akt3 o B-Raf, dominio, derivado, o variante, secuencias complementarias Akt3 o B-Raf, secuencias de ARNip Akt3 o B-Raf, y ribozimas de Akt3 o B-Raf. Típicamente, tales secuencias se ligarán operacionalmente a un promotor, pero en numerosas aplicaciones un ácido nucleico se administrarán a una célula que es, en sí misma, directamente terapéuticamente efectiva, por ejemplo, ciertas moléculas no codificantes, de ARNip, o de ribozima.

El promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. El promotor se ubica opcionalmente alrededor de la misma distancia del sitio de iniciación de transcripción heteróloga, tal como está a partir del sitio de iniciación de transcripción en su escenario natural. Como se sabe en el arte, sin embargo, cierta variación en esta distancia puede acomodarse sin pérdida de la función promotora.

Aparte del promotor, el vector de expresión contiene típicamente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico que codifica Akt3 o que codifican B-Raf en células hospedadoras. Un casete de expresión típico contiene por lo tanto un promotor operacionalmente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido Akt3 o B-Raf, y señales requeridas para una poliadenilación eficiente del transcrito, sitios de unión a ribosomas, y terminación de la traducción. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido Akt3 o B-Raf puede ligarse a una secuencia de péptidos de señal segmentable para promover la

secreción de la proteína codificada por la célula transfectada. Elementos adicionales del casete pueden incluir potenciadores y, si se usa ADN genómico con el gen estructural, intrones con sitios funcionales de empalme donante y receptor.

Además de una secuencia promotora, el casete de expresión debe contener igualmente una región de terminación de transcripción corriente abajo del gen estructural para posibilitar una terminación eficiente. La región de terminación puede obtenerse del mismo gen como la secuencia promotora o puede obtenerse de diferentes genes.

El vector de expresión particular utilizado para transportar la información genética a la célula no es particularmente crítica. Puede utilizarse cualquiera de los vectores convencionales usados para expresión en células eucariotas o procariotas. Factores de expresión útiles, por ejemplo, pueden constar de segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético.

Vectores apropiados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, plásmidos de *E. coli* col E1, pCRI, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith et al., 1988, *Gene* 67:31-40), pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados de fago 1, por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentosos; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2m o sus derivados; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de expresión; y similares. Por ejemplo, vectores de expresión mamíferos contemplados para uso en la invención incluyen vectores con promotores inducibles, tales como el promotor dihidrofolato reductasa (DHFR), por ejemplo, cualquier vector de expresión

b2 420

con un vector de expresión DHFR, o un vector de co-amplificación DHFR/metotrexato, tales como pED (sitio de clonación PstI, SalI, SbaI, SmaI, y EcoRI, con el vector que expresa al gen clonado y al DHFR; véase Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16.12 (1991). Alternativamente, un vector de co-amplificación glutamina sintetasa/metionina sulfoximina, tal como pEE14 (sitio de clonación HindIII, XbaI, SmaI, SbaI, EcoRI, y BclI, en los cuales el vector expresa glutamina sintasa y el gen clonado; Celltech). En otra incorporación, puede usarse un vector que dirige la expresión episómica bajo control del Virus de Epstein Barr (EBV), tal como pREP4 (sitio de clonación BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, y KpnI, promotor constitutivo de Repetición de Terminal Largo del Sarcoma de Rous (RSV-LTR), marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pCEP4 (sitio de clonación BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, y KpnI, gen precoz inmediato constitutivo del citomegalovirus humano (hCMV), marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pMEP4 (sitio de clonación KpnI, PvuI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, BamHI, promotor inducible del gen de metalotioneína IIa, marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pREP8 (sitio de clonación BamHI, XhoI, NotI, HindIII, NheI, y KpnI, promotor RSV-LTR, marcador seleccionable de histidinol; Invitrogen), pREP9 (sitio de clonación KpnI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, y BamHI, promotor RSV-LTR, marcador seleccionable G418; Invitrogen), y pEBVHis (promotor RSV-LTR, marcador seleccionable de higromicina, péptido N-terminal purificable mediante resina ProBond y segmentado mediante enterocinasa; Invitrogen). Vectores seleccionables de expresión mamífera para uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, pRc/CMV (sitio de clonación HincII, BstXI, NotI, SbaI, y ApaI, selección de G418; Invitrogen), sitio de clonación pRc/RSV HindIII, SpeI, BstXI, NotI, XbaI, selección G418; Invitrogen), y otros. Vectores de expresión mamífera del

b5 421

virus de la vacuna (véase, Kaufman, 1991, supra) contemplados por esta invención incluyen pero no se limitan a pSC11 (sitio de clonación SmaI, selección TK-y.beta-gal selection), pMJ601 (sitio de clonación Sall, SmaI, AflI, NarI, BspMII, BamHI, ApaI, NheI, SacII, KpnI, y HindIII; selección TK-y beta (β)-gal), y pTKgptF1S (sitio de clonación EcoRI, PstI, SalI, AccI, HindII, SbaI, BamHII, y Hpa, selección TK o XPRT).

Los elementos que se incluyen típicamente en vectores de expresión comprenden además un replicón que funciona en in E. coli, un gen que codifica la resistencia a los antibióticos para permitir la selección de bacterias que albergan plásmidos recombinantes, y sitios de rigurosidad únicos en regiones no esenciales del plásmido para posibilitar la inserción de secuencias eucariotas. El gen particular de la resistencia a los antibióticos elegido no es crítico; cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en el arte es apropiado. Las secuencias procariotas se seleccionan opcionalmente de modo que no interfieran la replicación del ADN en células eucariotas, si es necesario.

Una vez identificada y aislada una molécula de ADN recombinante particular, pueden usarse varios métodos conocidos en el arte para propagarla. Una vez establecidos un sistema anfitrión apropiado y condiciones de crecimiento, pueden propagarse y prepararse en cantidad vectores de expresión recombinantes. Los vectores de expresión que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, los siguientes vectores o sus derivados: virus humanos o animales tales como el virus de la vacuna o adenovirus; virus de insecto tales como baculovirus; vectores de levadura; vectores de bacteriófago (por ejemplo, lambda), y vectores de ADN de plásmido y cósmido, para sólo mencionar unos cuantos y que son conocidos por los expertos en el arte.

Adicionalmente, puede seleccionarse una cepa de células hospedadoras, que module la expresión de las secuencias insertadas, o

62 422

modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Diferentes células hospedadoras poseen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento traduccional y pos-traduccional y modificación de proteínas. Estirpes celulares apropiadas o sistemas anfitriones pueden seleccionarse para garantizar la modificación y procesamiento deseados de la proteína extraña expresada. La expresión en levadura puede producir un producto biológicamente activo. La expresión de células eucariotas puede aumentar la probabilidad de plegamiento "nativo". Más aún, la expresión en células mamíferas puede proporcionar una herramienta para reconstituir, o constituir, la actividad Akt3 y/o B-Raf en melanoma. Adicionalmente, diferentes sistemas de expresión vector/anfitrión pueden afectar las reacciones de procesamiento, tales como segmentaciones proteolíticas, en una medida diferente.

Métodos de transfección estándar se usan para producir estirpes celulares bacterianas, mamíferas, de levadura o insecto que expresan grandes cantidades de proteína Akt3 o B-Raf, las cuales se purifican luego utilizando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Colley et al., 1989, J. Biol. Chem. 264:17619-17622; "Guide to Protein Purification", in Methods in Enzymology, Vol. 182, 1990 (Deutscher, Ed.). La transformación de células eucariotas y procariotas se lleva a cabo de acuerdo con técnicas estándar (véase, por ejemplo, Morrison, 1977, J. Bact. 132:349-351; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362, 1983 (Wu et al., eds.).

Puede emplearse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en las células. Éstos incluyen el uso de reactivos tales como Superfect (Qiagen), liposomas, transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección, vectores de plásmido, vectores víricos, aceleración de partículas biolística (acelerador de partículas), o cualquiera

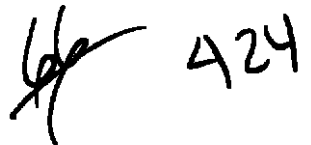
6f 423

de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño en una célula hospedadora (véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra).

Una vez introducido el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan bajo condiciones que favorezcan la expresión del polipéptido Akt3 y/o B-Raf, que se recupera del cultivo usando técnicas estándar identificadas más adelante. Métodos de cultivar células procariotas o eucariotas son bien conocidas y se enseñan, por ejemplo, en Ausubel et al., Sambrook et al., y en Freshney, 1993, Culture of Animal Cells, 3. sup.rd. Ed., A Wiley-Liss Publication.

Cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en células hospedadoras pueden usarse para introducir un vector, por ejemplo, un vector de reconocimiento, en las células. Tal como se contempla más adelante, ácidos nucleicos de esta invención pueden introducirse en las células mediante cualquier mecanismo de transferencia de genes, tal como, por ejemplo, transferencia de genes mediada por virus, transferencia de genes mediada por fosfato de calcio, electroporación, microinyección o proteoliposomas. Las células transducidas pueden infundirse luego (por ejemplo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable) o retransplantarse homotópicamente en el sujeto por métodos estándar para la célula o tipo de tejido. Se conocen métodos estándar para trasplante o infusión de varias células en un sujeto.

La transferencia del ácido nucleico o vector a células puede realizarse mediante una variedad de mecanismos. Como un ejemplo, la transferencia puede ser a través de un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles en el comercio tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, Md.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis.), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con



procedimientos estándar en el arte. Adicionalmente, el ácido nucleico o vector de esta invención puede transferirse *in vivo* mediante electroporación, cuya tecnología se puede obtener de Genetronics, Inc. (San Diego, Calif.) así como mediante una máquina SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Ariz.).

Como un ejemplo, la transferencia del vector puede ser a través de un sistema vírico, tales como un sistema de vector retrovírico que pueden empacar un genoma recombinante (véase, por ejemplo, 62, 63). El retrovirus recombinante puede usarse luego para infectar y, así, transferir ácidos nucleicos a las células infectadas. El método exacto de introducir el ácido nucleico en células mamarias, naturalmente, no se limita al uso de vectores retrovíricos. Otras técnicas se encuentran ampliamente disponibles para este procedimiento, incluido el uso de vectores adenovíricos, vectores víricos adeno-asociados (AAV), vectores lentivíricos, vectores retrovíricos pseudotipificados. Pueden emplearse asimismo técnicas de transducción física, tal como transferencia de liposomas y otros mecanismos de endocitosis y mediados por receptores. Esta invención puede utilizarse en conjunción con cualquiera de éstos u otros métodos de transferencia de genes usados comúnmente.

Inducción de Apoptosis en una Célula Cancerosa Reduciendo los Niveles de Actividad de Akt3

En una incorporación, esta invención provee métodos de inducir apoptosis en una célula tumoral cancerosa contactando una célula con un agente que reduce la actividad Akt3. En una incorporación preferida, el agente es una molécula de ARNip. Un polinucleótido de ARNip es una molécula de ácido nucleico de ARN que media el efecto de la interferencia del ARN, a un mecanismo de silenciamiento génico pos-transcripcional. Un polinucleótido ARNip comprende preferiblemente un ARN bicatenario

(ARNbc) pero no pretende limitarse a él y puede comprender uno monocatenario (véase, por ejemplo, Martinez et al. Cell 110:563-74(2002)). Un polinucleótido de ARNip puede comprender otros polímeros monocatenarios o bicatenarios sintéticos, recombinantes o de ocurrencia natural, de nucleótidos (ribonucleótidos o deoxiribonucleótidos o una combinación de los dos) y/o análogos de nucleótidos, como se contempla aquí (por ejemplo, un oligonucleótido o polinucleótido o similares, típicamente en el ligamiento fosfodiéster 5' a 3'). Por consiguiente, se observará que ciertas secuencias ejemplares, divulgadas aquí como secuencias de ADN capaces de dirigir la transcripción de una incorporación de los polinucleótidos ARNip de la presente invención, tienen además como finalidad describir las secuencias correspondientes de ARN y sus complementos, dados los principios bien establecidos de apareamiento de bases de nucleótidos complementarios. Un ARNip puede transcribirse usando como plantilla un ADN (genómico, ADNc, o sintético) que contiene promotor de ARN polimerasa, por ejemplo, un promotor U6 o el promotor de H1 ARN polimerasa III, o el ARNip puede ser una molécula de ARN sintéticamente derivada. En ciertas incorporaciones el polinucleótido ARNip de la presente invención puede tener extremos romos, es decir, cada nucleótido en una hebra del bicatenario es perfectamente complementaria (por ejemplo, mediante apareamiento de bases de Watson-Crick) con un nucleótido de la hebra opuesta. En algunas otras incorporaciones, por lo menos una hebra del polinucleótido de ARNip de la presente invención tiene por lo menos uno y, preferiblemente, dos nucleótidos que "sobresalen" (es decir, que no se aparean con una base complementaria en una hebra opuesta) en el extremo 3' de una cualquiera de las hebras o, preferiblemente, las dos hebras, del polinucleótido de ARNip. En algunas otras incorporaciones de la invención, cada hebra del duplo de polinucleótido de ARNip tiene una saliente de dos nucleótidos en el extremo 3'. La saliente

68 426

de dos nucleótidos es preferiblemente un dinucleótido de timidina (TT), pero puede comprender igualmente otras bases, por ejemplo, un dinucleótido TC o un dinucleótido TG, o cualquier otro dinucleótido. Para una discusión de los extremos 3' de polinucleótidos de ARNip véase, por ejemplo, WO 01/75164.

Polinucleótidos de ARNip preferidos comprenden nucleótidos oligoméricos bicatenarios de alrededor de 18-30 pares de bases de nucleótidos, preferiblemente alrededor de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ó 27 pares de bases, y en otras incorporaciones preferidas alrededor de 19, 20, 21, 22 ó 23 pares de bases, o alrededor de 27 pares de bases, con lo cual el uso de "alrededor de" indica, como ya se describió, que en ciertas incorporaciones y bajo ciertas condiciones los pasos de segmentación progresivos que pueden dar origen a polinucleótidos de ARNip funcional, capaces de interferir la expresión de un polipéptido seleccionado, pueden no ser absolutamente eficiente. Por lo tanto, polinucleótidos de ARNip, por ejemplo, de "alrededor de" 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ó 25 pares de bases pueden incluir una o más moléculas de polinucleótidos de ARNip que pueden diferir (por ejemplo, por inserción o eliminación de nucleótidos) en longitud en uno, dos, tres o cuatro pares de bases, a modo de teoría no limitante como consecuencia de la variabilidad en procesamiento, en biosíntesis, o en síntesis artificial. Los polinucleótidos de ARNip contemplados de la presente invención pueden comprender también una secuencia de polinucleótidos que exhibe variabilidad difiriendo (por ejemplo, por sustitución de nucleótidos, incluidas transición o transversión) en uno, dos, tres o cuatro nucleótidos de una secuencia particular, ocurriendo las diferencias en cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, ó 19 de una secuencia de polinucleótidos de ARNip particular, o en las posiciones 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ó 27 de polinucleótidos de ARNip dependiendo de la longitud de la

68 427

molécula, situadas en una hebra codificante ("*a sense strand*") o en una hebra complementaria del polinucleótido bicatenario. La sustitución de nucleótidos puede hallarse únicamente en una hebra, a modo de ejemplo en la hebra complementaria, de un polinucleótido bicatenario, y el nucleótido complementario con el cual el nucleótido sustituto formaría típicamente apareamiento de bases de enlaces hidrógeno puede no sustituirse necesariamente en forma correspondiente en la hebra codificante. En incorporaciones preferidas, los polinucleótidos de ARNip son homogéneos con respecto a una secuencia de nucleótidos específicos. Como se describe aquí, polinucleótidos de ARNip preferidos interfieren la expresión del polipéptido Akt3 de la invención. Estos polinucleótidos pueden encontrar también uso como sondas o cebadores.

Polinucleótidos que son polinucleótidos de ARNip de la presente invención pueden, en ciertas incorporaciones, derivarse de un polinucleótido monocatenario que comprende un fragmento de oligonucleótido monocatenario (por ejemplo, de alrededor de 18-30 nucleótidos, que debería entenderse que incluyen cualquier número entero de nucleótidos incluidos y entre 18 y 30) y su complemento inverso, separados típicamente por una secuencia espaciadora. De acuerdo con ciertas incorporaciones, la segmentación del espaciador provee el fragmento de oligonucleótido monocatenario y su complemento inverso, de modo que se puedan hibridar para formar (opcionalmente con pasos adicionales de procesamiento que pueden resultar en la adición o retiro de uno, dos, tres o más nucleótidos del extremo 3' y/o el extremo 5' de una cualquiera o ambas hebras) el polinucleótido de ARNip bicatenario de la presente invención. En ciertas incorporaciones el espaciador es de una longitud que permite que el fragmento y su complemento inverso hibriden y formen una estructura bicatenaria (por ejemplo, como un polinucleótido de horquilla) antes de la segmentación del espaciador (y, opcionalmente, pasos de procesamiento

428

subsiguientes que pueden resultar en la adición o retiro de uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos del extremo 3' y/o el extremo 5' de una cualquiera o ambas hebras). Por lo tanto, una secuencia espaciadora puede ser cualquier secuencia de polinucleótidos como se contempla aquí, que se sitúa entre dos regiones de secuencias de polinucleótidos complementarias que, cuando se hibridan en un ácido nucleico bicatenario, comprenden un polinucleótido de ARNip. Preferiblemente una secuencia espaciadora comprende por lo menos 4 nucleótidos, aunque en ciertas incorporaciones el espaciador puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-25, 26-30, 31-40, 41-50, 51-70, 71-90, 91-110, 111-150, 151-200 o más nucleótidos. Se han descrito ejemplos de polinucleótidos de ARNip derivados de una cadena única de nucleótido que comprende dos secuencias de nucleótidos complementarias separadas por un espaciador (por ejemplo, Brummelkamp et al., 2002 Science 296:550; Paddison et al., 2002 Genes Develop. 16:948; Paul et al. Nat. Biotechnol. 20:505-508 (2002); Grabarek et al., BioTechniques 34:734-44 (2003)).

Variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones, y/o inserciones de modo que la actividad del polinucleótido de ARNip no se disminuya sustancialmente, como ya se describió. El efecto sobre la actividad del polinucleótido de ARNip puede evaluarse generalmente como se describe aquí o usando métodos convencionales. Las variantes exhiben preferiblemente por lo menos alrededor de 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88% o 89% de identidad y, más preferiblemente, por lo menos alrededor de 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una porción de una secuencia de polinucleótidos que codifica Akt3 nativo. La identidad porcentual puede determinarse fácilmente comparando secuencias de los polinucleótidos con la porción correspondiente de un polinucleótido de Akt3 de longitud completa, tales como las conocidas en el arte y citadas aquí, usando un

X 429

método que incluye emplear algoritmos de computación bien conocidos por aquellas personas de habilidad ordinaria en el arte, tales como el algoritmo Align o BLAST (Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992), disponible en el sitio en la red del NCBI (véase [en línea] Internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). Pueden utilizarse parámetros predeterminados.

Ciertas variantes de polinucleótido de ARNip son sustancialmente homólogas a una porción del gen PTP1B nativo. Ácidos nucleicos monocatenarios derivados (por ejemplo, por desnaturalización térmica) de tales variantes de polinucleótido son capaces de hibridarse, bajo condiciones de rigurosidad moderada, a una secuencia de ADN o ARN de ocurrencia natural, que codifica un polipéptido de Akt3 nativo (o una secuencia complementaria). Un polinucleótido que se hibrida detectablemente bajo condiciones de rigurosidad moderada puede tener una secuencia de nucleótidos que incluye por lo menos 10 nucleótidos consecutivos, más preferiblemente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos consecutivos complementarios a un polinucleótido particular. En ciertas incorporaciones preferidas tal secuencia (o su complemento) será única a un polipéptido de Akt para el cual se desea interferencia de la expresión, y en ciertas otras incorporaciones la secuencia (o su complemento) puede ser compartida por Akt3 y una o más isoformas de Akt, para las cuales se desea interferencia de la expresión del polipéptido. En ciertas incorporaciones preferidas tal secuencia (o su complemento) puede ser única a un polipéptido de B-Raf para el cual se desea interferencia de la expresión, y en ciertas otras incorporaciones la secuencia (o su complemento) puede ser compartida por B-Raf o una o más isoformas de Raf para las cuales se desea interferencia de la expresión del polipéptido.

Condiciones apropiadas de rigurosidad moderada incluyen, por ejemplo, pre-lavar en una solución de 5x SSC, 0.5% SDS, 1.0 Mm EDTA (pH 8.0); hibridar a 50°C-70°C, 5x SSC durante 1-16 horas (por ejemplo, de un día para otro); seguido por el lavado una vez o dos veces a 22-65°C durante 20-40 minutos con uno o más de cada uno de 2x, 0.5x y 0.2x SSC que contiene 0.05-0.1% SDS. Para rigurosidad adicional, las condiciones pueden incluir un lavado en 0.1x SSC y 0.1% SDS a 50-60 C durante 15-40 minutos. Como lo saben las personas de habilidad ordinaria en el arte, variaciones en las condiciones de hibridación o rigurosidad pueden lograrse alterando el tiempo, la temperatura, y/o concentración de las soluciones usadas para la pre-hibridación, hibridación, y pasos de lavado. Condiciones apropiadas pueden depender asimismo, en parte, de las secuencias de nucleótidos particulares de la sonda utilizada, y de la muestra de ácido nucleico *probando* transferida. En consecuencia, se observará que condiciones de rigurosidad apropiada pueden seleccionarse fácilmente sin experimentación excesiva cuando se identifica una selectividad deseada de la sonda, basándose en su capacidad de hibridarse a una o más de ciertas secuencias *probando*, no hibridándose a ciertas otras secuencias *probando*.

Polinucleótidos ARNip específicos de secuencia de la presente invención pueden diseñarse usando uno o más de varios criterios. Por ejemplo, para diseñar un polinucleótido ARNip que tenga 19 nucleótidos consecutivos idénticos a una secuencia que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, Akt3 y otros polipéptidos descritos aquí), el marco de lectura abierto de la secuencia de polinucleótidos puede explorarse para detectar secuencias de 21 bases que posean una o más de las siguientes características: (1) una proporción A+T/G+C de aproximadamente 1:1 pero no superior a 2:1 ó 1:2; (2) un dinucleótido AA o un dinucleótido CA en el extremo 5'; (3) un temperatura interna de fusión del bucle de horquilla de menos de 55°C; (4) una temperatura de fusión de homodímero de menos de

X7 431

37°C (cálculos de temperatura de fusión como los descritos en (3) y (4) pueden determinarse usando software de computador conocida por los expertos en el arte); (5) una secuencia de por lo menos 16 nucleótidos consecutivos no identificados como presentes en cualquiera otra secuencia de polinucleótidos conocida (tal evaluación puede determinarse fácilmente usando programas de computador al alcance de un experto, tal como BLAST para explorar bases de datos a disposición del público). Alternativamente, una secuencia de polinucleótidos ARNip puede diseñarse y seleccionarse usando un software de computador obtenible en el comercio de varios proveedores (por ejemplo, OligoEngine.TM. (Seattle, Wash.); Dharmacon, Inc. (Lafayette, Colo.); Ambion Inc. (Austin, Tex.); y QIAGEN, Inc. (Valencia, Calif.)). (Véase asimismo Elbashir et al, Genes & Development 15:188-200 (2000); Elbashir et al., Nature 411:494-98 (2001); y [en línea] Internet: URL<[http://www.mp-ibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/Tuschl_MIV2\(3\).sub.-2002.pdf](http://www.mp-ibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/Tuschl_MIV2(3).sub.-2002.pdf).) Los polinucleótidos ARNip pueden analizarse entonces con respecto a su capacidad de interferir la expresión del polipéptido asignado de acuerdo con métodos conocidos en el arte y descritos aquí. La determinación de la efectividad de un polinucleótido ARNip incluye no sólo la consideración de su capacidad de interferir la expresión del polipéptido, sino además la consideración de si el polinucleótido ARNip manifiesta o no efectos tóxicos indeseables, por ejemplo, apoptosis de una célula, célula para la cual la muerte no es un efecto deseado del la interferencia del ARN (por ejemplo, interferencia de la expresión de Akt3 en una célula).

Personas de habilidad ordinaria en el arte observarán además fácilmente que, como resultado, de la degeneración del código genético, muchas secuencias de nucleótidos pueden codificar un polipéptido, tal como se describe aquí. Es decir, un aminoácido puede codificarse por uno de varios codones diferentes, y una persona experta en el arte puede

432

determinar con facilidad que aunque una secuencia de nucleótidos particular puede diferir de otra (lo cual puede determinarse por métodos de alineación divulgados aquí y conocidos en el arte), las secuencias pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos idénticas. A modo de ejemplo, el aminoácido leucina en un polipéptido puede codificarse por uno de seis diferentes codones (TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, y CTG) como puede la serina (TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, y AGC). Otros aminoácidos, tales como prolina, alanina, y valina, por ejemplo, pueden codificarse por uno de cuatro codones diferentes (CCT, CCC, CCA, CCG para prolina; GCT, GCC, GCA, GCG para alanina; y GTT, GTC, GTA, GTG para valina). Algunos de estos polinucleótidos tienen homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente por la presente invención.

Polinucleótidos, incluidos polinucleótidos asignados (por ejemplo, polinucleótidos capaces de codificar un polipéptido asignado de interés), pueden prepararse usando cualquiera de una variedad de técnicas, que serán útiles para la preparación de polinucleótidos de ARNip específicamente deseados y para la identificación y selección de secuencias deseables a usarse en polinucleótidos de ARNip. Por ejemplo, un polinucleótido puede amplificarse de ADNc preparado de una célula apropiada o tipo de tejido. Tales polinucleótidos pueden amplificarse mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). Para este método, cebadores específicos de secuencia pueden diseñarse con base en las secuencias contempladas aquí y pueden adquirirse o sintetizarse. Una porción amplificada puede usarse para aislar un gen de longitud completa, o una porción deseada del mismo, de una biblioteca apropiada (por ejemplo, ADNc de melanoma humano) empleando técnicas bien conocidas. Dentro de tales técnicas, se criba una biblioteca (ADNc o genómico) utilizando una o más sondas de

X 933

polinucleótidos o cebadores apropiados para amplificación. Preferiblemente, se selecciona por tamaño una biblioteca para incluir moléculas más grandes. Pueden preferirse asimismo bibliotecas cebadas aleatoriamente para identificar regiones 5' y corriente arriba de genes. Se prefieren genotecas de ADNg para obtener intrones y secuencias 5' de extensión. Secuencias apropiadas para un polinucleótido de ARNip contempladas por la presente invención pueden seleccionarse igualmente de una biblioteca de secuencias de polinucleótidos de ARNip.

Para técnicas de hibridación, una secuencia parcial puede marcarse (por ejemplo, por traducción de pequeños cortes ("*nick-translation*") o marcación de extremos con ^{32}P) usando técnicas conocidas. A continuación puede cribarse una biblioteca de bacterias o bacteriófagos mediante filtros de hibridación que contengan colonias bacterianas desnaturalizadas (o capas sobrenadantes ("*lawns*") que contienen placas de fagos) con la sonda marcada (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Colonias hibridadoras o placas se seleccionan y se amplían, y se aísla el ADN para análisis posterior. Los clones pueden analizarse para determinar la cantidad de secuencia adicional mediante, por ejemplo, PCR usando un cebador de la secuencia parcial y un cebador del vector. Pueden generarse mapas de restricción y secuencias parciales para identificar uno o más clones solapantes. Una molécula de ADNc de longitud completa puede generarse ligando fragmentos apropiados, usando técnicas bien conocidas.

Alternativamente, en el arte se conocen numerosas técnicas de amplificación para obtener una secuencia codificante de longitud completa de una secuencia de ADNc parcial. Dentro de tales técnicas, la amplificación se realiza generalmente mediante PCR. Una técnica tal se conoce como "amplificación rápida de extremos de ADNc" o RACE. Esta técnica implica el uso de un cebador interno y un cebador externo, que se

hibrida a una región poliA o secuencia vector, para identificar secuencias que son 5' y 3' de una secuencia conocida. Cualquiera de una variedad de kits disponibles en el comercio puede utilizarse para llevar a cabo el paso de amplificación. Pueden diseñarse cebadores usando, por ejemplo, software bien conocido en el arte. Cebadores (u oligonucleótidos para otros usos contemplados aquí, incluidos, por ejemplo, sondas y oligonucleótidos complementarios) son preferiblemente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ó 32 nucleótidos de longitud, tienen un contenido GC de por lo menos 40% e hibridan a la secuencia designada a temperaturas de alrededor de 54°C a 72°C. La región amplificada puede secuenciarse como se describe anteriormente, y secuencias solapantes ensambladas en una secuencia contigua. Ciertos oligonucleótidos contemplados por la presente invención, para algunas incorporaciones preferidas, tienen longitudes de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33-35, 35-40, 41-45, 46-50, 56-60, 61-70, 71-80, 81-90 o más nucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos como se describen aquí pueden unirse a una variedad de otras secuencias de nucleótidos usando técnicas establecidas de ADN recombinante. Por ejemplo, un polinucleótido puede clonarse en cualquiera de una variedad de vectores de clonación, incluidos plásmidos, fagómidos, derivado de fago lambda, y cósmidos. Vectores de interés particular incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sonda, y vectores de secuenciación. En general, un vector apropiado contiene un origen de replicación en por lo menos un organismo, sitios convenientes de endonucleasa de restricción, y uno o más marcadores seleccionables. (Véase, por ejemplo, WO 01/96584; WO01/29058; Patente de los Estados Unidos No. 6, 326, 193; U.S. 2002/0007051).

435

Otros elementos dependerán del uso deseado, y serán evidentes a aquellas personas de habilidad ordinaria en el arte. Por ejemplo, la invención contempla el uso de secuencias de polinucleótido de ARNip en la preparación de constructos de ácido nucleico recombinante incluidos vectores para interferir la expresión de un polipéptido designado deseado tal como un polipéptido Akt3 o B-Raf *in vivo*; la invención contempla además la generación ARNip transgénico o animales y células "inactivadas" (por ejemplo, células, clones de células, estirpes o linajes, u organismos en los cuales la expresión de uno o más polipéptidos deseados (por ejemplo, un polipéptido designado) se encuentra comprometido completa o parcialmente). Un polinucleótido de ARNip que es capaz de interferir la expresión de un polipéptido deseado (por ejemplo, un polipéptido designado), como se contempla aquí, incluye por lo tanto cualquier polinucleótido de ARNip que, cuando se pone en contacto con un sujeto o fuente biológica, como se contempla aquí, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para que tenga lugar la expresión del polipéptido designado en la ausencia del polinucleótido de ARNip, resulta en una disminución estadísticamente significativa (alternativamente designada como "inactivación" de la expresión) en el nivel de expresión del polipéptido deseado que puede detectarse. Preferiblemente la disminución es mayor del 10%, más preferiblemente, mayor del 20%, más preferiblemente, mayor del 30%, más preferiblemente, mayor del 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% en relación con el nivel de expresión en el polipéptido detectada en la ausencia del ARNip, usando métodos convencionales para determinar la expresión del polipéptido, como se conocen en el arte y contemplados aquí. Preferiblemente, la presencia del polinucleótido de ARNip en una célula no resulta en u ocasiona cualesquiera efectos tóxicos indeseados, por ejemplo,

apoptosis o muerte de una célula en la cual la apoptosis no es un efecto deseado de la interferencia de ARN.

Secuencias ejemplares de 19 meros para el ARNip de Akt3 como se divulgan aquí son para Akt3 humano (NM_005465): Akt3 doble 2: CUAUCUACAUUCCGGAAAG; Akt3 doble 4:GAAUUUACAGCUCAGACUA; y Akt3 doble 5:CAGCUCAGACUAUUACAAU.

Secuencias ejemplares de 25 meros para el ANRip de Akt3 como se divulgan aquí son las siguientes:

Nombre del Cebador	Secuencia
Akt3#2 Codificante	CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG
Akt3#2 No codificante	CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG
Akt3#4 Codificante	GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA
Akt3#4 No codificante	UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC
Akt3#5 Codificante	AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU
Akt3#5 No codificante	AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAU

Secuencias ejemplares de 25 meros para el ARNip de B-Raf como se divulgan aquí son para B-Raf mutante humano: 5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3' y para B-Raf tipo humano natural 5' 5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3'.

La presente invención se refiere asimismo al uso de una estrategia mediada víricamente que resulta en el silenciamiento de un gen designado, PTEN, mediante ARNip. El uso de esta estrategia se reduce en una expresión notoriamente disminuida de PTEN, llevando así a un aumento en la Akt fosforilada total. Esta estrategia mediada víricamente es útil en identificar el mecanismo que subyace a la desregulación de Akt3 en melanomas con el fin de modelar procesos biológicos o para ofrecer una terapia para este cáncer.

X 437

La presente invención se refiere asimismo a vectores y constructos que incluyen o codifican polinucleótidos de ARNip de la presente invención y, en particular, a "constructos de ácido nucleico recombinante" que incluyen cualquier ácido nucleico tal como un segmento de polinucleótido de ADN que puede transcribirse para proporcionar polinucleótidos de ARNip específicos de polinucleótido de Akt3 de acuerdo con la invención como se contempla anteriormente; a células hospederas que se manipulan genéticamente con vectores y/o constructos de la invención y a la producción de polinucleótidos de ARNip, polipéptidos, y/o proteínas de fusión de la invención, o sus fragmentos o variantes, mediante técnicas recombinantes. Secuencias de ARNip divulgadas aquí como polinucleótidos de ARN pueden manipularse para producir secuencias de ADN correspondientes usando metodologías bien establecidas, tales como las descritas aquí. Así, por ejemplo, un polinucleótido de ADN puede generarse de cualquier secuencia de ARNip descrita aquí, de modo que las presentes secuencias de ARNip se reconocerán como suministradoras también de polinucleótidos de ADN correspondientes (y sus complementos). Por lo tanto, estos polinucleótidos de ADN se encuentran abarcados dentro de la invención contemplada, por ejemplo, para incorporarse en constructos de ácido nucleico recombinante de la presente invención, a partir de los cuales puede transcribirse ARNip.

En otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' GGUCUAGCUACAGAGAAUCUCGAU 3' o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' CUAUCUACA UCCGGAAAG 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que

tiene una secuencia de 5' GAAUUUACAGCUCAGACUA 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' CAGCUCAGACUAUUACAAU 3', o su complemento. En otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' CUUGGACUAUCUACAUCCGGAAAG 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3' o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3', o su complemento. En todavía otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU

439

3', o su complemento. En una incorporación preferida, el agente contacta una célula usando cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en células hospederas. Éstos incluyen, pero no se limitan a, un liposoma, un nanoliposoma, un nanoliposoma que contenga ceramidas, un proteoliposoma, un nanoparticulado, un nanoparticulado de silicato de fósforo cálcico, un nanoparticulado de fosfato cálcico, un nanoparticulado de dióxido de silicón, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrímico, un virus, transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico, electroporación, y microinyección. El uso de un nanoliposoma, un nanoparticulado, un nanodendrímico para la transferencia de agentes a una célula se demuestran en Figuras 5-11 y se describen con más detalle en la Solicitud Serial No. 10/835,520, presentada el 26 de abril de 2004, incorporada aquí por referencia.

Polinucleótidos Complementarios

En otra incorporación, el agente es un polinucleótido complementario.

Incorporaciones específicamente contempladas se refieren a la regulación por disminución de la actividad Akt3 mediante el uso de polinucleótidos complementarios, es decir, un ácido nucleico complementario a, y que preferiblemente puede hibridarse a una secuencia codificadora de ácidos nucleicos de ARNm, por ejemplo, ARNm de Akt3 o una subsecuencia del mismo. La unión del nucleótido complementario al ARNm de Akt3 reduce la traducción y/o estabilidad del ARNm de Akt3 o B-Raf.

En el contexto de la invención, polinucleótidos complementarios pueden comprender nucleótidos de ocurrencia natural, o especies sintéticas

formada de subunidades de ocurrencia natural o sus homólogos cercanos. Polinucleótidos complementarios pueden tener asimismo fracciones de azúcar alteradas o enlaces inter-azúcar. Ejemplares entre éstos se encuentran el fosforotioato y otras especies que contienen azufre, las cuales son bien conocidas para uso en el arte. Todos dichos análogos están comprendidos por esta invención, en la medida en que funcionen efectivamente para hibridar ARNm de Akt3 o B-Raf. Para una reseña general véase, por ejemplo, Jack Cohen, Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; and Synthesis 1:1-5 (1988).

Antagonistas

La presente invención contempla además una incorporación en donde el agente que reduce la actividad Akt3 es un polinucleótido complementario. La invención concierne igualmente a variantes de las proteínas Akt3 que funcionan como antagonistas de Akt3. Variantes de la proteína Akt3 pueden generarse por mutagénesis (por ejemplo, mutación puntual discreta o truncamiento de la proteína Akt3). Un antagonista de la proteína Akt3 puede inhibir una o más de las actividades de la forma de ocurrencia natural de la proteína Akt3, por ejemplo, uniéndose competitivamente a un miembro corriente abajo o corriente arriba de una cascada de señalización celular que incluye la proteína Akt3. Por consiguiente, pueden producirse efectos biológicos específicos mediante el tratamiento con una variante de función limitada. La presente invención contempla el tratamiento de un sujeto con una variante, que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma de ocurrencia natural de la proteína, con menos efectos colaterales en un sujeto, en relación con el tratamiento con la forma de ocurrencia natural de la proteína Akt3s.

87 441

Variantes de la proteína Akt3 que funcionan como antagonistas de Akt3 pueden identificarse cribando bibliotecas combinatorias de mutantes (por ejemplo, mutantes de truncamiento) de las proteínas Akt3 con respecto a actividad antagonista Akt3. La presente invención contempla que una variada biblioteca de variantes Akt3 se genere por mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y que se codifique por una genoteca variada. Una genoteca variada de variantes Akt3 puede producirse, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias de genes, de manera que un conjunto degenerado de secuencias Akt3 potenciales sea expresable como polipéptidos individuales, o alternatively, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para despliegue de fagos) que contenga en él el conjunto de secuencias de Akt3. Existe una variedad de métodos que pueden emplearse para producir bibliotecas de variantes Akt3 potenciales de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. Síntesis química de una secuencia de genes degenerados puede llevarse a cabo en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintético puede ligarse entonces en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes posibilita la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias Akt3 potenciales. Métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son bien conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Narang, 1983. Tetrahedron 39:3; Itakura, et al., 1984. Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura, et al., 1984. Science 198:1056; Ike, et al., 1983. Nucl. Acids Res. 11:477.

Ribozimas

En todavía otra incorporación, el agente es una ribozima. Puede usarse una ribozima para designar e inhibir la transcripción de Akt3. Una ribozima es una molécula de ARN que segmenta catalíticamente otras

84 442

moléculas de ARN. Se han descrito diferentes clases de ribozimas, incluidas ribozimas del grupo I, ribozimas cabeza de martillo, ribozimas de horquilla, ribonucleasa P, y ribozimas en forma de hacha (véase, por ejemplo, Castanotto et al. 1994, Adv. In Pharmacology 25:289-317 para una reseña general de las propiedades de las ribozimas).

Las características generales de las ribozimas de horquilla se describen, por ejemplo, en Hampel et al., 1990, Nucl. Acids Res., 18:299-304; Hampel et al., 1990, Publicación de Patente Europea No. 0 360 257; Patente de los Estados Unidos No. 5,254,678. Métodos de preparación son bien conocidos por las personas expertas en el arte (véase, por ejemplo, Wong-Staal et al., WO 94/26877; Ojwang et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6340-6344; Yamada et al., 1994, Human Gene Therapy 1:39-45; Leavitt et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:699-703; Leavitt et al., 1994, Human Gene Therapy 5:1151-120; and Yamada et al., 1994, Virology 205:121-126).

Inhibidores de Actividad de Polipéptido Akt3

En todavía otra incorporación, la actividad Akt3 se disminuye por un agente que es un inhibidor del polipéptido Akt3. Esto puede lograrse en cualquiera de un número de modos, incluido proveer un polipéptido Akt3 negativo dominante, por ejemplo, una forma de Akt3 que en sí misma no tiene actividad y que, cuando está presente en la misma célula como un Akt3 funcional, reduce o elimina la actividad Akt3 de la Akt3 funcional. El diseño de formas negativas dominantes es bien conocido por los expertos y se describe, por ejemplo, en Herskowitz, 1987, Nature, 329:219-22. Además, pueden utilizarse variantes de polipéptidos inactivos (mutélnas), por ejemplo, cribando con respecto a la capacidad de inhibir la actividad Akt3. Métodos de elaborar mutélnas son bien conocidos por los expertos (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos No. 5,486,463,

443

5,422,260, 5,116,943, 4,752,585, 4,518,504). Adicionalmente, cualquier molécula pequeña, por ejemplo, cualquier péptido, aminoácido, nucleótido, lípido, carbohidrato, o cualquier otra molécula orgánica o inorgánica puede cribarse con respecto a la capacidad de unirse a o inhibir la actividad Akt3.

Péptidos

En todavía otra incorporación, el agente, un péptido correspondiente a las secuencias de aminoácidos contiguos del dominio de homología pleckstrin, o el dominio catalítico o el dominio regulador de Akt3, disminuirá la actividad Akt3. Sin querer entrar en limitaciones teóricas, se contempla que el péptido actúe como un pseudosustrato o un inhibidor competitivo, inhibiendo en esa forma la actividad Akt3. En otra incorporación, el péptido actúa como un pseudosustrato para el dominio catalítico o regulador (cola) de Akt3. En todavía otra incorporación, el péptido actúa como un inhibidor competitivo para el dominio catalítico de Akt3. Los inventores contemplan asimismo que el péptido actúe como un inhibidor competitivo del dominio de homología de pleckstrin de Akt3. En todavía otra incorporación, el péptido actúa como un inhibidor competitivo para el dominio regulador de Akt3. Un experto en el arte puede diseñar fácilmente y determinar si un péptido disminuye o no la actividad de Akt3. Obata T et al. J Biol Chem. 275 (46):36108-15 (2000), Niv MY et al. J Biol Chem. 279(2):1242-55. Epub 2003 (2004), Luo Y et al. Biochemistry. 43(5):1254-63(2004).

Por ejemplo, se incuban células con el péptido bajo condiciones adecuadas para evaluar la actividad de Akt3. La actividad del Akt3 se evalúa y compara con un control apropiado, por ejemplo, la actividad de las mismas células incubadas bajo las mismas condiciones en la ausencia de un péptido o un péptido mezclado, usando análisis de transferencia *Western blot* con un anticuerpo que reconoce treonina 305 o serina 472.

444

Anticuerpos que reconocen Akt3 se encuentran disponibles de un número de fuentes, incluidas Stratagene (La Jolla, CA) y IGeneX, Inc. (Palo Alto) para nombrar unos pocos. Alternativamente, la actividad Akt3 podría evaluarse inmunoprecipitando Akt3 y usando el inmunoprecipitado en un análisis de cinasa *in vitro* en el cual Crosstide, un sustrato de péptido sintético para Akt3 obtenible de Discover Rx Corporation, Fremont, CA, se fosforila por Akt3 para calcular la actividad. Una actividad mayor o menor de fosforilación comparada con el control indica que el péptido de prueba disminuye la actividad de dicha Akt3.

Un péptido comprende alrededor de 5 a 30 residuos de aminoácidos de longitud, preferiblemente entre 10 y 20 aminoácidos de longitud. Secuencias de péptidos de la presente invención pueden sintetizarse por el método de síntesis peptídica de fase sólida (por ejemplo, BOC o FMOC), por síntesis de solución de fase, o por otras técnicas apropiadas incluidas combinaciones de los métodos anteriores. Los métodos BOC y FMOC, que están establecidos y se usan ampliamente, se describen en Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 88:2149 (1963); Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, C.H. Li, Ed., Academic Press, 1983, pp. 48-267; y Barany y Merrifield, in The Peptides, E. Gross and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, New York, 1980, pp. 3-285. Métodos de síntesis peptídica de fase sólida se describe en Merrifield, R.B., Science, 232:341(1986); Carpino, L.A. and Han, G.Y., J. Org. Chem., 37:3404 (1972); and Gauspohl, H. et al., Synthesis, 5:315(1992)). Las enseñanzas de estas referencias se incorporan aquí por referencia.

Moléculas Pequeñas

La presente invención contempla una incorporación en donde el agente que reduce la actividad Akt3 es una molécula pequeña. Moléculas pequeñas pueden usarse igualmente para regular, por ejemplo, la función de

la cinasa divulgada, receptores de cinasa, moléculas que interactúan con receptores de cinasa, y moléculas en las vías de señalización de los receptores de cinasa. Los expertos en el arte entienden cómo generar moléculas pequeñas de este tipo, y bibliotecas y métodos ejemplares para aislar reguladores de moléculas pequeñas. La "molécula pequeña", como se emplea aquí se une preferiblemente a Akt3 y/o B-Raf e inhibe por lo menos una de sus funciones.

Moduladores y Compuestos de Unión

Los compuestos probados como moduladores de una proteína Akt3 y/o B-Raf pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Típicamente, los compuestos de prueba serán moléculas químicas pequeñas y péptidos. Esencialmente puede emplearse cualquier compuesto químico como modulador potencial o compuesto de unión en los análisis de la invención, aunque muy a menudo los compuestos pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente a base de DMSO). Los análisis se diseñan para cribar enormes bibliotecas de químicos automatizando los pasos de análisis y proveyendo compuestos de cualquier fuente conveniente para los análisis, los cuales se realizan típicamente en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en análisis robóticos). Se observará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluidos Sigma (St. Louis, Mo.), Aldrich (St. Louis, Mo.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytik (Buchs, Suiza) y similares.

Esta invención contempla métodos de cribado de alto rendimiento que implican proveer una biblioteca combinatoria de péptidos o químicos, que contenga un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos potenciales moduladores o de unión). Tales "bibliotecas

combinatorias de químicos" se criban luego en uno o más análisis, como se describe aquí, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases de químicos particulares), que despliegan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos líderes" convencionales o pueden usarse ellos mismos como sustancias terapéuticas efectivas o potenciales.

Una biblioteca combinatoria química es una colección de diversos compuestos químicos generados ya sea por síntesis química o por síntesis biológica, combinando un número de "elementos fundamentales" químicos tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un conjunto de elementos fundamentales químicos (aminoácidos) en toda forma posible para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipéptido). Millones de compuestos químicos pueden sintetizarse mediante dicha mezcla combinatoria de elementos fundamentales químicos.

La preparación y cribado de bibliotecas combinatorias de químicos son bien conocidos por los expertos en el arte. Tales bibliotecas combinatorias químicas incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,010,175, Furka, 1991, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493 and Houghton et al., 1991, Nature 354:84-88). Pueden usarse también otras químicas para generar bibliotecas de diversidad de químicos. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a: péptidos (por ejemplo, Publicación PCT No. WO91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, Publicación PCT No. WO93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación PCT No. WO92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,288,514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., 1993, Proc. Nat. Acad. Sci.

USA 90:6909-6913), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., 1992, J. Amer. Chem. Soc. 114:6568), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann et al., 1992, J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218), síntesis orgánicas de análogos de pequeñas bibliotecas de compuestos (Chen et al., 1994, J. Amer. Chem. Soc. 116:2661), oligocarbamatos (Cho et al., 1993, Science 261:1303), y/o peptidilfosfonatos (Campbell et al., 1994, J. Org. Chem. 59:658), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger and Sambrook, todos más arriba), bibliotecas de ácidos nucleicos de péptidos (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,539,083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314 and PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang et al., 1996, Science, 274:1520-1522 y Patente de los Estados Unidos No. 5,593,853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum, 1993, C&EN, January 18, page 33; isoprenoides, Patente de los Estados Unidos No. 5,569,588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente de los Estados Unidos No. 5,549,974; pirrolidinas, Patentes de los Estados Unidos No. 5,525,735 y 5,519,134; compuestos morfolino, Patente de los Estados Unidos No. 5,506,337; benzodiazepinas, Patente de los Estados Unidos No. 5,288,514, y similares).

Dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias se encuentran disponibles en el comercio (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Sky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Adicionalmente, numerosas bibliotecas combinatorias se encuentran disponibles ellas mismas en el comercio (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, Mo., 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Columbia, Md., etc.).

Agentes Quimioterapéuticos

En otra incorporación, se induce la apoptosis disminuyendo la actividad de Akt3 en conjunción con agentes quimioterapéuticos. Tal como se emplea aquí, la quimioterapia incluye tratamiento con un agente quimioterapéutico único o con una combinación de agentes. Agentes quimioterapéuticos que pueden usarse con la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, productos vegetales derivados o naturales, hormonas y esteroides (incluidos análogos sintéticos), y fármacos de platino, como se describe en Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and Melanoma Chemoresistance. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20): 3138-51. Ejemplos de agentes dentro de estas clases se consignan a continuación. Agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo nitrosoureas, mostaza nitrogenada, y triazenos. Nitrosoureas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo carmustina, lomustina, y semustina. Mostaza nitrogenada, incluye pero no se limita a, por ejemplo ciclofosfomida. Triazenos, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo dacarbazina, y temozolomida. La FDA ha aprobado dacarbazina para uso en el tratamiento de melanoma. Antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina deaminasa: metotrexato, 5-fluorouracil, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina, y gemcitabina. Antibióticos que pueden usarse con la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo antraciclinas. Ejemplos de antraciclinas, incluyen, pero no se limitan a doxorubicina (adriamicina). Productos naturales o derivados de plantas que pueden utilizarse con la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo vinca alcaloide, epipodofilotoxinas, taxanos. Ejemplos de vinca alcaloide incluyen, pero no se limitan a por ejemplo, vincristina, y vinblastina. Ejemplos de epipodofilotoxinas incluyen, pero no

se limitan a por ejemplo etopósido. Taxanos, incluyen, pero no se limitan a por ejemplo, taxol, paclitaxel, y docetaxel. Análogos hormonales y esteroides que pueden usarse con la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, antiestrógeno, 17.alpha.-etinilestradiol, dietilstilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, dromostanolona propionato, testolactona, megestrol acetato, tamoxifeno, metilprednisolona, metiltestosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, medroxiprogesterona acetato, leuprolida, flutamida, toremifeno, zoladex. Fármacos de platino que pueden usarse con la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, hidroxíurea, amsacrina, procaxbazina, mitotano, mitoxantrona, levamisol, y hexametilmelamina.

Métodos para la administración segura y efectiva de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos son conocidos por los expertos en el arte. Adicionalmente, su administración se describe en la bibliografía estándar. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en el "Physicians' Desk Reference" (PDR), por ejemplo, 1996 edition (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); cuya divulgación se incorpora aquí por referencia.

Irradiación

En forma opcional puede agregarse irradiación a los regímenes de tratamiento de la presente invención. El término "irradiación", tal como se emplea aquí, tiene su significado convencional y se limita únicamente en la medida en que la irradiación con rayos X tenga suficiente energía para penetrar el cuerpo y sea capaz de inducir la liberación de antígenos específicos del tumor *in vivo*. La intensidad óptima de la radiación para dañar un tipo particular de es conocida por el experto en el arte.

Apoptosis

Un experto en el arte sabría cómo detectar y/o medir apoptosis usando una variedad de métodos, por ejemplo, empleando el análisis de citometría de flujo con yoduro de propidio descrita en Dengler et al., (1995) *Anticancer Drugs*. 6:522-32, o por el análisis de traducción de cortes pequeños y deoxinucleotidil transferasa terminal *in situ* (análisis TUNEL) descrito en Gorozyva, (1993) *Cancer Res* 53:1945-51.

Tratamiento de un Tumor de Melanoma

La presente invención se basa en parte en las observaciones de los inventores que muestran que Akt3 regula la apoptosis y ^{V599E}B-Raf regula el crecimiento y desarrollo vascular. Éste es un descubrimiento significativo puesto que identifica por primera vez un producto terapéutico designado, combinado, efectivo para melanoma. Como se discute *más adelante*, reducir la actividad de Akt3 incrementará la sensibilidad de células de melanoma a la apoptosis; por lo tanto, agentes que actúan a través de apoptosis tales como productos quimioterapéuticos convencionales son más efectivos cuando se reduce la actividad de Akt3 en células de melanoma. En una incorporación, la presente invención provee un método para tratar un tumor de melanoma en un mamífero que comprende: administrar a un tumor en un mamífero una cantidad efectiva de un agente que reduce la actividad de V599E B-Raf; y administrar a un tumor en un mamífero una cantidad efectiva de un agente que reduce la actividad de Akt3, reduciendo así el tamaño de un tumor.

En una incorporación preferida, el agente para reducir la actividad de Akt3 es una molécula de ARNip. En otra incorporación, el agente es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip que reduce la actividad de Akt3 comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de

97-451

5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', 5'
 CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3', 5' GAAUUUACAGCUCAGACUA 3',
 5'CAGCUCAGACUAUUACAAU 3',
 5'CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',
 5'CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3',
 5'GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3',
 5'UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3',
 5'AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3',
 5'AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', o sus complementos.

En una incorporación, el agente para reducir la actividad B-Raf es una molécula de ARNip en donde la molécula de ARNip que reduce la actividad de B-Raf es un polinucleótido que tiene una secuencia de 5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', y/o 5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3'.

En una incorporación preferida, el agente que reduce Akt3 contacta una célula usando cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en células hospederas. Éstos incluyen un liposoma, un nanoliposoma, un nanoliposoma que contenga ceramidas, un proteoliposoma, un nanoparticulado, un nanoparticulado de silicato de fósforo cálcico, un nanoparticulado de fosfato cálcico, un nanoparticulado de dióxido de silicón, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrúmero, un virus, transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico, electroporación, y microinyección. El uso de un nanoliposoma, un nanoparticulado, un nanodendrúmero para la transferencia de agentes a una célula se demuestran en Figura 5-11 y se describen además en la Solicitud de Patente Serial No. 10/835,520, presentada el 26 de abril de 2004, incorporada aquí por referencia.

94/452

En una incorporación preferida, el agente que reduce la actividad de B-Raf contacta una célula usando cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en células hospederas. Éstos incluyen un liposoma, un nanoliposoma, un nanoliposoma que contenga ceramidas, un procoliposoma, un nanoparticulado, un nanoparticulado de silicato de fósforo cálcico, un nanoparticulado de fosfato cálcico, un nanoparticulado de dióxido de silicona, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrímico, un virus, transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico, electroporación, y microinyección. El uso de un nanoliposoma, un nanoparticulado, un nanodendrímico para la transferencia de agentes a una célula se demuestran en Figura 5-11 y se describen además en la Solicitud de Patente Serial No. 10/835,520, presentada el 26 de abril de 2004, incorporada aquí por referencia.

En una incorporación preferida, la presente invención provee un método para el uso de nanotecnología como la estrategia para administrar múltiples agentes para inhibir el desarrollo del tumor de melanoma e incrementar o inducir apoptosis. Combinaciones de péptido de Akt3; ARNip de Akt3, ARNip de V599E B-Raf, paclitaxel, carboplatino, carmustina, dacarbazina, y vinblastina se cargan simultáneamente en liposomas no tóxicos. Estos liposomas transfieren efectivamente esta carga en células de melanoma que crecen en cultivo. Ésta es la primera demostración de la transferencia simultánea de diferentes sustancias terapéuticas en células cancerosas usando un solo agente de transferencia. Liposomas que incorporan agentes terapéuticos de combinación circularían en el torrente sanguíneo e ingresarían en la vasculatura del tumor para ser absorbidos por células expuestas de melanoma. Esto se traduce en eliminación dirigida de células de melanoma en tumores, llevando a la

4/453

regresión del tumor. La utilidad clínica de este método radica en la transferencia de sustancias terapéuticas a los tumores. Enlazando covalentemente un anticuerpo anti-CD63 al segmento de pegalación que se extiende del liposoma llevará a la captación preferencial por células del melanoma. Por consiguiente, tejido estromal absorbe poco o nada del liposoma demostrando la transferencia dirigida del liposoma. El liposoma inmunitario puede potenciar la captación en células tumorales del melanoma versus tejido estromal de control.

En otra incorporación, el agente que reduce la actividad de Akt3 es un polinucleótido complementario. En una incorporación, el agente que reduce la actividad de B-Raf es un polinucleótido complementario.

En todavía otra incorporación, el agente que reduce la actividad de Akt3 es una ribozima. En todavía otra incorporación, el agente que reduce la actividad de B-Raf es una ribozima. Ribozimas pueden usarse para direccionar e inhibir la transcripción de Akt3, B-Raf o ambas.

En todavía otra incorporación, la actividad de Akt3 se disminuye por un agente que es un inhibidor del polipéptido de Akt3. Esto puede lograrse en cualquiera de un número de modos, incluido proveer un polipéptido de Akt3 negativo dominante, por ejemplo, una forma de Akt3 que en sí misma no tenga actividad y que, cuando está presente en la misma célula como una Akt3 funcional, reduce o elimina la actividad Akt3 de la Akt3 funcional. En todavía otra incorporación, la actividad B-Raf se disminuye por un agente que es un inhibidor del polipéptido B-Raf. En una incorporación preferida, el inhibidor de B-Raf es BAY43-9006. Inhibidores de B-Raf incluyen, pero no se limitan a BAY 43-9006, obtenible comercialmente de BAYER) u otros inhibidores de B-Raf disponibles en el comercio. Los inhibidores de B-Raf pueden incluir adicionalmente inhibidores de B-Raf competitivos y no competitivos. Un inhibidor de B-Raf competitivo es una molécula que une la enzima B-Raf en una manera que es mutuamente

454

exclusiva de unión de sustrato. Típicamente, un inhibidor competitivo de B-Raf se unirá al sitio activo. Un inhibidor de B-Raf no competitivo puede ser uno que inhibe la unión de B-Raf, pero su unión a la enzima no es mutuamente exclusiva a lo largo de la unión al sustrato. Los inhibidores de B-Raf contemplados por esta invención son compuestos que reducen la actividad de B-Raf en células animales sin un efecto significativo sobre otras actividades celulares, por lo menos con concentraciones comparables. No obstante, esta inhibición puede realizarse en cualquiera de un número de modos, inclusive proveyendo un polipéptido B-Raf negativo dominante, por ejemplo, una forma de B-Raf que en sí misma no tiene actividad y que, cuando está presente en la misma célula como una B-Raf funcional, reduce o elimina la actividad de B-Raf en el B-Raf funcional.

En todavía otra incorporación, el agente que reduce la actividad de Akt3 es un péptido correspondiente a las secuencias de aminoácidos contiguas del dominio de homología pleckstrin, o el dominio catalítico o el dominio regulador de Akt3.

La presente invención contempla además una incorporación donde el agente que reduce la actividad de Akt3 es una molécula pequeña. En otra incorporación, la presente invención contempla igualmente incorporaciones donde el agente que reduce la actividad de B-Raf es una molécula pequeña.

En otra incorporación, el método para tratar un tumor de melanoma incluye administrar agentes quimioterapéuticos. Tal como se emplea aquí, la quimioterapia incluye tratamiento con un solo agente quimioterapéutico o con una combinación de agentes. Agentes quimioterapéuticos que pueden usarse con la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, productos derivados de plantas o naturales, hormonas y esteroides (incluidos análogos sintéticos), y fármacos de platino como se describe.

91 455

En otra incorporación, el método para tratar un tumor de melanoma en un mamífero incluye terapia de irradiación.

En incorporaciones preferidas, los métodos de la presente invención pueden usarse para tratar melanomas teniendo un efecto significativo sobre la muerte celular (por ejemplo, mediante apoptosis), así como la proliferación y angiogénesis. Un experto en el arte estará familiarizado con métodos que miden el tamaño de un tumor a cuantificar, por ejemplo, la regresión o reducción en el tamaño del tumor, angiogénesis, y apoptosis. Ventajosamente, los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse en dosis relativamente bajas (y/o menos frecuentemente) para minimizar potenciales efectos colaterales tóxicos contra células normales, no transformadas.

Por consiguiente, la presente invención provee igualmente métodos de inducir un nivel significativo de muerte de las células cancerosas (por ejemplo, apoptosis) e inhibición del desarrollo del tumor de melanoma en un sujeto con un melanoma, que comprende administrar, concurrente o secuencialmente, cantidades efectivas de un agente que reduce la actividad de Akt3 y un agente que reduce la actividad de B-Raf. Tal como se emplea aquí, "concurrentemente" se refiere a simultáneamente en el tiempo, o en diferentes tiempos durante el ciclo de un programa de tratamiento común; y "secuencialmente" administrando uno de los agentes del método para reducir la actividad de Akt3 o B-Raf, y un agente adicional para reducir la actividad de B-Raf o la actividad de Akt3, en donde el segundo agente puede administrarse sustancialmente inmediatamente después del primer agente, o el segundo agente puede administrarse en un período de tiempo efectivo después del primer agente; el período de tiempo efectivo es la cantidad de tiempo dado para la realización de un beneficio máximo desde la administración del primer agente.

gxf 45b

Dirigir Akt3 junto con ^{V599B} B-Raf mutante y sustancias quimioterapéuticas seleccionadas tiene un efecto sinérgico, más potente y prolongado que dirigir cualquiera de los dos solos. Esto aporta una base racional para combinar terapias dirigidas junto con sustancias químicas seleccionadas, lo cual no existe actualmente para el melanoma.

Usos de Proteína Akt3 y/o B-Raf y Proteínas Relacionadas con Akt3 y/o Relacionadas con B-Raf

Las proteínas de la invención poseen un número de usos específicos diferentes. Las dos, Akt3 y B-Raf son proteínas claves que contribuyen al desarrollo de melanoma. La proteína Akt3 y/o B-Raf y la proteína relacionada con Akt3 o B-Raf se emplean en métodos que evalúan el estado de productos génicos Akt3 y/o B-Raf en tejidos normales versus cancerosos, elucidando en esa forma el fenotipo maligno. Típicamente, polipéptidos de regiones específicas de una proteína Akt3 o B-Raf pueden utilizarse para evaluar la presencia de perturbaciones (tales como eliminaciones, inserciones, mutaciones puntuales, etc.) en aquellas regiones (conteniendo tales regiones uno o más motivos). Un ejemplo no limitante incluye el uso de anticuerpos que dirigen la proteína Akt3 y/o B-Raf y la proteína relacionada con Akt3 y/o B-Raf, que comprenden el residuo de aminoácidos de uno o más de los motivos biológicos contenidos en secuencias de polipéptidos de Akt3 y/o B-Raf, respectivamente, con el fin de evaluar las características de esta región en tejidos normales versus cancerosos o para provocar una respuesta inmunitaria al epítipo. Alternativamente, proteínas relacionadas con Akt3 y/o proteínas relacionadas con B-Raf, que contienen el residuo de aminoácidos de uno o más de los motivos biológicos en una proteína Akt3 y/o B-Raf respectivamente, se emplean para cribar con respecto a factores que interactúan con esa región de Akt3 y/o B-Raf.

94 457

Ambos fragmentos/subsecuencias de la proteína Akt3 y B-Raf son particularmente útiles en generar y caracterizar anticuerpos específicos de dominio (por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítipo extracelular o intracelular de una proteína Akt3 o B-Raf), para identificar agentes o factores celulares que se unen a Akt3 o B-Raf o un dominio estructural particular de la misma y, en varios contextos terapéuticos y diagnósticos, incluidos pero no limitados a, análisis diagnósticos, vacunas contra el cáncer y métodos de preparar tales vacunas.

La proteína codificada por el gen Akt3 y/o B-Raf, o por análogos, homólogos o sus fragmentos, tiene una variedad de usos, incluidos, pero no limitados a, generar anticuerpos y en métodos para identificar ligandos y otros agentes y constituyentes celulares que se unen a un producto del gen Akt3 y/o B-Raf. Anticuerpos producidos contra una proteína Akt3 o B-Raf o su fragmento son útiles en análisis diagnósticos y pronósticos, y metodologías radiográficas en el manejo de cáncer de melanoma humano caracterizado por la expresión de la proteína Akt3 o B-Raf.

Pueden emplearse diferentes análisis inmunológicos útiles para la detección de la proteína Akt3 y/o B-Raf, incluidos, pero no limitados a, varios tipos de radioinmunoanálisis, inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), análisis inmunofluorescentes ligados a enzimas (ELIFA), métodos inmunocitoquímicos, y similares. Pueden marcarse y utilizarse anticuerpos como reactivos inmunológicos capaces de detectar células que expresen Akt3 o B-Raf.

Anticuerpos Dirigidos a Akt3 y/o B-Raf en Melanoma

De acuerdo con la invención, el polipéptido Akt3 y/o B-Raf codificado por la isoforma Akt3 o la isoforma B-Raf, respectivamente, hallada en melanomas inclusive sus fragmentos, incluidas proteínas de fusión, puede usarse como un antígeno o inmunógeno para generar

168-458

anticuerpos. Preferiblemente, los anticuerpos unen específicamente la isoforma Akt3 humana, pero no unen otras formas de Akt. Preferiblemente, los anticuerpos unen específicamente la isoforma B-Raf humana, pero no unen otras formas de B-Raf.

Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmunitario, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de linfocito T. Un polipéptido o péptido antigénico contiene por lo menos alrededor de 5 y, preferiblemente, por lo menos alrededor de 10, aminoácidos. Una porción antigénica de una molécula puede ser aquella porción que es inmunodominante para el reconocimiento de receptor de anticuerpo o linfocito T, o puede ser una porción usada para generar un anticuerpo dirigido a la molécula conjugando la porción antigénica a una molécula portadora para inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser ella misma inmunogénica, es decir, capaz de provocar una respuesta inmunitaria sin un portador.

Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena única, fragmentos Fab, y una biblioteca de expresión Fab. Los anticuerpos anti-Akt3 de la invención pueden ser de reacción cruzada, por ejemplo, pueden reconocer Akt3 de diferentes especies. Análogamente, los anticuerpos anti-B-Raf de la invención pueden ser de reacción cruzada, por ejemplo, pueden reconocer B-Raf de diferentes especies. Los anticuerpos policlonales poseen una mayor probabilidad de reactividad cruzada. Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede ser específico para una sola forma de Akt3 o B-Raf. Preferiblemente, tal anticuerpo es específico para Akt3 o B-Raf de melanoma humano.

Varios procedimientos conocidos en el arte pueden usarse para la producción de anticuerpos policlonales. Para la producción de anticuerpo,

10/ 459

varios animales hospederos pueden inmunizarse mediante inyección con el polipéptido Akt3 o B-Raf, o su derivado (por ejemplo, fragmento o proteína de fusión), incluidos, pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. En una incorporación, el polipéptido Akt3 o B-Raf o su fragmento puede conjugarse a un portador inmunogénico, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) o hemocianina de lapa (KLH). Pueden emplearse varios coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedera, incluidos pero no limitados a coadyuvantes de Freund (completos e incompletos), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol, y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos al polipéptido Akt3 o B-Raf, o su fragmento, análogo, o derivado, puede usarse cualquier técnica que posibilite la producción de moléculas de anticuerpo por estirpes celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, desarrollada originalmente por Kohler y Milstein [Nature 256:495-497 (1975)], así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocito B humano [Kozbor et al., Immunology Today 4:72 1983]; Cote et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030 (1983)], y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)]. En una incorporación adicional de la invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes [Publicación Internacional de Patente No. WO 89/12690, publicada el 28 de diciembre de 1989]. De hecho, de acuerdo con la invención, pueden emplearse técnicas

H 460

desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" [Morrison et al., J. Bacteriol. 159:870 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454(1985)] empalmando los genes de una molécula de anticuerpo en ratón, específica para un polipéptido Akt3, junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada; tales anticuerpos se encuentran dentro del ámbito de esta invención. Tales anticuerpos humanos o quiméricos humanizados se prefieren para uso en terapia de enfermedades humanas (descritas más adelante), puesto que los anticuerpos humanos o humanizados tienden en mucha menor proporción que los anticuerpos xenogénicos a inducir, ellos mismos, una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta alérgica.

Técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena Fv (scFv) [Patentes de los Estados Unidos No. 5,476,786 y 5,132,405 a Huston; Patente de los Estados Unidos No. 4,946,778] pueden adaptarse para producir anticuerpos de una sola cadena específicos de polipéptido de Akt3. Una incorporación adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab [Huse et al., Science 246:1275-1281(1989)] para permitir una identificación fácil y rápida de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido de Akt3, o sus derivados, o análogos.

Fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula del anticuerpo pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a: el fragmento F(ab')₂ que puede producirse por descomposición de pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂, y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula del anticuerpo con papaína como agente reductor.

107 461

En la producción de anticuerpos, el cribado para detectar el anticuerpo deseado puede realizarse mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, radioinmunoanálisis, ELISA (inmunoanálisis ligado a enzima), inmunoanálisis "sandwich", análisis inmunorradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, análisis de inmunodifusión, inmunoanálisis *in situ* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o de radioisótopos, por ejemplo), *Western blots*, reacciones de precipitación, análisis de aglutinación (por ejemplo, análisis de aglutinación en gel, análisis de hemaglutinación), análisis de fijación de complemento, análisis de inmunofluorescencia, análisis de proteína A, y análisis de inmunoelectroforesis, etc. En una incorporación, la unión de anticuerpo se detecta detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra incorporación, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo del anticuerpo primario. En una incorporación adicional, el anticuerpo secundario se marca. Se conocen muchos medios en el arte para detectar la unión en un inmunoanálisis y se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconozcan un epítipo específico de un polipéptido o péptido de Akt3 o B-Raf, se pueden analizar hibridomas generados con respecto a un producto que se une a un fragmento de polipéptido de Akt3 o B-Raf, que contiene tal epítipo. Para la selección de un anticuerpo específico de un polipéptido o péptido de Akt3 o B-Raf de una especie particular de animal, uno puede seleccionar sobre la base de la unión positiva con polipéptido o péptido de Akt3 o B-expresado por o aislado de células de esa especie de animal.

Identificación de Moléculas que Interactúan con Akt3 o B-Raf

Las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos para Akt3 y B-Raf halladas en melanoma le permiten a un experto identificar proteínas,

105/ 462

moléculas pequeñas y otros agentes que interactúan con Akt3 o B-Raf, así como vías activadas por Akt3 o B-Raf mediante cualquiera de una variedad de protocolos aceptados por el arte. Por ejemplo, uno puede utilizar uno de los así llamados sistema de trampa de interacción (también denominados el "análisis de dos híbridos"). En tales sistemas, moléculas interactúan y reconstituyen un factor de transcripción que dirige la expresión de un gen reportero, tras lo cual se estudia la expresión del gen reportero. Otros sistemas identifican interacciones proteína-proteína *in vivo* a través de la reconstitución de un activador transcripcional eucariota, véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,955,280 publicada el 21 de septiembre de 1999, Patente de los Estados Unidos No. 5,925,523 publicada el 20 de julio de 1999, Patente de los Estados Unidos No. 5,846,722 publicada el 8 de diciembre de 1998 y Patente de los Estados Unidos No. 6,004,746 publicada el 21 de diciembre de 1999. Se cuenta asimismo con algoritmos en el arte para predicciones basadas en el genoma de la función de las proteínas (véase, por ejemplo, Marcotte, et al., Nature 402: 4 November 1999, 83-86).

Alternativamente uno puede cribar bibliotecas de péptidos para identificar moléculas que interactúan con secuencias de proteínas Akt3 o B-Raf. En tales métodos, péptidos que se unen a Akt3 o B-Raf se identifican cribando bibliotecas que codifican una colección aleatoria o controlada de aminoácidos. Péptidos codificados por las bibliotecas se expresan como proteínas de fusión de cubiertas proteínicas de bacteriófagos, a continuación se criban las partículas de bacteriófago contra la proteína % Akt3 o B-Raf respectivamente.

Por consiguiente, péptidos que tienen una amplia variedad de usos, tales como reactivos terapéuticos, pronósticos o diagnósticos, se identifican así sin información previa de ningún tipo sobre la estructura del ligando esperado o molécula del receptor.

401 463

Composición Farmacéutica

En una incorporación, se provee una composición farmacéutica para tratar un tumor de melanoma, que comprende un agente que reduce la actividad de Akt3 y un vehículo. Vehículos apropiados para uso con la presente invención serán conocidos por los expertos en el arte. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, un liposoma, un nanoliposoma, un nanoliposoma que contenga ceramidas, un proteoliposoma, un nanoparticulado, un nanoparticulado de silicato de fósforo cálcico, un nanoparticulado de fosfato cálcico, un nanoparticulado de dióxido de silicón, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrúmero, un virus, y transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico.

En otra incorporación, la composición farmacéutica comprende un agente que incluye, pero no se limita a, una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña. En otras incorporaciones, las moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip) incluyen los polinucleótidos 5"

GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', 5'
CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3', 5' GAAUUUACAGCUCAGACUA 3',
5'CAGCUCAGACUAUUACAAU 3',
5'CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',
5'CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3',
5'GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3',
5'UAGUCUGAGCUGUAAAUUCWCAUC 3',
5'AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3',
5'AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3' o sus complementos. En
todavía otra incorporación, la composición farmacéutica comprende un
agente que es un péptido que actúa como un pseudosustrato para Akt3. En

106 464

otra incorporación, el péptido actúa como un seudosustrato para un dominio catalítico de Akt3.

En todavía otra incorporación, el agente que reduce la actividad de Akt3 es un péptido que actúa como un inhibidor competitivo para Akt3. Los inventores contemplan que el péptido puede actuar como un inhibidor competitivo para un dominio catalítico de Akt3, un dominio de homología pleckstrin de Akt3, y/o para un dominio regulador de Akt3. En todavía otra incorporación, la composición farmacéutica comprende un agente que reduce la actividad de B-Raf. Los inventores contemplan que el agente incluya una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña. En otra incorporación, el agente que reduce la actividad de B-Raf es una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) que comprende: un polinucleótido 5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', o su complemento o un polinucleótido 5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3', o su complemento.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a manera de ilustración y no a manera de limitación.

EJEMPLOS PARA AKT3

MATERIALES Y MÉTODOS

EJEMPLO 1: Regulación por Disminución, Mediada por ARNip, de Isoformas de Akt:

Para demostrar la especificidad de ARNip contra Akt1, Akt2 y Akt3 (Dharmacon) en células UACC 903, constructos de Akt1, Akt2 o Akt3 marcados con HA se co-nucleofectaron juntos con cada ARNip respectivo. Los constructos de Akt usados para estos estudios se han descrito con anterioridad (Sun et al., *Am J Path* 159:431-437(2001); Mitsuuchi et al., *J*

107 465

Cellular Biochem 70:433-441(1998); y Brodbeck et al., *J Biol Chem* 274:9133-9136 (1999)). Cada constructo (5 g), ya sea solo o en combinación con 100 pmol o 200 pmol de cada ARNip respectivo, se introdujo en 7×10^5 células UACC 903 mediante nucleofección usando un nucleofector Amaxa. La eficiencia de transfección resultante usando constructos que expresan GFP fue >60%. Se recolectaron lisados de proteína 72 horas después y se realizaron análisis *Western blot* como se describió anteriormente (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897(2003)). Se utilizó igualmente nucleofección con ARNip para inactivar la expresión endógena de las isoformas de Akt y/o PTEN (Dharmacon) en melanocitos y en las estirpes celulares de melanoma UACC 903, SK-MEL-24, WM115, y WM35. Los reactivos de nucleofección Amaxa y el protocolo para melanocitos se empleó también con células WM35, mientras que otras células se nucleofectaron usando Solución Amaxa R/programa K-17. Las condiciones de cultivo para estas estirpes celulares se han descrito previamente (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003); Hsu et al., *In Human Cell Culture*, J.R.W.M.a.B. Palsson, editor. Great Britain: Kluwer Academic Publishers. 259-274 (1999)).

EJEMPLO 2: *Western Blotting*, Inmunoprecipitación y Análisis de Cinastas:

El procedimiento *Western blot* y los anticuerpos usados, excepto para Akt2 (SantaCruz) y Akt3 (UpstateBiotech), se han descrito previamente (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). Para la inmunoprecipitación, se recogió la proteína luego de la adición de tampón de lisis de proteína (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaCl, 10 mM β -glicerol fosfato sódico, 5 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 0.1% 2-mercaptoetanol, y 0.5% cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma)) a placas de células, seguido por

congelamiento instantáneo en nitrógeno líquido. El desecho celular se peletizó por centrifugación ($\geq 10,000 \times g$) de lisados y se cuantificó la concentración de proteína usando el Análisis de Proteína BioRad BCA. Se incubó proteína para inmunoprecipitación (100 μg) con 2 μg de anticuerpo Akt2 o 5 μl de Akt3 de un día para otro a 4°C con mezclado constante. Seguidamente se agregaron 15 μl de glóbulos de sefarosa GammaBind G equilibrada (Amersham Biosciences) a cada tubo y se incubaron 2 horas (4°C) con mezclado constante. Los glóbulos peletizados se lavaron dos veces con tampón de lisis para retirar el anticuerpo y la proteína no ligados. A continuación se resuspendieron muestras y se sometieron a electroforesis bajo condiciones reductoras de acuerdo con el protocolo suministrado por Invitrogen Life Technologies con el NuPage Gel System. Se probaron *Western blots* con fósforo-Akt y se cuantificaron mediante densitometría como se describe previamente (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897(2003)).

Para el análisis de Akt cinasa, 15 μl de glóbulos de sefarosa Gamma Bind G equilibrada se lavaron con 200 μl de tampón de lisis, luego se incubaron con 2 μg de anticuerpo Akt2 o 5 μl de Akt3 en un volumen de 400 μl a 4°C con mezclado constante durante ≥ 2 horas. Se agregó microcistina (1 μM) de MPBiomedicals al tampón de lisis para garantizar la completa inactivación de las fosfatases PP1 y PP2 celulares. El complejo anticuerpo/sefarosa se lavó dos veces con 750 μl de tampón de lisis, luego se incubó con 100 μg de proteína en un volumen de 400 μl durante ≥ 1.5 horas a 4°C con mezclado constante. Este complejo se lavó con 500 μl de tampón de lisis (3X), luego una vez con 500 μl de Tampón de Dilución de Análisis (20 mM MOPS, pH 7.2, 25mM μ -glicerol fosfato, 1 mM ortovanadato sódico, y 1 mM DTT). Péptido inhibidor de PKA (10 μM) de Santa Cruz, 37.5 μM ATP, 17 mM $MgCl_2$, 0.25 $\mu Ci/\mu l$ - ^{32}P -ATP, y 90 μM

XOT 467

de Croastide de sustrato específico de Akt de Uipstate Biotechnology se agregaron a los tubos en tampón de dilución de análisis y se incubaron a 35°C durante 10 minutos con mezclado continuo. A continuación, 20 µl de líquido se pasaron a papel de fosfoCelulosa, el cual se lavó 3X durante 5 minutos con 40 ml de 0.75% ácido fosfórico. Luego de un lavado con acetona de 5 minutos, se dejó secar la fosfoCelulosa, se transfirió a un frasco de escintilación con 5ml de fluido de escintilación de Amersham Biosciences y se midió la cpm en un sistema de Escintilación en Líquido Beckman Coulter LS 3801.

EJEMPLO 3: Estudios de Tumores y Medición de Apoptosis:

La recolección de tumores de melanoma de pacientes humanos se llevó a cabo de acuerdo con protocolos aprobados por la Oficina de Protección de Sujetos Humanos de Penn State, la Oficina de Administración de Protocolos del Instituto Cancerológico Dana-Farber, y la Red Cooperativa de Tejido Humano. Especímenes de melanoma de archivo insertados en parafina, fijados con formalina se usaron para inmunohistoquímica para medir la Akt fosforilada. Sesenta y tres especímenes de archivo insertados en parafina, fijados con formalina de lesiones melanocíticas se utilizaron para experimentos de inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal fósforo-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology) con una titulación de 1:50 de acuerdo con el protocolo recomendado del fabricante. Se determinaron la especificidad y la intensidad de la tinción mediante comparación cualitativa con controles del endotelio de vasos sanguíneos internos, epitelio escamoso o de músculo liso, presentes en cada espécimen.

La proteína para *Western blotting* o inmunoprecipitación se recogió usando maja y mortero enfriado en nitrógeno líquido para pulverizar el material tumoral congelado instantáneamente en nitrógeno líquido, que

109 468

constaba de >60% material tumoral. Un ml de tampón de lisis de proteína se agregó por cada 200 mg de polvo de tejido y se sonicó durante 2 minutos (intervalos de 15 segundos) en un baño sonicador lleno de hielo. Las muestras se centrifugaron (~12,000xg) a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se cuantificó usando el Análisis de Proteína BioRad BCA.

Se llevó a cabo experimentación animal de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en el Colegio de Medicina del Estado de Pensilvania. Ratones hembra atímicos, inmunitariamente desprotegidos se adquirieron de Harlan Sprague Dawley y se midió la quinesis tumoral por inyección s.c. de 1×10^6 células en 0.2 ml de DMEM que contenía 10% FBS en el tórax izquierdo y derecho de ratones inmunitariamente desprotegidos de 4-6 semanas de edad. Para la experimentación animal que implicaba ARNip, 1×10^6 células UACC 903 se nucleofectaron con ARNip a isoformas de Akt y 48 horas después, células nucleofectadas en 0.2ml de DMEM que contenía 10% FBS se inyectaron s.c. en el tórax izquierdo y derecho de ratones inmunitariamente desprotegidos. Las dimensiones de los tumores en que se desarrollaron se midieron en días alternos usando calibres. Cuando se midió la apoptosis, 5×10^6 células se inyectaron por sitio y se recolectaron 4-6 tumores 4 días después. Las mediciones de apoptosis se llevaron a cabo en secciones del tumor insertadas en parafina, fijadas con formalina usando el kit Roche TUNEL TMR Red Apoptosis como se describe previamente (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). Se contaron un mínimo de 8 casillas de tres o cuatro secciones diferentes del tumor, y el número de células TUNNEL positivas se expresó como el porcentaje de células apoptóticas.

EJEMPLO 4: Estadísticas:

469

Para análisis estadísticos, se utilizó la prueba *t* de Student para comparaciones pareadas y la ANOVA de una sola variable dependiente cuantitativa o ANOVA de Kruskal Wallis en Rangos, usada para comparaciones de grupos, seguida por las pruebas apropiadas *post hoc* (de Dunnett o Dunn). Los resultados se consideraron significativos en un valor P de <0.05.

Tabla 1. Intensidad relativa de la tinción p-Akt en lunares comunes, lunares displásicos, melanomas primarios y metástasis de pacientes con melanoma.

Categoría (# de muestras)	Intensidad de Tinción p-Akt (%)	
	Moderada a débil ¹	Fuerte ²
Lunares comunes (14)	100	0 ^a
Lunares displásicos (25)	88	12 ^b
Melanomas primarios (15)	47	53 ^c
Melanomas metastásicos (9)	33	67 ^d

¹Las células tumorales se tifieron a una intensidad similar a la de pericitos adyacentes a los vasos sanguíneos en la sección del tumor.

²Las células tumorales se tifieron a una intensidad mayor que pericitos adyacentes a vasos sanguíneos en la sección del tumor.

Estadísticas, P<0.5 para ^a versus ^{c,d} y ^b versus ^d.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

EJEMPLO 5: ARNip Específicos de Isoforma identifican Implicación de Akt3 en Melanoma.

En un modelo melanoma genético experimental recientemente descrito (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)), se demostró que la actividad Akt desregulada (mediante pérdida de PTEN) juega un papel

470

importante en la tumorigénesis de melanoma disminuyendo la capacidad apoptótica de las células de melanoma (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897(2003)). Nosotros supusimos que, puesto que este modelo reflejaba la importancia de Akt en la tumorigénesis de melanoma, podría usarse para identificar isoformas de Akt específicas cuya actividad desregulada controla el desarrollo del tumor de melanoma. Validando resultados anteriores (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897(2003)), células UACC 903(-PTEN) parentales tuvieron una expresión de Akt fosforilada total elevada (una medida de actividad) (Figura 1A). La expresión de PTEN en células UACC 903 resultó en una actividad de Akt disminuida en tres estirpes celulares derivadas independientemente (36A, 29A, y 37A), la cual se reversó en estirpes celulares revertientes que perdieron la actividad PTEN funcional (36 A revertientes) durante la tumorigénesis.

Para identificar la isoforma Akt predominante activa en melanomas, usamos ARNip específico a cada isoforma Akt para determinar la extensión en que cada isoforma reducía la cantidad de Akt fosforilada (activa) en la estirpe celular UACC 903(-PTEN) parental. La especificidad de reducir la expresión para cada isoforma de Akt en células UACC 903 se determinó co-nucleofectando constructos que expresaban HA-Akt1, HA-Akt2 o HA-Akt3 marcadas junto con ARNip específico para cada isoforma. Confirmando la especificidad, se descubrió que cada ARNip de Akt sólo reducía la expresión de la isoforma de Akt contra la cual se hizo, mostrada en n Figura 1B. Seguidamente, ARNip a cada isoforma de Akt se nucleofectó en la estirpe celular UACC 903, así como dos estirpes celulares de melanoma adicionales, independientemente derivadas (WM115 y SK-MEL-24) para determinar cuál ARNip bajaba el nivel de Akt fosforilada (activa) en estas células (Figura 1C). Aunque ARNip a Akt1 o Akt2 tuvo únicamente un efecto sin valor, no significativo, el ARNip a Akt3 redujo significativamente los niveles de Akt total fosforilada, sugiriendo que Akt3

W 471

era la isoforma que regulaba el desarrollo del tumor en el modelo UACC 903 (PTEN) (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). Como todas las tres estirpes celulares de melanoma derivadas independientemente indicaban que Akt3 era la isoforma activa predominante en melanomas, los experimentos subsiguientes se enfocaron en examinar la desregulación de Akt3, y utilizaron Akt2 como control de comparación, puesto que se ha informado que se amplifica en múltiples tipos de cáncer (Chen et al., *Proc Nat Acad Sciences USA* 89:9267-9271 (1992); Cheng et al., *Proc Nat Acad Sciences USA* 93:3636-3641 (1996); Lu et al., *Chung-OHua I Hsueh Tsa Chih [Chinese Medical Journal]* 75:679-682 (1995); Bellacosa et al., *Int J Cancer* 64:280-285 (1995); y van Dekken et al., *Cancer Res* 59:748-752 (1999)).

Para confirmar aún más que Akt3 era la isoforma predominante cuya actividad se reducía específicamente por PTEN en el modelo de tumorigénesis UACC 903 (PTEN), se midió la actividad de Akt3 inmunoprecipitando Akt3 o Akt2 total de lisados de células, seguido por *Western blotting* para calcular la cantidad de Akt fosforilada (activa) en la inmunoprecipitada (Figura 1D). Los niveles de Akt3 fosforilada, mas no de Akt2, fueron elevados en la estirpe celular UACC 903 parental, así como las dos estirpes celulares 36A revertientes tumorigénicas que carecen de PTEN. En contraste, niveles apenas detectable de Akt3 fosforilada se observaron en las estirpes celulares 36A, 29A o 37A, las cuales tenían bajos niveles de actividad Akt, debida ostensiblemente a la expresión PTEN (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897(2003)). Para verificar que los niveles fosforilados de Akt3 reflejaban Akt activa, Akt3 y Akt2 inmunoprecipitadas se analizaron en un estudio de cinasa *in vitro*, y los resultados para Akt3 se muestran en Figura 1E. Una diferencia estadísticamente significativo en Akt3 (Figura 1E), mas no actividad de Akt2 (no se muestran los datos), se identificó en células revertientes (-

X17 472

PTEN) comparadas con células que expresan PTEN ($P < 0.05$). Colectivamente, estos resultados indican que la actividad Akt3 se regulaba específicamente por PTEN en el modelo de tumorigénesis UACC 903 (PTEN).

EJEMPLO 6: Actividad Akt3 Incrementada Ocurre Precozmente Durante la Evolución del Tumor de Melanoma.

Se cree que los melanocitos son capaces de transformarse directamente en un melanoma (Herlyn, M., *Molecular and cellular biology of melanoma*: Austin: R.G. Landes Co. (1993)). Alternativamente, los melanocitos pueden seguir un modelo de evolución del tumor en el cual evolucionan en una manera gradual desde lunares comunes, a lunares atípicos, a melanoma *in situ* (fase de crecimiento radial y vertical) y, finalmente, a melanomas metastásicos (Herlyn, M., *Molecular and cellular biology of melanoma*: Austin: R.G. Landes Co. (1993)). Independientemente del proceso, la evolución de células tumorales más agresivas requiere la acumulación de alteraciones que afecten genes supresores tumorales y oncogenes. Éstos, a su vez, resultan en subpoblaciones de células que tienen un crecimiento selectivo, siempre creciente, o ventajas de supervivencia que promueven el proceso oncogénico.

Para aportar evidencia de la implicación selectiva de Akt3 durante la evolución del tumor de melanoma, se midieron la expresión y la actividad de Akt3 y Akt2 en un modelo de evolución de tumor de melanoma (suministrado generosamente por el Dr. Meenhard Herlyn) (Herlyn, M., *Molecular and cellular biology of melanoma*: Austin: R.G. Landes Co. (1993); Hsu et al., *In Human Cell Culture* J.R.W.M.a.B. Palsson, editor. Great Britain: Kluwer Academic Publishers. 259-274 (1999)). En este modelo de evolución, melanocitos se comparan con estirpes celulares de

114 473

bajo paso establecidas de tumores de melanoma primarios en las fases radial (WM35 y WM3211) y vertical (WM115, WM98.1 y WM278) de crecimiento. En comparación con los melanocitos, Figura 2A muestra que una de las dos estirpes celulares de la fase radial de crecimiento y todas de la fase vertical de crecimiento tenían Akt fosforilada elevada, lo cual sugería que la actividad Akt aumentaba precozmente durante el desarrollo del melanoma primario en la fase de crecimiento radial. A continuación, se examinó la expresión de la isoforma Akt3 mediante *Western blotting* y se comparó con la expresión Akt2 en estas estirpes celulares (Figura 2B). Se encontró que la expresión de Akt3 era elevada en todas, excepto la estirpe celular de la fase de crecimiento radial WM98.1, que se comparó con los melanocitos. Puesto que la expresión no refleja necesariamente la actividad, se examinó la cantidad de Akt3 activa por inmunoprecipitación de Akt3 o Akt2, seguida por análisis *Western blot* para medir el nivel de Akt fosforilada en el inmunoprecipitado. En comparación con los melanocitos, la actividad Akt3 fue elevada en todas, excepto en la estirpe celular de la fase de crecimiento radial WM35 (Figura 2C). Nótese que aunque la expresión de la proteína Akt3 en la estirpe celular de la fase de crecimiento vertical WM98.1 fue similar a la observada en melanocitos, la actividad Akt3 fue significativamente más alta. En contraste con los resultados de Akt3, la expresión de Akt2 fue elevada únicamente en las estirpes celulares de la fase de crecimiento radial, en comparación con los melanocitos (Figura 2B). No obstante, sólo la estirpe celular de la fase de crecimiento radial WM3211 tuvo un incremento correspondiente en la actividad Akt2, pero tuvo igualmente una actividad Akt3 elevada cuando se comparó con los melanocitos. Estos datos sugieren que Akt3 era la isoforma Akt predominantemente implicada, activa en el modelo de evolución del tumor de melanoma.

Hf 474

EJEMPLO 7: Frecuencia de la Desregulación de Akt3 en Tumores de Pacientes con Melanoma

Puesto que los experimentos anteriores identificaron a Akt3 como la isoforma Akt predominantemente activa en los modelos de tumorigénesis UACC 903 (PTEN) y evolución del tumor de melanoma, estudios subsiguientes *in vivo* se enfocaron en establecer la frecuencia de la desregulación de Akt3 en tumores de pacientes con melanoma. La intensidad relativa de la Akt fosforilada total se evaluó inicialmente en lesiones melanocíticas mediante análisis inmunohistoquímico de lunares comunes, lunares displásicos, melanomas primarios y metástasis de pacientes con melanoma para determinar la frecuencia de la activación de Akt (Tabla 1). Aunque se detectaron niveles moderados de tinción en 100% de lunares comunes, se observó una fuerte tinción en 12% de los lunares displásicos, 53% de melanomas primarios y 67% de melanomas metastáticos. Estos resultados sugieren que aunque la actividad Akt puede cumplir algún papel no identificado en el desarrollo de los lunares, la actividad Akt desregulada es indicativa de un papel más importante en melanomas de fase avanzada.

El análisis de las regiones genómicas que contenían los genes Akt1, Akt2 y Akt3, de un informe publicado (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998)), no encontró amplificación. No obstante, la región 1q43-44 que contiene Akt3 experimenta aumentos del número de copias (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thomson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57 :2765-2780 (1997)), lo cual sugiere la sobreexpresión como un mecanismo que contribuye a la actividad Akt3 incrementada en melanomas. En contraste, la región 14q32 que contiene Akt1 y la región 19q13 que contiene Akt2 permanecen inmodificadas o tienden a experimentar pérdida (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thomson et al., *Cancer Genet Cytogenet*

H/6 475

83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780(1997)). Para establecer si la expresión de Akt3 incrementada podría ser un mecanismo selectivo que lleve a una actividad aumentada, se extrajeron lisados de proteína de tumores de pacientes con melanoma para comparar el nivel de expresión y actividad de Akt3 y Akt2. Se extrajo proteína de 31 melanomas metastásicos y se analizó por *Western blotting* para determinar el nivel de expresión y actividad de Akt3 y Akt2 en el material tumoral.

Tres *Western blots* independientes se usaron para cuantificar la expresión en cada muestra, la cual se comparó luego con la expresión en melanocitos. En general, 61% (19/31) de los tumores tenían expresión elevada de la proteína Akt3, variando desde un aumento de ~2-9 sobre la expresión observada en melanocitos, comparados con 10% (3/31) para Akt2. Estos resultados son consistentes con el tipo de aumentos del número de copias de la región del cromosoma 1q43-44 que contiene el gen Akt3 del que se describe en la bibliografía que ocurre en los tumores de melanoma (Bastian et al. *Cancer Res* 58:2170-2175; Thomson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104(1995); y Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997)). Aproximadamente 55% (6/11) de melanomas de sitio primario y 65% (13/20) de las metástasis de melanoma tuvieron una expresión de Akt3 incrementada. En contraste, sólo se observaron fluctuaciones sin valor cuando se comparó la expresión de Akt2 en tumores versus melanocitos. A continuación se midieron los niveles de actividad cuantificando la Akt fosforilada en cualquiera de los dos inmunoprecipitados Akt3 o Akt2. Sorprendentemente, se detectó Akt3 fosforilada (activa) en 62±0.02% (SE) de las muestras. En contraste, no se detectó Akt2 fosforilada (excepto para el control positivo) en estos tumores. Más aún, ~35% de los tumores tenía actividad Akt3 elevada en comparación con melanocitos desarrollados en cultivo. Estos datos confirman la implicación de la desregulación de Akt3 en >60% de los tumores de pacientes con melanoma en etapa avanzada y

Con formato: Sin Resultar
Con formato: Sin Resultar
Con formato: Fuente: Courier

11X 476

sugiere que la expresión aumentada es uno de los mecanismos que contribuye a una actividad Akt3 desregulada en melanomas.

EJEMPLO 8: Mecanismos Subyacentes a la Desregulación de Akt3 en Melanomas.

Los anteriores experimentos identificaron a Akt3 como la isoforma predominantemente activa *in vitro* en modelos de cultivo de células e *in vivo* en tumores de pacientes. Por lo tanto, seguidamente nos centramos en determinar los mecanismos que conducen a la actividad Akt3 desregulada en melanomas. Puesto que el modelo de tumorigénesis UACC 903 (PTEN) inicial sugería que PTEN jugaba un papel significativo regulando la actividad Akt en melanomas, examinamos si la expresión disminuida de PTEN aumentaba directa y específicamente la actividad Akt3. Para lograr este objetivo, se inactivó la expresión PTEN (actividad) mediante ARNip en melanocitos y células de melanomas primarios de fase de crecimiento radial (WM35) para medir el efecto sobre el nivel de Akt fosforilada. Se eligió la estirpe celular WM35 puesto que estas células poseen una actividad Akt3 básica insignificante y expresan la proteína PTEN (véase Figura 1C). Tal como se predijo, Figura 4A y Figura 4B muestran que la regulación por disminución, mediada por ARNip de PTEN llevó a un aumento en Akt fosforilada total (franjas 4 y 11), mientras que un control de ARNip mezclado ejerció un efecto sin valor, no significativo (franjas 2 y 9). La isoforma Akt predominante activada luego de la regulación por disminución de PTEN se determinó por co-nucleofección de ARNip contra PTEN junto con cualquiera de ARNip a Akt1 (franjas 5 y 12), Akt2 (franjas 6 y 13) o Akt3 (franjas 7 y 14). Únicamente ARNip dirigido contra Akt3 (franjas 7 y 14) redujeron el nivel de Akt fosforilada al observado en células no nucleofectadas (franjas 1 y 8) o células nucleofectadas con ARNip únicamente (franjas 2 y 9). En contraste, la reducción de los niveles de

11/8 477

proteína de Akt1 o Akt2 no redujeron la cantidad de Akt fosforilada, demostrando nuevamente la selectividad de la desregulación de Akt3. Por lo tanto, la regulación selectiva de la actividad Akt3 por PTEN es un mecanismo significativo para activar Akt3 en melanomas, puesto que la pérdida de PTEN aumenta la actividad Akt3 sin sobreexpresión. Por consiguiente, una reducción en PTEN podría, a su vez, llevar a un aumento en la concentración de PIP₃ celular (fosfatidilinosítido 3,4,5-trisfosfato), lo cual podría ser efectivo para incrementar específicamente la actividad Akt3 en melanomas. El mecanismo subyacente a esta especificidad se desconoce en la actualidad.

Estudios que implican material tumoral de pacientes con melanoma indicaron que la expresión incrementada de Akt3 podría jugar igualmente un papel significativo en aumentar la actividad Akt3 en melanomas. Para investigar esta posibilidad, se sobreexpresó Akt3 en melanocitos y células WM35 (no mostrada) que expresan la proteína PTEN. Akt3 natural marcada con HA, una versión inactivada de cinasa de Akt3 T305A/S472A (inactiva) o una Akt3 miristoilada (activa) se sobreexpresó en melanocitos (Figura 4C). A continuación las células se privaron de factores de crecimiento durante 24 horas, se volvieron a llenar con medio completo y luego se cosecharon los lisados 10 minutos después. Se usaron constructos equivalentes para Akt2 como controles (datos no mostrados). La sobreexpresión de Akt3 natural y Akt3 miristoilada llevaron a niveles incrementados de Akt total fosforilada; en comparación con vector únicamente o células nucleofectadas con Akt3 inactivada de cinasa. Más aún, la inactivación mediada por ARNip de PTEN junto con la sobreexpresión de Akt3 llevó a niveles más elevados de Akt fosforilada, comparada con la expresión de Akt3 natural sola (datos no mostrados). Por consiguiente, la sobreexpresión de Akt3 sola, o en combinación con la

X4 473

pérdida de PTEN, es un mecanismo adicional que contribuye a una actividad Akt3 elevada en melanomas.

EJEMPLO 9: Actividad Akt3 Incrementada Promueve la Tumorigénesis del Melanoma Disminuyendo la Apoptosis.

Puesto que la actividad Akt3 desregulada se observó consistentemente en tumores de melanoma, estudios subsiguientes se centraron en determinar los mecanismos por los cuales la actividad Akt3 incrementada promovía la tumorigénesis. Estirpes celulares del modelo de tumorigénesis UACC 903 (PTEN) se usaron para demostrar que una actividad Akt3 elevada promovía la tumorigénesis del melanoma en un modelo de ratones inmunitariamente desprotegidos. Un millón de células de UACC 903 (-PTEN), 36A (+PTEN) parental o una estirpe celular (-PTEN) revertiente 36A se inyectaron debajo de la piel de ratones hembra inmunitariamente desprotegidos de 4 a 6 semanas de edad y, 10 días más tarde, se midió el tamaño del tumor formado. Células 36A con una actividad Akt3 reducida fueron no tumorigénicas en comparación con células UACC 903 parentales y 36A revertientes que tenían actividad Akt3 elevada ($P < 0.5$). Aunque el potencial oncogénico de las células revertientes 36A aumentó significativamente comparado con las células 36A, el desarrollo del tumor permaneció retrasado debido a la retención de un segundo gen supresor de melanoma en el cromosoma 10, que se usó para crear este modelo (Robertson et al., *Cancer Res* 59:3596-3601(1999)). Para confirmar estas observaciones y demostrar la especificidad de la implicación de Akt3 en la tumorigénesis de melanoma, creamos un modelo UACC 903 (Akt) usando ARNip. La reducción mediada por ARNip, de la expresión de Akt3 (actividad) en células UACC 903 desaceleró significativamente el desarrollo del tumor en comparación con las células nucleofectadas con tampón únicamente, ARNip mezclado o ARNip contra

20 479

Akt2 o Akt1 ($P < 0.05$). Por consiguiente, ya sea reduciendo específicamente la actividad Akt3 usando ARNip contra Akt3 (Figura 4B) o ya sea aumentando la expresión PTEN (Figura 4A) inhibió el desarrollo del tumor de melanoma en ratones inmunitariamente desprotegidos.

Para establecer si la apoptosis incrementada era el mecanismo predominante subyacente a la inhibición del tumor *in vivo* a raíz de disminuciones en la actividad (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897(2003)), se examinó la apoptosis en los modelos UACC 903 (PTEN) (Figuras 4C, 4E) y los modelos UACC 903 (Akt) (Figuras 4D, 4F) que diferían en actividad Akt3. Estirpes celulares 36A no tumorigénicas y UACC 903 tumorigénicas y revertientes 36A se inyectaron subcutáneamente en ratones inmunitariamente desprotegidos, y masas tumorales temporal y espacialmente coincidentes que se desarrollaban en paralelo de cada tipo de célula se recolectaron entonces 4 días después para comparar la magnitud de la apoptosis, evaluada mediante TUNEL (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897(2003)). Un número significativamente mayor de células apoptóticas se observó en las masas tumorales 36A (+PTEN) que tenían una baja actividad Akt3 que en los tumores formados de las estirpes celulares UACC 903 (-PTEN) parentales o (-PTEN) revertientes 36A, las cuales tienen actividad Akt3 alta (Figuras 4C, 4E)($P < 0.05$). Resultados similares se observaron en células UACC 903, en las cuales ARNip contra Akt3 se empleó para disminuir la expresión Akt3 (actividad). Células nucleofectadas con tampón únicamente o ARNip contra Akt2 tenían aproximadamente 5 a 7 veces menos células apoptóticas que las células UACC 903 tratadas con ARNip contra Akt3 ($P < 0.05$). Por consiguiente, estos resultados demuestran que la actividad Akt3 regula preferencialmente la magnitud de la apoptosis, contribuyendo en esa forma a la supervivencia de las células de melanoma y promoviendo la tumorigénesis.

72/480

DISCUSIÓN EXPERIMENTAL PARA AKT3

En la presente invención, los inventores demuestran que Akt3 es una importante cinasa de supervivencia, en parte, responsable del desarrollo del melanoma. El modelo de melanoma UACC 903 (PTEN) que reflejaba la importancia de Akt en la tumorigénesis de melanoma se utilizó para identificar Akt3 como la isoforma predominante desregulada durante la tumorigénesis de melanoma. El uso de ARNip demostró que la inactivación selectiva de Akt3, mas no Akt1 o Akt2, disminuyó el nivel de Akt fosforilada total y redujo el potencial oncogénico de las células de melanoma. Resultados similares se encontraron en dos estirpes celulares de melanoma independientemente derivadas (WM115 y SK-MEL-24), fundamentando aún más la importancia de este descubrimiento. La relevancia clínica de esta observación se validó demostrando que la inhibición selectiva de la expresión de Akt3 (por inactivación con ARNip) o de la actividad (por expresión de PTEN) reducía significativamente el desarrollo del tumor de melanoma.

Dos mecanismos distintos que llevan a la activación de Akt3 en melanomas se identificaron en este estudio. El primer mecanismo depende de la expresión de la proteína Akt3 estructuralmente normal. El análisis de melanomas de etapa avanzada de pacientes humanos mostró una expresión incrementada en >60% de los casos. La sobreexpresión de Akt3 en melanocitos y células WM35 lleva a una actividad incrementada confirmando los resultados del tumor humano. La sobreexpresión de Akt no es única de los melanomas pero se ha documentado en varios tipos de cáncer con un número de estudios que describen amplificaciones de las isoformas Akt. Se ha descrito la amplificación de Akt1 en cáncer del estómago (Staal, S.O., *Proc Nat Acad Sciences USA* 84:5034-5037 (1987)) mientras que la amplificación del gen Akt2 se ha encontrado en neoplasias

124
481

malignas de los ovarios, páncreas, estómago y mama (Cheng et al., *Proc Nat Acad Sciences USA* 89:9267-9271 (1992); Ghent et al., *Proc Nat Acad Sciences USA* 93:3636-3641 (1996); Lu et al., *Chung-Hua I Hsueh Tsa Chih [Chinese Medical Journal]* 75:679-682 (1995); Bellacosa et al., *Int J Cancer* 64:280-285 (1995); van Dekken et al., *Cancer Res* 59:748-752(1999)). Aunque no se han relatado en melanomas amplificaciones de las regiones genómicas que contienen los genes Akt, varios informes describen aumentos del número de copias del brazo largo del cromosoma 1 que contiene el gen Akt3 (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thomson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997)). En contraste, los brazos largos del cromosoma 14 y el cromosoma 19 que contienen los genes Akt1 y Akt2, respectivamente, tienden a permanecer inmodificados o experimentan pérdida (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thomson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780(1997)). Por consiguiente, aumentos del número de copias del gen Akt3 es uno de los mecanismos que contribuye a una expresión y actividad incrementadas del Akt3 en el desarrollo del melanoma.

El segundo mecanismo identificó que la activación Akt3 selectiva en el modelo UACC 903 (PTEN) se debía, en parte, a una actividad PTEN disminuida. Una observación relacionada en melanocitos y células de melanoma primario que retienen la expresión PTEN (WM35) mostraron que la reducción, mediada por ARNip, de PTEN aumentaba específicamente la fosforilación de Akt3 (actividad), reforzando aún más la importancia de la implicación de Akt3 en el desarrollo del melanoma. Estudios publicados, que caracterizan los cambios genéticos que ocurren en material tumoral obtenido de pacientes con melanoma, ofrecen un sustento adicional para la expresión PTEN disminuida que juega un papel significativo en el desarrollo precoz del melanoma (Bastian et al., *Cancer*

27 432

Res 58:2170-2175 (1998); Thomson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997); Parmiter et al., *Cancer Genet Cytogenet* 30:313-317 (1988)). Específicamente, la pérdida de un alelo de PTEN, o la haploinsuficiencia de PTEN, ocurre comúnmente en melanomas precoces por la pérdida de una copia entera del cromosoma 10 (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175(1998); Thomson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997); Parmiter et al., *Cancer Genet Cytogenet* 30:313-317 (1988)). Bajo esta condición, se predice que la pérdida del cromosoma 10 reduce la expresión de PTEN en una sub-población de células de melanoma en evolución llevando a una activación Akt3 incrementada, dotando a estas células con una ventaja de crecimiento y supervivencia selectivos. Por lo tanto, una expresión disminuida debida a la haploinsuficiencia o la pérdida de actividad de PTEN en melanoma juega un papel importante en la progresión del tumor de melanoma aumentando específicamente la actividad Akt3.

La base molecular subyacente para la activación Akt3 selectiva, sobre Akt1 y Akt2, luego de la expresión PTEN disminuida en melanomas es desconocida. No obstante, especulamos que el mecanismo que lleva a esta especificidad involucra la interacción preferencial de PIP₃ u otras proteínas con el dominio de homología (PH) pleckstrin. El dominio PH amino-terminal media las interacciones proteína-proteína y PIP₃ lípido-proteína. El dominio PH de la Akt3 humana es ~104 aminoácidos de largo (NCBI número de acceso: NP_005456) y 84% y 78% idéntico a Akt1 y Akt2, respectivamente (Brazil et al., *Cell* 111:293-303 (2002); y Nicholson et al., *Cell Signal* 14:381-395(2002)). Más aún, dentro del dominio PH se encuentran sitios de fosforilación que difieren entre las isoformas Akt y poseen funciones no caracterizadas hasta ahora. Por ejemplo, un sitio de fosforilación, dependiente de PKC zeta, inducido por ceramida en

12/483

treonina34 (dentro del dominio PH), lleva a la inactivación de Akt1 impidiendo la unión a PIP₃ (Powell et al., *Mol Cell Biol* 23: 7794-7808 (2003)). Por otro lado, Akt2 y Akt3 tienen una serina en esta posición, que puede fosforilarse y regularse diferentemente.

Nuestro análisis de otros sitios potenciales de fosforilación dentro del dominio PH de las tres isoformas Akt identificó tres potenciales sitios Akt3 únicos. El residuo 21 de Akt3 es una asparagina mientras que los sitios equivalentes en Akt1 y Akt2 son treoninas. Más aún, se descubrió asimismo que la treonina 31 y la tirosina 49 de Akt3 diferían de las otras dos isoformas Akt (Asn31 y Ser31 de Akt1 y Akt2, respectivamente; Ala50 y Pro50 de Akt1 y Akt2, respectivamente). Por consiguiente, la regulación diferencial de sitios de fosforilación supuestos dentro del dominio PH de unión a lípidos PIP₃ pueden ofrecer una base para la especificidad de la activación de Akt3 en melanomas. Es también posible que interacciones no sospechadas entre oncogenes conocidos puedan regular selectivamente la activación de la isoforma Akt en melanomas. Por ejemplo, se ha demostrado que TCL1 une selectivamente el dominio PH de Akt3 y promueve la hetero-oligomerización de Akt1 con Akt3 llevando a la transfosforilación de las moléculas de Akt en leucoemogénesis (Laine et al., *J Biol Chem* 277:3743-3751 (2002)). TCL1 u otros factores no caracterizados en células de melanoma pueden promover la activación de Akt3 selectiva en una manera similar.

La activación de Akt3 incrementada juega también un papel significativo en la progresión a tumores agresivos más avanzados. El examen de la expresión y actividad de Akt3 en melanomas metastásicos indicó que la expresión o actividad desregulada ocurre en >60% de los melanomas metastásicos de fase avanzada. No obstante, se desconoce actualmente si la presencia de actividad Akt3 elevada puede predecir el pronóstico de la enfermedad o el resultado de regímenes terapéuticos. La

127484

medición de la activación de Akt3 en melanomas ofrece una esperanza como un indicador pronóstico más preciso, novedoso, del resultado de la enfermedad que las mediciones histopatológicas tales como la profundidad de Breslow (es decir, la distancia medida en milímetros desde la capa celular granular a la célula tumoral más profunda) y ulceración (es decir, pérdida de la epidermis que recubre el melanoma) que se emplean actualmente. Una prueba de base molecular que evalúa el porcentaje de activación de Akt3 en lesiones melanocíticas puede ser más sensible y menos subjetiva que la evaluación histológica. Este enfoque podría asimismo ser útil para seleccionar pacientes apropiados para estudios clínicos utilizando medicamentos que se diseñan para dirigir Akt3 activada u otros miembros de esta vía de señalización.

Este estudio ha demostrado que el uso de ARNip o la expresión de PTEN para reducir la actividad Akt3 pueden disminuir efectivamente el potencial oncogénico de células de melanoma alterando la sensibilidad apoptótica. Por consiguiente, células de melanoma que tienen altos niveles de actividad Akt3 están mejor adaptadas para sobrevivir en el ambiente tumoral *in vivo* y la inhibición de la actividad Akt3, ya sea directamente o interfiriendo sus reguladores corriente arriba, representa probablemente una estrategia anticáncer efectiva para pacientes con melanoma (Soengas et al., *Oncogen* 22:3138-3151 (2003); Johnstone et al., *Cell* 108:153-164 (2002)). Ciertamente, como la vasta mayoría de los agentes quimioterapéuticos trabajan induciendo apoptosis, uno predeciría que la inhibición de Akt3 podría bajar las dosis umbral de los medicamentos o la radiación requerida para una quimio- o radioterapia efectiva, proveyendo un mecanismo para atacar selectivamente células de melanoma (Soengas et al., *Oncogen* 22:3138-3151 (2003)). Por lo tanto, atacando terapéuticamente la actividad Akt3 sola o en combinación con agentes quimioterapéuticos podría constituir una terapia potencialmente importante para pacientes con melanoma

12p 435

(Soengas et al., *Oncogen* 22:3138-3151(2003)). En síntesis, hemos identificado a Akt3 como una cinasa pro-supervivencia específica, cuya actividad incrementada en tumores de melanoma se correlaciona con la progresión del tumor y dota a las células con una ventaja selectiva para proliferar y sobrevivir a estrés ambiental.

EJEMPLOS PARA B-RAF

MATERIALES Y MÉTODOS

EJEMPLO 10: Estirpes Celulares, Condiciones de Cultivo y Estado Mutacional de B-Raf:

Las estirpes celulares de melanoma humano UACC 903, 1205 Lu y C8161, así como células HEK 293T se mantuvieron en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% FBS (Hyclone, Logan, UT). La presencia o ausencia de la mutación T1796A *B-RAF* en las estirpes celulares UACC 903 y C8161 se llevó a cabo como se describe previamente (Miller CJ et al. *J Invest Dermatol.* 123: 990-2 (2004).). Más aún, la presencia de esta mutación en células UACC 903 y 1205 Lu se ha informado previamente (Miller CJ et al. *J Invest Dermatol.* 123:990-2(2004)., Tsao H et al. *J Invest Dermatol.* 122:337-41(2004)., Krasilnikov M et al. *Oncogene.* 22:4092-101(2003).).

EJEMPLO 11: Estudios de ARNip *In Vitro*:

ARNip (100 pmol) se introdujo en 1×10^6 células UACC 903, 1205 Lu o C8161 mediante nucleofección con un Nucleofector Amaxa (Colonia, Alemania) usando Solución R/programa K-17 como se describe en ref. (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64:7002-10 (2004).). La eficiencia de transfección resultante fue >90%. Luego de la nucleofección, las células se volvieron a esparcir en las placas durante 24-48 horas, luego de las cuales se recolectaron los lisados de proteína para análisis *Western blot*. Para

12X 486

medir la duración de la inactivación del ARNip, las células se recolectaron los días 0, 2, 4, 6, y 8 luego de la nucleofección con ARNip a B-Raf o C-Raf y se sometieron a análisis *Western blot*. ARNip Stealth duplicado (Invitrogen, Carlsbad, CA) se usó para estos estudios con las secuencias B-Raf modificadas de ref. (Hingorani SR et al. *Cancer Res.*;63:5198-202(2003)). Las secuencias de ARNip utilizadas fueron las siguientes: WT *B-RAF* (COM4 ó 4)-

GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU; MUT *B-RAF* (MuA or A)-

GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU; *C-RAF*-

GGUCAAUGUGCGAAAUGGAAUGAGC; *LAMIN A/C*-

GAGGAACUGGACUCCAGAAGAACA; y *VEGF*-

GCACATAGGAGAGATGAGCTTCCTA.

EJEMPLO 12: Análisis *Western Blot*:

Para el análisis *Western Blot*, se recolectaron lisados de células en placas de Petri mediante la adición de tampón de lisis que contenía 50 mM HEPES (pH7.5), 150 mM NaCl, 10mM EDTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 mM ortovanadato sódico, 0.1mM molibdato sódico, 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 20 µg/ml aprotinina, y 5 µg/ml leupeptina. Lisados celulares enteros se centrifugaron ($\geq 10.000X$ g) durante 10 minutos a 4°C para retirar los desechos de células. Las proteínas se cuantificaron usando el Análisis BCA de Pierce (Rockford, IL), y 30 µg de lisado por franja se cargaron en una NuPage Gel Life Technologies, Inc. (Carlsbad, CA). Luego de la electroforesis, las muestras se transfirieron a una membrana de polviniliden difluoruro (Pall Corporation, Pensacola, FL). Los blots se sondearon con anticuerpos de acuerdo con las recomendaciones de cada proveedor: anti-pErk y anti-pMek de Cell Signaling Technologies (Beverly, MA); anticuerpos dirigidos a B-Raf, C-Raf, Erk2 y α -enolasa de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); y un anticuerpo dirigido a

177
487

Lamin A/C de Biomeda Corp (Foster City, CA). Se conjugaron anticuerpos secundarios con peroxidasa de rábano y obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Los *immunoblots* se desarrollaron usando el sistema de detección de quimioluminiscencia intensificada (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

EJEMPLO 13: Estudios de ARNip *In Vivo*:

La experimentación animal se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en el Colegio de Medicina de la Universidad del Estado de Pensilvania. La cinética del tumor se midió mediante inyección subcutánea de 1×10^6 células UACC 903 6205 Lu nucleofectadas con ARNip en 0.2 ml de DMEM suplementado con 10% FBS en el tórax izquierdo y derecho de seis ratones inmunitariamente desprotegidos de 4-6 semanas de edad (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis. IN). Las dimensiones de los tumores en evolución se midieron usando calibres en días alternos. Para estudios de mecánica, 5×10^6 células UACC 903 nucleofectadas con ARNip se inyectaron en los ratones, y los tumores se recogieron 4 días después de la inyección de las células con el fin de medir los cambios en la proliferación celular y la apoptosis, como se describe previamente (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64:7002-10 (2004)., Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63:2881-90 (2003).).

EJEMPLO 14: Estudios de BAY 43-9006 *In Vitro* e *In Vivo*.

El compuesto BAY 43-9006 usado para estos estudios se sintetizó como se describe en ref. (Bankston D et al. *Organic Process Res Dev.* 6: 777-81 (2002).). Para evaluar los efectos inhibidores de BAY 43-9006 en B-Raf natural y mutante, células HEK 293T se transfectaron con *B-RAF* natural marcado con HA, ^{V599E}B-RAF mutante o vector (pcDNA3) usando

X24
408

fosfato cálcico como se describe previamente (Robertson GP et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:9418-23(1998).). Luego de la transfección (72 horas) el medio se reemplazó con medio DMEM suplementado con 10% FBS y 5 μ M BAY 43-9006 vehículo DMSO. Dos horas después, se recolectaron los lisados de proteína para análisis *Western blot*. Se cuantificaron los niveles de Mek y Erk fosforilada de 3 blots independientes y se estimaron las diferencias de múltiplo bajo diferentes condiciones luego de normalizar contra un control de carga de Erk 2.

Se midió el efecto de BAY 43-9006 sobre el desarrollo del tumor inyectando subcutáneamente 5×10^6 células UACC 903 o 1×10^6 células 1205 Lu en ratones inmunitariamente desprotegidos. Después de 6 días cuando se había desarrollado un tumor pequeño ($50-100 \text{ mm}^3$), los ratones recibieron una inyección intraperitoneal en días alternos, que consistía de 50 μ l de vehículo (DMSO), o el medicamento BAY 43-9006 en concentraciones de 10, 50 ó 100mg/kg de peso corporal para células UACC 903 y 50mg/kg de peso corporal para células 1205 Lu. Para estudios que implicaban pretratamiento con BAY 43-9006, 50mg/kg de peso corporal de medicamento se inyectaron intraperitonealmente dos veces (días -4 y -2) antes de la inyección subcutánea de células UACC 903 ó 1205 Lu. El mecanismo por el cual la inhibición farmacológica de ^{V399R} B-Raf mutante retrasa el desarrollo del tumor se identificó comparando tumores del mismo tamaño que se desarrollaban en paralelo. Esto se logró por inyección subcutánea de 5×10^6 células UACC 903 seguidas el día 6 por inyección intraperitoneal cada 2 días con 50mg/kg de BAY 43-9006. Para una coincidencia temporal y espacial del DMSO de control con tumores tratados con medicamento, 1×10^6 células, 2. 5×10^6 células 5×10^6 millones de células UACC 903 se inyectaron subcutáneamente y a partir del día 6 se trataron intraperitonealmente con vehículo DMSO cada 2 días. Los tumores tratados con medicamento o vehículo del mismo tamaño, que se

130
489

desarrollaban en paralelo, se recogieron los días 9, 11, 13 y 15 para comparación. En cada punto de tiempo, tumores de ratones tratados con vehículo o medicamento se recolectaron para análisis de proliferación celular, apoptosis y desarrollo vascular, como se describe previamente (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64:7002-10 (2004), Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63: 2881-90(2003)).

EJEMPLO 15: Mediciones de Apoptosis, Proliferación Celular y Densidad de Vasos en Tumores.

Mediciones de apoptosis en secciones de tumor insertadas en parafina, fijadas con formalina, se llevaron a cabo usando el kit de apoptosis TUNEL TMR Red de Roche (Mannheim, Alemania), como se describe previamente (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64:7002-10 (2004), Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63:2881-90 (2003)). Los porcentajes de proliferación celular en secciones de tumor fijadas en formalina se midieron usando el kit de proliferación celular RPN20 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), que utiliza incorporación BrdU (bromodeoxiuridina) e inmunocitoquímica. Dos horas antes de sacrificarlos, se inyectó 0.2ml de BrdU intraperitonealmente en los ratones, y los tumores se procesaron de acuerdo con las instrucciones del kit de proliferación. El número de células teñidas con BrdU se registró como el porcentaje de las células totales de tumores tratados con BAY43-9006 o vehículo (DMSO). La cuantificación de la densidad de los vasos usando un anticuerpo monoclonal anti-ratón CD31 (PECAM-1) en rata, purificado, (PharMingen, San Diego, CA) se ha descrito previamente (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64:7002-10 (2004), Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63:2881-90(2003)). El área proporcional de los tumores ocupada por los vasos sobre el área total se calculó usando el programa de software radiográfico IP Lab. Para todos los análisis del tumor, se analizó un

12/ 490

mínimo de 6 diferentes tumores con 4-6 casillas por tumor y los resultados se representan como la SEM (error estándar de la media) promedio.

EJEMPLO 16: Mediciones de pErk *In Vivo*:

Para cuantificar los cambios en los niveles de pErk en secciones del tumor insertadas en parafina, fijadas con formalina, se realizó la recuperación del antígeno con 0.01M de tampón de citrato a pH 6.0 durante 20 minutos en un baño maría a 95°C. Las laminillas se enfriaron durante 20 minutos, se enjuagaron en PBS y luego se incubaron en 3% H₂O₂ durante 10 minutos para extinguir la actividad peroxidasa endógena. A continuación, las secciones se bloquearon con 1% BSA durante 30 minutos y se incubaron con anticuerpo anti-pERK con una dilución 1:100 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) de un día para otro a 4°C. Luego de enjuagar en PBS, las secciones se incubaron con IgG anti-conejo biotinilada durante 1 hora, se enjuagó nuevamente en PBS, y se incubó con estreptavidina marcada con peroxidasa durante 30 minutos. La visualización se llevó a cabo usando el kit de sustrato AEC (aminoetil carbazol) durante 5-10 minutos (Zymed laboratories Inc., South San Francisco, CA) y los núcleos se contratiñeron con hematoxilina antes de montar la cubierta de vidrio usando una solución de montaje acuosa. El porcentaje promedio de las células $\pm$ SEM que teñían positivas para pErk se contó de un mínimo de 6 diferentes tumores con 4-6 casillas contadas por tumor.

EJEMPLO 17: Tiempos de Duplicación *In Vitro* y Períodos de Latencia del Tumor *In Vivo*.

El tiempo de duplicación *in vitro* de las células UACC 903 nucleofectadas con ARNip se calculó esparciendo en placas 5X10³ células/pocillo en 200 μ l de DMEM suplementado con 10% FBS en

12/491

múltiples hileras de pocillos en placas de 96 pocillos. Se midió el crecimiento cada 24 horas sobre un período de 5 días realizando un análisis colorimétrico en una placa cada día usando el ensayo de unión de sulforrodamina B(SRB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) y se calculó el tiempo de duplicación, como describe previamente (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63:2881-90(2003)). El período de latencia del tumor *in vivo* se midió calculando el número de días requeridos para que el tamaño medio del tumor alcanzara 10 mm³.

EJEMPLO 18: Inhibición del Crecimiento con BAY 43-9006/IC-50 de Células de Melanoma UACC 903.

Para medir los efectos inhibidores del crecimiento o IC-50 de BAY 43-9006 sobre células UACC 903, 5X10³ células/pocillo se esparcieron en placas de 96 pocillos. Luego de 24 horas, concentraciones variables de BAY 43-9006 (0, 0.02, 0.1, 0.4, 1.6, 6.3, 25, o 100uM;) se agregaron pocillos de duplicación de 8 tiras en la placa. Luego de 72 horas de crecimiento a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, se descartó el medio y las células se fijaron en 10% de ácido tricloroacético. Se calcularon las células sobrevivientes con cada concentración del medicamento usando el ensayo de unión SRB (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63:2881-90(2003)). Se empleó análisis *Western blot* para demostrar los efectos de aumentar las concentraciones de BAY 43-9006 (5, 10, 15 ó 20 uM) sobre los niveles de fosforilación de Mek 1/2 y Erk 1/2 en células UACC 903 luego de 2 hora de exposición al medicamento.

EJEMPLO 19: Análisis de Expresión de VEGF.

Para determinar la cantidad de VEGF secretado por células luego de la inactivación mediada por ARNip de la proteína B-Raf o después del tratamiento con BAY 43-9006, se utilizó el kit Quantikine de VEGF

137 492

humano (DVE00) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Células UACC 903 o 1205 Lu (5×10^5) nucleofectadas con los diferentes ARNip se esparcieron en placas de Petri de 60 mm y 24 horas más tarde el medio se reemplazó con DMEM que contenía 2% FBS. Luego de 24 horas más, se reemplazó nuevamente el medio y se recogió medio condicionado para análisis ELISA 24 y 48 horas después. Para estudios con BAY 43-9006, 3×10^5 células UACC 903 o 1205 Lu se distribuyeron en placas de Petri de 60 mm y 24 horas después se cambió el medio a DMEM que contenía 2% FBS. Luego de 24 horas más, el medio se reemplazó con DMEM suplementado con 2% FBS solo o en combinación con BAY 43-9006 (5, 10, 15 μ M) o vehículo DMSO. Después de 12 ó 24 horas, se recogió medio condicionado para análisis ELISA. El medio se aclaró por centrifugación a 14.000 rpm (4 °C) durante 5 minutos y se almacenó a -80°C. Análisis ELISA de VEGF se llevó a cabo en experimentos triplicados o duplicados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 20: Estadísticas:

En el análisis estadístico, se usó la prueba *t* de Student para comparaciones pareadas y el Análisis de Varianza de una sola variable dependiente cuantitativa (ANOVA) o la prueba Kruskal-Wallis para comparaciones en grupo, seguida por las pruebas *post hoc* apropiadas (de Dunnett, Tukey o Dunn). Los resultados se consideraron significativos con un valor P de <0.05.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

EJEMPLO 21: Direccionamiento mediado por ARNip de ^{V599E}B-Raf mutante inhibe el desarrollo del tumor de melanoma.

12/493

Tabla 2. Propiedades de crecimiento de células UACC 903 tratadas con ARNip contra B-Raf, C-Raf o ARNip mezclado

Tratamiento con ARNip	Tiempo de Duplicación <i>in vitro</i> en días (horas)	% de células proliferantes el día 4 en tumores ± SEM	Período latente para formación de tumor (días) ¹
Mezclado	1.25 (30)	10 ± 0.7	5
C-Raf	1.1 (26)	15 ± 0.6	5
B-Raf (4)	1.6 (38.4)	2 ± 0.6	14
B-Raf (A)	1.7 (40.8)	2 ± 0.4	16

¹ El período latente para la formación de tumor se definió como el número de días requeridos para que el tamaño medio del tumor alcanzara 10 mm³.

El papel del ^{V599E}B-Raf mutante en tumorigénesis de melanoma se desconoce en la actualidad. Para abordar este problema, supusimos que la inhibición de la expresión o actividad de la proteína ^{V599E}B-Raf mutante podría usarse para identificar el papel que esta proteína juega en la tumorigénesis de melanoma. Se utilizó una estrategia mediada por ARNip para inactivar la expresión de ^{V599E}B-Raf mutante en estirpes celulares UACC 903 y 1205 Lu que contenían la proteína mutante o B-Raf en la estirpe celular C8161 que carecía la mutación T1796A. El ARNip MuA o A se diseñó para reducir la expresión de proteína natural y mutante mientras que el ARNip Com 4 ó 4 sólo redujo la expresión de proteína mutante como se describe previamente (Hingorani SR et al. *Cancer Res.*; 63:5198-202(2003).). ARNip para estos estudios se introdujo en las estirpes celulares mediante nucleofección, resultante en eficiencias de transfección de >90% (datos no mostrados) (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64:7002-10 (2004).). Mediante análisis *Western blot* se midió la efectividad de ARNip

17/ 494

para reducir la expresión de la proteína B-Raf y C-Raf en células UACC 903 (Fig. 12A), 1205 Lu (Fig. 12B) y C8161 (Fig. 12C) luego de la nucleofección. A 24 y 48 horas después de la nucleofección, cada ARNip redujo sólo la expresión de la proteína contra la cual se hizo, demostrando en esa forma la especificidad y efectividad de la inactivación por ARNip en cada una de las estirpes celulares. En células UACC 903 y 1205 Lu, sólo el ARNip dirigido a B-Raf redujo los niveles de fosforilación (actividad) de las dianas corriente abajo Mek y Erk, mientras que ARNip mezclado o ARNip dirigido a C-Raf no tuvieron efecto sobre estas proteínas (Fig. 12A y Fig. 12B). La disminución máxima en los niveles de fosforilación (actividad) de Mek y Erk en células UACC 903 y 1205 Lu se observó 48 horas después de la nucleofección. En contraste, la expresión reducida de B-Raf o C-Raf en células C8161 tuvo un efecto insignificante, sin valor, sobre los niveles de Mek y Erk fosforiladas (Fig. 12C). Por consiguiente, la inhibición de la expresión de ^{V599E}B-Raf en estirpes celulares de melanoma que contenían proteína mutante lleva a una actividad reducida de Mek y Erk, aunque reducir la expresión de proteína B-Raf en células de melanoma, que carecen de la mutación T1796A, no parece afectar la actividad de dianas corriente abajo.

Para medir el efecto de la expresión de ^{V599E}B-Raf reducida (actividad) sobre el desarrollo del tumor de melanoma, se inhibió la expresión de ^{V599E}B-Raf en estirpes celulares UACC 903 y 1205 Lu usando ARNip seguido por inyección subcutánea en ratones empleando una estrategia de inactivación transitoria que hemos relatado previamente (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64:7002-10 (2004).). La inactivación mediada por ARNip de la expresión de proteína persistió durante un mínimo de 8 días en células UACC 903 (Fig. 13A) y 1205 Lu (Fig. 13B). Más aún, se observó igualmente una disminución correspondiente en los niveles de pErk durante el mismo período (Fig. 13B). El tamaño del tumor en desarrollo se midió

136 495

en días alternos hasta 17.5 días después de la nucleofección para determinar el efecto de la inactivación de B-Raf en la tumorigénesis de melanoma. Una reducción en el desarrollo del tumor se observó en ambas células UACC 903 (Fig. 13C) y 1205 Lu (Fig. 13D), en las cuales se había inactivado la expresión de la ^{V599E}B-Raf mutante. En contraste, la inhibición, mediada por ARNip, de C-Raf, un ARNip mezclado o controles de tampón no alteraron el desarrollo del tumor. La falta de un efecto luego de la inactivación de C-Raf, sugería que la señalización a través de ^{V599E}B-Raf era específicamente necesaria para el desarrollo del tumor. Por consiguiente, la reducción, mediada por ARNip, de la expresión de ^{V599E}B-Raf (actividad) en células de melanoma antes de la inyección en ratones inhibió la tumorigénesis.

Se realizó un experimento similar usando un inhibidor de cinasa Raf, llamado BAY 43-9006 para inhibir la actividad de la proteína B-Raf en células UACC 903, 1205 Lu o C8161. Se ha demostrado que este compuesto, originalmente identificado en un cribado de inhibidores de cinasa Raf, inhibe efectivamente la actividad de la proteína B-Raf natural (Lowinger TB et al. *Curr Pharm Des.* 8: 2269-78 (2002), Lyons JF et al. *Endocr Relat Cancer.* 8:219-25(2001).). Inicialmente, determinamos la concentración de BAY 43-9006 que reducía la supervivencia de la célula UACC 903 en la mitad, llamada también IC-50, y se encontró que era 5-6 uM (datos no mostrados). Por lo tanto, se eligió una concentración de 5 uM para estudios subsiguientes *in vitro*. A continuación, demostramos que BAY 43-9006 inhibía la actividad de la proteína B-Raf mutante y natural en una medida similar expresando constructos ^{V599E}B-Raf mutante o natural marcada con HA en células HEK293T (Fig. 14A). Como se describe previamente, observamos que niveles de Erk o Mek fosforilada (activa) en células que expresan ^{V599E}B-Raf eran 5-7 veces más altos que en células transfectadas con únicamente *B-RAF* natural (Davies H et al. *Nature.*

137 496

417:949-54 (2002).). Células HEK293T que expresan la proteína ^{V599E}B-Raf natural o mutante se expusieron luego a 5 uM BAY 43-9006 durante 2 horas para examinar el efecto sobre la actividad de la vía de señalización. La exposición a BAY 43-9006 redujo los niveles de Mek y Erk fosforilada en células que expresan la proteína ^{V599E}B-Raf natural o mutante en 5-6 veces y 3-4 veces, respectivamente (Fig. 14A). Por consiguiente, BAY 43-9006 inhibe la actividad de la B-Raf tanto natural como mutante.

Para demostrar que BAY 43-9006 inhibía la proteína ^{V599E}B-Raf mutante señalizante en células UACC 903, se expusieron cultivos *in vitro* durante 2 horas a concentraciones crecientes de BAY 43-9006. BAY 43-9006 redujo los niveles de Mek y Erk fosforilada (activa) en células UACC 903 en una manera sensible a la dosis (Fig. 14B). Los efectos inhibidores de BAY 43-9006 sobre la señalización de la cinasa MAP persistieron durante por lo menos 2 a 3 días en estirpes celulares UACC 903 y 1205 Lu (datos no mostrados). A continuación, evaluamos el efecto de pretratar animales con BAY 43-9006 antes de la inyección subcutánea de células UACC 903 ó 1205 Lu. Para estos experimentos, los ratones se expusieron a 50 mg/kg BAY 43-9006 durante 4 días antes de la inyección subcutánea de 5×10^6 células, la cual fue seguida por inyección intraperitoneal de medicamento cada 2 ó 3 días hasta el día 22. El desarrollo del tumor tanto de UACC 903 (Fig. 14C) y 1205 Lu (no mostrado) se inhibió significativamente (prueba *t* de Student; $p < 0.05$), y la comparación de tumores UACC 903 coincidentes en tamaño reveló la proliferación reducida y el desarrollo vascular disminuido en tumores tratados con BAY 43-9006, comparada con controles tratados con vehículo (no mostrados). Más aún, el tamaño del tumor aumentó lentamente hasta el día 8, luego del cual se niveló sin diferencia estadística entre mediciones subsiguientes del tumor (ANOVA; $P > 0.05$). Por consiguiente, la inhibición farmacológica de la actividad de ^{V599E}B-Raf mutante por el tratamiento previo del animal

X78 497

hospedero con BAY 43-9006 redujo significativamente el potencial oncogénico de las células de melanoma que expresan ^{V599E}B-Raf mutante.

Para identificar el mecanismo que lleva a la inhibición del tumor en células pretratadas con ARNip para inactivar la actividad ^{V599E}B-Raf, se midieron los porcentajes de proliferación celular y apoptosis en tumores UACC 903 4 días después de la inyección subcutánea. No se detectó diferencia en el porcentaje de apoptosis (1-2%) usando en análisis TUNNEL (datos no mostrados). No obstante, las células UACC 903 tratadas con ARNip dirigido a B-Raf tuvieron 5 a 6 veces menos células proliferantes, comparadas con células de control nucleofectadas con tampón únicamente, ARNip mezclado o ARNip *C-RAF* (Fig. 14D). Seguidamente, los tiempos de duplicación *in vitro*, los porcentajes de proliferación *in vivo* y los períodos de latencia de tumor de la estirpe celular UACC 903 se compararon para determinar si el crecimiento reducido podía explicar el desarrollo retrasado del tumor (Tabla 2). Células UACC 903 nucleofectadas con ARNip dirigido a *C-RAF* o ARNip mezclado se duplicaron en número *in vitro* cada 1.2 días (o ~29 horas), mientras que las células nucleofectadas con ARNip contra *B-RAF* se duplicaron cada 1.65 días (o ~40 horas), lo que representaba un retraso de ~38%. En contraste, el análisis de las células proliferantes en tumores mostró una diferencia significativa entre tumores de control nucleofectados con ARNip dirigido a C-Raf o ARNip mezclado (ANOVA; $p < 0.05$), que tenían 10-15% de células proliferantes, comparadas con células de tumor nucleofectadas con ARNip dirigido a B-Raf que tuvieron 2-3% células proliferantes. La reducción de ~82% en la capacidad proliferativa de las células nucleofectadas con ARNip *B-RAF* podría explicar el período retrasado de latencia del desarrollo del tumor. Por consiguiente, para tumores del mismo tamaño como controles en el día 5, células nucleofectadas con ARNip dirigido a *B-RAF* requirieron 10 días más para formar tumores del mismo

X³ 498

tamaño (Tabla 2). Puesto que se retrasó el desarrollo del tumor >200%, el porcentaje de crecimiento reducido observado *in vitro* e *in vivo* podría explicar el potencial oncogénico disminuido de estas células. Por lo tanto, la inhibición de la expresión de ^{V599E}B-Raf mutante (actividad) en células de melanoma antes de la formación del tumor redujo significativamente el potencial de crecimiento *in vivo* de células, retrasando así la tumorigénesis.

EJEMPLO 22: Inhibición del desarrollo del tumor de melanoma direccionando ^{V599E}B-Raf mutante en tumores pre-existentes.

Se desconoce actualmente si el direccionamiento de ^{V599E}B-Raf mutante en tumores establecidos de melanoma pre-existentes podría retardar el desarrollo del tumor, y en caso positivo, si el mecanismo es el mismo que el que ocurre cuando se direcciona ^{V599E}B-Raf en células antes de la formación del tumor. Por consiguiente, seguidamente examinamos si el direccionamiento farmacológico de B-Raf en tumores de melanoma pre-existentes inhibiría el desarrollo del tumor por un mecanismo similar. Cinco millones de células UACC 903, un millón de células 1205 Lu o cinco millones de células C8161 se inyectaron subcutáneamente en ratones hembra inmunitariamente desprotegidos de 4 a 6 semanas de edad. El día 6, vehículo (DMSO) o compuesto BAY 43-9006 disuelto en vehículo (10, 50 ó 100mg/kg) se administró a los ratones mediante inyección intraperitoneal cada 48 horas. Se escogió un período de 48 horas entre las administraciones de medicamento, puesto que los efectos inhibidores sobre la vía de señalización de la cinasa MAP en células UACC 903, 1205 Lu y C8161 persistieron durante por lo menos ese período (datos no mostrados). Se midió el tamaño de los tumores en desarrollo usando un calibrador micrométrico en días alternos, y los resultados se muestran para células UACC 903 en Fig. 15A y células 1205 Lu en Fig. 15B. Aunque todas las concentraciones del compuesto BAY 43-9006 desaceleraron el desarrollo

499

del tumor UACC 903, únicamente concentraciones ≥ 50 mg/kg hicieron que el desarrollo del tumor se nivelara 7 días después del inicio del tratamiento. El desarrollo del tumor en ratones tratados con BAY 43-9006 a 10 mg/kg se retrasó ~1 semana, pero los tumores UACC 903 aumentaron sostenidamente en tamaño, y los ratones tuvieron que sacrificarse el día 27 cuando los tumores alcanzaron tamaños >2.400 mm³. Para las células UACC 903, se presentó un pequeño incremento en el tamaño del tumor hasta el día 13; no obstante, después de una semana de tratamiento con el medicamento, los tamaños del tumor se estabilizaron y no hubo aumento estadísticamente significativo en los tamaños del tumor a partir de los días 13 a 31 (Fig. 15A) (ANOVA; $P>0.05$). El tratamiento de tumores 1205 Lu con 50mg/kg BAY 43-9006 redujo asimismo el desarrollo del tumor en una manera similar ocasionando una nivelación en el tamaño del tumor a partir de los días 17 a 31 (Fig. 15B)) (ANOVA; $P=0.12$). En contraste, aunque BAY 43-9006 inhibió los niveles de pMek y pErk en células C8161, no se observó diferencia en la cinética de formación del tumor (datos no mostrados). Por consiguiente, la inhibición farmacológica de la actividad de ^{V599E} B-Raf mutante retarda el desarrollo del tumor en tumores de melanoma pre-existentes, pero no produce la regresión del tumor. En contraste, la inhibición de B-Raf en células de melanoma que carecen de la mutación T1796A no pareció alterar el potencial oncogénico.

Para confirmar que el compuesto BAY 43-9006 afectaba la actividad de la vía de señalización del ^{V599E} B-Raf mutante en tumores, el porcentaje de células que expresan niveles elevados de Erk fosforilada se registró en tumores de ratones 9 días después del inicio del tratamiento con vehículo (DMSO) o vehículo que contenía 50mg/kg BAY 43-9006 (Fig. 15C). La cuantificación del número de células pErk positivas mostró que tumores tratados con BAY 43-9006 tenían ~3 veces menos células pErk positivas que los tumores tratados con vehículo de control (Fig. 15D) (prueba *t* de

44 500

Student; $P < 0.05$). El número significativamente más grande de células positivas en Erk fosforilada en tumores tratados con vehículo indicó que BAY 43-9006 estaba inhibiendo la actividad de la vía de señalización de $V599E$ B-Raf mutante *in vivo*. Por consiguiente, estos resultados demuestran que la inhibición farmacológica de $V599E$ B-Raf mutante con BAY 43-9006 reduce la vía de señalización de la cinasa MAP en tumores, mediando así la inhibición del tumor.

EJEMPLO 23: Mecánicamente, BAY 43-9006 inhibe el desarrollo vascular de tumores de melanoma pre-existentes llevando a una apoptosis incrementada.

Los experimentos anteriores mostraron una relación consistente entre la inhibición de la actividad de $V599E$ B-Raf mutante y el desarrollo reducido del tumor; por lo tanto, estudios subsiguientes se centraron en identificar el mecanismo por el cual esto ocurría en tumores de melanoma existentes. Para estos estudios, tumores UACC 903 coincidentes temporal y espacialmente, expuestos a vehículo o BAY 43-9006, se analizaron con respecto a desarrollo vascular, así como apoptosis y a porcentajes de proliferación, con el fin de identificar el evento clave que retrasa el crecimiento de tumores establecidos existentes. Cada dos días se recolectaron tumores coincidentes, comenzando en el día 9 y finalizando el día 15; porcentajes de apoptosis, crecimiento y desarrollo vascular se compararon en cada punto de tiempo (Fig. 16). Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el desarrollo vascular el día 9 entre tumores tratados con vehículo y con BAY 43-9006 (Fig. 16A) (prueba *t* de Student; $P < 0.05$). En contraste, no se detectó diferencia estadísticamente significativa en el número de células proliferantes (prueba *t* de Student; $P = 0.61$) o áreas apoptóticas (prueba *t* de Student; $P = 0.15$) en las masas del tumor el día 9 entre tumores tratados con control y BAY 43-9006 (Fig. 16B

144 501

y Fig. 16C). Sin embargo, para todos los análisis del día 11 en adelante, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre tumores tratados con control y con medicamento (prueba *t* de Student; $P < 0.05$). Colectivamente, estos datos sugieren que el desarrollo vascular significativamente reducido, observado el día 9 en tumores tratados con BAY 43-9006 fue un evento iniciador que lleva a un crecimiento desacelerado del tumor. La apoptosis se hizo evidente en los tumores tratados con BAY 43-9006 el día 11 y ocupó hasta el 25% del área del tumor el día 15 (Fig. 16B). El día 20, ~50% del área del tumor estaba experimentando apoptosis (datos no mostrados). BAY 43-9006 afectó igualmente la proliferación celular tumoral de tumores pre-existentes llevando a una disminución del 32-57% en el porcentaje de células proliferantes (Fig 16C). Colectivamente, estos datos llevaron a la conclusión de que la inhibición del desarrollo vascular es un evento clave que lleva a la inhibición del crecimiento de tumores de melanoma pre-existentes.

Puesto que el desarrollo vascular en tumores ocurre mediante la angiogénesis, o el crecimiento de nuevos vasos de los lechos vasculares circundantes, y se desencadena por factores angiogénicos secretados por las células tumorales (Carmeliet P, Jain RK. *Nature*. 407:249-57 (2000).), predijimos que la inhibición mediada por BAY 43-9006 y la inhibición mediada por ARNip de ^{V599B}-Raf reducían la actividad de un factor angiogénico clave, disminuyendo así el desarrollo vascular (Kranenburg O et al. *Biochim Biophys Acta*. 1654:23-37 (2004)., Jain RK. *Semin Oncol*. 29: 3-9(2002).). Para examinar esta posibilidad, se utilizó un análisis ELISA con el fin de determinar si la secreción de VEGF disminuía luego de la inhibición de ^{V599B}B-RAF. Inicialmente, células UACC 903 y 1205 Lu, en las cuales se inhibió la expresión de ^{V599B}B-Raf usando ARNip, se examinaron y revelaron una reducción significativa en la secreción de

147 502

VEGF, comparada con controles (Fig. 17A). Seguidamente, los efectos de la inhibición, mediada por BAY 43-9006, de ^{V599E}B-Raf en células UACC 903 y 1205 Lu se examinaron y se encontró también que disminuían la secreción de VEGF en una manera dependiente de la dosis (Fig. 17B). Para determinar si la reducción, mediada por ARNip, de VEGF resultaba en una inhibición del tumor similar a la observada luego de la inhibición de ^{V599E}B-Raf, ARNip contra VEGF se nucleofectó en células UACC 903 ó 1205 Lu. Se observó una expresión VEGF disminuida usando ARNip específico de VEGF (Fig. 17A), que redujo el potencial oncogénico de células UACC 903 (Fig. 17C) y 1205 Lu (Fig. 17D) en una manera consistente con la que ocurría luego de la expresión ^{V599E}B-Raf disminuida. Por consiguiente, la secreción de VEGF reducida, mediada por la actividad ^{V599E}B-Raf disminuida llevó a la inhibición del desarrollo vascular, lo cual afectó consecuentemente el desarrollo del tumor de melanoma.

DISCUSIÓN EXPERIMENTAL PARA B-Raf

Este estudio demuestra que el uso de ARNip o la inhibición farmacológica de la expresión de ^{V599E}B-Raf mutante (actividad) reducen efectivamente el potencial oncogénico de las células de melanoma disminuyendo la capacidad proliferativa y/o angiogénica de la célula tumoral. Como tales, células de melanoma que tengan ^{V599E}B-Raf están mejor adaptadas para proliferación en el entorno del tumor *in vivo*. Hemos demostrado que la reducción dirigida de la expresión ^{V599E}B-Raf (actividad) en células de melanoma antes del desarrollo del tumor disminuyó significativamente el crecimiento potencial de las células de melanoma, inhibiendo en esa forma el desarrollo del tumor. En contraste, la apoptosis no jugó un papel significativo en este proceso. Más aún, la inhibición del desarrollo del tumor sólo se observó en células en las cuales se había inactivado la expresión de ^{V599E}B-Raf mutante y no a raíz de la inactivación

H44 503

de C-Raf o a raíz de la inactivación de B-Raf en células de melanoma que carecían de la mutación T1796A *B-RAF*. Por lo tanto, es evidente que la señalización a través de ^{V599E}B-Raf fue específicamente necesaria para el desarrollo del tumor de melanoma. Estos datos son consistentes con nuestro estudio previo que demostró que la inhibición, mediada por ARNip, de ^{V599E}B-Raf en células de melanoma WM793 redujo el potencial de crecimiento *in vitro* de estas células (Hingorani SR et al. *Cancer Res.*; 63: 5198-202(2003)). Estudios similares *in vitro* usando células UACC 903 en este informe confirman aún más estas primeras observaciones. La inactivación de la expresión ^{V599E}B-Raf mutante (actividad) redujo también específicamente la señalización Erk constitutiva, llevando a un crecimiento reducido, lo que no ocurrió luego de la inactivación de C-Raf. Por consiguiente, ^{V599E}B-Raf mutante promueve el crecimiento de células de melanoma tanto *in vitro* como *in vivo*; más aún, la inhibición dirigida antes del desarrollo del tumor inhibe la tumorigénesis mediada a través del crecimiento reducido de las células tumorales.

El direccionamiento de ^{V599E}B-Raf mutante en tumores establecidos pre-existentes detuvo el crecimiento; no obstante, la inhibición del crecimiento jugó solamente un papel parcial en este proceso. Más significativamente, la comparación de tumores idénticos en tamaño y tiempo reveló que la inhibición del desarrollo vascular jugó un papel iniciador en retrasar el crecimiento del tumor. Como en todos los tumores sólidos, el desarrollo vascular ocurre gracias a la angiogénesis, en la cual el crecimiento de nuevos vasos de lechos vasculares circundantes es desencadenado por factores angiogénicos secretados por células tumorales (Carmeliet P, Jain RK. *Nature*. 407:249-57 (2000)). En este estudio, encontramos que la inhibición de ^{V599E}B-Raf reducía la secreción de VEGF por células de melanoma UACC 903 y 1205 Lu. Se ha informado que B-Raf ejerce un papel importante en el desarrollo vascular embrionario,

JH 504

puesto que ratones con *B-RAF* inactivado exhiben una muerte endotelial significativa, que lleva a hemorragia y letalidad embrionaria (Wojnowski L et al. *Nat Genet*; 16:293-7(1997)). No obstante, no observamos muerte celular endotelial significativa en vasos tumorales pre-existentes luego de la inhibición de ^{V599E}B-Raf usando BAY 43-9006. Más bien, inhibición la angiogénesis inhibida por ^{V599E}B-Raf (Kranenburg O et al. *Biochim Biophys Acta*. 1654:23-37(2004)., Jain RK. *Semin Oncol*. 29:3-9(2002).), mediada a través de la secreción VEGF reducida por las células tumorales. Esta observación está respaldada por evidencia publicada, en la cual la secreción VEGF disminuida llevó a una angiogénesis reducida, inhibiendo en esa forma el potencial oncogénico de células cancerosas (Heidenreich R et al. *Int J Cancer*. 111:348-57(2004)., Inai T et al. *Am J Pathol*. 165:35-52(2004).). Por consiguiente, la secreción de VEGF disminuida, mediada por una reducción en la señalización de ^{V599E}B-Raf mutante lleva a la inhibición de angiogénesis, deteniendo el crecimiento de tumores de melanoma pre-existentes.

Nuestro estudio muestra además que BAY 43-9006 inhibe la actividad ^{V599E}B-Raf *in vitro* e *in vivo*, conduciendo a una fosforilación reducida de dianas corriente abajo Mek y Erk, que desaceleró el desarrollo del tumor de melanoma. Observamos que el pre-tratamiento de animales con BAY 43-9006 redujo el desarrollo del tumor de melanoma en una manera similar a la inhibición mediada por ARNip. No obstante, el tratamiento con BAY 43-9006 sólo retardó el desarrollo de tumores establecidos interrumpiendo su desarrollo vascular. No ocurrió regresión completa de los tumores, más bien el tamaño se volvió relativamente estático después del tratamiento. Esta observación concuerda con datos preliminares de estudios clínicos en los cuales la monoterapia con BAY43-9006 fue relativamente inefectiva para el tratamiento de pacientes con melanoma de fase avanzada (Tuveson DA et al. *Cancer Cell*. 4:95-8

46 505

(2003)., Ahmad T et al. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 23:708 (2004).). Sin embargo, en combinación con la quimioterapia tradicional (paclitaxel y carboplatino), un porcentaje de respuesta del 50% ocurrió en pacientes (Tuveson DA et al. *Cancer Cell*. 4:95-8 (2003)., Flaherty K et al. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 23: 708 (2004).). Por lo tanto, aunque BAY 43-9006 desacelera el desarrollo del tumor, es probable que el fármaco necesite combinarse con otras sustancias terapéuticas sinérgicas para producir regresión de tumores pre-existentes establecidos (Tuveson DA et al. *Cancer Cell*. 4:95-8 (2003)., Bollag G et al. *Curr Opin Investig Drugs*. 4: 1436-41 (2003)., Lyons JF et al. *Endocr Relat Cancer*. 8:219-25 (2001).). Es también posible que la vía de administración del medicamento pueda alterar la eficacia de BAY 43-9006 en pacientes con melanoma. Aunque el estudio clínico involucraba la administración oral del medicamento, nuestro estudio administró el medicamento por inyección intraperitoneal cada 2 a 3 días. Una vía alternativa de administración podría ser más efectiva aumentando la biodisponibilidad local del medicamento (Sparreboom A et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2031-5(1997)., Bardelmeijer HA et al. *Cancer Research*. 62:6158-64(2002)., Hale JT et al. *Bioch Pharm*. 64: 1493-502 (2002)., Kimura Y et al. *Cancer Chemother Pharm*. 49:322-8 (2002).). Por consiguiente, el direccionamiento terapéutico de la actividad de ^{V599E}B-Raf en combinación con agentes quimioterapéuticos puede ofrecer una estrategia efectiva para contraer tumores de melanoma establecidos que contienen esta proteína mutante.

En conclusión, identificamos mecanismos por los cuales ^{V599E}B-Raf mutante promueve el desarrollo del tumor de melanoma y mostramos cómo esta mutación dota a las células de melanoma con ventajas angiogénicas y de crecimiento selectivo en el entorno del tumor.

H/K 506

EJEMPLO 24: Experimentos de Intercambio de Dominio Akt3, Resultados y Discusión

El intercambio de dominio entre las isoformas Akt ha identificado la región de Akt3 que lleva a la activación preferencial de Akt3 y no Akt1 o Akt2 en melanoma. La activación se mide como los niveles de fosforilación de treonina 308 o serina 472 en Akt3; o por inmunoprecipitación de Akt3 seguida por análisis de cinasa *in vitro* en el cual Crostide se fosforila por Akt3 para calcular la actividad. Dominios de Akt3 se intercambiaron con los de Akt2 o Akt1 y constructos que contenían los genes quiméricos se nucleofectaron en las estirpes celulares de melanoma WM35 o UACC903. Akt3 miristoilada y Akt2 sirvieron como control positivo mientras que la Akt3 inactivada (T305A/S472A) y Akt2 (T309A/S474A) sirvieron como controles negativos. La transferencia de Akt3 natural llevó a una actividad incrementada en contraste con Akt2 natural, que no lo hizo, lo cual demostró esa especificidad para la activación de Akt3 en células de melanoma. Constructos en los cuales el dominio de homología pleckstrin de Akt3 (aminoácidos 1-110) se conectó a los dominios catalíticos-reguladores de Akt2 no llevaron a la activación. En contraste, constructos en los cuales el dominio de homología de pleckstrin de Akt2 (aminoácidos 1-110) se conectó a los dominios catalíticos-reguladores de Akt3 (aminoácidos 111-497) se activaron. Esto delinea la región crítica que lleva a la activación Akt3 preferencial en melanomas de aminoácidos 111-497. Ésta es la región a la cual pueden dirigirse agentes terapéuticos para prevenir específicamente la activación Akt3 en melanomas.

Aunque la presente invención se ha descrito en conjunción con las incorporaciones específicas divulgadas anteriormente, muchas alternativas, modificaciones y variaciones de las mismas serán evidentes a las personas de habilidad ordinaria en el arte. Todas esas alternativas, modificaciones y

147 507

variaciones tienen como finalidad quedar incluidas en el espíritu y ámbito de la presente invención. Todos los documentos (por ejemplo, publicaciones y solicitudes de patente) citados aquí se incorporan por referencia en igual medida, como si cada documento individual se indicara específica e individualmente para incorporarse por referencia.

REFERENCIAS:

- Ahmad T, Marais R, Pyle L, al. e. BAY 43-9006 in patients with advanced melanoma: The Royal Marsden experience. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004;23:708.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15(23):6541-51 (1996).
- Andjelkovic M, Jones PF, Grossniklaus U, Cron P, Schier AF, Dick M, Bilbe G, Hemmings BA. Developmental regulation of expression and activity of multiple forms of the *Drosophila* RAC protein kinase. *J Biol Chem.* 270(8):4066-75 (1995).
- Atkins, J.H., and Gershell, L.J., Selective anticancer drugs, *Nature Rev. Drug Dis* 1:491-492 (2002).
- Ballo, M.T., and Ang, K.K., Radiation therapy for malignant melanoma, *Surgical Clinics North Am* 83:323-342 (2003).
- Bankston D, Dumas J, Natero R, Riedl B, Monahan M-K, Sibley R. A Scaleable Synthesis of BAY 43-9006: A Potent Raf Kinase Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Organic Process Res Dev* 2002;6:777-81.
- Bardelmeijer HA, Ouwehand M, Buckle T, et al. Low systemic exposure of oral docetaxel in mice resulting from extensive first-pass metabolism is boosted by ritonavir. *Cancer Research* 2002;62:6158-64.

146 508

- Bastian, B.C., LeBoit, P.E., Hamm, H., Brocker, E.B., and Pinkel, D., Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization, *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998).
- Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., and Masciullo, V., Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas, *Int J Cancer* 64:280-285 (1995).
- Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther*. 3(3):268-75. Epub 2004 (2004).
- Bollag G, Freeman S, Lyons JF, Post LE. Raf pathway inhibitors in oncology. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4:1436-41.
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 26(11):657-64 (2001).
- Brazil, D.P., Park, J., and Hemmings, B.A., PKB binding proteins. Getting in on the Akt, *Cell* 111:293-303 (2002).
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 29(5):233-42 (2004).
- Brodbeck D., Cron, P., and Hemmings, B.A., A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain, *J Biol Chem* 274:9133-9136 (1999).
- Brodbeck D, Hill MM, Hemmings BA. Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*. 276(31):29550-8. Epub 2001 (2001).

H/S 509

- Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62:6997-7000.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- Chang F, Steelman LS, Shelton JG, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Oncol* 2003;22:469-80.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, MX., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., et al., Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene, *Genes Dev* 15:2003-2208 (2001).
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N., and Testa, J.R., AKT2 a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinase, is amplified in human ovarian carcinomas, *Proc Nat Acad Sciences USA* 89:9267-9271 (1992).
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R., Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA, *Proc Nat Acad Sciences USA* 93:3636-3641 (1996).
- Cho, H., Mu, J., Kam, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J., Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta), *Science* 292:1728-1731 (2001).
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Fent, F., and Birnbaum, M J., Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for

15/510

- maintenance of glucose homeostasis in mice, *J Biol Chem* 276:38349-38352 (2001).
- Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003;15:463-9.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13(22):2905-27 (1999).
- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
- Dhawan, P., Singh, A.B., Ellis, D.O.L., and Richmond, A., Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression, *Cancer Res* 62:7335-7342 (2002).
- Ferguson KM, Kavran JM, Sankaran VG, Fournier E, Isakoff S J, Skolnik EY, Lemmon MA. Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell.* 6(2):373-84 (2000).
- Flaherty K, Brose MS, Schuchter L, et al. Phase I/II trial of BAY 43-9006, carboplatin and paclitaxel demonstrates preliminary antitumor activity in the expansion cohort of patients with metastatic melanoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004;23:708.
- Gorden A, Osman I, Gai W, et al. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res* 2003;63:3955-7.
- Grossman, D., and Altieri, D.C., Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets, *Cancer Metastasis Rev* 20:3-11 (2001). Hale JT, Bigelow JC, Mathews LA, McCormack JJ. Analytical and pharmacokinetic studies with 5-chloro-2'-deoxycytidine. *BiochPharm* 2002;64:1493-502.

152511

- Heidenreich R, Machein M, Nicolaus A, et al. Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF receptor-1 mutants. *Int J Cancer* 2004; 111:348-57.
- Helmbach, H., Rossmann, E., Kern, M.A., and Schadendorf, D., Drug-resistance in human melanoma, *Int J Cancer* 93:617-622 (2001).
- Herlyn, M., *Molecular and cellular biology of melanoma*: Austin: R.G. Landes Co. (1993).
- Hersey, P., Adjuvant therapy for high-risk primary and resected metastatic melanoma, *Int Med J* 33:33-43 (2003).
- Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* 2003 ;63:5198-202.
- Hsu, M.-Y., Elder, D.E., and Herlyn, M., Melanoma: The Wistar (WM) Cell Lines. In *Human Cell Culture*. J.R.W.M.a.B. Palsson, editor. Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 259-274 (1999).
- Inai T, Mancuso M, Hashizume H, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 2004;165:35-52.
- Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.
- Jemal, A., Devesa, S.S., Hartge, P., and Tucker, M.A., Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States., *J Nat Cancer Inst* 93:678-683 (2001).
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., and Thun, M., Cancer statistics, 2002. *Ca: a Cancer Journal for Clinicians* 52:23-47 (2002).
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., and Lowe, S.W., Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy, *Cell* 108:153-164 (2002).

HJ 512

- Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul.* 2(12):1001-9 (1991).
- Kimura Y, Aoki J, Kohno M, Ooka H, Tsuruo T, Nakanishi O. P-glycoprotein inhibition by the multidrug resistance-reversing agent MS-209 enhances bioavailability and antitumor efficacy of orally administered paclitaxel. *Cancer Chemother Pharm* 2002;49:322-8.
- Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654:23-37.
- Krasilnikov, M., Adler, V., Fuchs, S.Y., Dong, Z., Haimovitz-Friedman, A., Herlyn, M., and Ronai, Z., Contribution of phosphatidylinositol 3-kinase to radiation resistance in human melanoma cells, *Mol Carcinogenesis* 24:64-69 (1999).
- Kumar et al., BRAF Mutations in Metastatic Melanoma, *Clinical Cancer Research*, 9:3362-3368, (2003).
- Laine, J., Kunstle, G., Obata, T., and Noguchi, M., Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family, *J Biol Chem* 277:3743-3751 (2002).
- Lang J, Boxer M, MacKie R. Absence of exon 15 BRAF germline mutations in familial melanoma. *Hum Mutat* 2003;21:327-30.
- Laud K, Kamnengiesser C, Avril MF, et al. BRAF as a melanoma susceptibility candidate gene? *Cancer Res* 2003;63:3061-5.
- Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell.* 6(2):385-94 (2000).
- Lowinger TB, Riedl B, Dumas J, Smith RA. Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase. *Curr Pharm Des* 2002;8:2269-78.
- Lu, Y., Li, Z., and Sun, M., Multiple gene alterations involved in the processor of human gastric carcinogenesis, *Chung-Hua I Hsueh Tsa Chih [Chinese Medical Journal]* 75:679-682(1995).

1752

- Luo Y, Smith RA, Guan R, Liu X, Klinghofer V, Shen J, Hutchins C, Richardson P, Holzman T, Rosenberg SH, Giranda VL. Pseudosubstrate peptides inhibit Akt and induce cell growth inhibition. *Biochemistry*. 43(5): 1254-63 (2004).
- Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:219-25.
- Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653:25-40.
- Mertens, F., Johansson, B., Hoglund, M., and Mitelman, F., Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms, *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997).
- Meyer P, Klaes R, Schmitt C, Boettger MB, Garbe C. Exclusion of BRAFV599E as a melanoma susceptibility mutation. *Int J Cancer* 2003; 106:78-80.
- Miller CJ, Cheung M, Sharma A, et al. Method of Mutation Analysis May Contribute to Discrepancies in Reports of BRAF Mutation Frequencies in Melanocytic Neoplasms. *J Invest Dermatol* 2004;123:990-2.
- Mitsuuchi, Y., Johnson, S.W., Moonblatt, S., and Testa, J.R., Translocation and activation of AKT2 in response to stimulation by insulin, *J Cellular Biochem* 70:433-441 (1998).
- Nicholson, K.M., and Anderson, N.G., The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy, *Cell Signal* 14:381-395 (2002).
- Niv MY, Rubin H, Cohen J, Tsirolnikov L, Licht T, Peretzman-Shemer A, Cna'an E, Tartakovsky A, Stein I, Albeck S, Weinstein I, Goldenberg-Furmanov M, Tobi D, Cohen E, Laster M, Ben-Sasson SA, Reuveni H. Sequence-based design of kinase inhibitors applicable for therapeutics and target identification. *J Biol Chem*. 279(2):1242-55. Epub 2003 (2004).

47 514

- Obata T, Yaffe MB, Leparo GG, Piro ET, Maegawa H, Kashiwagi A, Kikkawa R, Cantley LC. Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J Biol Chem*. 275(46):36108-15 (2000).
- Parmiter, A.H., Balaban, G., Clark, W.H., Jr., and Nowell, P.C., Possible involvement of the chromosome region 10q24-q26 in early stages of melanocytic neoplasia, *cancer Genet Cytogenet* 30:313-317 (1988).
- Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G., et al., Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2, *Genes Dev*. 17:1352-1365 (2003).
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20.
- Powell, D.J., Hajdich, E., Kular, G., and Hundal, H.S., Ceramide Disables 3-Phosphoinoside Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-Dependent Mechanism, *Mol Cell Biol* 23:7794-7808 (2003).
- Robertson, G.P., Herbst, R.A., Nagane, M., Huang, H.J., and Cavenee, W.K., The chromosome 10 monosomy common in human melanomas results from loss of two separate tumor suppressor loci, *Cancer Res* 59:3596-3601 (1999).
- Robertson GP, Furnari FB, Miele ME, et al. In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9418-23.
- Sasaki Y, Niu C, Makino R, et al. BRAF Point Mutations in Primary Melanoma Show Different Prevalences by Subtype. *J Invest Dermatol* 2004; 123:177-83.

H76 515

- Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* 2003;63:756-9.
- Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(10):760-8 (2001).
- Scheid MP, Woodgett JR. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett*. 546(1): 108-12 (2003).
- Schalick, W.O., Albino, A.P., Reed, J.A., Fountain, J.W., Scott, G.A., SuPont, G., Puri, N., Herlyn, M., Halern, A.C., Gallagher, R.P., et al., *Cutaneous Oncology*. Maiden, MA:Blackwell Science, Inc. 180-340 (1998).
- Serrone, L., and Herseym, P., The chemoresistance of human malignant melanoma: an update, *Melanoma Res* 9:51-58 (1999).
- Serrone, L., Zeuli, M., Sega, F.M., and Cognetti, F., Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview, *J Exp Clin Cancer Res* 19:21-34 (2000).
- Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003; 104:527-32.
- Soengas, M.S., and Lowe, S.W., Apoptosis and melanoma chemoresistance, *Oncogene* 22:3138-3151 (2003).
- Staal, S.P., Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT 1 in a primary human gastric acenocarcinoma, *Proc Nat Acad Sciences USA* 84:5034-5037 (1987).
- Stahl, J.M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N.R., Shanmugam, S., and Robertson, G.P., Loss of PTEN Promotes Tumor Development in Malignant Melanoma, *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003).

17
516

- Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:2031-5.
- Stahl JM, Sharma A, Cheung M, et al. Deregulated Actividad Akt3 promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 2004;64:7002-10.
- Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, et al. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene* 2004.
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tsichlis, P.N., Nicosia, S.V., et al., AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells, *Am J Path* 159:431-437 (2001).
- Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(20): 10983-5 (2001).
- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122:337-41.
- Tuveson DA, Weber BL, Herlyn M. BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. *Cancer Cell* 2003;4:95-8.
- Thompson, F.H., Emerson, J., Olson, S., Weinstein, R., Leavitt, S.A., Leong, S.P., Emerson, S., Trent, J.M., Nelson, M.A., Salmon, S.E., et al., Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanoma. Subset analysis of near-diploid and simple karyotypes, *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995).

18 517

- Uribe P, Wistuba, II, Gonzalez S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol* 2003;25:365-70.
- Van Dekken, EL, Geelen, E., Dinjens, W.N., Wijnhoven, B.P., Tilanus, H.W., Tanke, H.J., and Rosenberg, C, Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14Q31-32.1 discriminates between esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinomas, *Cancer Res* 59:748-752 (1999).
- Waldmann, V., Wacher, J., and Deichmann, M., Absence of mutations in the pleckstrin homology (PH) domain of protein kinase B (PKB/Akt) in malignant melanoma, *Melanoma Res* 12:45-50 (2002).
- Waldmann, V., Wacker, J., and Diechmann, M., Mutations of the activation-associated phosphorylation sites at codons 308 and 473 of protein kinase B are absent in human melanoma, *Arch Dermatol Res* 293:368-372 (2001).
- Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, et al. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 1997;16:293-7.
- Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, et al. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2003;121:1160-2.