

06-94108

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



BT
A

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

~~DCT~~

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL:

06-94108

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO METODOS COMBINATORIOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE MELANOMA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61P 35/00

71. SOLICITANTE THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION

DOMICILIO UNIVERSITY PARK, PA 10802-1504, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO JUAN PA3LO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C. ✓

PETITORIO

AS: 101.954



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-094108- -00000-0000
Fec: 2006-09-19 16:19:45 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 318

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

19/10/06.

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: THE PENN STATE RESEARCH
FOUNDATION

Dirección: 304 Old Main, University Park, PA 16802-
1504, 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. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200 Fax 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: Gavin P. Robertson, Mark Kester, Lakshman Sandi-Rasegarane

Dirección: 304 Old Main, University Park, PA 16802-1504, US; 304 Old Main, University Park,
PA 16802-1504, US; 304 Old Main, University Park, PA 16802-1504, US (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/008950 Fecha 18-03-2005

Publicación Internacional No. WO 2005/089443 A2 Fecha 29-09-2005

Título (54): METODOS COMBINATORIOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE
MELANOMA

7 Clasificación Internacional (51) A61P 35/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

19-03-2004

(31) Número de Solicitud

60/554.509

9 Comprobante de pago No. 06-52.713

Fecha 18-09-2006

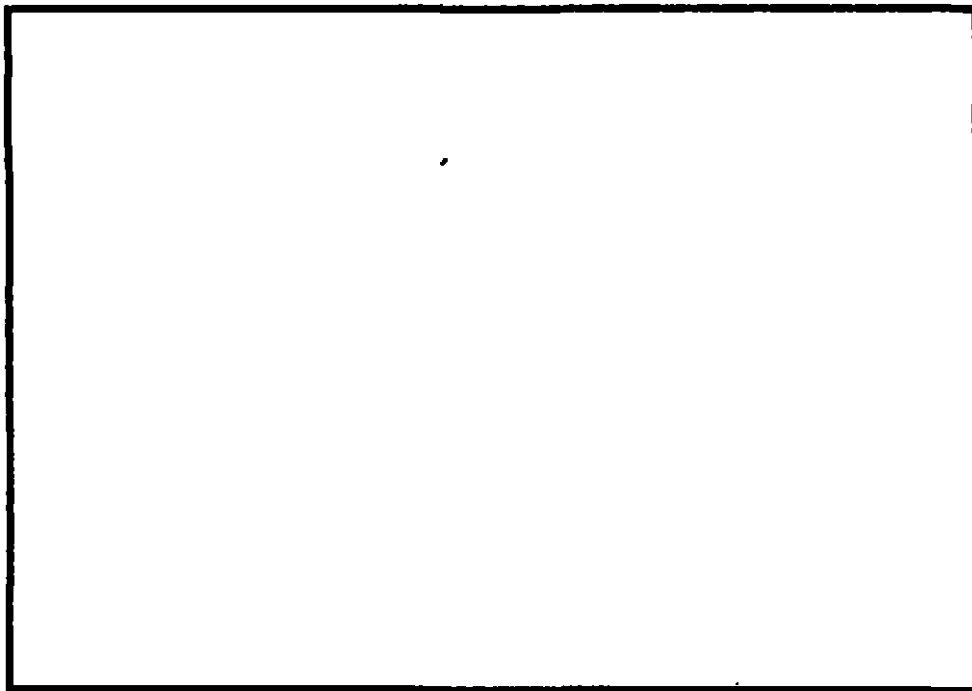
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

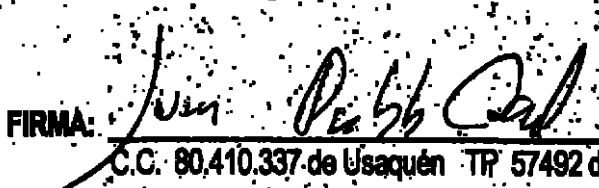
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$463.000
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Listado de Secuencias
Documentos PCT
Tarjeta de Propietarios

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

3

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-094108- -00000-0000
Fec: 2006-09-18 16:19:45 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII
Evo: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 318

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 52,713
FECHA : JULIO 12 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vir. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54971425	12/07/2006	13,940.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

folio 4
Tijeta tematica

1
1



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/089443 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2005/018950

(22) International Filing Date: 18 March 2005 (18.03.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

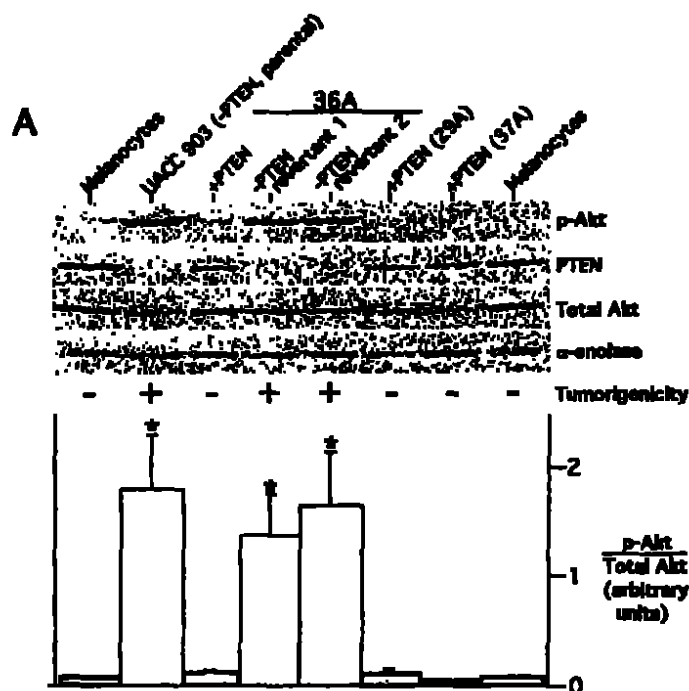
(30) Priority Data:
60/554,509 19 March 2004 (19.03.2004) US(71) Applicant (for all designated States except US): THE
PENN STATE RESEARCH FOUNDATION [US/US];
304 Old Main, University Park, PA 16802-1504 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ROBERTSON,
Gavin, P. [US/US]; 304 Old Main, University Park, PA
16802-1504 (US). KESTER, Mark [US/US]; 304 Old
Main, University Park, PA 16802-1504 (US). SANDI-
RASEGARANI, Leikahman [US/US]; 304 Old Main,
University Park, PA 16802-1504 (US).(74) Agent: LEHMAN BEIL, Junee; McKee, Voorhes &
sease, PLC, 801 Grand Avenue, Suite 3200, Des Moines,
IA 50309 (US).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continued on next page)

(54) Title: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF MELANOMA



(57) Abstract: The present invention provides a rational basis for combining targeted therapies together with selected chemotherapeutics, which does not currently exist for the treatment of melanoma. The present invention is based on the present inventors' discovery that Akt3 regulates apoptosis and V599B B-Raf regulates growth and vascular development in melanoma. Inventors are the first to recognize an effective combined targeted therapeutic for treating melanoma. In one embodiment, the invention provides a method for inducing apoptosis in a melanoma tumor cell by reducing Akt3 activity. In yet another embodiment, the invention provides a method for inducing apoptosis in a melanoma tumor cell comprising contacting a melanoma tumor cell with an agent that reduces Akt3 activity. Consequently, the method provided restores normal apoptotic sensitivity to a melanoma tumor cell, thereby allowing the administration of a lower concentration of chemotherapeutic agents resulting in decreased toxicity to a patient. The present inventors' contemplate a method for treating a melanoma tumor in a mammal comprising: administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent

to induce apoptosis; and administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent to reduce angiogenesis and cell proliferation. Also disclosed herein is a method for treating a melanoma in a mammal comprising: administering to a melanoma tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces Akt3 activity; administering to a melanoma tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces V599B B-Raf activity, thereby treating a melanoma tumor. In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition for treating a melanoma tumor comprising: an agent that reduces Akt3 activity; and a carrier.



Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF MELANOMA

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

- 5 This application claims priority under 35 U.S.C. § 119 of a provisional application U.S. Serial No. 60/554,509 filed March 19, 2004, which application is hereby incorporated by reference in its entirety.

GRANT REFERENCE

- 10 This application is supported by The Foreman Foundation for Melanoma Research and American Cancer Society (RSG-04-053-01-GMC).

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 15 Of the three major forms of skin cancer, malignant melanoma carries the highest risk of mortality from metastasis (Schalick et al., Blackwell Science, Inc. Malden, MA 180-348 (1998); Jemal et al., J. Nat. Cancer Inst. 93:678-683 (2001); and Jemal et al., Ca: a Cancer Journal for Clinicians 52:23-47 (2002)). The prognosis for patients in the late stages of this disease remains very poor with average survival from six to ten months. (Jemal et al., Ca: A Cancer Journal for Clinicians 52:23-47 (2002); and Soengas et al.,
20 Oncogen 22:3138-3151 (2003)). Currently, there is no effective long-term treatment for patients suffering from the advanced stages of this cancer despite many clinical trials testing the efficacy of a wide variety of therapeutics ranging from surgery to immuno-, radio- and chemotherapy (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);
25 Helmbach et al., Int J Cancer 93:617-622 (2001); Ballo et al., Surgical Clinics North Am 83:323-342 (2003); and Hersey, P., Int Med J 33:33-43 (2003)). The lack of effective therapeutic regimes is due, in part, to a lack of information about the predominant genes altered during melanoma development, and therapies specifically targeted to correct these defects (Serrone et al., J Exp Clin Cancer Res 19:21-34 (2000); and Atkins et al., Nature
30 Rev. Drug Dis 1:491-492 (2002)).

Patients with metastatic (Stage IV) malignant melanoma have a median survival of approximately one year (Balch et al., 1993; Koh, 1991). Current standard treatment

consists of combination chemotherapy with agents such as cisplatin, DTIC, and BCNU, with or without cytokines such as interleukin-2 (IL-2) or interferon-.alpha. (IFN-.alpha.) (Balch et al., 1993; Koh, 1991; Legha and Buzaid, 1993). Response rates to chemotherapy have been reported to be as high as 60%, yet only approximately 5% of patients experience
5 long-term survival, regardless of the therapeutic regimen employed. Conventional chemotherapy aims to control the growth of cancer by targeting rapidly growing cells. However, this function is not specific, as many normal cells, such as those of the bone marrow and the intestinal epithelium, also have a basal level of proliferation. Therefore, many normal cells of the body also are susceptible to the toxic effects of chemotherapy,
10 and conventional chemotherapy can impart a substantial degree of morbidity to the patient. Clearly, new approaches to the treatment of metastatic melanoma are needed.

The Akt protein kinase family consists of three members, Akt1/PKB α , Akt2/PKB β and Akt3/PKB γ , which share a high degree of structural similarity (Brazil et al., *Cell* 111:293-303 (2002); and Nicholson et al., *Cell Signal* 14:381-395 (2002)). Family
15 members share extensive structural similarity with one another, exhibiting greater than 80% homology at the amino acid level (Nicholson KM, Anderson NG. *Cell Signal*. 14(5):381-95 (2002), Datta SR et al. *Genes Dev.* 13(22):2905-27 (1999).). All Akt isoforms share major structural features, having three distinct functional domains (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),
20 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).). One is an amino-terminal pleckstrin homology domain (PH) domain that mediates protein-protein and protein-lipid interactions. This domain consists of approximately one hundred amino acids, resembles the three phosphoinositides binding domains in other signaling molecules (Lietzke SE et al. *Mol Cell.* 6(2):385-94 (2000), Ferguson KM et al. *Mol Cell.* 6(2):373-84 (2000).). The
25 second domain is a carboxy-terminal kinase catalytic region that mediates phosphorylation of substrate proteins. It shows a high degree of similarity to those in protein kinase A
30

(PKA) and protein kinase 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).). The third domain is a tail region with an important regulatory role. This region is sometimes referred to as the tail or regulatory domain. Within the latter two regions are serine and threonine residues whose phosphorylation is required for Akt activation. The sites vary slightly dependent of the particular Akt isoform. The first site on all three isoforms is a threonine at amino acid position 308/309/305 and on Akt1/2/3 respectively. The second site is a serine occurring within the hydrophobic C-terminal tail at amino acid positions 473/474/472 on Akt 1/2/3 respectively. Phosphorylation on both sites occurring in response to growth factors or other extracellular stimuli is essential for maximum Akt activation (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).). Akt may also be phosphorylated on other residues; however, the functional significance of this phosphorylation is an area of continuing investigation (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).). Also, although splice variants of Akt3 lacking the serine 472 phosphorylation site have been identified, the cellular role of this variant remains uncertain (Brodbeck D, Hill MM, Hemmings BA. J Biol Chem. 276(31):29550-8. Epub 2001 (2001).). It is also unknown whether this variant is present or performs any role in the melanoma cells.

While all isoforms may be expressed in a particular cell type, only certain isoforms may be active. It also appears that each isoform can perform unique as well as common functions in cells (Brazil et al., Cell 111:293-303 (2002); and Nicholson et al., Cell Signal 14:381-395 (2002); Chen et al., Genes Dev 15:2203-2208 (2001); and Cho et al., Science 292:1728-1731 (2001)). Knockout mice lacking Akt1 are growth retarded and have increased rates of spontaneous apoptosis in the testis and thymus (Chen et al., Genes Dev 15:2203-2208 (2001); Cho et al., J Biol Chem 276:38349-38352 (2001); Peng et al., Genes Dev 17:1352-1365 (2003)). In contrast, Akt2 knockout mice have impaired insulin

regulation and consequently a defective capability of lowering blood glucose levels due to defects in the action of insulin on liver and skeletal muscle (Cho et al., *Science* 292:1728-1731 (2001); Peng et al., *Genes Dev* 17:1352-1365 (2003)). Currently, there is no published report describing the phenotype associated with an Akt3 knockout mouse; thus, there is very little known about the specific functions of Akt3 or its role in human cancer.

Genetic amplification that increase the expression of Akt1 or Akt2 have been reported in cancers of the stomach, ovary, pancreas and breast (Staal, S.P., *Proc Nat Acad Sciences USA* 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 Hsueh Tsa Chih [*Chinese Medical Journal*] 75:679-682 (1995); Bellacosa et al., *Int J Cancer* 64:280-285 (1995); and van Dekken et al., *Cancer Res* 59:749-752 (1999)). While no activating mutations of Akt have been identified in melanomas (Waldmann et al., *Arch Dermatol Res* 293:368-372 (2001); Waldmann et al., *Melanoma Res* 12:45-50 (2002)), blocking total Akt function by targeting P13K (with the P13K inhibitors Wortmannin or LY-294002) inhibits cell proliferation and reduces the sensitivity of melanoma cells to UV radiation (Krasilnikov et al., *Mol Carcinogenesis* 24:64-69 (1999)). Total Akt activity has also been measured in melanomas using immunohistochemistry to demonstrate increased levels of total phosphorylated Akt in severely dysplastic nevi and metastatic melanomas compared to normal or mildly dysplastic nevi (Dhawan et al., *Cancer Res* 62:7335-7342 (2002)). However, the role played by individual Akt isoforms and mechanisms leading to deregulation of particular Akt isoforms in melanoma is unknown. Recently, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway was found to play a critical role in melanoma tumorigenesis (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). Deregulated Akt activity through loss of the PTEN phosphatase, a negative regulator of P13K/Akt signaling, was found to decrease the apoptotic capacity of melanoma cells and thereby regulate melanoma tumorigenesis (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)).

The Raf protein serine/threonine kinase family consists of three members, A-Raf, B-Raf, and C-Raf. (Mercer et al., *Biochim Biophys Acta* 1653:25-40 (2003)). Raf family members are intermediate molecules in the MAPK (Ras/Raf/MAPK kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway, which is a signal transduction

pathway that relays extracellular signals from cell membrane to nucleus via an ordered series of consecutive phosphorylation events (Mercer et al., *Biochim Biophys Acta* 1653:25-40 (2003), Smalley. *Int J Cancer* 104: 527-32 (2003)). Typically, an extracellular ligand binds to its tyrosine kinase receptor, leading to Ras activation and initiation of a cascade of phosphorylation events (Mercer et al., *Biochim Biophys Acta* 1653:25-40 (2003), Smalley. *Int J Cancer* 104: 527-32 (2003)). Activated Ras causes phosphorylation and activation of Raf, which in turn phosphorylates and activates MEK1 MEK2. MEK kinases in turn phosphorylate and activate ERK1 and ERK2 (Chong et al, *Cell Signal* 15:163-69 (2003)), which phosphorylates several cytoplasmic and nuclear targets that ultimately lead to expression of proteins playing important roles in cell growth and survival (Chang et al., *Int J Oncol* 22:469-80 (2003)).

Mutations that lead to activation of B-Raf have been found in the majority of sporadic melanomas, mainly B-RAF the most mutated gene in melanomas with a mutation rate ranging from 60 to 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); and Yazdi et al., *J Invest Dermatol* 121:1160-62 (2003)). The majority of B-RAF mutations occur as a result of a single base missense substitution that converts T to A at nucleotide 1796 which substitutes a Valine for a Glutamic Acid at codon 599 (V599E) in exon 15 (Davies et al., *Nature* 417:949-54 (2002)). This mutation increases basal kinase activity of B-Raf, resulting in hyperactivity of the MAPK pathway evidenced by constitutively elevated levels of downstream kinases MEK and ERK (Davies et al., *Nature* 417:949-54 (2002)). B-RAF mutations are acquired, somatic, post-zygotic events that have not been identified in familial melanomas (Lang et al. *Hum Mutat* 21:327-30 (2003); Laud et al, *Cancer Res* 63:3061-65 (2003); and Meyer et al, *Int J Cancer* 106:78-80 (2003)).

RNA interference (RNAi) is a polynucleotide sequence-specific, post-transcriptional gene silencing mechanism effected by double-stranded RNA that results in degradation of a specific messenger RNA (mRNA), thereby reducing the expression of a desired target polypeptide encoded by the mRNA (see, e.g., WO 99/32619; WO 01/75164; U.S. Pat. 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)). RNAi is mediated by double-stranded polynucleotides as also described herein

below, for example, double-stranded RNA (dsRNA), having sequences that correspond to exonic sequences encoding portions of the polypeptides for which expression is compromised. RNAi reportedly is not effected by double-stranded RNA polynucleotides that share sequence identity with intronic or promoter sequences (Elbashir et al., 2001).

5 RNAi pathways have been best characterized in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*, but "small interfering RNA" (siRNA) polynucleotides that interfere with expression of specific polypeptides in higher eukaryotes such as mammals (including humans) have also been considered (e.g., 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, 10 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).

According to a current non-limiting model, the RNAi pathway is initiated by ATP-dependent, processive cleavage of long dsRNA into double-stranded fragments of about 18-27 (e.g., 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, etc.) nucleotide base pairs in length, called small
15 interfering RNAs (siRNAs) (see review by 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)). In *Drosophila*, an enzyme known as "Dicer" cleaves the longer double-stranded RNA into siRNAs; Dicer belongs to the RNase III family of dsRNA-specific endonucleases (WO 01/68836; Bernstein et al., 20 2001 *Nature* 409:363-66 (2001)). Further according to this non-limiting model, the siRNA duplexes are incorporated into a protein complex, followed by ATP-dependent unwinding of the siRNA, which then generates an active RNA-induced silencing complex (RISC) (WO 01/68836). The complex recognizes and cleaves a target RNA that is complementary to the guide strand of the siRNA, thus interfering with expression of a specific protein
25 (Hutvagner et al., *supra*).

In *C. elegans* and *Drosophila*, RNAi may be mediated by long double-stranded RNA polynucleotides (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); see also WO 01/92513 (RNAi-mediated silencing in yeast)). In mammalian cells,
30 however, transfection with long dsRNA polynucleotides (i.e., greater than 30 base pairs) leads to activation of a non-specific sequence response that globally blocks the initiation of

protein synthesis and causes mRNA degradation (Bass, Nature 411:428-29 (2001)).

Transfection of human and other mammalian cells with double-stranded RNAs of about 18-27 nucleotide base pairs in length interferes in a sequence-specific manner with expression of particular polypeptides encoded by messenger RNAs (mRNA) containing corresponding nucleotide sequences (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).

siRNA polynucleotides may offer certain advantages over other polynucleotides known to the art for use in sequence-specific alteration or modulation of gene expression to yield altered levels of an encoded polypeptide product. These advantages include lower effective siRNA polynucleotide concentrations, enhanced siRNA polynucleotide stability, and shorter siRNA polynucleotide oligonucleotide lengths relative to such other polynucleotides (e.g., antisense, ribozyme or triplex polynucleotides). By way of a brief background, "antisense" polynucleotides bind in a sequence-specific manner to target nucleic acids, such as mRNA or DNA, to prevent transcription of DNA or translation of the mRNA (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,168,053; U.S. Pat. No. 5,190,931; U.S. Pat. No. 5,135,917; U.S. Pat. No. 5,087,617; see also, e.g., Clusel et al., 1993 Nucl. Acids Res. 21:3405-11, describing "dumbbell" antisense oligonucleotides). "Ribozyme" polynucleotides can be targeted to any RNA transcript and are capable of catalytically cleaving such transcripts, thus impairing translation of mRNA (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,272,262; U.S. Pat. No. 5,144,019; and U.S. Pat. Nos. 5,168,053, 5,180,818, 5,116,742 and 5,093,246; U.S. 2002/193579). "Triplex" DNA molecules refer to single DNA strands that bind duplex DNA to form a collinear triplex molecule, thereby preventing transcription (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,176,996, describing methods for making synthetic oligonucleotides that bind to target sites on duplex DNA). Such triple-stranded structures are unstable and form only transiently under physiological conditions. Because single-stranded polynucleotides do not readily diffuse into cells and are therefore susceptible to nuclease digestion, development of single-stranded DNA for antisense or triplex technologies often requires chemically modified nucleotides to improve stability and absorption by cells. siRNAs, by contrast, are readily taken up by intact cells, are effective at

interfering with the expression of specific polypeptides at concentrations that are several orders of magnitude lower than those required for either antisense or ribozyme polynucleotides, and do not require the use of chemically modified nucleotides.

Malignant melanoma is the skin cancer with the most significant impact on man carrying the highest risk of death from metastasis. Both incidence and mortality rates continue to rise each year, with no effective long-term treatment on the horizon. In part, this reflects lack of identification of critical genes involved and specific therapies targeted to correct these defects. Accordingly, a need exist in the art for identification of critical genes involved and specific therapies targeted to correct these defects, and targeted reduction of gene(s) identified as key in the PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. Identifying a gene as a selective target provides new therapeutic opportunities for melanoma patients.

Therefore, it is a primary object, feature, or advantage of the present invention to improve upon the state of the art.

It is a further object, feature, or advantage of the present invention to provide a method for reducing Akt3 activity in a cancer cell, thereby restoring normal apoptotic sensitivity to a cancer cell.

It is a further object, feature, or advantage of the present invention to provide a method for inducing apoptosis in a cancer cell with an agent that reduces Akt3 activity.

It is a further object, feature, or advantage of the present invention to provide a combinatorial approach of treating melanomas by restoring normal apoptotic sensitivity to a melanoma tumor cell, decreasing cell proliferation and growth of the melanoma tumor cell, and inhibiting vascularization of the melanoma tumor cell.

It is a further object, feature, or advantage of the present invention to provide a method of treating melanomas that reduces tumor size more efficiently than conventional methods.

It is a further object, feature, or advantage of the present invention to provide a method of treating melanomas that requires a lower concentration of chemotherapy to be used, thereby decreasing toxicity to the patient.

These and other objects, features, or advantages will become apparent from the following description of the invention.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a rational basis for combining targeted therapies together with selected chemotherapeutics, which does not currently exist for the treatment of melanoma. The present invention is based on the present inventors' discovery that Akt3 regulates apoptosis and V599E B-Raf regulates growth and vascular development in melanoma. Inventors are the first to recognize an effective combined targeted therapeutic for treating melanoma. In one embodiment, the invention provides a method for inducing apoptosis in a melanoma tumor cell by reducing Akt3 activity. In yet another embodiment, the invention provides a method for inducing apoptosis in a melanoma tumor cell comprising contacting a melanoma tumor cell with an agent that reduces Akt3 activity. Consequently, the method provided restores normal apoptotic sensitivity to a melanoma tumor cell, thereby allowing the administration of a lower concentration of chemotherapeutic agents resulting in decreased toxicity to a patient.

The present inventors' contemplate a method for treating a melanoma tumor in a mammal comprising: administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent to induce apoptosis; and administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent to reduce angiogenesis and cell proliferation.

Also disclosed herein is a method for treating a melanoma in a mammal comprising: administering to a melanoma tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces Akt3 activity; administering to a melanoma tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces V599E B-Raf activity, thereby treating a melanoma tumor.

In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition for treating a melanoma tumor comprising: an agent that reduces Akt3 activity; and a carrier.

These and other embodiments of the invention will become apparent upon reference to the following Detailed Description. All references disclosed herein are hereby incorporated by reference in their entireties as if each was incorporated individually.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows identification of Akt3 involvement in malignant melanoma. A. Akt activity in the melanoma cell line UACC 903 is regulated by PTEN. Western blot analysis showing expression of phosphorylated-Akt, total Akt, PTEN and α -enolase (loading control). The 36A, 29A and 37A cell lines are genetically related cell lines created from the UACC 903 parental cell line that expresses PTEN. Tumorigenic revertant cell lines derived from the 36A cell line are considered isogenic, differing only in PTEN expression. Melanocytes serve as a control for normal cells. The graph represents densitometric scans from 3 separate Western blots to quantitatively demonstrate the level of phosphorylated to total Akt in each cell line; bars, $\pm$ SEM; statistics, One-Way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparisons versus the melanocyte control, * $P < 0.5$. B. SiRNA for each of the Akt isoforms demonstrates specificity of knockdown of each ectopically expressed Akt isoform in the UACC 903 cell line. Constructs expressing tagged HA-Akt1, HA-Akt2 or HA-Akt3 were co-nucleofected together with siRNA specific to Akt1, Akt2 or Akt3 into UACC 903 cells. Controls were non-nucleofected or vector only nucleofected cells. Western blots were probed with antibodies to HA to detect the ectopically expressed protein as well as for α -enolase, which served as a loading control. C. SiRNA mediated knockdown of Akt3, but not Akt2 or Akt2, alters level of phosphorylated Akt (activity) in the melanoma cell lines UACC 903, WM1 15 and SK-MEL-24. Western blot analysis showing expression of phosphorylated-Akt, Akt3, Akt2 and α -enolase following nucleofection with 50 (left) or 100 pmoles (right) for each respective siRNA. Controls were non-nucleofected or cells nucleofected with scrambled siRNA. Data are representative of a minimum 2 separate experiments. The loading control for these experiments was α -enolase. D. Phosphorylated Akt3 is reduced when PTEN protein is present in the UACC 903 (PTEN) tumorigenic model. Akt3 and Akt2 were immunoprecipitated from cell lines in the UACC 903 (PTEN) tumorigenic model and analyzed by Western blotting with an antibody recognizing phosphorylated Akt. The PTEN expressing 36A, 29A and 37A cell lines were derived from the UACC 903 parental cell line that lacks PTEN protein. The two tumorigenic revertant cell lines were derived from the 36A cell line and no longer express PTEN. A negative antigen control is shown together with positive and negative controls for Akt3 and Akt2. Controls for Akt3 and Akt2 were HEK 298T or LNCaP cells respectively, untreated (positive) or treated with LY-

294002 (negative), an inhibitor of P13K. E. Akt3 activity is reduced in the presence of PTEN in the UACC 903 (PTEN) tumorigenic model. Immunoprecipitated Akt3 was used in an *in vitro* kinase assay in which Crosstide was phosphorylated by Akt3 to estimate activity. Plot shows activity after subtraction of the no antigen control; bars, $\pm$ SEM; statistics, One-Way ANOVA followed by Dunnet's Multiple Comparisons versus the melanocyte control, * $P < 0.05$.

Figure 2 shows increased Akt3 expression and activity occur during melanoma tumor progression. A. An increase in the level of phosphorylated (active) Akt occurs during the radial growth phase in the melanoma tumor progression model. Western blot comparing amount of phosphorylated Akt in melanocytes to low passage melanoma cell lines established from primary tumors at the radial (WM35 and WM3211) and vertical (WM115, WM98.1 and WM278) stages of growth. Total Akt is shown as a control. B. Comparison of Akt3 versus Akt2 expression in the melanoma tumor progression model. Western blots showing the levels of expression of Akt3 and Akt2 are shown together with α -enolase as a loading control. C. Akt3 is preferentially activated in cell lines of the melanoma tumor progression model compared to Akt2. Akt3 or Akt2 was immunoprecipitated from each cell line and subject to Western blot analysis to measure the amount of phosphorylated Akt in the immunoprecipitate. D. Akt3 is preferentially overexpressed in metastatic melanomas from human patients compared to melanocytes. Akt3 and Akt2 expression were measured from metastatic melanomas derived from 31 tumors. Akt3 and Akt2 expression was normalized to α -enolase expression. The graph quantitatively compares the level of Akt3 or Akt2 expression in each tumor versus melanocytes. Bars represent average values from densitometric scans of 3 separate Western blots; bars, $\pm$ SEM. Value above represents the fold increase in expression over that occurring in melanocytes; only differences of ≥ 2 -fold were scored as significant. E. Expression and activity of Akt3, but not Akt2, increases in tumors from melanoma patients compared to melanocytes. Activity was determined by immunoprecipitation of Akt3 and Akt2 followed by Western blot analysis with an antibody recognizing phosphorylated Akt to determine the percentage of tumors in which phosphorylated (active) Akt3 or Akt2 could be detected; statistics, *t*-test, * $P < 0.05$.

Figure 3 shows the mechanism underlying deregulated Akt3 activity in malignant melanomas. A. Decreased PTEN expression (activity) specifically increases Akt3 activity in melanocytes and: B. radial growth phase WM35 (radial growth phase) cells. SiRNA mediated reduction of PTEN is shown alone (control) or in combination with scrambled siRNA or with siRNA against Akt1, Akt2 or Akt3. Western blot analysis shows expression of phosphorylated Akt, Akt3, Akt2 and PTEN. α -enolase served as a loading control. C. Over expression of Akt3 in human melanocytes increases the levels of phosphorylated Akt. Wild type Akt3, dead Akt3 (inactive) or myristoylated Akt3 (active) were nucleofected into melanocytes. Similar constructs for Akt2 served as controls (data not shown). Akt phosphorylation (activity) was measured by Western blot analysis to measure levels of phosphorylated Akt. Arrowhead shows location endogenously active Akt3 while arrow indicates ectopically expressed active HA-tagged Akt3.

Figure 4 shows increased Akt3 activity promotes melanoma tumor development by reducing apoptosis rates. A. PTEN-mediated reduction of Akt3 activity inhibits melanoma tumor development. Size of tumors formed by parental UACC 903 melanoma cells, the isogenic 36A (retaining PTEN) and revertant cell line (lacking PTEN) were measured 10 days after injection into nude mice. Values are means of a minimum of six injection sites in three mice per cell line, bars, $\pm$ SEM; statistics, One-Way ANOVA followed by Dunnet's Multiple Comparisons versus UACC 903, $*P < 0.05$. B. SiRNA mediated down-regulation of Akt3 reduces the tumorigenic potential of UACC 903 melanoma cells. SiRNA against Akt3, Akt2 and Akt1 were nucleofected into UACC 903 cells and after 48 hours, cells were injected into nude mice. Size of tumors was measured 10 days later. Controls are UACC 903 cells nucleofected with buffer only or a scrambled siRNA. Values are means of a minimum of six injection sites in three mice per cell line; bars, $\pm$ SEM; statistics, One-Way ANOVA followed by Dunnet's Multiple Comparisons versus UACC 903, $*P < 0.05$. C.D.E.F. PTEN or siRNA-mediated reduction of Akt3 increases apoptosis in tumors growing in nude mice. Quantification (C, D) and photographs (E, F) of TUNEL positive cells in tumor masses derived from UACC 903 cells expressing PTEN (36A) or nucleofected with siRNA to siAkt3 and siAkt2; bars, $\pm$ SEM; statistics, Kruskal-Wallis followed by Dunnet's Multiple Comparisons versus UACC 903, $*P < 0.05$. Tumors were analyzed 4 days after injection of cells into nude mice; magnification, 200X. The controls

11
were UACC 903 cells or UACC 903 cells nucleofected with buffer only. White nuclei represent cells undergoing apoptosis.

Figure 5 depicts a demonstration that liposomes alone are non-toxic to melanoma cells. Addition of liposomes at various concentrations did not reduce the number of viable cells. In fact, they increased cell viability at all concentrations by 48 hours. Methods: Toxicity of liposomes was evaluated in 1205 Lu using the MTS assays at 24, 48, and 72 hours after addition of liposomes at concentrations of 6.25, 12.5, 25, and 50 μ M.

Figure 6 depicts a demonstration that melanoma cells readily take up liposomes. Methods: Labeled liposomes (green) were added to AUCC 903 melanoma cells growing in culture. Images show cell nuclei on left (counterstained with DAPI) and cells that have taken up labeled liposomes on the right; magnification, 40X. Approximately, 99% of cells take-up liposomes.

Figure 7 depicts a quantitation of liposome uptake by melanoma cells. Methods: Labeled liposomes or liposomes containing labeled siRNA were added to cells growing in culture at a concentration of 20nM. One hour later cells were fixed with 5% paraformaldehyde, counterstained with DAPI and % of cells that had taken-up labeled product were scored.

Figure 8 depicts a demonstration of size uniformity and size distribution of liposomes. Methods: Left: Scanning Electron Micrograph showing uniform size of liposomes. Right: Size distribution of liposomes determined by light scattering analysis. Graph shows size range of liposomes, with the average size occurring between 70-80 nm.

Figure 9 depicts a demonstration of liposomes delivering pools of siRNA to melanoma cells. Methods: Red and green labeled siRNA were added to melanoma cells growing in culture. One hour after uptake the cells were fixed in 4% paraformaldehyde and counterstained with DAPI. The left shows the cell nuclei stained blue, followed by red siRNA and green siRNA. The last column is the merged image, magnification 40X.

Figure 10 depicts a demonstration of duration of Stealth siRNA knockdown of protein expression in 1205 Lu melanoma cells. Methods: The duration of protein knockdown by Stealth siRNA from Invitrogen was determined to be beyond 8 days. SiRNA was transferred into the 1205 Lu melanoma cell line by nucleofection. Western blot analysis of B-Raf protein levels was measured at 2-day intervals up to day 8. SiRNA

against C-Raf served as a control. In addition to decreased B-Raf expression, activity of the pErk 1/2 downstream in the signaling pathway was also decreased for 8 days. Erk-2 served as a protein loading control.

Figure 11 depicts a demonstration of knockdown of protein expression following liposome mediated delivery of siRNA into melanoma cells. siRNA liposome complexes targeted to mutant B-Raf can knockdown 50% of protein expression at 200nM. This indicates a base line; higher concentrations will increase knockdown. Methods: siRNA liposome complexes were added to cells at a concentration of 100 or 200nM. Lysates were collected after 72 hours and analyzed by Western blot.

Figure 12 shows siRNA-mediated reduction of mutant ^{V599E}B-Raf reduces the downstream activity of MEK and ERK in melanoma. siRNA-mediated knockdown of B-Raf and C-Raf reduces levels of each respective protein 24 and 48 hours after nucleofection in melanoma cell lines UACC 903 (A), 1205 Lu (B), and C8161 (C). Scrambled siRNA was used as a control, whereas lamin A/C siRNA was used as an additional control for UACC 903 cells. Only siRNA to B-Raf reduced the levels of active (phosphorylated) MEK and ERK downstream of B-Raf in UACC 903 and 1205 LU cells containing mutant ^{V599E}B-Raf. ERK2 is used as a loading control.

Figure 13 shows melanoma tumor development was inhibited with ^{V599E}B-Raf but not siRNA to C-RAF or scrambled siRNA. siRNA-mediated knockdown of B-Raf protein persists for 6 to 8 days after nucleofection into UACC 903 (A) and 1205 Lu (B) cell lines growing in culture. A corresponding decrease was observed in phosphorylated ERK1/ERK2 levels (B). ERK2 served as a loading control. siRNA-mediated reduction of B-Raf led to decreased tumorigenic potential of UACC 903 (C) and 1206 Lu (D) cells. siRNA against B-Raf, C-Raf and scrambled siRNA were introduced into UAC 903 or 1205 Lu cells (white arrow) and 36 hours later cells were injected into nude mice (black arrow). Size of tumors was measured at 2-day intervals. siRNA-mediated down-regulation of B-Raf reduced the tumorigenic potential of UACC 903 and 1205 Lu melanoma cells. Controls cells were nucleofected with buffer only, a scrambled siRNA or siRNA against C-Raf. Values are means of minimum of 12 injection sites in six mice with two separate experiments. Bars ±SE.

Figure 14 shows pharmacologic inhibition of B-Raf activity using BAY 43-9006 inhibits melanoma tumor development. A, BAY 43-9006 inhibits both wild-type and mutant ^{V599B}B-Raf activity. HA-tagged wild-type or mutant ^{V599B}B-Raf were expressed in HEK 293T cells exposed to 5 μ mol/L BAY 43-9006 or DMSO vehicle. HA indicates ectopically expressed B-Raf protein. Activation or inhibition of the MAPK pathway was determined by comprising levels of pMEK and pERK, ERK2 served as a loading control.; B, BAY 43-9006 decreases pMEK and PERK (activity) levels in UACC 903 melanoma cells containing mutant ^{V599B}B-Raf in a dose responsive manner. Western blot analysis of reduced pMEK and PERK levels in UACC 903 cells with increasing concentrations of BAY 43-9006. The loading control was ERK2. C, pretreatment of mice with BAY 43-9006 inhibits development of melanoma tumors. Four days before injection of 5×10^8 UACC 903 cells, mice were pretreated twice i.p. with 50 mg/kg BAY 43-9006 or DMSO vehicle, which continued every 2 days (arrowheads). Tumor size is shown at 2-day intervals up to day 22. Bars, $\pm$ SE D, decreased tumor cell proliferation accompanies siRNA-mediated inhibition of melanoma tumor development. Five- to 8-fold decrease in bromodeoxyuridine-positive cells occurs following siRNA-mediated inhibition of B-Raf but no C-Raf or scrambled siRNA. *. $P < 0.05$. Columns, means from six different tumors with four to six fields counted per tumor; bars, $\pm$ SE.

Figure 15 shows inhibition of B-Raf activity using BAY 43-9006 inhibits melanoma tumor development. The effects of BAY 43-9006 treatment are shown on UACC 903(A) and 1205 Lu (B) tumor development. UACC 903 and 1205 Lu cells were injected into nude mice and tumor development allowed to occur to day 6 at which point mice were injected i.p. every 2 days with BAY 43-9006 dissolved in DMSO (arrowheads). Control conditions were DMSO treatment only. The Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 reduces the tumorigenic potential of melanoma cells containing mutant ^{V599B}B-Raf protein at concentrations ≥ 50 mg/kg. C, decreased amounts of phosphorylated (active) ERK were observed for those cells following treatment with BAY 43-9006 but not with vehicle treatment. Immunohistochemical comparison of the number of pERK-positive cells in UACC 903 tumor sections treated with 50 mg/kg BAY 43-9006 (in DMSO) or in DMSO vehicle alone. A 3-fold difference was detected between control vehicle and BAY 43-9006

treated cells (D). *. $P < 0.05$. Columns, means from six different tumors with four to six fields counted per tumor; bars, $\pm$ SE.

Figure 16 shows mechanism underlying inhibition of melanoma tumor development following pharmacologic or siRNA-mediated inhibition of mutant $V599B$ -Raf in melanoma tumors. Comparison of the vascular development (A), apoptosis (B), and proliferation rates (C) in temporally and spatially matched tumors exposed to BAY 43-9006 or vehicle (DMSO). Size- and time-matched tumors developing in parallel were compared to identify the effects of B-Raf inhibition on tumor development. A difference in vascular development was the first statistically significant different (*, $P < 0.05$) observed following treatment of UACC 903 tumors with BAY 43-9006, which was followed by increased apoptosis (*, $P < 0.05$) and reduced cell proliferation (*; $P < 0.05$). Columns, means from two separate experiments with four to six fields analyzed from each of six tumors per experiment; bars, $\pm$ SE.

Figure 17 shows siRNA and pharmacologic inhibition of $V599B$ -Raf reduces VEGF secretion from melanoma cells. VEGF secretion was measured from UACC 903 or 1205 Lu cells growing in culture by ELISA assay following nucleofection with either B-Raf or VEGF siRNA (A) or after treatment with increasing concentrations of BAY 43-9006 (B). C-Raf and scrambled siRNA served as controls. Bars, $\pm$ SD. The effects of reduced VEGF expression are shown on UACC 903 (C) and 1205 Lu (D) tumor development. Tumor size is shown at 2-day intervals up to day 17.5. Reduction of VEGF expression inhibits melanoma tumor development in a manner with that occurring following reduction of $V599B$ -Raf expression. Points, means from six different tumors; bars, $\pm$ SE.

Figure 18: shows the region of Akt3 that causes preferential activation in melanoma. Activation is measured as the levels of phosphorylation; darker bands indicating higher activity. The lower bands indicate endogenous Akt activity. The domains of Akt3 were switched with those of Akt2 and constructs containing the chimeric constructs were nucleofected into the melanoma cell line WM35. Myristoylated Akt3 and Akt2 served as positive controls. Dead Akt3 (T305A/S472A) and Akt2 (T309A/S474A) served as negative controls. Transfer of wild type Akt3 led to increased activity in contrast to wild type Akt2 that did not. Constructs in which the pleckstrin homology (PH) domain from Akt3 (amino acids 1-110) was switched with those from Akt2 were used to identify

the region of Akt3 leading to activation in melanoma cells. Note, only constructs containing the catalytic and regulatory (C/R) domains of Akt3 (from amino acids 111-497) led to activation. This maps the region from amino acids 111-497 as critical for activation of Akt3 in human melanomas. This is one site critical for therapeutic targeting that would specifically prevent Akt3 activation in melanomas. METHODS: HA-tagged wild type constructs, and chimeric constructs PH-Akt3-C/R-Akt2 and PH-Akt2-C/R-Akt3 were prepared by switching the pleckstrin homology (PH) domains (from amino acids 1-110) and catalytic domain (from 111-479 of Akt3 or 481 in Akt2). Constructs were nucleofected into the WM35 melanoma cell line using the Amaxa NHEM-NEO nucleofector reagent and 48 hours later analyzed by Western blot analysis by probing with an antibody to ser-473 of Akt.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The present invention is directed in part to the discovery that Akt3 is an important serine/threonine protein kinase, and plays a role in melanoma survival so that melanoma tumor cells are resistant to apoptosis. A melanoma model that reflects the importance of Akt in melanoma tumorigenesis was used to identify Akt3 as the predominant isoform deregulated during melanoma tumorigenesis. As demonstrated herein the selective knockdown of Akt3, but not Akt1 or Akt2, decreases the level of total phosphorylated Akt and lowers the tumorigenic potential of melanoma cells. Consequently, Akt3 provides a therapeutic target for melanoma cancer.

The present invention is also directed in part to the discovery that V599E B-Raf plays a role in melanoma growth and proliferation. It has now been found that inhibition or reduction of B-Raf expression decreases tumor cells' proliferation and formation of new blood vessels (angiogenesis). It should be noted that due to errant sequence data the valine (V) to glutamic acid (E) substitution in B-Raf actually corresponds to codon 600 and the nucleotide 1799 (not 1796) in the correct version as shown in NCBI gene bank Accession Number. NT_007914. Kumar et al., Clinical Cancer Research, 9: 3362-3368 (2003). However, in this application, we have used the uncorrected nucleotide and codon numbers throughout for historical and familiarity reasons.

The present inventors contemplate a combination therapy to treat tumor cells that involves the induction of apoptosis and reduction of cell proliferation and angiogenesis. In one embodiment, apoptosis is induced by reducing Akt3 activity and cell proliferation and angiogenesis is decreased by reducing V599E B-Raf activity. The present inventors also
5 contemplate that reducing Akt3 activity in a tumor cell decreases the apoptotic threshold in tumor cells, especially in melanoma cells, allowing much lower doses of chemotherapy to be employed than based on conventional treatments. Thus, patients would receive a more effective treatment and experience less side effects from toxic chemotherapy drugs.

To aid in the understanding of the specification and claims, the following
10 definitions are provided.

DEFINITIONS

As used herein, the term "siRNA" means either: (i) a double stranded RNA oligonucleotide, or polynucleotide, that is 18 base pairs, 19 base pairs, 20 base pairs, 21
15 base pairs, 22 base pairs, 23 base pairs, 24 base pairs, 25 base pairs, 26 base pairs, 27 base pairs, 28 base pairs, 29 base pairs or 30 base pairs in length and that is capable of interfering with expression and activity of a Akt3 polypeptide, or a variant of the Akt3 polypeptide, wherein a single strand of the siRNA comprises a portion of a RNA polynucleotide sequence that encodes the Akt3 polypeptide, its variant, or a complementary
20 sequence thereto; (ii) a single stranded oligonucleotide, or polynucleotide of 18 nucleotides, 19 nucleotides, 20 nucleotides, 21 nucleotides, 22 nucleotides, 23 nucleotides, 24 nucleotides, 25 nucleotides, 26 nucleotides, 27 nucleotides, 28 nucleotides, 29 nucleotides or 30 nucleotides in length and that is either capable of interfering with expression and/or activity of a target Akt3 polypeptide, or a variant of the Akt3
25 polypeptide, or that anneals to a complementary sequence to result in a dsRNA that is capable of interfering with target polypeptide expression, wherein such single stranded oligonucleotide comprises a portion of a RNA polynucleotide sequence that encodes the PTP-1B polypeptide, its variant, or a complementary sequence thereto; or (iii) an oligonucleotide, or polynucleotide, of either (i) or (ii) above wherein such oligonucleotide,
30 or polynucleotide, has one, two, three or four nucleic acid alterations or substitutions therein.

"Nucleic acid or "polynucleotide" as used herein refers to purine- and pyrimidine-containing polymers of any length, either polyribonucleotides or polydeoxyribonucleotide or mixed polyribo-polydeoxyribonucleotides. This includes single- and double-stranded molecules, i.e., DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA hybrids, as well as "protein nucleic acids" (PNA) formed by conjugating bases to an amino acid backbone. This also includes nucleic acids containing modified bases.

A "gene" refers to an assembly of nucleotides that encode a polypeptide, and includes cDNA and genomic DNA nucleic acids.

A "vector" is any means for the transfer of a nucleic acid into a host cell. A vector may be a replicon to which another DNA segment may be attached so as to bring about the replication of the attached segment. A "replicon" is any genetic element (e.g., plasmid, phage, cosmid, chromosome, virus) that functions as an autonomous unit of DNA replication in vivo, i.e., capable of replication under its own control. The term "vector" includes both viral and nonviral means for introducing the nucleic acid into a cell in vitro, ex vivo or in vivo. Viral vectors include retrovirus, adeno-associated virus, pox, baculovirus, vaccinia, herpes simplex, Epstein-Barr and adenovirus vectors. Non-viral vectors include, but are not limited to plasmids, liposomes, electrically charged lipids (cytofectins), DNA-protein complexes, and biopolymers. In addition to a nucleic acid, a vector may also contain one or more regulatory regions, and/or selectable markers useful in selecting, measuring, and monitoring nucleic acid transfer results (transfer to which tissues, duration of expression, etc.).

A "cassette" refers to a segment of DNA that can be inserted into a vector at specific restriction sites. The segment of DNA encodes a polypeptide of interest, and the cassette and restriction sites are designed to ensure insertion of the cassette in the proper reading frame for transcription and translation.

A cell has been "transfected" by exogenous or heterologous DNA when such DNA has been introduced inside the cell. A cell has been "transformed" by exogenous or heterologous DNA when the transfected DNA effects a phenotypic change. The transforming DNA can be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome of the cell.

A "nucleic acid molecule" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules"), or any phosphoester analogs thereof, such as phosphorothioates and thioesters, in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, inter alia, in linear or circular DNA molecules (e.g., restriction fragments), plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of DNA (i.e., the strand having a sequence homologous to the mRNA). A "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

The present invention contemplates isolation from melanoma of a gene encoding a human Akt3 protein or polypeptide of the invention, including a full length, or naturally occurring form of Akt3, and any human Akt3-specific antigenic fragments thereof. As used herein, "Akt3" refers to Akt3 polypeptide, and "akt3" refers to a gene encoding Akt3 polypeptide.

The term "Akt3" refers to Akt3 nucleic acid (DNA and RNA), protein (or polypeptide), their polymorphic variants, alleles, mutants, and interspecies homologs that have (i) substantial nucleotide sequence homology with the nucleotide sequence of the Accession Number AJ245709 (Homo sapiens mRNA for serine/threonine kinase Akt-3 (Akt3 gene)gi|5804885|emb|AJ245709.1|HSA245709[5804885]); Accession Number AF135794 (Homo sapiens AKT3 protein kinase mRNA, complete cds gi|4574743|gb|AF135794.1|AF135794[4574743]); Accession Number NM_005465 (Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma) (AKT3), transcript variant 1, mRNA gi|32307164|ref|NM_005465.3|[32307164]); Accession Number NM_181690 (Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma) (AKT3), transcript variant 2, mRNA

- gi|32307162|ref|NM_181690.1|[32307162]); Accession Number AY005799 (Homo sapiens protein kinase B gamma 1 (AKT3) mRNA, complete cds, alternatively spliced gi|15072339|gb|AY005799.1|[15072339]); Accession Number AF124141 (Homo sapiens protein kinase B gamma mRNA, complete cds
- 5 gi|4757578|gb|AF124141.1|AF124141[4757578]); or (ii) substantial sequence homology with the encoding amino acid sequence Accession Number CAB53537 (Akt-3 protein [Homo sapiens] gi|5804886|emb|CAB53537.1|[5804886]); Accession Number AAD24196 (AKT3 protein kinase [Homo sapiens] gi|4574744|gb|AAD24196.1|AF135794_1[4574744]); Accession Number AAF91073
- 10 (protein kinase B gamma 1 [Homo sapiens] gi|15072340|gb|AAF91073.1|[15072340]); Accession Number AAD29089 (protein kinase B gamma [Homo sapiens] gi|4757579|gb|AAD29089.1|AF124141_1[4757579]); Accession Number NP_005456 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 isoform 1; protein kinase B gamma; RAC-gamma serine/threonine protein kinase; serine threonine protein kinase, Akt-3 [Homo sapiens] gi|4885549|ref|NP_005456.1|[4885549]); Accession Number NP_859029 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 isoform 2; protein kinase B gamma; RAC-gamma serine/threonine protein kinase; serine threonine protein kinase, Akt-3 [Homo sapiens] gi|32307163|ref|NP_859029.1|[32307163]).

The term "B-Raf" refers to B-Raf nucleic acid (DNA and RNA), protein (or

20 polypeptide), their polymorphic variants, alleles, mutants, and interspecies homologs that have (i) substantial nucleotide sequence homology with the nucleotide sequence of B-Raf found in Genbank (NM_004333) a Homo sapiens v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF), mRNA, gi|33188458|ref|NM_004333.2|[33188458]. The cognate protein sequence for B-Raf is GenBank Accession Number P15056.

25 One B-Raf protein found in Genbank is M95712 Homo sapiens B-raf protein (BRAF) mRNA, complete cds gi|41387219|gb|M95712.2|HUMBRAF[41387219].

A "control sample" refers to a sample of biological material representative of healthy, cancer-free animals. The level of Akt3 or B-Raf in a control sample, or the encoding corresponding gene copy number, is desirably typical of the general population of

30 normal, cancer-free subject of the same species. This sample either can be collected from an animal for the purpose of being used in the methods described in the present invention

or it can be any biological material representative of normal, cancer-free animals obtained for other reasons but nonetheless suitable for use in the methods of this invention. A control sample can also be obtained from normal tissue from the animal that has cancer or is suspected of having cancer. A control sample also can refer to a given level of Akt3, representative of the cancer-free population, that has been previously established based on measurements from normal, cancer-free subjects. Alternatively, a biological control sample can refer to a sample that is obtained from a different individual or be a normalized value based on baseline data obtained from a population. Further, a control sample can be defined by a specific age, sex, ethnicity or other demographic parameters. In some situations, the control is implicit in the particular measurement. An example of an implicit control is where a detection method can only detect Akt3, or the corresponding gene copy number, when a level higher than that typical of a normal, cancer-free subject is present. A typical control level for a gene is two copies per cell. Another example is in the context of an immunohistochemical assay where the control level for the assay is known. Other instances of such controls are within the knowledge of the skilled person.

A level of Akt3 or B-Raf polypeptide or polynucleotide that is "expected" in a control sample refers to a level that represents a typical, cancer-free sample, and from which an elevated, or diagnostic, presence of Akt3 polypeptide or polynucleotide can be distinguished. Preferably, an "expected" level will be controlled for such factors as the age, sex, medical history, etc. of the mammal, as well as for the particular biological subject being tested.

The term "tumor cell" is meant a cell that is a component of a tumor in a subject, or a cell that is determined to be destined to become a component of a tumor, i.e., a cell that is a component of a precancerous lesion in a subject.

"cDNA" refers to complementary or copy DNA produced from an RNA template by the action of RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase). Thus, a "cDNA clone" means a duplex DNA sequence complementary to an RNA molecule of interest, carried in a cloning vector or PCR amplified. This term includes genes from which the intervening sequences have been removed.

"Cloning vector" refers to a plasmid or phage DNA or other DNA sequence that is able to replicate in a host cell. The cloning vector is characterized by one or more

endonuclease recognition sites at which such DNA sequences may be cut in a determinable fashion without loss of an essential biological function of the DNA, which may contain a marker suitable for use in the identification of transformed cells.

"Expression vector" refers to a vehicle or vector similar to a cloning vector but which is capable of expressing a nucleic acid sequence that has been cloned into it, after transformation into a host. A nucleic acid sequence is "expressed" when it is transcribed to yield an mRNA sequence. In most cases, this transcript will be translated to yield amino acid sequence. The cloned gene is usually placed under the control of (i.e., operably linked to) an expression control sequence.

"Expression control sequence" or "regulatory sequence" refers to a nucleotide sequence that controls or regulates expression of structural genes when operably linked to those genes. These include, for example, the lac systems, the trp system, major operator and promoter regions of the phage lambda, the control region of fd coat protein and other sequences known to control the expression of genes in prokaryotic or eukaryotic cells.

Expression control sequences will vary depending on whether the vector is designed to express the operably linked gene in a prokaryotic or eukaryotic host, and may contain transcriptional elements such as enhancer elements, termination sequences, tissue-specificity elements or translational initiation and termination sites.

"Operably linked" means that the promoter controls the initiation of expression of the gene. A promoter is operably linked to a sequence of proximal DNA if upon introduction into a host cell the promoter determines the transcription of the proximal DNA sequence(s) into one or more species of RNA. A promoter is operably linked to a DNA sequence if the promoter is capable of initiating transcription of that DNA sequence.

"Host" means eukaryotes. The term includes an organism or cell that is the recipient of a replicable expression vector.

The introduction of the nucleic acids into the host cell by any method known in the art, including those described herein, will be referred to herein as "transformation." The cells into which have been introduced nucleic acids described above are meant to also include the progeny of such cells.

Nucleic acids referred to herein as "isolated" are nucleic acids separated away from the nucleic acids of the genomic DNA or cellular RNA of their source of origin (e.g., as it

exists in cells or in a mixture of nucleic acids such as a library), and may have undergone further processing. "Isolated", as used herein, refers to nucleic or amino acid sequences that are at least 60% free, preferably 75% free, and most preferably 90% free from other components with which they are naturally associated. "Isolated" nucleic acids (polynucleotides) include nucleic acids obtained by methods described herein, similar methods or other suitable methods, including essentially pure nucleic acids, nucleic acids produced by chemical synthesis, by combinations of biological and chemical methods, and recombinant nucleic acids which are isolated. Nucleic acids referred to herein as "recombinant" are nucleic acids which have been produced by recombinant DNA methodology, including those nucleic acids that are generated by procedures which rely upon a method of artificial replication, such as the polymerase chain reaction (PCR) or cloning into a vector using restriction enzymes. "Recombinant" nucleic acids are also those that result from recombination events that occur through the natural mechanisms of cells, but are selected for after the introduction to the cells of nucleic acids designed to allow or make probable a desired recombination event. Portions of the isolated nucleic acids which code for polypeptides having a certain function can be identified and isolated by, for example, the method of Jasin, M., et al., U.S. Pat. No. 4,952,501.

As used herein, the terms "protein" and "polypeptide" are synonymous. "Peptides" are defined as fragments or portions of polypeptides, preferably fragments or portions having at least one functional activity (e.g., proteolysis, adhesion, fusion, antigenic, or intracellular activity) as the complete polypeptide sequence.

The terms "patient" or "subject" are used interchangeably and refer to mammals such as human patients and non-human primates, as well as experimental animals such as rabbits, rats, and mice, and other animals.

"Biological sample" as used herein is a sample of biological tissue or fluid that contains Akt3 and/or B-Raf nucleic acids or polypeptides, e.g., of a melanoma cancer protein, polynucleotide or transcript. Such samples include, but are not limited to, tissue isolated from humans. Biological samples may also include sections of tissues such as biopsy and autopsy samples, frozen sections taken for histologic purposes, blood, plasma, serum, sputum, stool, tears, mucus, hair, skin, etc. Biological samples also include explants and primary and/or transformed cell cultures derived from patient tissues. A biological

sample is typically obtained from a eukaryotic organism, preferably eukaryotes such as fungi, plants, insects, protozoa, birds, fish, reptiles, and preferably a mammal such as rat, mice, cow, dog, guinea pig, or rabbit, and most preferably a primate such as chimpanzees or humans.

5 Cancer" or "malignancy" are used as synonymous terms and refer to any of a number of diseases that are characterized by uncontrolled, abnormal proliferation of cells, the ability of affected cells to spread locally or through the bloodstream and lymphatic system to other parts of the body (i.e., metastasize) as well as any of a number of characteristic structural and/or molecular features. A "cancerous" or "malignant cell" is
10 understood as a cell having specific structural properties, lacking differentiation and being capable of invasion and metastasis. Examples of cancers are skin, kidney, colon, breast, prostate and liver cancer. (see DeVita, V. et al. (eds.), 2001, Cancer Principles and Practice of Oncology, 6th. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.; this reference is herein incorporated by reference in its entirety for all purposes).

15 The term "apoptosis" and "programmed cell death" (PCD) are used as synonymous terms and describe the molecular and morphological processes leading to controlled cellular self-destruction (see, e.g., Kerr J. F. R. et al., 1972, Br J Cancer. 26:239-257). Apoptotic cell death can be induced by a variety of stimuli, such as ligation of cell surface receptors, starvation, growth factor/survival factor deprivation, heat shock, hypoxia, DNA
20 damage, viral infection, and cytotoxic/chemotherapeutical agents. The apoptotic process is involved in embryogenesis, differentiation, proliferation/homoeostasis, removal of defect and therefore harmful cells, and especially in the regulation and function of the immune system. Thus, dysfunction or dysregulation of the apoptotic program is implicated in a variety of pathological conditions, such as immunodeficiency, autoimmune diseases,
25 neurodegenerative diseases, and cancer. Apoptotic cells can be recognized by stereotypical morphological changes: the cell shrinks, shows deformation and looses contact to its neighboring cells. Its chromatin condenses, and finally the cell is fragmented into compact membrane-enclosed structures, called "apoptotic bodies" which contain cytosol, the condensed chromatin, and organelles. The apoptotic bodies are engulfed by macrophages
30 and thus are removed from the tissue without causing an inflammatory response. This is in contrast to the necrotic mode of cell death in which case the cells suffer a major insult,

resulting in loss of membrane integrity, swelling and disruption of the cells. During necrosis, the cell contents are released uncontrolled into the cell's environment what results in damage of surrounding cells and a strong inflammatory response in the corresponding tissue. See, e.g., Tomei L. D. and 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; each of which is herein incorporated by reference in its entirety for all purposes. A variety of apoptosis assays are well known to one of skill in the art (e.g., DNA fragmentation assays, radioactive proliferation assays, DNA laddering assays for treated cells, Fluorescence microscopy of 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) stained cells assays, and the like).

"Conservatively modified variants" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given polypeptide. For instance, the codons CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, and AGG all encode the amino acid arginine. Thus, at every position where an arginine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent substitutions" or "silent variations," which are one species of "conservatively modified variations." Every polynucleotide sequence described herein which encodes a polypeptide also describes every possible silent variation, except where otherwise noted. Thus, silent substitutions are an implied feature of every nucleic acid sequence which encodes an amino acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine) can be modified to yield a functionally identical molecule by standard techniques. In some embodiments, the nucleotide sequences that encode the enzymes are preferably optimized for expression in a particular host cell (e.g., yeast, mammalian, plant, fungal, and the like) used to produce the enzymes.

As to amino acid sequences, one of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence which

B

alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a "conservatively modified variant" where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art.

- 5 See, for example, Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1994). Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention.

The following eight groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (see, e.g., Creighton, 1984, *Proteins*).

The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (i.e., about 70% identity, preferably 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or higher identity over a specified region (e.g., the sequence of the melanoma-associated Akt3 gene), when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window or designated region) as measured using a BLAST or BLAST 2.0 sequence comparison algorithms with default parameters described below, or by manual alignment and visual inspection. Such sequences are then said to be "substantially identical." This definition also refers to the complement of a test sequence. The definition also includes sequences that have deletions and/or additions, as well as those that have substitutions. As described below, the preferred algorithms can account for gaps and the like. Preferably, the identity exists over a region that is at least about 25 amino acids or nucleotides in length, or more preferably over a region that is 50-100 amino acids or nucleotides in length.

For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if

necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

5 A "comparison window", as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 600, usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150 in which a sequence can be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. Methods of alignment of sequences
10 for comparison are well-known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local homology algorithm of Smith & Waterman, 1991, *Adv. Appl. Math.* 2:482, by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, by the search for similarity method of Pearson & Lipman, 1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, by computerized implementations of these algorithms
15 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), or by manual alignment and visual inspection (see, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 supplement).

 Another example of algorithm that is suitable for determining percent sequence
20 identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al., 1977, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 and Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). This algorithm involves first identifying high scoring
25 sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul et al., *supra*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are extended in both
30 directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters

M (reward score for a pair of matching residues; always >0) and N (penalty score for mismatching residues; always <0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands.

The BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin & Altschul, 1993, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.2, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

An indication that two nucleic acid sequences or polypeptides are substantially identical is that the polypeptide encoded by the first nucleic acid is immunologically cross reactive with the antibodies raised against the polypeptide encoded by the second nucleic acid, as described below. Thus, a polypeptide is typically substantially identical to a second polypeptide, for example, where the two peptides differ only by conservative substitutions. Another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the two molecules or their complements hybridize to each other under stringent conditions, as described below. Yet another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the same primers can be used to amplify the sequence.

The phrase "selectively (or specifically) hybridizes to" refers to the binding, duplexing, or hybridizing of a molecule only to a particular nucleotide sequence under stringent hybridization conditions when that sequence is present in a complex mixture (e.g., total cellular or library DNA or RNA).

5 The phrase "stringent hybridization conditions" refers to conditions under which a probe will hybridize to its target subsequence, typically in a complex mixture of nucleic acid, but to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen,
10 1993, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" in Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes. Generally, stringent conditions are selected to be about 5-10° C. lower than the thermal melting point (T_M) for the specific sequence at a defined ionic strength pH. The T_M is the temperature (under defined ionic strength, pH, and nucleic concentration) at which 50% of
15 the probes complementary to the target hybridize to the target sequence at equilibrium (as the target sequences are present in excess, at T_M , 50% of the probes are occupied at equilibrium). Stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.0 M sodium ion, typically about 0.01 to 1.0 M sodium ion concentration (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30° C. for short probes (e.g., 10
20 to 50 nucleotides) and at least about 60° C. for long probes (e.g., greater than 50 nucleotides). Stringent conditions can also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. For selective or specific hybridization, a positive signal is at least two times background, optionally 10 times background hybridization. Exemplary stringent hybridization conditions can be as following: 50% formamide, 5X SSC, and 1%
25 SDS, incubating at 42° C., or, 5X SSC, 1% SDS, incubating at 65° C., with wash in 0.2X SSC, and 0.1% SDS at 65° C. Such washes can be performed for 5, 15, 30, 60, 120, or more minutes. For PCR, a temperature of about 36° C. is typical for low stringency amplification, although annealing temperatures can vary between about 32° C. and 48° C. depending on primer length. For high stringency PCR amplification, a temperature of about
30 62° C. is typical, although high stringency annealing temperatures can range from about 50° C. to about 65° C., depending on the primer length and specificity. Typical cycle

conditions for both high and low stringency amplifications include a denaturation phase of 90° C.-95° C. for 30 sec.-2 min., an annealing phase lasting 30 sec.-2 min., and an extension phase of about 72° C. for 1-2 min.

Nucleic acids that do not hybridize to each other under stringent conditions are still substantially identical if the polypeptides which they encode are substantially identical. This occurs, for example, when a copy of a nucleic acid is created using the maximum codon degeneracy permitted by the genetic code. In such cases, the nucleic acids typically hybridize under moderately stringent hybridization conditions. Exemplary "moderately stringent hybridization conditions" include a hybridization in a buffer of 40% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS at 37° C., and a wash in 1X SSC at 45° C. Such washes can be performed for 5, 15, 30, 60, 120, or more minutes. A positive hybridization is at least twice background. Those of ordinary skill will readily recognize that alternative hybridization and wash conditions can be utilized to provide conditions of similar stringency.

Standard reference works setting forth the general principles of recombinant DNA technology include 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.

The term "reduces Akt3 activity" is used herein to refer to about a 25% to about a 100% decrease in Akt3 activity. The invention contemplates the inhibition Akt3 via any (a) agent that reduces the level of Akt3 mRNA or the level of Akt3 protein produced by the cell when the agent is administered to the cell or (b) any agent that affects the level of Akt3 mRNA or protein via the PI3K/Akt signal transduction pathway resulting a reduction in the level of Akt3 mRNA or the level of Akt3 protein produced by the cell when the agent is administered to the cell, or (c) any agent that decreases the activity of Akt3, such as through phosphorylation or dephosphorylation. Agents that decrease activity of downstream pathways that remove products of Akt3 activity and decreasing activity of upstream pathways providing reactants for Akt3 are also within the scope of this term. A decrease or change in Akt3 activity can be measured by any known method including, but not limited to, kinase assays, phosphorylation status in western blots, or levels of protein expression.

The term "reduces V599E B-Raf activity" is used herein to refer to about a 25% to about a 100% decrease in B-Raf activity. The invention contemplates the inhibition B-Raf via any (a) agent that reduces the level of V599E B-Raf mRNA or the level of V599E protein produced by the cell when the agent is administered to the cell or (b) any agent that affects the level of B-Raf mRNA or protein via the MAPK or ERK signal transduction pathway resulting a reduction in the level of V599E B-Raf mRNA or the level of V599E protein produced by the cell when the agent is administered to the cell, or (c) any agent that decreases the activity of B-Raf, such as through phosphorylation or dephosphorylation. Agents that decrease activity of downstream pathways that remove products of V599E B-Raf activity and decreasing activity of upstream pathways providing reactants for V599E B-Raf are also within the scope of this term. A decrease or change in B-Raf activity can be measured by any known method including, but not limited to, kinase assays, phosphorylation status in western blots, or levels of protein expression.

The term "treating a melanoma" refers to prohibiting, alleviating, ameliorating, halting, restraining, slowing or reversing the progression, or reducing tumor development in mammals and increasing apoptosis rates or inducing apoptosis in a tumor cell.

As used herein, the term "angiogenesis" when used in reference to reducing vascularization when, means that the amount of new blood vessel formation that occurs in the presence of an agent is decreased below the amount of blood vessel formation that occurs in the absence of an exogenously added agent. Methods for determining an amount of blood vessel formation in a tissue, including the immunohistochemical methods are well known in the art by quantifying the number of vessels staining positive for the CD-31 antigen or area in the tumor occupied by CD-31 positive vessels.

Detection of Akt3 and/or B-Raf Nucleic Acids

In some embodiments of the present invention, nucleic acids encoding an Akt3 or B-Raf polypeptide, including a full-length Akt3 or B-Raf protein, or any derivative, variant, homolog, or fragment thereof derived from a melanoma cell, will be used. Such nucleic acids are useful for any of a number of applications, including for the production of Akt3 or B-Raf protein, for diagnostic assays, for therapeutic applications, for Akt3-specific or B-Raf-specific probes, for assays for Akt3 or B-Raf binding and/or modulating compounds, to identify and/or isolate Akt3 or B-Raf homologs from other species or from mice, and other applications.

A. General Recombinant DNA Methods

Numerous applications of the present invention involve the cloning, synthesis, maintenance, mutagenesis, and other manipulations of nucleic acid sequences that can be performed using routine techniques in the field of recombinant genetics. Basic texts disclosing the general methods of use in this invention include 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.).

For nucleic acids, sizes are given in either kilobases (kb) or base pairs (bp). These are estimates derived from agarose or acrylamide gel electrophoresis, from sequenced nucleic acids, or from published DNA sequences. For proteins, sizes are given in kilodaltons (kDa) or amino acid residue numbers. Proteins sizes are estimated from gel electrophoresis, from sequenced proteins, from derived amino acid sequences, or from published protein sequences.

Oligonucleotides that are not commercially available can be chemically synthesized according to the solid phase phosphoramidite triester method first described by Beaucage & Caruthers, 1981, Tetrahedron Letts. 22:1859-1862, using an automated synthesizer, as described in Van Devanter et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12:6159-6168. Purification of oligonucleotides is by either native acrylamide gel electrophoresis or by anion-exchange HPLC as described in Pearson & Reanier, 1983, J. Chrom. 255:137-149.

The sequence of the cloned genes and synthetic oligonucleotides can be verified after cloning using, e.g., the chain termination method for sequencing double-stranded templates of Wallace et al., 1981, Gene 16:21-26.

B. Isolating and Detecting Akt3 and/or B-Raf Nucleotide Sequences

In some embodiments of the present invention, Akt3 and/or B-Raf nucleic acids will be isolated and cloned using recombinant methods. Such embodiments are used, e.g., to isolate Akt3 and/or B-Raf polynucleotides for protein expression or during the generation of variants, derivatives, expression cassettes, or other sequences derived from Akt3 and/or B-Raf, to monitor Akt3 and/or B-Raf gene expression, for the determination of Akt3 and/or B-Raf sequences in various species, for diagnostic purposes in a patient, i.e., to detect mutations in Akt3 and/or B-Raf, or for genotyping and/or forensic applications.

Polymorphic variants, alleles, and interspecies homologs and nucleic acids that are substantially identical to the Akt3 or B-Raf gene can be isolated using Akt3 or B-Raf nucleic acid probes, and oligonucleotides by screening libraries under stringent hybridization conditions. Alternatively, expression libraries can be used to clone Akt3 or B-Raf proteins, polymorphic variants, alleles, and interspecies homologs, by detecting expressed homologs immunologically with antisera or purified antibodies made against an Akt3 or B-Raf polypeptide, which also recognize and selectively bind to the Akt3 or B-Raf homolog.

To make a Akt3 cDNA library, one should choose a source that is rich in Akt3 RNA. To make a B-Raf cDNA library, one should choose a source that is rich in B-Raf RNA. The mRNA is then made into cDNA using reverse transcriptase, ligated into a recombinant vector, and transfected into a recombinant host for propagation, screening and cloning. Methods for making and screening cDNA libraries are well known (see, e.g., Gubler & Hoffman, 1983, Gene 25:263-269; Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra).

For a genomic library, the DNA is extracted from the tissue and either mechanically sheared or enzymatically digested to yield fragments of about 12-20 kb. The fragments are then separated by gradient centrifugation from undesired sizes and are constructed in bacteriophage lambda vectors. These vectors and phage are packaged in vitro.

- 5 Recombinant phage are analyzed by plaque hybridization as described in Benton & Davis, 1977, Science 196:180-182. Colony hybridization is carried out as generally described in Grunstein et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72:3961-3965.

- 10 More distantly related Akt3 or B-Raf homologs can be identified using any of a number of well known techniques, including by hybridizing an Akt3 probe or a B-Raf probe with a genomic or cDNA library using moderately stringent conditions, or under low stringency conditions using probes from regions which are selective for Akt3 or B-Raf, e.g., specific probes generated to the C-terminal domain. Also, a distant homolog can be amplified from a nucleic acid library using degenerate primer sets, i.e., primers that incorporate all possible codons encoding a given amino acid sequence, in particular based on a highly conserved amino acid stretch. Such primers are well known to those of skill, and numerous programs are available, e.g., on the internet, for degenerate primer design.

- 15 In certain embodiments, Akt3 or B-Raf polynucleotides will be detected using hybridization-based methods to determine, e.g., Akt3 or B-Raf RNA levels or to detect particular DNA sequences, e.g., for diagnostic purposes. For example, gene expression of Akt3 and/or B-Raf can be analyzed by techniques known in the art, e.g., Northern blotting, reverse transcription and PCR amplification of mRNA, including quantitative PCR analysis of mRNA levels with real-time PCR procedures (e.g., reverse transcriptase-TAQMAN™ amplification), dot blotting, in situ hybridization, RNase protection, probing DNA microchip arrays, and the like.

- 25 In another embodiment, high density oligonucleotide analysis technology (e.g., GeneChip™) may be used to identify orthologs, alleles, conservatively modified variants, and polymorphic variants of Akt3 and/or B-Raf, or to monitor levels of Akt3 and/or B-Raf mRNA. In the case where a homologs is linked to a known disease, e.g., melanoma, they can be used with GeneChip™ as a diagnostic tool in detecting melanoma in a biological sample, see, e.g., Gunthand 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;
- 30

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.

Detection of Akt3 and/or B-Raf polynucleotides and polypeptides can involve quantitative or qualitative detection of the polypeptide or polynucleotide, and can involve an actual comparison with a control value or, alternatively, can be performed so that the detection itself inherently indicates an increased level of Akt3 and/or B-Raf.

In certain embodiments, for example, diagnosis of melanoma cancer, the level of Akt3 and/or B-Raf polynucleotide, polypeptide, or protein activity will be quantified. In such embodiments, the difference between an elevated level of Akt3 and/or B-Raf and a normal, control level will preferably be statistically significant. Typically, a diagnostic presence, i.e., overexpression or an increase of Akt3 and/or B-Raf polypeptide or nucleic acid, represents at least about a 1.5, 2, 3, 5, 10, or greater fold increase in the level of Akt3 and/or B-Raf polypeptide or polynucleotide in the biological sample compared to a level expected in a noncancerous sample. Detection of Akt3 and/or B-Raf can be performed *in vitro*, i.e., in cells within a biological sample taken from the patient, or *in vivo*. In one embodiment an increased level of Akt3 and/or B-Raf is used as a diagnostic marker of Akt3 and/or B-Raf respectively. As used herein, a "diagnostic presence" indicates any level of Akt3 or B-Raf that is greater than that expected in a noncancerous sample. In a one embodiment, assays for an Akt3 or B-Raf polypeptide or polynucleotide in a biological sample are conducted under conditions wherein a normal level of Akt3 or B-Raf polypeptide or polynucleotide, i.e., a level typical of a noncancerous sample, i.e., cancer-free, would not be detected. In such assays, therefore, the detection of any Akt3 and/or B-Raf polypeptide or nucleic acid in the biological sample indicates a diagnostic presence, or increased level.

As described below, any of a number of methods to detect Akt3 and/or B-Raf can be used. An Akt3 and/or B-Raf polynucleotide level can be detected by detecting any cognate Akt3 or B-Raf DNA or RNA, including Akt3 genomic DNA, mRNA, and cDNA. An Akt3 or B-Raf polypeptide can be detected by detecting an Akt3 and/or B-Raf polypeptide itself, or by detecting Akt3 and/or B-Raf protein activity. Detection can involve quantification of the level of Akt3 and/or B-Raf (e.g., genomic DNA, cDNA, mRNA, or protein level, or protein activity) or, alternatively, can be a qualitative

23

assessment of the level, or of the presence or absence, of Akt3 and/or B-Raf, in particular in comparison with a control level. Any of a number of methods to detect any of the above can be used, as described *infra*. Such methods include, for example, hybridization, amplification, and other assays.

5 In certain embodiments, the ability to detect an increased level, or diagnostic presence, in a cell is used as a marker for cancer cells, i.e., to monitor the number or localization of cancer cells in a patient, as detected *in vivo* or *in vitro*.

Typically, the Akt3 polynucleotides or polypeptides detected herein will be at least about 70% identical, and preferably 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,
10 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical, over a region of at least about 50, 100, 200, or more nucleotides, or 20, 50, 100, or more amino acids, to the naturally occurring Akt3 gene. Such polynucleotides or polypeptides can represent functional or nonfunctional forms of Akt3, or any variant, derivative, or fragment thereof.

1. Detection of Copy Number

15 In one embodiment, e.g., for the diagnosis or presence of cancer, the copy number, i.e., the number of Akt3 genes in a cell, is evaluated. Generally, for a given autosomal gene, an animal has two copies of each gene. The copy number can be increased, however, by gene amplification or duplication, e.g., in cancer cells, or reduced by deletion. Methods of evaluating the copy number of a particular gene are well known to those of skill in the
20 art, and include, *inter alia*, hybridization- and amplification-based assays.

a) Hybridization-based Assays

Any of a number of hybridization-based assays can be used to detect the Akt3 gene or the copy number of Akt3 genes in the cells of a biological sample. One such method is by Southern blot. In a Southern blot, genomic DNA is typically fragmented, separated
25 electrophoretically, transferred to a membrane, and subsequently hybridized to an Akt3 - specific probe. For copy number determination, comparison of the intensity of the hybridization signal from the probe for the target region with a signal from a control probe for a region of normal genomic DNA (e.g., a nonamplified portion of the same or related cell, tissue, organ, and the like) provides an estimate of the relative Akt3 copy number.
30 Southern blot methodology is well known in the art and is described, e.g., in Ausubel et al., or Sambrook et al., *supra*.

An alternative means for determining the copy number of Akt3 genes in a sample is by in situ hybridization, e.g., fluorescence in situ hybridization, or FISH. In situ hybridization assays are well known (e.g., Angerer, 1987, Meth. Enzymol 152:649). Generally, in situ hybridization comprises the following major steps: (1) fixation of tissue or biological structure to be analyzed; (2) prehybridization treatment of the biological structure to increase accessibility of target DNA, and to reduce nonspecific binding; (3) hybridization of the mixture of nucleic acids to the nucleic acid in the biological structure or tissue; (4) post-hybridization washes to remove nucleic acid fragments not bound in the hybridization; and (5) detection of the hybridized nucleic acid fragments.

The probes used in such applications are typically labeled, e.g., with radioisotopes or fluorescent reporters. Preferred probes are sufficiently long, e.g., from about 50, 100, or 200 nucleotides to about 1000 or more nucleotides, so as to specifically hybridize with the target nucleic acid(s) under stringent conditions.

The present invention contemplates "comparative probe" methods, such as comparative genomic hybridization (CGH), are used to detect Akt3 gene amplification. In comparative genomic hybridization methods, a "test" collection of nucleic acids is labeled with a first label, while a second collection (e.g., from a healthy cell or tissue) is labeled with a second label. The ratio of hybridization of the nucleic acids is determined by the ratio of the first and second labels binding to each fiber in an array. Differences in the ratio of the signals from the two labels, e.g., due to gene amplification in the test collection, is detected and the ratio provides a measure of the Akt3 gene copy number.

Hybridization protocols suitable for use with the methods of the invention are described, e.g., in 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., and the like.

b) Amplification-based Assays

In another embodiment, amplification-based assays are used to detect Akt3 or to measure the copy number of Akt3 genes. In such assays, the Akt3 nucleic acid sequences act as a template in an amplification reaction (e.g., Polymerase Chain Reaction, or PCR). In a quantitative amplification, the amount of amplification product will be proportional to the

amount of template in the original sample. Comparison to appropriate controls provides a measure of the copy number of the Akt3 gene. Methods of quantitative amplification are well known to those of skill in the art. Detailed protocols for quantitative PCR are provided, e.g., in Innis et al., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.). The nucleic acid sequence for Akt3 is sufficient to enable one of skill to routinely select primers to amplify any portion of the gene.

In some embodiments, a TaqMan based assay is used to quantify Akt3 polynucleotides. TaqMan based assays use a fluorogenic oligonucleotide probe that contains a 5' fluorescent dye and a 3' quenching agent. The probe hybridizes to a PCR product, but cannot itself be extended due to a blocking agent at the 3' end. When the PCR product is amplified in subsequent cycles, the 5' nuclease activity of the polymerase, e.g., AmpliTaq, results in the cleavage of the TaqMan probe. This cleavage separates the 5' fluorescent dye and the 3' quenching agent, thereby resulting in an increase in fluorescence as a function of amplification (see, for example, literature provided by Perkin-Elmer, e.g., www.perkin-elmer.com).

Other suitable amplification methods which are contemplated by the invention include, but are not limited to, ligase chain reaction (LCR) (see, Wu and Wallace, 1989, Genomics 4:560, Landegren et al., 1988, Science 241:1077, and Barringer et al., 1990, Gene 89:117), transcription amplification (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173), self-sustained sequence replication (Guatelli et al., 1990, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:1874), dot PCR, and linker adapter PCR, etc.

2. Detection of Akt3 and/or B-Raf Expression

a) Direct Hybridization-based Assays

Methods of detecting and/or quantifying the level of Akt3 and/or B-Raf gene transcripts (mRNA or cDNA made there from) using nucleic acid hybridization techniques are known to those of skill in the art (see, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2D Ed., Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, New York).

For example, one method for evaluating the presence, absence, or quantity of Akt3 cDNA involves a Northern blot. In brief, in a typical embodiment, mRNA is isolated from a given biological sample, electrophoresed to separate the mRNA species, and transferred

from the gel to a nitrocellulose membrane. Labeled Akt3 probes are then hybridized to the membrane to identify and/or quantify the mRNA.

b) Amplification-based Assays

In another embodiment, an Akt3 and/or B-Raf transcript (e.g., Akt3 mRNA) is detected using amplification-based methods (e.g., RT-PCR). RT-PCR methods are well known to those of skill (see, e.g., Ausubel et al., *supra*). Preferably, quantitative RT-PCR is used, thereby allowing the comparison of the level of mRNA in a sample with a control sample or value.

3. Detection of Akt3 and/or B-Raf Polypeptide Expression

In addition to the detection of Akt3 and/or B-Raf genes and gene expression using nucleic acid hybridization technology, Akt3 and/or B-Raf levels can also be detected and/or quantified by detecting or quantifying the polypeptide. Akt3 or B-Raf polypeptides are detected and quantified by any of a number of means well known to those of skill in the art. These include analytic biochemical methods such as electrophoresis, capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC), hyperdiffusion chromatography, and the like, or various immunological methods such as fluid or gel precipitin reactions, immunodiffusion (single or double), immunoelectrophoresis, radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), immunofluorescent assays, western blotting, and the like. Akt3 polypeptide detection is discussed *infra*.

C. Expression in Prokaryotes and Eukaryotes

In some embodiments, it is desirable to produce Akt3 and/or B-Raf polypeptides using recombinant technology. To obtain high level expression of a cloned gene or nucleic acid, such as a cDNA encoding an Akt3 or B-Raf polypeptide, an Akt3 or B-Raf sequence is typically subcloned into an expression vector that contains a strong promoter to direct transcription, a transcription/translation terminator, and if for a nucleic acid encoding a protein, a ribosome binding site for translational initiation. Suitable bacterial promoters are well known in the art and are described, e.g., in Sambrook et al. and Ausubel et al. Bacterial expression systems for expressing the Akt3 protein are available in, e.g., *E. coli*, *Bacillus* sp., and *Salmonella* (Palva et al., 1983, *Gene* 22:229-235; Mosbach et al., 1983, *Nature* 302:543-545. Kits for such expression systems are commercially available.

Eukaryotic expression systems for mammalian cells, yeast, and insect cells are well known in the art and are also commercially available. In one embodiment, the eukaryotic expression vector is an adenoviral vector, an adeno-associated vector, or a retroviral vector.

For therapeutic applications, Akt3 and/or B-Raf nucleic acids are introduced into a cell, *in vitro*, *in vivo*, or *ex vivo*, using any of a large number of methods including, but not limited to, infection with viral vectors, liposome-based methods, biolistic particle acceleration (the gene gun), and naked DNA injection. Such therapeutically useful nucleic acids include, but are not limited to, coding sequences for full-length Akt3 or B-Raf, coding sequences for a Akt3 or B-Raf fragment, domain, derivative, or variant, Akt3 or B-Raf antisense sequences, Akt3 or B-Raf siRNA sequences, and Akt3 or B-Raf ribozymes. Typically, such sequences will be operably linked to a promoter, but in numerous applications a nucleic acid will be administered to a cell that is itself directly therapeutically effective, e.g., certain antisense, siRNA, or ribozyme molecules.

The promoter used to direct expression of a heterologous nucleic acid depends on the particular application. The promoter is optionally positioned about the same distance from the heterologous transcription start site as it is from the transcription start site in its natural setting. As is known in the art, however, some variation in this distance can be accommodated without loss of promoter function.

In addition to the promoter, the expression vector typically contains a transcription unit or expression cassette that contains all the additional elements required for the expression of the Akt3-encoding or B-Raf-encoding nucleic acid in host cells. A typical expression cassette thus contains a promoter operably linked to the nucleic acid sequence encoding an Akt3 or B-Raf polypeptide, and signals required for efficient polyadenylation of the transcript, ribosome binding sites, and translation termination. The nucleic acid sequence encoding an Akt3 or B-Raf polypeptide can be linked to a cleavable signal peptide sequence to promote secretion of the encoded protein by the transfected cell. Additional elements of the cassette can include enhancers and, if genomic DNA is used as the structural gene, introns with functional splice donor and acceptor sites.

In addition to a promoter sequence, the expression cassette should also contain a transcription termination region downstream of the structural gene to provide for efficient

termination. The termination region can be obtained from the same gene as the promoter sequence or can be obtained from different genes.

The particular expression vector used to transport the genetic information into the cell is not particularly critical. Any of the conventional vectors used for expression in eukaryotic or prokaryotic cells can be used. Useful expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, e.g., *E. coli* plasmids col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith et al., 1988, *Gene* 67:31-40), pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; phage DNAs, e.g., the numerous derivatives of phage λ , e.g., NM989, and other phage DNA, e.g., M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2 μ plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like. For example, mammalian expression vectors contemplated for use in the invention include vectors with inducible promoters, such as the dihydrofolate reductase (DHFR) promoter, e.g., any expression vector with a DHFR expression vector, or a DHFR/methotrexate co-amplification vector, such as pED (PstI, SalI, SbaI, SmaI, and EcoRI cloning site, with the vector expressing both the cloned gene and DHFR; see Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.12 (1991). Alternatively, a glutamine synthetase/methionine sulfoximine co-amplification vector, such as pEE14 (HindIII, XbaI, SmaI, SbaI, EcoRI, and BclI cloning site, in which the vector expresses glutamine synthase and the cloned gene; Celltech). In another embodiment, a vector that directs episomal expression under control of Epstein Barr Virus (EBV) can be used, such as pREP4 (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, and KpnI cloning site, constitutive Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat (RSV-LTR) promoter, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pCEP4 (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, and KpnI cloning site, constitutive human cytomegalovirus (hCMV) immediate early gene, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pMEP4 (KpnI, PvuI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, BamHI cloning site, inducible methallothionein IIa gene promoter, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pREP8 (BamHI, XhoI, NotI,

HindIII, NheI, and KpnI cloning site, RSV-LTR promoter, histidinol selectable marker; Invitrogen), pREP9 (KpnI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, and BamHI cloning site, RSV-LTR promoter, G418 selectable marker; Invitrogen), and pEBVHis (RSV-LTR promoter, hygromycin selectable marker, N-terminal peptide purifiable via ProBond resin and cleaved by enterokinase; Invitrogen). Selectable mammalian expression vectors for use in the invention include, but are limited to, pRc/CMV (HindIII, BstXI, NotI, SbaI, and ApaI cloning site, G418 selection; Invitrogen), pRc/RSV (HindIII, SpeI, BstXI, NotI, XbaI cloning site, G418 selection; Invitrogen), and others. Vaccinia virus mammalian expression vectors (see, Kaufman, 1991, *supra*) contemplated by this invention include but are not limited to pSC11 (SmaI cloning site, TK- and β -gal selection), pMJ601 (SalI, SmaI, AflI, NarI, BspMII, BamHI, ApaI, NheI, SacII, KpnI, and HindIII cloning site; TK- and β -gal selection), and pTKgptF1S (EcoRI, PstI, SalI, AccI, HindII, SbaI, BamHI, and Hpa cloning site, TK or XPRT selection).

The elements that are typically included in expression vectors also include a replicon that functions in *E. coli*, a gene encoding antibiotic resistance to permit selection of bacteria that harbor recombinant plasmids, and unique restriction sites in nonessential regions of the plasmid to allow insertion of eukaryotic sequences. The particular antibiotic resistance gene chosen is not critical, any of the many resistance genes known in the art are suitable. The prokaryotic sequences are optionally chosen such that they do not interfere with the replication of the DNA in eukaryotic cells, if necessary.

Once a particular recombinant DNA molecule is identified and isolated, several methods known in the art may be used to propagate it. Once a suitable host system and growth conditions are established, recombinant expression vectors can be propagated and prepared in quantity. The expression vectors which can be used include, but are not limited to, the following vectors or their derivatives: human or animal viruses such as vaccinia virus or adenovirus; insect viruses such as baculovirus; yeast vectors; bacteriophage vectors (e.g., lambda), and plasmid and cosmid DNA vectors, to name but a few and which are known to those of skill in the art.

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the

translational and post-translational processing and modification of proteins. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the foreign protein expressed. Expression in yeast can produce a biologically active product. Expression in eukaryotic cells can increase the likelihood of "native" folding.

5 Moreover, expression in mammalian cells can provide a tool for reconstituting, or constituting, Akt3 and/or B-Raf activity in melanoma. Furthermore, different vector/host expression systems may affect processing reactions, such as proteolytic cleavages, to a different extent.

Standard transfection methods are used to produce bacterial, mammalian, yeast or
10 insect cell lines that express large quantities of a Akt3 or a B-Raf protein, which are then purified using standard techniques (see, e.g., Colley et al., 1989, J. Biol. Chem. 264:17619-17622; "Guide to Protein Purification," in Methods in Enzymology, Vol. 182, 1990 (Deutscher, Ed.). Transformation of eukaryotic and prokaryotic cells are performed according to standard techniques (see, e.g., Morrison, 1977, J. Bact. 132:349-351; Clark-
15 Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362, 1983 (Wu et al., eds.).

Any of the well known procedures for introducing foreign nucleotide sequences into host cells can be used. These include the use of reagents such as Superfect (Qiagen), liposomes, calcium phosphate transfection, polybrene, protoplast fusion, electroporation, microinjection, plasmid vectors, viral vectors, biolistic particle acceleration (the gene gun),
20 or any of the other well known methods for introducing cloned genomic DNA, cDNA, synthetic DNA or other foreign genetic material into a host cell (see, e.g., Sambrook et al., supra).

After the expression vector is introduced into the cells, the transfected cells are cultured under conditions favoring expression of the Akt3 and/or B-Raf polypeptide, which
25 is recovered from the culture using standard techniques identified below. Methods of culturing prokaryotic or eukaryotic cells are well known and are taught, e.g., in Ausubel et al., Sambrook et al., and in Freshney, 1993, Culture of Animal Cells, 3.sup.rd. Ed., A Wiley-Liss Publication.

Any of the well known procedures for introducing foreign nucleotide sequences
30 into host cells can be used to introduce a vector, e.g., a targeting vector, into cells. Any of the well known procedures for introducing foreign nucleotide sequences into host cells can

be used. As provided infra, nucleic acids of this invention can be introduced into the cells via any gene transfer mechanism, such as, for example, virus-mediated gene delivery, calcium phosphate mediated gene delivery, electroporation, microinjection or proteoliposomes. The transduced cells can then be infused (e.g., in a pharmaceutically acceptable carrier) or homotopically transplanted back into the subject per standard methods for the cell or tissue type. Standard methods are known for transplantation or infusion of various cells into a subject.

Delivery of the nucleic acid or vector to cells can be via a variety of mechanisms. As one example, delivery can be via a liposome, using commercially available liposome preparations such as LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, Md.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Germany) and TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis.), as well as other liposomes developed according to procedures standard in the art. In addition, the nucleic acid or vector of this invention can be delivered in vivo by electroporation, the technology for which is available from Genetronics, Inc. (San Diego, Calif.) as well as by means of a SONOPORATION machine (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Ariz.).

As one example, vector delivery can be via a viral system, such as a retroviral vector system which can package a recombinant retroviral genome (see e.g., 62, 63). The recombinant retrovirus can then be used to infect and thereby deliver to the infected cells nucleic acids. The exact method of introducing the nucleic acid into mammalian cells is, of course, not limited to the use of retroviral vectors. Other techniques are widely available for this procedure including the use of adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV) vectors, lentiviral vectors, pseudotyped retroviral vectors. Physical transduction techniques can also be used, such as liposome delivery and receptor-mediated and other endocytosis mechanisms. This invention can be used in conjunction with any of these or other commonly used gene transfer methods.

Inducing Apoptosis in a Cancer Cell by Reducing Akt3 Activity Levels in Cells

In one embodiment, this invention provides methods of inducing apoptosis in a melanoma tumor cell by contacting a cell with an agent that reduces Akt3 activity. In a preferred embodiment, the agent is a siRNA molecule.

A siRNA polynucleotide is a RNA nucleic acid molecule that mediates the effect of RNA interference, a post-transcriptional gene silencing mechanism. A siRNA polynucleotide preferably comprises a double-stranded RNA (dsRNA) but is not intended to be so limited and may comprise a single-stranded RNA (see, e.g., Martinez et al. Cell 110:563-74 (2002)). A siRNA polynucleotide may comprise other naturally occurring, recombinant, or synthetic single-stranded or double-stranded polymers of nucleotides (ribonucleotides or deoxyribonucleotides or a combination of both) and/or nucleotide analogues as provided herein (e.g., an oligonucleotide or polynucleotide or the like, typically in 5' to 3' phosphodiester linkage). Accordingly it will be appreciated that certain exemplary sequences disclosed herein as DNA sequences capable of directing the transcription of an embodiment of the subject invention siRNA polynucleotides are also intended to describe the corresponding RNA sequences and their complements, given the well established principles of complementary nucleotide base-pairing. A siRNA may be transcribed using as a template a DNA (genomic, cDNA, or synthetic) that contains a RNA polymerase promoter, for example, a U6 promoter or the H1 RNA polymerase III promoter, or the siRNA may be a synthetically derived RNA molecule. In certain embodiments the subject invention siRNA polynucleotide may have blunt ends, that is, each nucleotide in one strand of the duplex is perfectly complementary (e.g., by Watson-Crick base-pairing) with a nucleotide of the opposite strand. In certain other embodiments, at least one strand of the subject invention siRNA polynucleotide has at least one, and preferably two nucleotides that "overhang" (i.e., that do not base pair with a complementary base in the opposing strand) at the 3' end of either strand, or preferably both strands, of the siRNA polynucleotide. In certain other embodiments of the invention, each strand of the siRNA polynucleotide duplex has a two-nucleotide overhang at the 3' end. The two-nucleotide overhang is preferably a thymidine dinucleotide (TT) but may also comprise other bases, for example, a TC dinucleotide or a TG dinucleotide, or any other dinucleotide. For a discussion of 3' ends of siRNA polynucleotides see, e.g., WO 01/75164.

Preferred siRNA polynucleotides comprise double-stranded oligomeric nucleotides of about 18-30 nucleotide base pairs, preferably about 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, or 27 base pairs, and in other preferred embodiments about 19, 20, 21, 22 or 23 base pairs, or about 27 base pairs, whereby the use of "about" indicates, as described above, that in

certain embodiments and under certain conditions the processive cleavage steps that may give rise to functional siRNA polynucleotides that are capable of interfering with expression of a selected polypeptide may not be absolutely efficient. Hence, siRNA polynucleotides, for instance, of "about" 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 base pairs may include one or more siRNA polynucleotide molecules that may differ (e.g., by nucleotide insertion or deletion) in length by one, two, three or four base pairs, by way of non-limiting theory as a consequence of variability in processing, in biosynthesis, or in artificial synthesis. The contemplated siRNA polynucleotides of the present invention may also comprise a polynucleotide sequence that exhibits variability by differing (e.g., by nucleotide substitution, including transition or transversion) at one, two, three or four nucleotides from a particular sequence, the differences occurring at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, or 19 of a particular siRNA polynucleotide sequence, or at positions 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, or 27 of siRNA polynucleotides depending on the length of the molecule, whether situated in a sense or in an antisense strand of the double-stranded polynucleotide. The nucleotide substitution may be found only in one strand, by way of example in the antisense strand, of a double-stranded polynucleotide, and the complementary nucleotide with which the substitute nucleotide would typically form hydrogen bond base pairing may not necessarily be correspondingly substituted in the sense strand. In preferred embodiments, the siRNA polynucleotides are homogeneous with respect to a specific nucleotide sequence. As described herein, preferred siRNA polynucleotides interfere with expression of the Akt3 polypeptide of the invention. These polynucleotides may also find uses as probes or primers.

Polynucleotides that are siRNA polynucleotides of the present invention may in certain embodiments be derived from a single-stranded polynucleotide that comprises a single-stranded oligonucleotide fragment (e.g., of about 18-30 nucleotides, which should be understood to include any whole integer of nucleotides including and between 18 and 30) and its reverse complement, typically separated by a spacer sequence. According to certain such embodiments, cleavage of the spacer provides the single-stranded oligonucleotide fragment and its reverse complement, such that they may anneal to form (optionally with additional processing steps that may result in addition or removal of one, two, three or more nucleotides from the 3' end and/or the 5' end of either or both strands) the double-

stranded siRNA polynucleotide of the present invention. In certain embodiments the spacer is of a length that permits the fragment and its reverse complement to anneal and form a double-stranded structure (e.g., like a hairpin polynucleotide) prior to cleavage of the spacer (and, optionally, subsequent processing steps that may result in addition or removal of one, two, three, four, or more nucleotides from the 3' end and/or the 5' end of either or both strands). A spacer sequence may therefore be any polynucleotide sequence as provided herein that is situated between two complementary polynucleotide sequence regions which, when annealed into a double-stranded nucleic acid, comprise a siRNA polynucleotide. Preferably a spacer sequence comprises at least 4 nucleotides, although in certain embodiments the spacer may comprise 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 or more nucleotides. Examples of siRNA polynucleotides derived from a single nucleotide strand comprising two complementary nucleotide sequences separated by a spacer have been described (e.g., 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)).

Polynucleotide variants may contain one or more substitutions, additions, deletions, and/or insertions such that the activity of the siRNA polynucleotide is not substantially diminished, as described above. The effect on the activity of the siRNA polynucleotide may generally be assessed as described herein or using conventional methods. Variants preferably exhibit at least about 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88% or 89% identity and more preferably at least about 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to a portion of a polynucleotide sequence that encodes a native Akt3. The percent identity may be readily determined by comparing sequences of the polynucleotides to the corresponding portion of a full-length Akt3 polynucleotide such as those known to the art and cited herein, using any method including using computer algorithms well known to those having ordinary skill in the art, such as Align or the BLAST algorithm (Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992), which is available at the NCBI website (see [online] Internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). Default parameters may be used.

30

Certain siRNA polynucleotide variants are substantially homologous to a portion of a native PTP1B gene. Single-stranded nucleic acids derived (e.g., by thermal denaturation) from such polynucleotide variants are capable of hybridizing under moderately stringent conditions to a naturally occurring DNA or RNA sequence encoding a native Akt3 polypeptide (or a complementary sequence). A polynucleotide that detectably hybridizes under moderately stringent conditions may have a nucleotide sequence that includes at least 10 consecutive nucleotides, more preferably 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 or 30 consecutive nucleotides complementary to a particular polynucleotide. In certain preferred embodiments such a sequence (or its complement) will be unique to an Akt polypeptide for which interference with expression is desired, and in certain other embodiments the sequence (or its complement) may be shared by Akt3 and one or more Akt isoforms for which interference with polypeptide expression is desired. In certain preferred embodiments such a sequence (or its complement) will be unique to a B-Raf polypeptide for which interference with expression is desired, and in certain other embodiments the sequence (or its complement) may be shared by B-Raf and one or more Raf isoforms for which interference with polypeptide expression is desired.

Suitable moderately stringent conditions include, for example, pre-washing in a solution of 5x SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50° C-70° C, 5x SSC for 1-16 hours (e.g., overnight); followed by washing once or twice at 22-65° C for 20-40 minutes with one or more each of 2x, 0.5x and 0.2x SSC containing 0.05-0.1% SDS. For additional stringency, conditions may include a wash in 0.1x SSC and 0.1% SDS at 50-60° C for 15-40 minutes. As known to those having ordinary skill in the art, variations in stringency of hybridization conditions may be achieved by altering the time, temperature, and/or concentration of the solutions used for pre-hybridization, hybridization, and wash steps. Suitable conditions may also depend in part on the particular nucleotide sequences of the probe used, and of the blotted, proband nucleic acid sample. Accordingly, it will be appreciated that suitably stringent conditions can be readily selected without undue experimentation when a desired selectivity of the probe is identified, based on its ability to hybridize to one or more certain proband sequences while not hybridizing to certain other proband sequences.

Sequence specific siRNA polynucleotides of the present invention may be designed using one or more of several criteria. For example, to design a siRNA polynucleotide that has 19 consecutive nucleotides identical to a sequence encoding a polypeptide of interest (e.g., Akt3 and other polypeptides described herein), the open reading frame of the

5 polynucleotide sequence may be scanned for 21-base sequences that have one or more of the following characteristics: (1) an A+T/G+C ratio of approximately 1:1 but no greater than 2:1 or 1:2; (2) an AA dinucleotide or a CA dinucleotide at the 5' end; (3) an internal hairpin loop melting temperature less than 55° C; (4) a homodimer melting temperature of less than 37° C (melting temperature calculations as described in (3) and (4) can be

10 determined using computer software known to those skilled in the art); (5) a sequence of at least 16 consecutive nucleotides not identified as being present in any other known polynucleotide sequence (such an evaluation can be readily determined using computer programs available to a skilled artisan such as BLAST to search publicly available databases). Alternatively, a siRNA polynucleotide sequence may be designed and chosen

15 using a computer software available commercially from various vendors (e.g., OligoEngine.TM. (Seattle, Wash.); Dharmacon, Inc. (Lafayette, Colo.); Ambion Inc. (Austin, Tex.); and QIAGEN, Inc. (Valencia, Calif.)). (See also Elbashir et al., Genes & Development 15:188-200 (2000); Elbashir et al., Nature 411:494-98 (2001); and [online] Internet:URL<[http://www.mp-ibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/Tuschl_MIV2\(3\).sub.-](http://www.mp-ibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/Tuschl_MIV2(3).sub.-2002.pdf)

20 2002.pdf.) The siRNA polynucleotides may then be tested for their ability to interfere with the expression of the target polypeptide according to methods known in the art and described herein. The determination of the effectiveness of an siRNA polynucleotide includes not only consideration of its ability to interfere with polypeptide expression but also includes consideration of whether the siRNA polynucleotide manifests undesirably

25 toxic effects, for example, apoptosis of a cell for which cell death is not a desired effect of RNA interference (e.g., interference of Akt3 expression in a cell).

Persons having ordinary skill in the art will also readily appreciate that as a result of the degeneracy of the genetic code, many nucleotide sequences may encode a polypeptide as described herein. That is, an amino acid may be encoded by one of several different

30 codons and a person skilled in the art can readily determine that while one particular nucleotide sequence may differ from another (which may be determined by alignment

31
methods disclosed herein and known in the art), the sequences may encode polypeptides with identical amino acid sequences. By way of example, the amino acid leucine in a polypeptide may be encoded by one of six different codons (TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, and CTG) as can serine (TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, and AGC). Other amino acids, such as proline, alanine, and valine, for example, may be encoded by any one of four different codons (CCT, CCC, CCA, CCG for proline; GCT, GCC, GCA, GCG for alanine; and GTT, GTC, GTA, GTG for valine). Some of these polynucleotides bear minimal homology to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present invention.

10 Polynucleotides, including target polynucleotides (e.g., polynucleotides capable of encoding a target polypeptide of interest), may be prepared using any of a variety of techniques, which will be useful for the preparation of specifically desired siRNA polynucleotides and for the identification and selection of desirable sequences to be used in siRNA polynucleotides. For example, a polynucleotide may be amplified from cDNA prepared from a suitable cell or tissue type. Such polynucleotides may be amplified via polymerase chain reaction (PCR). For this approach, sequence-specific primers may be designed based on the sequences provided herein and may be purchased or synthesized. An amplified portion may be used to isolate a full-length gene, or a desired portion thereof, from a suitable library (e.g., human melanoma cDNA) using well known techniques.

15 Within such techniques, a library (cDNA or genomic) is screened using one or more polynucleotide probes or primers suitable for amplification. Preferably, a library is size-selected to include larger molecules. Random primed libraries may also be preferred for identifying 5' and upstream regions of genes. Genomic libraries are preferred for obtaining introns and extending 5' sequences. Suitable sequences for a siRNA polynucleotide contemplated by the present invention may also be selected from a library of siRNA polynucleotide sequences.

25 For hybridization techniques, a partial sequence may be labeled (e.g., by nick-translation or end-labeling with ^{32}P) using well known techniques. A bacterial or bacteriophage library may then be screened by hybridizing filters containing denatured bacterial colonies (or lawns containing phage plaques) with the labeled probe (see, e.g., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

30

Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Hybridizing colonies or plaques are selected and expanded, and the DNA is isolated for further analysis. Clones may be analyzed to determine the amount of additional sequence by, for example, PCR using a primer from the partial sequence and a primer from the vector. Restriction maps and partial sequences may be generated to identify one or more overlapping clones. A full-length cDNA molecule can be generated by ligating suitable fragments, using well known techniques.

Alternatively, numerous amplification techniques are known in the art for obtaining a full-length coding sequence from a partial cDNA sequence. Within such techniques, amplification is generally performed via PCR. One such technique is known as "rapid amplification of cDNA ends" or RACE. This technique involves the use of an internal primer and an external primer, which hybridizes to a polyA region or vector sequence, to identify sequences that are 5' and 3' of a known sequence. Any of a variety of commercially available kits may be used to perform the amplification step. Primers may be designed using, for example, software well known in the art. Primers (or oligonucleotides for other uses contemplated herein, including, for example, probes and antisense oligonucleotides) are preferably 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 or 32 nucleotides in length, have a GC content of at least 40% and anneal to the target sequence at temperatures of about 54° C to 72° C. The amplified region may be sequenced as described above, and overlapping sequences assembled into a contiguous sequence. Certain oligonucleotides contemplated by the present invention may, for some preferred embodiments, have lengths of 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 or more nucleotides.

Nucleotide sequences as described herein may be joined to a variety of other nucleotide sequences using established recombinant DNA techniques. For example, a polynucleotide may be cloned into any of a variety of cloning vectors, including plasmids, phagemids, lambda phage derivatives, and cosmids. Vectors of particular interest include expression vectors, replication vectors, probe generation vectors, and sequencing vectors. In general, a suitable vector contains an origin of replication functional in at least one organism, convenient restriction endonuclease sites, and one or more selectable markers. (See, e.g., WO 01/96584; WO 01/29058; U.S. Pat. No. 6,326,193; U.S. 2002/0007051).

31

Other elements will depend upon the desired use, and will be apparent to those having ordinary skill in the art. For example, the invention contemplates the use of siRNA polynucleotide sequences in the preparation of recombinant nucleic acid constructs including vectors for interfering with the expression of a desired target polypeptide such as a Akt3 or B-Raf polypeptide *in vivo*; the invention also contemplates the generation of siRNA transgenic or "knock-out" animals and cells (e.g., cells, cell clones, lines or lineages, or organisms in which expression of one or more desired polypeptides (e.g., a target polypeptide) is fully or partially compromised). An siRNA polynucleotide that is capable of interfering with expression of a desired polypeptide (e.g., a target polypeptide) as provided herein thus includes any siRNA polynucleotide that, when contacted with a subject or biological source as provided herein under conditions and for a time sufficient for target polypeptide expression to take place in the absence of the siRNA polynucleotide, results in a statistically significant decrease (alternatively referred to as "knockdown" of expression) in the level of target polypeptide expression that can be detected. Preferably the decrease is greater than 10%, more preferably greater than 20%, more preferably greater than 30%, more preferably greater than 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 98% relative to the expression level of the polypeptide detected in the absence of the siRNA, using conventional methods for determining polypeptides expression as known to the art and provided herein. Preferably, the presence of the siRNA polynucleotide in a cell does not result in or cause any undesired toxic effects, for example, apoptosis or death of a cell in which apoptosis is not a desired effect of RNA interference.

Exemplary 19mer sequences for the Akt3 siRNA as disclosed herein are to human Akt3 (NM_005465): Akt3 duplex 2:CUAUCUACA UUCCGGAAAG; Akt3 duplex 4:GAAUUUACAGCUCAGACUA; and Akt3 duplex 5:CAGCUCAGACUAUUACAAU.

Exemplary 25mer sequences for the Akt3 siRNA as disclosed herein are as follows:

<u>Primer Name</u>	<u>Sequence</u>
Akt3#2 Sense	CUUGGACUAUCUACA UUCCGGAAAG
Akt3#2 Antisense	CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG
Akt3#4 Sense	GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA
Akt3#4 Antisense	UAGUCUGAGCUGUAAA UUCUUCAUC
Akt3#5 Sense	AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU

Akt3#5 Antisense**AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU**

Exemplary 25mer sequences for the B-Raf siRNA as disclosed herein are to human Mutant B-Raf: 5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3' and to human wild-type B-Raf 5' 5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3'.

5 The present invention also relates to use of a viral-mediated strategy that result in silencing of a targeted gene, PTEN, via siRNA. Use of this strategy results in markedly diminished expression of PTEN, thereby leading to an increase in total phosphorylated Akt. This viral-mediated strategy is useful in identifying the mechanism underlying Akt3 deregulation in melanomas in order to model biological processes or to provide therapy for
10 this cancer.

 The present invention also relates to vectors and to constructs that include or encode siRNA polynucleotides of the present invention, and in particular to "recombinant nucleic acid constructs" that include any nucleic acid such as a DNA polynucleotide segment that may be transcribed to yield Akt3 polynucleotide-specific siRNA
15 polynucleotides according to the invention as provided above; to host cells which are genetically engineered with vectors and/or constructs of the invention and to the production of siRNA polynucleotides, polypeptides, and/or fusion proteins of the invention, or fragments or variants thereof, by recombinant techniques. SiRNA sequences disclosed herein as RNA polynucleotides may be engineered to produce corresponding DNA
20 sequences using well-established methodologies such as those described herein. Thus, for example, a DNA polynucleotide may be generated from any siRNA sequence described herein, such that the present siRNA sequences will be recognized as also providing corresponding DNA polynucleotides (and their complements). These DNA polynucleotides are therefore encompassed within the contemplated invention, for example, to be
25 incorporated into the subject invention recombinant nucleic acid constructs from which siRNA may be transcribed.

 In an another embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a polynucleotide having a sequence of 5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3' or the complement thereof. In yet another
30 embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a polynucleotide having a sequence of 5' CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3', or the

complement thereof. In yet another embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a polynucleotide having a sequence of 5'

GAAUUUACAGCUCAGACUA 3', or the complement thereof. In still another

embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a

5 polynucleotide having a sequence of 5' CAGCUCAGACUAUUACAAU 3', or the

complement thereof. In another embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a polynucleotide having a sequence of 5'

CUUGGACUAUCUACAUCCGGAAAG 3', or the complement thereof. In still another

embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a

10 polynucleotide having a sequence of 5' CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3', or

the complement thereof. In still another embodiment, the agent is a siRNA molecule

wherein the siRNA molecule comprises a polynucleotide having a sequence of 5'

GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3', or the complement thereof. In still another

embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a

15 polynucleotide having a sequence of 5' UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3', or

the complement thereof. In still another embodiment, the agent is a siRNA molecule

wherein the siRNA molecule comprises a polynucleotide having a sequence of 5'

AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3', or the complement thereof. In still another

embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule comprises a

20 polynucleotide having a sequence of 5' AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', or

the complement thereof. In a preferred embodiment, the agent contacts a cell using any of

the well known procedures for introducing foreign nucleotide sequences into host cells.

These include but are not limited to a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing

nanoliposome, a proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate

25 nanoparticulate, a calcium phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a

nanocrystalline particulate, a semiconductor nanoparticulate, a nanodendrimer, a virus,

calcium phosphate nucleotide mediated nucleotide delivery, poly (D-arginine),

electroporation, and microinjection. The use of nanoliposome, a nanoparticulate, a

nanodendrimer for delivery of agents to a cell are demonstrated in Figures 5-11 and further

30 described in Application Serial No. 10/835,520, filed on April 26, 2004, herein

incorporated by reference.

Antisense Polynucleotides

In another embodiment, the agent is an antisense polynucleotide.

Specifically contemplated embodiments relate to the downregulation of Akt3 activity by the use of antisense polynucleotides, i.e., a nucleic acid complementary to, and which can preferably hybridize specifically to a coding mRNA nucleic acid sequence, e.g., Akt3 mRNA or a subsequence thereof. Binding of the antisense nucleotide to the Akt3 mRNA reduces the translation and/or stability of the Akt3 or B-Raf mRNA.

In the context of the invention, antisense polynucleotides can comprise naturally-occurring nucleotides, or synthetic species formed from naturally-occurring subunits or their close homologs. Antisense polynucleotides can also have altered sugar moieties or inter-sugar linkages. Exemplary among these are the phosphorothioate and other sulfur containing species which are well known for use in the art. All such analogs are comprehended by this invention so long as they function effectively to hybridize Akt3 or B-Raf mRNA. For a general review see, e.g., Jack Cohen, Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; and Synthesis 1:1-5 (1988).

Antagonists

The present also contemplates an embodiment where the agent that reduces Akt3 activity is an antisense polynucleotide. The invention also pertains to variants of the Akt3 proteins that function as Akt3 antagonists. Variants of the Akt3 protein can be generated by mutagenesis (e.g., discrete point mutation or truncation of the Akt3 protein). An antagonist of the Akt3 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the Akt3 protein by, for example, competitively binding to a downstream or upstream member of a cellular signaling cascade which includes the Akt3 protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. The present invention contemplates treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the Akt3 proteins.

Variants of the Akt3 protein that function as Akt3 antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants (e.g., truncation mutants) of the Akt3 proteins for Akt3 antagonist activity. The present invention contemplates a variegated library of Akt3 variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is

34 33

encoded by a variegated gene library. A variegated library of Akt3 variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential Akt3 sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (e.g., for phage display) containing the set of Akt3 sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential Akt3 variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential Akt3 sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are well-known within the art. See, e.g., 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.

Ribozymes

In yet another embodiment, the agent is a ribozyme. A ribozyme can be used to target and inhibit transcription of Akt3. A ribozyme is an RNA molecule that catalytically cleaves other RNA molecules. Different kinds of ribozymes have been described, including group I ribozymes, hammerhead ribozymes, hairpin ribozymes, RNAase P, and axhead ribozymes (see, e.g., Castanotto et al. 1994, Adv. In Pharmacology 25:289-317 for a general review of the properties of ribozymes).

The general features of hairpin ribozymes are described, e.g., in Hampel et al., 1990, Nucl. Acids Res., 18:299-304; Hampel et al., 1990, European Patent Publication No. 0 360 257; U.S. Pat. No. 5,254,678. Methods of preparing are well known to those of skill in the art (see, e.g., 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).

Inhibitors of Akt3 Polypeptide Activity

In yet another embodiment, Akt3 activity is decreased by agent that is an inhibitor of the Akt3 polypeptide. This can be accomplished in any of a number of ways, including by providing a dominant negative Akt3 polypeptide, e.g., a form of Akt3 that itself has no

activity and which, when present in the same cell as a functional Akt3, reduces or eliminates the Akt3 activity of the functional Akt3. Design of dominant negative forms is well known to those of skill and is described, e.g., in Herskowitz, 1987, *Nature*, 329:219-22. Also, inactive polypeptide variants (muteins) can be used, e.g., by screening for the ability to inhibit Akt3 activity. Methods of making muteins are well known to those of skill (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,486,463, 5,422,260, 5,116,943, 4,752,585, 4,518,504). In addition, any small molecule, e.g., any peptide, amino acid, nucleotide, lipid, carbohydrate, or any other organic or inorganic molecule can be screened for the ability to bind to or inhibit Akt3 activity.

Peptides

In yet another embodiment, the agent, a peptide corresponding to the contiguous amino acid sequences of the pleckstrin homology domain, or the catalytic or the regulatory domain of Akt3, will decrease Akt 3 activity. With out wishing to be bound by this theory, the peptide is contemplated to act as a pseudosubstrate or a competitive inhibitor, thereby inhibiting Akt3 activity. In another embodiment, the peptide acts as a pseudosubstrate for the Akt3 catalytic or regulatory (tail) domain. In yet another embodiment, the peptide acts as a competitive inhibitor for the catalytic domain of Akt3. The inventors also contemplate that the peptide acts as a competitive inhibitor for the pleckstrin homology domain of Akt3. In yet another embodiment, peptide acts as a competitive inhibitor for the regulatory domain of Akt3. One of skill in the art can readily design and determine whether a peptide decreases the activity of 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).

For example, cells are incubated with the peptide under conditions suitable for assessing activity of Akt3. The activity of the Akt3 is assessed and compared with a suitable control, e.g., the activity of the same cells incubated under the same conditions in the absence of the peptide or a scrambled peptide, using Western blot analysis with an antibody recognizing threonine 305 or serine 472. Antibodies recognizing Akt3 are available from a number of sources, including Stratagene (La Jolla, CA) and IGeneX, Inc. (Palo Alto) to name a few. Alternatively, Akt3 activity could be assessed by immunoprecipitating Akt3 and using the immunoprecipitate in an *in vitro* kinase assay in

which Crosstide, a synthetic peptide substrate for Akt3 available from Discover Rx Corporation, Fremont, CA, is phosphorylated by Akt3 to estimate activity. A greater or lesser activity of phosphorylation compared with the control indicates that the test peptide decreases the activity of said Akt3.

5 A peptide comprises about 5 to 30 amino acid residues in length, preferably between 10 and 20 amino acids in length. Peptide sequences of the present invention may be synthesized by solid phase peptide synthesis (e.g., BOC or FMOC) method, by solution phase synthesis, or by other suitable techniques including combinations of the foregoing methods. The BOC and FMOC methods, which are established and widely used, are
10 described in Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 88:2149 (1963); Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, C. H. Li, Ed., Academic Press, 1983, pp. 48-267; and Barany and Merrifield, in The Peptides, E. Gross and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, New York, 1980, pp. 3-285. Methods of solid phase peptide synthesis are described in Merrifield, R. B., Science, 232: 341 (1986); Carpino, L. A. and Han, G. Y., J. Org. Chem., 37: 3404
15 (1972); and Gauspohl, H. et al., Synthesis, 5: 315 (1992)). The teachings of these references are incorporated herein by reference.

Small Molecules

The present also contemplates an embodiment where the agent that reduces Akt3 activity is a small molecule. Small molecules can also be used to regulate, for example, the
20 function of the disclosed kinase, kinase receptors, molecules that interact with kinase receptors, and molecules in the signaling pathways of the kinase receptors. Those of skill in the art understand how to generate small molecules of this type, and exemplary libraries and methods for isolating small molecule regulators. The "small molecules", as used
herein preferably binds to Akt3 and/or B-Raf and inhibits at least one of its functions.

25 Modulators and Binding Compounds

The compounds tested as modulators of an Akt3 and/or B-Raf protein can be any small chemical compound, or a biological entity, such as a protein, sugar, nucleic acid or lipid. Typically, test compounds will be small chemical molecules and peptides. Essentially
30 any chemical compound can be used as a potential modulator or binding compound in the assays of the invention, although most often compounds can be dissolved in aqueous or organic (especially DMSO-based) solutions. The assays are designed to screen large

chemical libraries by automating the assay steps and providing compounds from any convenient source to assays, which are typically run in parallel (e.g., in microtiter formats on microtiter plates in robotic assays). It will be appreciated that there are many suppliers of chemical compounds, including Sigma (St. Louis, Mo.), Aldrich (St. Louis, Mo.),
5 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland) and the like.

This invention contemplates high throughput screening methods involve providing a combinatorial chemical or peptide library containing a large number of potential therapeutic compounds (potential modulator or binding compounds). Such "combinatorial
10 chemical libraries" are then screened in one or more assays, as described herein, to identify those library members (particular chemical species or subclasses) that display a desired characteristic activity. The compounds thus identified can serve as conventional "lead compounds" or can themselves be used as potential or actual therapeutics.

A combinatorial chemical library is a collection of diverse chemical compounds
15 generated by either chemical synthesis or biological synthesis, by combining a number of chemical "building blocks" such as reagents. For example, a linear combinatorial chemical library such as a polypeptide library is formed by combining a set of chemical building blocks (amino acids) in every possible way for a given compound length (i.e., the number of amino acids in a polypeptide compound). Millions of chemical compounds can be
20 synthesized through such combinatorial mixing of chemical building blocks.

Preparation and screening of combinatorial chemical libraries is well known to those of skill in the art. Such combinatorial chemical libraries include, but are not limited to, peptide libraries (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,010,175, Furka, 1991, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493 and Houghton et al., 1991, Nature 354:84-88). Other chemistries for generating
25 chemical diversity libraries can also be used. Such chemistries include, but are not limited to: peptoids (e.g., PCT Publication No. WO 91/19735), encoded peptides (e.g., PCT Publication No. WO 93/20242), random bio-oligomers (e.g., PCT Publication No. WO 92/00091), benzodiazepines (e.g., U.S. Pat. No. 5,288,514), diversomers such as hydantoins, benzodiazepines and dipeptides (Hobbs et al., 1993, Proc. Nat. Acad. Sci. USA
30 90:6909-6913), vinylogous polypeptides (Hagihara et al., 1992, J. Amer. Chem. Soc. 114:6568), nonpeptidal peptidomimetics with glucose scaffolding (Hirschmann et al.,

1992, J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218), analogous organic syntheses of small compound libraries (Chen et al., 1994, J. Amer. Chem. Soc. 116:2661), oligocarbamates (Cho et al., 1993, Science 261:1303), and/or peptidyl phosphonates (Campbell et al., 1994, J. Org. Chem. 59:658), nucleic acid libraries (see Ausubel, Berger and Sambrook, all
5 supra), peptide nucleic acid libraries (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,539,083), antibody libraries (see, e.g., Vaughn et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314 and PCT/US96/10287), carbohydrate libraries (see, e.g., Liang et al., 1996, Science, 274:1520-1522 and U.S. Pat. No. 5,593,853), small organic molecule libraries (see, e.g., benzodiazepines, Baum, 1993, C&EN, January 18, page 33; isoprenoids, U.S. Pat. No. 5,569,588; thiazolidinones and
10 metathiazanones, U.S. Pat. No. 5,549,974; pyrrolidines, U.S. Pat. Nos. 5,525,735 and 5,519,134; morpholino compounds, U.S. Pat. No. 5,506,337; benzodiazepines, U.S. Pat. No. 5,288,514, and the like).

Devices for the preparation of combinatorial libraries are commercially available (see, e.g., 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin,
15 Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). In addition, numerous combinatorial libraries are themselves commercially available (see, e.g., ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, Mo., 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Columbia, Md., etc.).

Chemotherapeutic agents

20 In another embodiment, apoptosis is induced by decreasing Akt3 activity in conjunction with chemotherapeutic agents. As used herein, chemotherapy includes treatment with a single chemotherapeutic agent or with a combination of agents. Chemotherapeutic agents that may be used with the invention include, but are not limited to, alkylating agents, antimetabolites, antibiotics, natural or plant derived products,
25 hormones and steroids (including synthetic analogs), and platinum drugs as described in Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and Melanoma Chemoresistance. Oncogene. 2003 May 19;22(20):3138-51. Examples of agents within these classes are given below. Alkylating agents include, but are not limited to, for example nitrosoureas, nitrogen mustard, and triazenes. Nitrosoureas include, but are not limited to, for example
30 carmustine, lomustine, and semustine. Nitrogen mustard, include but are not limited to, for example cyclophosphamide. Triazenes, include, but are not limited to, for example

dacarbazine, and temozolomide. The FDA has approved dacarbazine for use in the treatment of melanoma. Antimetabolites include but are not limited to folic acid antagonists, pyrimidine analogs, purine analogs and adenosine deaminase inhibitors: methotrexate, 5-fluorouracil, floxuridine, cytarabine, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, fludarabine phosphate, pentostatine, and gemcitabine. Antibiotics that may be used with the present invention, include, but not limited to, for example anthracyclines. Examples of anthracyclines, include but are not limited to doxorubicin (adriamycin). Natural or plant derived products that may be used with the present invention, include, but are not limited to, for example vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, taxanes. Examples of vinca alkaloids include but are not limited to for example, vincristine, and vinblastine. Examples of epipodophyllotoxins include but are not limited to for example etoposide. Taxanes, include but are not limited to for example, taxol, paclitaxel, and docetaxel. Hormonal analogs and steroids that may be used with the present invention, include, but are not limited to, for example, antiestrogen, 17.alpha.-Ethinylestradiol, diethylstilbestrol, testosterone, prednisone, fluoxymesterone, dromostanolone propionate, testolactone, megestrolacetate, tamoxifen, methylprednisolone, methyltestosterone, prednisolone, triamcinolone, chlorotrianisene, hydroxyprogesterone, aminoglutethimide, estramustine, medroxyprogesteroneacetate, leuprolide, flutamide, toremifene, zoladex. Platinum drugs that may be used with the present invention, include, but are not limited to, for example, cisplatin, carboplatin, hydroxyurea, amsacrine, procarbazine, mitotane, mitoxantrone, levamisole, and hexamethylmelamine.

Methods for the safe and effective administration of most of these chemotherapeutic agents are known to those skilled in the art. In addition, their administration is described in the standard literature. For example, the administration of many of the chemotherapeutic agents is described in the "Physicians' Desk Reference" (PDR), e.g., 1996 edition (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); the disclosure of which is incorporated herein by reference thereto.

Irradiation

Irradiation can optionally be added to treatment regimens of the present invention. The term "irradiation" as used herein, has its conventional meaning and is only limited to the extent that the X-irradiation have sufficient energy to penetrate the body and be capable

of inducing the release of tumor-specific antigens *in vivo*. The optimal radiation intensity for damaging a particular type of tumor is known to one of ordinary skill in the art.

Apoptosis

One of skill in the art would know how to detect and/or measure apoptosis using a variety of methods, e.g., using the propidium iodide flow cytometry assay described in Dengler et al., (1995) *Anticancer Drugs* 6:522-32, or by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay (TUNEL analysis) described in Gorczyca, (1993) *Cancer Res* 53:1945-51.

Treating a Melanoma Tumor

The present invention is based in part on the Inventors' observations showing that Akt3 regulates apoptosis and ^{V599B}B-Raf regulates growth and vascular development. This is a significant discovery since it identifies for the first time an effective combined targeted therapeutic for melanoma. As discussed *infra*, reducing Akt3 activity will increase the sensitivity of melanoma cells to apoptosis; therefore, agents that act through apoptosis such as conventional chemotherapeutics are more effective when Akt3 activity is reduced in melanoma cells. In one embodiment, the present invention provides a method for treating a melanoma tumor in a mammal comprising: administering to a tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces V599B B-Raf activity; and administering to a tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces Akt3 activity, thereby reducing the size of a tumor.

In a preferred embodiment, the agent for reducing Akt3 activity is a siRNA molecule. In another embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule that reduces Akt 3 activity comprises a polynucleotide having a sequence of 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', or the complements thereof.

In one embodiment, the agent for reducing B-Raf activity is a siRNA molecule. In a preferred embodiment, the agent is a siRNA molecule wherein the siRNA molecule that reduces B-Raf activity comprises a polynucleotide having a sequence of 5'

GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', and/or 5'

5 GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3'.

In a preferred embodiment, the agent that reduces Akt3 contacts a cell using any of the well known procedures for introducing foreign nucleotide sequences into host cells.

These include a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing nanoliposome, a proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate nanoparticulate, a calcium phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a nanocrystalline particulate, a semiconductor nanoparticulate, a nanodendrimer, a virus, calcium phosphate mediated nucleotide delivery, poly(D-arginine), electroporation, and microinjection. The use of a nanoliposome, a nanoparticulate, a nanodendrimer for delivery of agents to a cell are demonstrated in Figures 5-11 and further described in Patent Application Serial No. 10/835,520, filed on April 26, 2004, herein incorporated by reference.

In a preferred embodiment, the agent that reduces B-Raf activity contacts a cell using any of the well known procedures for introducing foreign nucleotide sequences into host cells. These include a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing nanoliposome, a proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate nanoparticulate, a calcium phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a nanocrystalline particulate, a semiconductor nanoparticulate, a nanodendrimer, a virus, calcium phosphate mediated nucleotide delivery, poly(D-arginine), electroporation, and microinjection. The use of a nanoliposome, a nanoparticulate, a nanodendrimer for delivery of agents to a cell are demonstrated in Figures 5-11 and further described in Patent Application Serial No. 10/835,520, filed on April 26, 2004, herein incorporated by reference.

In a preferred embodiment, the present invention provides a method for the use of nano technology as the strategy to administer multiple agents to inhibit melanoma tumor development and increase or induce apoptosis. Combinations of Akt3 peptide; Akt 3 siRNA, V599E B-Raf siRNA, Paclitaxel, Carboplatin, Carmustine, Dacarbazine, or Vinblastine are simultaneously loaded into non-toxic liposomes. These liposomes

effectively deliver this cargo into melanoma cells growing in culture. This is the first demonstration of simultaneous delivery of different therapeutics into cancer cells using a single delivery agent. Liposomes carrying combination therapeutic agents would travel in the bloodstream and enter the tumor vasculature to be taken up by exposed melanoma cells.

- 5 This results in targeted killing of melanoma cells in tumors leading to regression of the tumor. The clinical utility of this approach is for delivering combination therapeutics into tumors. Covalently linking anti-CD63 antibody to the pegylation segment extending from the liposome will lead to preferential uptake by melanoma cells. Thus, stromal tissue takes up little or none of the liposome demonstrating targeted delivery of the liposome.
- 10 The immuno liposome can enhance uptake into melanoma tumor cells versus control stromal tissue.

In another embodiment, the agent that reduces Akt 3 activity is an antisense polynucleotide. In one embodiment, the agent that reduces B-Raf activity is an antisense polynucleotide.

- 15 In yet another embodiment, the agent that reduces Akt 3 activity is a ribozyme. In still another embodiment, the agent that reduces B-Raf activity is a ribozyme. Ribozymes can be used to target and inhibit transcription of Akt3, B-Raf or both.

- In yet another embodiment, Akt3 activity is decreased by agent that is an inhibitor of the Akt3 polypeptide. This can be accomplished in any of a number of ways, including
- 20 by providing a dominant negative Akt3 polypeptide, e.g., a form of Akt3 that itself has no activity and which, when present in the same cell as a functional Akt3, reduces or eliminates the Akt3 activity of the functional Akt3. In yet another embodiment, B-Raf activity is decreased by agent that is an inhibitor of the B-Raf polypeptide. In a preferred embodiment, the B-Raf inhibitor is BAY 43-9006. Inhibitors of B-Raf include but are not
- 25 limited to BAY 43-9006, commercially available from BAYER) or other commercially available B-Raf inhibitors. Inhibitors of B-Raf may additionally include competitive and noncompetitive B-Raf inhibitors. A competitive B-Raf inhibitor is a molecule that binds the B-Raf enzyme in a manner that is mutually exclusive of substrate binding. Typically, a competitive inhibitor of B-Raf will bind to the active site. A noncompetitive B-Raf inhibitor
- 30 can be one which inhibits the synthesis of B-Raf, but its binding to the enzyme is not mutually exclusive over substrate binding. B-Raf inhibitors contemplated by this invention

are compounds that reduce the activity of B-Raf in animal cells without any significant effect on other cellular activities, at least at comparable concentrations. However, this inhibition can be accomplished in any of a number of ways, including by providing a dominant negative B-Raf polypeptide, e.g., a form of B-Raf that itself has no activity and which, when present in the same cell as a functional B-Raf, reduces or eliminates the B-Raf activity of the functional B-Raf.

In yet another embodiment, the agent that reduces Akt 3 activity is a peptide corresponding to the contiguous amino acid sequences of the pleckstrin homology domain, or the catalytic or the regulatory domain of Akt3.

The present also contemplates an embodiment where the agent that reduces Akt3 activity is a small molecule. In another embodiment, the present also contemplates embodiments where the agent that reduces B-Raf activity is a small molecule.

In another embodiment, the method for treating a melanoma tumor includes administering chemotherapeutic agents. As used herein, chemotherapy includes treatment with a single chemotherapeutic agent or with a combination of agents. Chemotherapeutic agents that may be used with the invention include, but are not limited to, alkylating agents, antimetabolites, antibiotics, natural or plant derived products, hormones and steroids (including synthetic analogs), and platinum drugs as described

In another embodiment, the method for treating a melanoma tumor in a mammal includes irradiation therapy.

In preferred embodiments, the methods of the present invention can be used to treat melanomas by having a significant effect on cell death (e.g. by apoptosis) as well as proliferation and angiogenesis. One of skill in the art would be familiar with methods measuring the size of a tumor to measure, for example, the regression or reduction in tumor size, angiogenesis, and apoptosis. Advantageously, chemotherapeutic agents can be administered in relatively low doses (and/or less frequently) to minimize potential toxic side effects against normal, untransformed cells.

Thus, the present invention also provides methods of inducing a significant level of cancer cell death (e.g., apoptosis) and inhibition of melanoma tumor development in a subject with a melanoma, comprising administering, concurrently or sequentially, effective amounts of an agent that reduces Akt3 activity and an agent that reduces B-Raf activity. As

39 30

used herein, "concurrently" refers to simultaneously in time, or at different times during the course of a common treatment schedule; and "sequentially" administering one of the agents of the method for reducing Akt3 or B-Raf activity, and an additional agent for reducing B-Raf or Akt3 activity wherein the second agent can be administered substantially immediately after the first agent, or the second agent can be administered after an effective time period after the first agent; the effective time period is the amount of time given for realization of maximum benefit from the administration of the first agent.

Targeting Akt3 together with mutant ^{V399B}B-Raf and selected chemotherapeutics has a synergistic, more potent and prolonged effect than targeting either alone. This provides a rational basis for combining targeted therapies together with selected chemotherapeutics, which does not currently exist for melanoma.

Uses of Akt3 and/or B-Raf Protein and Akt3-Related and/or B-Raf-Related Proteins

The proteins of the invention have a number of different specific uses. Both Akt3 and B-Raf are key proteins contributing to melanoma development. Akt3 and/or B-Raf protein and Akt3 or B-Raf related protein are used in methods that assess the status of Akt3 and/or B-Raf gene products in normal versus cancerous tissues, thereby elucidating the malignant phenotype. Typically, polypeptides from specific regions of an Akt3 or B-Raf protein may be used to assess the presence of perturbations (such as deletions, insertions, point mutations etc.) in those regions (such as regions containing one or more motifs). A non-limiting example includes use of antibodies targeting Akt3 and/or B-Raf protein and Akt3-related and/or B-Raf-related protein comprising the amino acid residues of one or more of the biological motifs contained within an Akt3 and/or B-Raf polypeptide sequences respectively in order to evaluate the characteristics of this region in normal versus cancerous tissues or to elicit an immune response to the epitope. Alternatively, Akt3-related and/or B-Raf-related proteins that contain the amino acid residues of one or more of the biological motifs in an Akt3 and/or B-Raf protein respectively are used to screen for factors that interact with that region of Akt3 and/or B-Raf.

Both Akt3 and B-Raf protein fragments/subsequences are particularly useful in generating and characterizing domain-specific antibodies (e.g., antibodies recognizing an extracellular or intracellular epitope of an Akt3 or B-Raf protein), for identifying agents or cellular factors that bind to Akt3 or B-Raf or a particular structural domain thereof, and in

various therapeutic and diagnostic contexts, including but not limited to diagnostic assays, cancer vaccines and methods of preparing such vaccines.

The protein encoded by the Akt3 and/or B-Raf gene, or by analogs, homologs or fragments thereof, has a variety of uses, including but not limited to generating antibodies and in methods for identifying ligands and other agents and cellular constituents that bind to an Akt3 and/or B-Raf gene product. Antibodies raised against an Akt3 or B-Raf protein or fragment thereof are useful in diagnostic and prognostic assays, and imaging methodologies in the management of human melanoma cancer characterized by expression of Akt3 or B-Raf protein.

Various immunological assays useful for the detection of Akt3 and/or B-Raf protein may be used, including but not limited to various types of radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), enzyme-linked immunofluorescent assays (ELIFA), immunocytochemical methods, and the like. Antibodies can be labeled and used as immunological imaging reagents capable of detecting Akt3 or B-Raf-expressing cells.

Antibodies to Akt3 and/or B-Raf in Melanoma

According to the invention, the Akt3 and/or B-Raf polypeptide encoded by the Akt3 isoform or B-Raf isoform respectively found in melanomas includes fragments thereof, including fusion proteins, may be used as an antigen or immunogen to generate antibodies. Preferably, the antibodies specifically bind the human Akt3 isoform, but do not bind other forms of Akt. Preferably, the antibodies specifically bind the human B-Raf isoform, but do not bind other forms of B-Raf.

A molecule is "antigenic" when it is capable of specifically interacting with an antigen recognition molecule of the immune system, such as an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor. An antigenic polypeptide or peptide contains at least about 5, and preferably at least about 10, amino acids. An antigenic portion of a molecule can be that portion that is immunodominant for antibody or T cell receptor recognition, or it can be a portion used to generate an antibody to the molecule by conjugating the antigenic portion to a carrier molecule for immunization. A molecule that is antigenic need not be itself immunogenic, i.e., capable of eliciting an immune response without a carrier.

Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and a Fab expression library. The anti-Akt3 antibodies of the

invention may be cross reactive, e.g., they may recognize Akt3 from different species.

Similarly, the anti-B-Raf antibodies of the invention may be cross reactive, e.g., they may recognize B-Raf from different species. Polyclonal antibodies have greater likelihood of cross reactivity. Alternatively, an antibody of the invention may be specific for a single

5 form of Akt3 or B-Raf. Preferably, such an antibody is specific for human melanoma Akt3 or B-Raf.

Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies. For the production of antibody, various host animals can be immunized by injection with the Akt3 or B-Raf polypeptide, or a derivative (e.g., fragment or fusion
10 protein) thereof, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, etc. In one embodiment, the Akt3 or B-Raf polypeptide or fragment thereof can be conjugated to an immunogenic carrier, e.g., bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete),
15 mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and Corynebacterium parvum.

For preparation of monoclonal antibodies directed toward the Akt3 or B-Raf
20 polypeptide, or fragment, analog, or derivative thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein [Nature 256:495-497 (1975)], as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique [Kozbor et al., Immunology Today 4:72 1983]; Cote et al., Proc. Natl.
25 Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030 (1983)], and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies [Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)]. In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals [International Patent Publication No. WO 89/12690, published Dec. 28, 1989]. In fact, according to the
30 invention, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" [Morrison et al., J. Bacteriol. 159:870 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et

al., Nature 314:452-454 (1985)] by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for an Akt3 polypeptide together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used; such antibodies are within the scope of this invention. Such human or humanized chimeric antibodies are preferred for use in therapy
5 of human diseases (described *infra*), since the human or humanized antibodies are much less likely than xenogenic antibodies to induce an immune response, in particular an allergic response, themselves.

Techniques described for the production of single chain Fv (scFv) antibodies [U.S. Pat. Nos. 5,476,786 and 5,132,405 to Huston; U.S. Pat. No. 4,946,778] can be adapted to
10 produce Akt3 polypeptide-specific single chain antibodies. An additional embodiment of the invention utilizes the techniques described for the construction of Fab expression libraries [Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)] to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for an Akt3 polypeptide, or its derivatives, or analogs.

15 Antibody fragments which contain the idiotype of the antibody molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the
20 antibody molecule with papain and a reducing agent.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, e.g., radioimmunoassay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, in situ immunoassays (using
25 colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, precipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is
30 detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labeled. Many means are known in the art

for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention. For example, to select antibodies which recognize a specific epitope of an Akt3 or B-Raf polypeptide or peptide, one may assay generated hybridomas for a product which binds to an Akt3 or B-Raf polypeptide fragment containing such epitope. For selection of an antibody specific to an Akt3 or B-Raf polypeptide or peptide from a particular species of animal, one can select on the basis of positive binding with Akt3 or B-Raf polypeptide or peptide expressed by or isolated from cells of that species of animal.

Identification of Molecules that Interact with Akt3 or B-Raf

The protein and nucleic acid sequences for Akt3 and B-Raf found in melanoma allow a skilled artisan to identify proteins, small molecules and other agents that interact with Akt3 or B-Raf, as well as pathways activated by Akt3 or B-Raf via any one of a variety, of art accepted protocols. For example, one can utilize one of the so-called interaction trap systems (also referred to as the "two-hybrid assay"). In such systems, molecules interact and reconstitute a transcription factor which directs expression of a reporter gene, whereupon the expression of the reporter gene is assayed. Other systems identify protein-protein interactions in vivo through reconstitution of a eukaryotic transcriptional activator, see, e.g., U.S. Pat. No. 5,955,280 issued Sep. 21, 1999, U.S. Pat. No. 5,925,523 issued Jul. 20, 1999, U.S. Pat. No. 5,846,722 issued Dec. 8, 1998 and U.S. Pat. No. 6,004,746 issued Dec. 21, 1999. Algorithms are also available in the art for genome-based predictions of protein function (see, e.g., Marcotte, et al., Nature 402: 4 November 1999, 83-86).

Alternatively one can screen peptide libraries to identify molecules that interact with Akt3 or B-Raf protein sequences. In such methods, peptides that bind to Akt3 or B-Raf are identified by screening libraries that encode a random or controlled collection of amino acids. Peptides encoded by the libraries are expressed as fusion proteins of bacteriophage coat proteins, the bacteriophage particles are then screened against the Akt3 or B-Raf protein(s) respectively.

Accordingly, peptides having a wide variety of uses, such as therapeutic, prognostic or diagnostic reagents, are thus identified without any prior information on the structure of the expected ligand or receptor molecule.

Pharmaceutical Composition

In one embodiment, a pharmaceutical composition for treating a melanoma tumor comprises an agent that reduces Akt3 activity; and a carrier is provided. Carriers suitable for use with the present invention will be known to those of skill in the art. Such carriers include but are not limited to a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing nanoliposome, a proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate nanoparticulate, a calcium phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a nanocrystalline particulate, a semiconductor nanoparticulate, poly(D-arginine), a nanodendrimer, a virus, and calcium phosphate nucleotide-mediated nucleotide delivery.

In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises an agent that includes but is not limited to a siRNA molecule, an antisense molecule, an antagonist, a ribozyme, an inhibitor, a peptide, and a small molecule. In other embodiments, the small interfering RNA (siRNA) molecules includes the polynucleotides 5'

GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', 5' CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3', 5'

GAAUUUACAGCUCAGACUA 3', 5' CAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',

5'CUUUCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3',

5'GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3',

5'UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCauc 3',

5'AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3' or the complements thereof. In yet

another embodiment, the pharmaceutical composition comprises an agent that is a peptide that acts as a pseudosubstrate for Akt3. In another embodiment, the peptide acts as a pseudosubstrate for a catalytic domain of Akt3.

In still another embodiment, the agent that reduces Akt3 activity is a peptide that acts as a competitive inhibitor for Akt3. The inventors contemplate that the peptide can act as a competitive inhibitor for a catalytic domain of Akt3, a pleckstrin homology domain of Akt3, and/or for a regulatory domain of Akt3. In yet another embodiment, the pharmaceutical composition includes an agent that reduces B-Raf activity. The inventors contemplate that the agent includes a siRNA molecule, an antisense molecule, an antagonist, a ribozyme, an inhibitor, a peptide, and a small molecule. In another

41

embodiment, the agent that reduces B-Raf activity is a small interfering RNA (siRNA) molecule comprises:

a polynucleotide 5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', or the complement thereof or a polynucleotide 5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3', or the complement thereof.

The following Examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXAMPLES FOR AKT3

10 MATERIALS AND METHODS

EXAMPLE 1: siRNA Mediated Downregulation of Akt Isoforms:

To demonstrate the specificity of siRNA against Akt1, Akt2 and Akt3 (Dharmacon) in UACC 903 cells, HA-tagged Akt1, Akt2 or Akt3 constructs were co-nucleofected together with each respective siRNA. The Akt constructs used for these studies have been described previously (Sun et al., *Am J Path* 159:431-437 (2001); Mitsuuchi et al., *J Cellular Biochem* 70:433-441 (1998); and Brodbeck et al., *J Biol Chem* 274:9133-9136 (1999)). Each construct (5 µg), either alone or in combination with 100 pmol or 200 pmol of each respective siRNA, was introduced into 7×10^5 UACC 903 cells via nucleofection using an Amaxa Nucleofector. The resultant transfection efficiency using constructs expressing GFP was >60%. Protein lysates were harvested 72 h later and Western blot analysis performed as described previously (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). Nucleofection with siRNA was also used to knockdown endogenous expression of the Akt isoforms and/or PTEN (Dharmacon) in melanocytes and in the melanoma cell lines UACC 903, SK-MEL-24, WM115, and WM35. The Amaxa nucleofection reagents and protocol for melanocytes was also used with WM35 cells while other cell lines were nucleofected using Amaxa Solution R/ program K-17. The growth conditions for these cell lines have been described previously (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)).

30 EXAMPLE 2: Western Blotting, Immunoprecipitation and Kinase Assays:

The Western blot procedure and antibodies used, except for Akt2 (Santa Cruz) and Akt3 (Upstate Biotech), have been reported previously (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). For immunoprecipitation, protein was collected following addition of protein lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaCl, 10 mM sodium β -glycerol phosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1% 2-mercaptoethanol, and 0.5% protease inhibitor cocktail (Sigma)) to plates of cells followed by snap freezing in liquid nitrogen. Cellular debris was pelleted by centrifugation ($\geq 10,000\times g$) of lysates and protein concentration quantitated using the BioRad BCA Protein Assay. Protein for immunoprecipitation (100 μ g) was incubated with 2 μ g of Akt2 or 5 μ l of Akt3 antibody overnight at 4°C with constant mixing. Next 15 μ l of equilibrated GammaBind G Sepharose beads (Amersham Biosciences) were added to each tube and incubated 2 h (4°C) with constant mixing. Pelleted beads were washed twice with lysis buffer to remove unbound antibody and protein. Samples were then resuspended and electrophoresed under reducing conditions according to the protocol provided by Invitrogen Life Technologies with the NuPage Gel System. Western blots were probed with phosphor-Akt and quantitated by densitometry as described previously (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)).

For Akt kinase assay, 15 μ l of equilibrated GammaBind G Sepharose beads were washed with 200 μ l of lysis buffer, then incubated with 2 μ g of Akt2 or 5 μ l of Akt3 antibody in a volume of 400 μ l at 4°C with constant mixing for ≥ 2 h. Microcystin (1 μ M) from MP Biomedicals was added to the lysis buffer to ensure complete inactivation of cellular PP1 and PP2 phosphatases. The antibody/sepharose complex was washed twice with 750 μ l of lysis buffer, then incubated with 100 μ g of protein in a volume of 400 μ l for ≥ 1.5 h at 4°C with constant mixing. This complex was washed with 500 μ l lysis buffer (3X) then once with 500 μ l of Assay Dilution Buffer (20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM μ -glycerol phosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM DTT). PKA Inhibitor peptide (10 μ M) from Santa Cruz, 37.5 μ M ATP, 17 mM $MgCl_2$, 0.25 μ Ci/ μ l γ - ^{32}P -ATP, and 90 μ M Akt specific substrate Crosstide from Upstate Biotechnology were added to the tubes in assay dilution buffer and incubated at 35°C for 10 m with continuous mixing. Next, 20 μ l of liquid was transferred to phosphocellulose paper, which was washed 3X for 5 m with 40 ml of 0.75% phosphoric acid. Following a 5 m acetone wash, the phosphocellulose was

43
42
allowed to dry, transferred to a scintillation vial with 5 ml of Amersham Biosciences scintillation fluid and cpm measured in a Beckman Coulter LS 3801 Liquid Scintillation System.

EXAMPLE 3: Tumor Studies and Apoptosis Measurements:

5 Collection of melanoma tumors from human patients was performed according to protocols approved by the Penn State Human Subjects Protection Office, the Dana-Farber Cancer Institute Protocol Administration Office, and Cooperative Human Tissue Network. Formalin-fixed paraffin embedded archival melanoma specimens were used for immunohistochemistry to measure phosphorylated Akt. Sixty-three formalin-fixed paraffin
10 embedded archival specimens of melanocytic lesions were used for immunohistochemistry experiments with the phosphor-Akt (Ser473) monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) at a 1:50 titer according to the manufacturer's recommended protocol. Specificity and intensity of staining was determined through qualitative comparison to internal blood vessel endothelium, squamous epithelium or smooth muscle controls present
15 in each specimen.

 Tumor protein for Western blotting or immunoprecipitation was collected by using a mortar and pestle chilled in liquid nitrogen to pulverize tumor material flash frozen in liquid nitrogen, which consisted of >60% tumor material. One ml of protein lysis buffer was added for every 200 mg of tissue powder and sonicated for 2 m (15 s intervals) in an
20 ice-filled sonicator bath. The samples were centrifuged (~12,000xg) at 4°C for 10 minutes. The supernatant was transferred to a clean tube and quantitated using the BioRad BCA Protein Assay.

 Animal experimentation was performed according to protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Pennsylvania State College of
25 Medicine. Athymic female nude mice were purchased from Harlan Sprague Dawley and tumor kinetics measured by s.c. injection of 1×10^6 cells in 0.2 ml of DMEM containing 10% FBS above the left and right rib cages of 4-6 week old nude mice. For animal experimentation involving siRNA, 1×10^6 UACC 903 cells were nucleofected with siRNA to Akt isoforms and 48 h later, nucleofected cells in 0.2 ml of DMEM containing 10% FBS
30 were s.c. injected above the left and right rib cages of nude mice. The dimensions of the developing tumors were measured on alternating days using calipers. When measuring

apoptosis, 5x10⁶ cells were injected per site and 4-6 tumors were harvested 4 days later. Apoptosis measurements were performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor sections using the Roche TUNEL TMR Red Apoptosis kit as described previously (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). A minimum of 8-fields were counted from three or four different tumor sections, and the number of TUNEL positive cells was expressed as the percentage of apoptotic cells.

EXAMPLE 4: Statistics:

For statistical analyses, the Student's t-test was used for pair wise comparisons and the One-way ANOVA or Kruskal Wallis ANOVA on Ranks used for group wise comparisons, followed by the appropriate post hoc tests (Dunnett's or Dunn's). Results were considered significant at a P-value of <0.05.

Table 1. Relative intensity of p-Akt staining in common nevi, dysplastic nevi, primary melanomas and metastases from melanoma patients.

Category (# of samples)	p-Akt Staining Intensity (%)	
	Moderate to weak ¹	Strong ²
Common nevi (14)	100	0 ^a
Dysplastic nevi (25)	88	12 ^b
Primary melanomas (15)	47	53 ^c
Metastatic melanomas (9)	33	67 ^d

¹Tumor cells were stained to an intensity similar to that in pericytes adjacent to blood vessels in the tumor section.

²Tumor cells were stained to an intensity greater than pericytes adjacent to blood vessels in the tumor section.

Statistics, P<0.5 for ^a versus ^{c,d} and ^b versus ^d.

EXPERIMENTAL RESULTS

EXAMPLE 5: Isoform Specific siRNA Identify Akt3 Involvement in Melanoma.

In a recently described experimental genetic melanoma model (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)), deregulated Akt activity (through PTEN loss) was demonstrated to play a critical role in melanoma tumorigenesis by decreasing the apoptotic capacity of melanoma cells (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). We reasoned that since

43

this model reflected the importance of Akt in melanoma tumorigenesis, it could be used to identify the specific Akt isoforms whose deregulated activity controls melanoma tumor development. Validating earlier results (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)), parental UACC 903 (-PTEN) cells had elevated total phosphorylated Akt expression (a measure of activity) (Figure 1A). Expression of PTEN in UACC 903 cells resulted in diminished Akt activity in three independently derived cell lines (36A, 29A, and 37A), which was reversed in revertant cell lines that lost functional PTEN activity (36A revertants) during tumorigenesis.

To identify the predominant Akt isoform active in melanomas, we used siRNA specific to each Akt isoform to determine the extent to which each isoform reduced the amount of phosphorylated (active) Akt in the parental UACC 903 (-PTEN) cell line. The specificity of knocking down expression for each Akt isoform in UACC 903 cells was determined by co-nucleofecting constructs expressing tagged HA-Akt1, HA-Akt2 or HA-Akt3 together with siRNA specific for each isoform. Attesting to specificity, each Akt siRNA was found to only reduce expression of the Akt isoform against which it was made, shown in Figure 1B. Next, siRNA to each Akt isoform was nucleofected into the UACC 903 cell line as well as two additional independently derived melanoma cells lines (WM115 and SK-MEL-24) to determine which siRNA lowered the level of phosphorylated (active) Akt in these cells (Figure 1C). While siRNA to Akt1 or Akt2 had only a negligible, non-significant effect, siRNA to Akt3 significantly reduced the levels of phosphorylated total Akt, suggesting that Akt3 was the isoform regulating tumor development in the UACC 903 (PTEN) model (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). Since all three independently derived melanoma cell lines indicated that Akt3 was the predominant active isoform in melanomas, subsequent experiments focused on examining Akt3 deregulation, and used Akt2 as a control for comparison since it has been reported to be amplified in multiple types of cancers (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); and van Dekken et al., *Cancer Res* 59:748-752 (1999)).

To further confirm that Akt3 was the predominant isoform whose activity was specifically reduced by PTEN in the UACC 903 (PTEN) tumorigenesis model, Akt3 activity was measured by immunoprecipitating total Akt3 or Akt2 from cell lysates followed by Western blotting to estimate the amount of phosphorylated (active) Akt in the immunoprecipitated (Figure 1D). Phosphorylated Akt3, but not Akt2, levels were elevated in the parental UACC 903 cell line as well as the two tumorigenic revertant 36A cell lines that lack PTEN. In contrast, barely detectable levels of phosphorylated Akt3, were observed in the 36A, 29A or 37A cell lines, which had low levels of Akt activity, ostensibly due to PTEN expression (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). To verify that the phosphorylated levels of Akt3 reflected active Akt, immunoprecipitated Akt3 and Akt2 were assayed in an *in vitro* kinase assay, and the results for Akt3 are shown in Figure 1E. A statistically significant difference in Akt3 (Figure 1E), but not Akt2 activity (data not shown), was identified in revertants (-PTEN) compared to PTEN expressing cells ($P < 0.05$). Collectively, these results indicate that Akt3 activity was specifically regulated by PTEN in the UACC 903 (PTEN) tumorigenesis model.

EXAMPLE 6: Increased Akt3 Activity Occurs Early During Melanoma Tumor Progression.

Melanocytes are thought to be capable of transforming directly into a melanoma (Herlyn, M., *Molecular and cellular biology of melanoma*: Austin: R.G. Landes Co. (1993)). Alternatively, melanocytes can follow a model of tumor progression in which they evolve in a stepwise fashion from common nevi, to atypical nevi, to melanoma *in situ* (Radial and vertical growth phases), and finally to metastatic melanomas (Herlyn, M., *Molecular and cellular biology of melanoma*: Austin: R.G. Landes Co. (1993)). Regardless of the process, the evolution of more aggressive tumor cells requires the accumulation of alterations affecting tumor suppressor genes and oncogenes. These, in turn, result in sub-populations of cells that have ever-increasing selective growth or survival advantages that promote the tumorigenic process.

To provide evidence for the selective involvement of Akt3 during melanoma tumor progression, Akt3 and Akt2 expression and activity were measured in a melanoma tumor progression model (generously provided by 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)). In this progression model, melanocytes are compared to low passage cell lines established from primary melanoma tumors at the radial (WM35 and WM3211) and vertical (WM115, WM98.1 and WM278) stages of growth. In comparison to melanocytes, Figure 2A shows that one of the two radial growth phase and all three of the vertical growth phase cell lines had elevated phosphorylated Akt, which suggested that Akt activity increased early during primary melanoma development in the radial growth phase. Next, expression of the Akt3 isoform was examined by Western blotting and compared to Akt2 expression in these cell lines (Figure 2B). Akt3 expression was found to be elevated in all except the WM98.1 radial growth phase cell line which compared to melanocytes. Since expression does not necessarily reflect activity, the amount of active Akt3 was examined by immunoprecipitation of Akt3 or Akt2 followed by Western blot analysis to measure the level of phosphorylated Akt in the immunoprecipitate. In comparison to melanocytes, Akt3 activity was elevated in all except the WM35 radial growth phase cell line (Figure 2C). Note that even though Akt3 protein expression in the WM98.1 vertical growth phase cell line was similar to that observed in melanocytes, Akt3 activity was significantly higher. In contrast to the Akt3 results, Akt2 expression was elevated only in the radial growth phase cell lines in comparison to melanocytes (Figure 2C). However, only the WM3211 radial growth phase cell line had a corresponding increase in Akt2 activity, but also had elevated Akt3 activity when compared to melanocytes. These data suggest that Akt3 was the predominantly involved Akt isoform active in the melanoma tumor progression model.

EXAMPLE 7: Frequency of Akt3 Deregulation in Tumors from Melanoma Patients

Since the foregoing experiments identified Akt3 as the predominantly active Akt isoform in both the UACC 903 (PTEN) tumorigenesis and melanoma tumor progression models, subsequent *in vivo* studies focused on establishing the frequency of Akt3 deregulation in tumors from melanoma patients. The relative intensity of total phosphorylated Akt was initially assessed in melanocytic lesions by immunohistochemical analysis of common nevi, dysplastic nevi, primary melanomas and metastases from melanoma patients to determine the frequency of Akt activation (Table 1). While moderate levels of staining were detected in 100% of common nevi, strong staining was observed in

12% of dysplastic nevi, 53% of primary melanomas and 67% of metastatic melanomas. These results suggest that while Akt activity may serve some unidentified role in nevi development, deregulated Akt activity is indicative of a more important role in advanced stage melanomas.

- 5 Analysis of the genomic regions containing the Akt1, Akt2 and Akt3 genes, from a published report (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998)), has not found amplification. However, the 1q43-44 region containing Akt3 does undergo copy number increases (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thompson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997)), which
- 10 suggests overexpression as a mechanism contributing to increased Akt3 activity in melanomas. In contrast, the 14q32 region containing Akt1 and the 19q13 region containing Akt2 remain unchanged or tend to undergo loss (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thompson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al.,
- 15 *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997)). To establish whether increased Akt3 expression could be a selective mechanism leading to increased activity, protein lysates from melanoma patients' tumors were extracted to compare the level of expression and activity of Akt3 and Akt2. Protein was extracted from 31 metastatic melanomas and analyzed by Western blotting to determine the level of expression and activity of Akt3 and Akt2 in the tumor material.
- 20 Three independent Western blots were used to quantitate expression in each sample, which was then compared to expression in melanocytes (Figure 2D). Overall, 61% (19/31) of the tumors had elevated Akt3 protein expression, ranging from a ~2-9 fold increase over the expression observed in melanocytes compared to 10% (3/31) for Akt2. These results are consistent with type of copy number increases of the region of
- 25 chromosome 1q43-44 containing the Akt3 gene reported in the literature to occur in melanoma tumors (Bastian et al. *Cancer Res* 58:2170-2175; Thompson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); and Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997)). Approximately 55% (6/11) of primary site melanomas and 65% (13/20) of melanoma metastases had increased Akt3 expression. In contrast, only negligible fluctuations were
- 30 observed when comparing expression of Akt2 in tumors versus melanocytes (Figure 2D). Next, levels of activity were measured by quantifying phosphorylated Akt in either Akt3 or

Akt2 immunoprecipitates. Strikingly, phosphorylated (active) Akt3 was detected in 62±0.02% (SE) of the samples (Figure 2E). In contrast, no phosphorylated Akt2 (except for the positive control) was detected in these tumors. Furthermore, ~35% of tumors had elevated Akt3 activity in comparison to melanocytes grown in culture. These data confirm the involvement of Akt3 deregulation in >60% of tumors from advanced-stage melanoma patients and suggest that increased expression is one of the mechanisms contributing to deregulated Akt3 activity in melanomas.

EXAMPLE 8: Mechanisms Underlying Akt3 Deregulation in Melanomas.

The foregoing experiments identified Akt3 as the predominantly active isoform *in vitro* in cell culture models and *in vivo* in patient tumors. Therefore, we next focused on determining the mechanisms leading to deregulated Akt3 activity in melanomas. Since the initial UACC 903 (PTEN) tumorigenesis model suggested that PTEN played a significant role regulating Akt activity in melanomas, we examined whether decreased expression of PTEN directly and specifically increased Akt3 activity. To accomplish this objective, PTEN expression (activity) was knocked down by siRNA in melanocytes and radial growth phase primary melanoma cells (WM35) to measure the effect on the level of phosphorylated Akt. The WM35 cell line was chosen since these cells have negligible basal Akt3 activity and express PTEN protein (see Figure 1C). As predicted, Figure 3A and Figure 3B show that siRNA-mediated down regulation of PTEN led to an increase in total phosphorylated Akt (lanes 4 and 11), while a scrambled siRNA control exerted a negligible, non-significant, effect (lanes 2 and 9). The predominant Akt isoform activated following PTEN down regulation was determined by co-nucleofection of siRNA against PTEN together with either siRNA to Akt1 (lanes 5 and 12), Akt2 (lanes 6 and 13) or Akt3 (lanes 7 and 14). Only siRNA directed against Akt3 (lanes 7 and 14) lowered the level of phosphorylated Akt to that observed in non-nucleofected cells (lanes 1 and 8) or cells nucleofected with scrambled siRNA only (lanes 2 and 9). In contrast, reduction of Akt1 or Akt2 protein levels did not reduce the amount of phosphorylated Akt, again attesting to the selectivity of the Akt3 deregulation. Hence, selective regulation of Akt3 activity by PTEN is a significant mechanism for activating Akt3 in melanomas, since PTEN loss increases Akt3 activity without overexpression. Thus, a reduction in PTEN could, in turn, lead to an increase in the cellular PIP₃ (phosphatidylinositide 3,4,5-trisphosphate) concentration,

which would be effective for specifically increasing Akt3 activity in melanomas. The mechanism underlying this specificity is currently unknown.

Studies involving tumor material from melanoma patients indicated that increased expression of Akt3 might also play a significant role augmenting Akt3 activity in melanomas. To investigate this possibility, Akt3 was overexpressed in melanocytes and WM35 cells (not shown) which express PTEN protein. HA-tagged wild type Akt3, a kinase dead version of Akt3 T305A/S472A (inactive) or a myristoylated Akt3 (active) was overexpressed in melanocytes (Figure 3C). Cells were then starved of growth factors for 24 h, replenished with complete media and then lysates harvested 10 m later. Equivalent constructs for Akt2 were used as controls (data not shown). Overexpression of wild type Akt3 and myristoylated Akt3 led to increased levels of phosphorylated total Akt; in comparison to vector only or cells nucleofected with kinase dead Akt3. Furthermore, siRNA-mediated knockdown of PTEN together with Akt3 overexpression led to higher levels of phosphorylated Akt compared to wild type Akt3 expression alone (data now shown). Thus, overexpression of Akt3 alone, or in combination with PTEN loss, is an additional mechanism contributing to elevated Akt3 activity in melanomas.

EXAMPLE 9: Increased Akt3 Activity Promotes Melanoma Tumorigenesis by Decreasing Apoptosis.

Since deregulated Akt3 activity was observed consistently in melanoma tumors, subsequent studies focused on determining the mechanisms by which increased Akt3 activity promoted tumorigenesis. Cell lines from UACC 903 (PTEN) tumorigenesis model were used to demonstrate that elevated Akt3 activity promoted melanoma tumorigenesis in a nude mouse model. One million cells from the parental UACC 903 (-PTEN), 36A (+PTEN) or a 36A revertant (-PTEN) cell line were injected beneath the skin of 4- to 6-week old female nude mice and the size of the tumor formed was measured 10 days later. Figure 4A shows that 36A cells having reduced Akt3 activity were non-tumorigenic in comparison with parental UACC 903 and revertant 36A cells having elevated Akt3 activity ($P < 0.5$). While the tumorigenic potential of the 36A revertant cells increased significantly compared to 36A cells, tumor development remained delayed due to retention of a second melanoma suppressor gene on chromosome 10 that was used to create this model (Robertson et al., *Cancer Res* 59:3596-3601 (1999)). To confirm these observations and

5 demonstrate the specificity of Akt3 involvement in melanoma tumorigenesis, we created a UACC 903 (Akt) model using siRNA. SiRNA-mediated reduction of Akt3 expression (activity) in UACC 903 cells, shown in Figure 4B, significantly slowed tumor development in comparison to cells nucleofected with only buffer, scrambled siRNA or siRNA against Akt2 or Akt1 ($P<0.05$). Thus, either specifically reducing Akt3 activity using siRNA against Akt3 (Figure 4B) or increasing PTEN expression (Figure 4A) inhibited melanoma tumor development in nude mice.

To establish whether increased apoptosis was the predominant mechanism underlying tumor inhibition *in vivo* following decreases in Akt activity (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)), apoptosis was examined in both the UACC 903 (PTEN) (Figures 4C, 4E) and UACC 903 (Akt) models (Figures 4D, 4F) differing in Akt3 activity. Non-tumorigenic 36A and tumorigenic UACC 903 and 36A revertant cell lines were injected subcutaneously into nude mice and temporally and spatially matched tumor masses developing in parallel from each cell type were then harvested 4 days later to compare the magnitude of apoptosis, assessed by TUNEL (Stahl et al., *Cancer Res* 63:2891-2897 (2003)). A significantly greater number of apoptotic cells were observed in 36A (+PTEN) tumor masses having low Akt3 activity than in tumors formed from the parental UACC 903 (-PTEN) or 36A revertant (-PTEN) cell lines, which have high Akt3 activity (Figures 4C, 4E) ($P<0.05$). Similar results were observed in UACC 903 cells in which siRNA against Akt3 was used to lower Akt3 expression (activity). Cells nucleofected with buffer only or siRNA against Akt2 had approximately 5 to 7-fold fewer apoptotic cells than UACC 903 cells treated with siRNA against Akt3 (Figures 4D, 4F) ($P<0.05$). Thus, these results demonstrate that Akt3 activity preferentially regulates the extent of apoptosis, thereby aiding melanoma cell survival and promoting tumorigenesis.

25 EXPERIMENTAL DISCUSSION FOR AKT3

In the present invention, the Inventors demonstrate that Akt3 is an important survival kinase, in part, responsible for melanoma development. The UACC 903 (PTEN) melanoma model that reflected the importance of Akt in melanoma tumorigenesis was used to identify Akt3 as the predominant isoform deregulated during melanoma tumorigenesis. The use of siRNA demonstrated that selective knockdown of Akt3, but not Akt1 or Akt2, decreased the level of total phosphorylated Akt and lowered the tumorigenic potential of

melanoma cells. Similar results were found in two independently derived melanoma cell lines (WM115 and SK-MEL-24), further supporting the significance of this discovery. The clinical relevance of this observation was validated by demonstrating that selective inhibition of Akt3 expression (by siRNA knockdown) or activity (by PTEN expression) significantly reduced melanoma tumor development.

Two distinct mechanisms leading to Akt3 activation in melanomas were identified in this study. The first mechanism is dependent upon overexpression of the structurally normal Akt3 protein. Analysis of advanced stage melanomas from human patients showed increased expression in >60% of the cases. Overexpression of Akt3 in melanocytes and WM35 cells lead to increased activity confirming the human tumor results.

Overexpression of Akt is not unique to melanomas but has been documented in several human cancers with a number of studies reporting amplifications of the Akt isoforms.

Amplification of Akt1 has been reported in stomach cancer (Staal, S.O., *Proc Nat Acad Sciences USA* 84:5034-5037 (1987)) while Akt2 gene amplification has been found in

cancers of the ovary, pancreas, stomach and breast (Cheng et al., *Proc Nat Acad Sciences USA* 89:9267-9271 (1992); Chent 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)). While no amplifications of the genomic regions containing the Akt

genes have been reported in melanomas, several reports describe copy number increases of the long arm of chromosome 1 containing the Akt3 gene (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thompson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997)). In contrast, the long arms of

chromosome 14 and chromosome 19 containing the Akt1 and Akt2 genes, respectively,

which tend to be unchanged or undergo loss (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thompson et al., *Cancer Genet Cytogenet* 83:93-104 (1995); Mertens et al., *Cancer Res* 57:2765-2780 (1997)). Thus, copy number increases of the Akt3 gene is one

of the mechanisms contributing to increased expression and activity of Akt3 in melanoma development.

The second mechanism identified that selective Akt3 activation in the UACC 903 (PTEN) model was due, in part, to decreased PTEN activity. A related observation in

melanocytes and primary melanoma cells that retain PTEN expression (WM35) showed that siRNA-mediated reduction of PTEN specifically increased Akt3 phosphorylation (activity), further reinforcing the significance of Akt3 involvement in melanoma development. Published studies that characterize the genetic changes occurring in tumor material obtained from melanoma patients provide additional support for decreased PTEN expression playing a significant role in early melanoma development (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thompson 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)). Specifically, loss of one allele of PTEN, or PTEN haploinsufficiency, occurs commonly in early melanomas through loss of entire copy of chromosome 10 (Bastian et al., *Cancer Res* 58:2170-2175 (1998); Thompson 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)). Under this condition, it is predicted that loss of chromosome 10 reduces PTEN expression in a sub-population of evolving melanoma cells leading to increased Akt3 activation, providing these cells with a selective growth and survival advantage. Therefore, decreased expression due to haploinsufficiency or loss of activity of PTEN in melanoma plays an important role in melanoma tumor progression by specifically increasing Akt3 activity.

The underlying molecular basis for selective Akt3 activation, over Akt1 and Akt2, following decreased PTEN expression in melanomas is unknown. However, we speculate that the mechanism leading to this specificity involves preferential interaction of PIP₃ or other proteins with the pleckstrin homology (PH) domain. The amino-terminal PH domain mediates protein-protein and PIP₃ lipid-protein interactions. The PH domain of human Akt3 is ~104 amino acids long (NCBI accession number: NP_005456) and 84% and 78% identical to Akt1 and Akt2, respectively (Brazil et al., *Cell* 111:293-303 (2002); and Nicholson et al., *Cell Signal* 14:381-395 (2002)). Furthermore, within the PH domain are phosphorylation sites that differ between the Akt isoforms and have as yet uncharacterized functions. For example, a ceramide-induced, PKC zeta-dependent, phosphorylation site at threonine 34 (within the PH domain), leads to inactivation of Akt1 by preventing binding to PIP₃ (Powell et al., *Mol Cell Biol* 23:7794-7808 (2003)). On the other hand, Akt2 and Akt3 have a serine at this position, which may be phosphorylated and regulated differently.

Our analysis of other potential phosphorylation sites within the PH domain of the three Akt isoforms identified three potential unique Akt3 sites. Residue 21 of Akt3 is an asparagine while the equivalent sites on Akt1 and Akt2 are threonines. Furthermore, threonine 31 and tyrosine 49 of Akt3 were also found to differ from the other two Akt isoforms (Asn31 and Ser31 of Akt1 and Akt2, respectively; Ala50 and Pro50 of Akt1 and Akt2, respectively).

Thus, differential regulation of putative phosphorylation sites within the PIP₃ lipid binding PH domain may offer a basis for the specificity of Akt3 activation in melanomas. It is also possible that unsuspected interactions between known oncogenes might be selectively regulating Akt isoform activation in melanomas. For example, TCL1 has been shown to selectively bind the Akt3 PH domain and promote hetero-oligomerization of Akt1 with Akt3 leading to transphosphorylation of the Akt molecules in leukemogenesis (Laine et al., *J Biol Chem* 277:3743-3751 (2002)). TCL1 or other uncharacterized factors in melanoma cells may promote selective Akt3 activation in a similar manner.

Increased Akt3 activation also plays a significant role in the progression to more advanced aggressive tumors. Examination of Akt3 expression and activity in metastatic melanomas indicated that deregulated expression or activity occurs in >60% advanced stage metastatic melanomas. However, it is currently unknown whether the presence of elevated Akt3 activity can predict disease prognosis or the outcome of therapeutic regimes. Measurement of Akt3 activation in melanomas offers hope as a novel, more accurate prognostic indicator of disease outcome than the histopathologic measurements such as Breslow depth (i.e., the distance measured in millimeters from the granular cell layer to the deepest tumor cell) and ulceration (i.e., loss of the epidermis overlying the melanoma) that are currently used. A molecular based test assessing the activation state of Akt3 in melanocytic lesions may be more sensitive and less subjective than histological evaluation. This approach might also be useful for selecting appropriate patients for clinical trials utilizing drugs that are designed to target activated Akt3 or other members of this signaling pathway.

This study has shown that use of siRNA or expression of PTEN to lower Akt3 activity can effectively reduce the tumorigenic potential of melanoma cells by altering apoptotic sensitivity. Thus, melanoma cells having high levels of Akt3 activity are better suited for surviving in the *in vivo* tumor environment and inhibition of Akt3 activity, either

directly or by interfering with its upstream regulators, is likely to represent an effective anticancer strategy for melanoma patients (Soengas et al., *Oncogen* 22:3138-3151 (2003); Johnstone et al., *Cell* 108:153-164 (2002)). Indeed, as the vast majority of chemotherapeutic agents work by inducing apoptosis, one would predict that inhibition of Akt3 could lower the threshold doses of drugs or radiation required for effective chemo- or radio-therapy, providing a mechanism to selectively target melanoma cells (Soengas et al., *Oncogen* 22:3138-3151 (2003)). Therefore, therapeutically targeting Akt3 activity alone or in combination with chemotherapeutic agents could be a potentially important therapy for melanoma patients (Soengas et al., *Oncogen* 22:3138-3151 (2003)). In summary, we have identified Akt3 as a specific prosurvival kinase, whose increased activity in melanoma tumors correlates with tumor progression and provides cells with a selective advantage to proliferate and survive environmental stresses.

EXAMPLES FOR B-RAF

MATERIALS AND METHODS

15 EXAMPLE 10: Cell Lines, Culture Conditions and B-Raf Mutational Status:

The human melanoma cell lines UACC 903, 1205 Lu and C8161, as well as HEK 293T cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FBS (Hyclone, Logan, UT). The presence or absence of the T1796A *B-RAF* mutation in the UACC 903 and C8161 cell lines was undertaken as described previously (Miller CJ et al. *J Invest Dermatol.* 123: 990-2 (2004).). Furthermore, the presence of this mutation in UACC 903 and 1205 Lu cells has been reported previously (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).).

EXAMPLE 11: *In Vitro* siRNA Studies:

25 siRNA (100 pmol) was introduced into 1×10^6 UACC 903, 1205 Lu or C8161 cells via nucleofection with an Amaxa Nucleofector (Koeln, Germany) using Solution R/ program K-17 as described in ref. (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64: 7002-10 (2004).). The resultant transfection efficiency was >90%. Following nucleofection, cells were replated for 24-48 hours after which protein lysates were harvested for Western blot analysis. To measure the duration of siRNA knockdown, cells were harvested at 0, 2, 4, 6, and 8 days following nucleofection with siRNA to B-Raf or C-Raf and subjected to Western blot analysis. Duplexed Stealth siRNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) were used for these studies

with the B-Raf sequences modified from ref. (Hingorani SR et al. *Cancer Res.*;63: 5198-202 (2003).). The siRNA sequences used were as follows: WT *B-RAF* (COM4 or 4) – GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU; MUT *B-RAF* (MuA or A) – GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU; *C-RAF* –
5 GGUCAAUGUGCGAAAUGGAAUGAGC; *LAMIN A/C* – GAGGAACUGGACUCCAGAAGAACA; and *VEGF* – GCACATAGGAGAGATGAGCTTCCTA.

EXAMPLE 12: Western Blot Analysis:

For Western Blot analysis, cell lysates were harvested in petri dishes by the addition
10 of lysis buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1mM sodium molybdate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 µg/ml aprotinin, and 5 µg/ml leupeptin. Whole cell lysates were centrifuged ($\geq 10,000 \times g$) for 10 minutes at 4°C to remove cell debris. Proteins were quantitated using the BCA Assay from Pierce (Rockford, IL), and 30 µg of
15 lysate per lane were loaded onto a NuPage Gel Life Technologies, Inc. (Carlsbad, CA). Following electrophoresis, samples were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Pall Corporation, Pensacola, FL). The blots were probed with antibodies according to each supplier's recommendations: anti-pErk and anti-pMek from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA); antibodies to B-Raf, C-Raf, Erk2 and α -enolase
20 from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); and an antibody to Lamin A/C from Biomedica Corp (Foster City, CA). Secondary antibodies were conjugated with horseradish peroxidase and obtained from Santa Cruz Biotechnology. The immunoblots were developed using the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

EXAMPLE 13: *In Vivo* siRNA Studies:

Animal experimentation was performed according to protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at The Pennsylvania State University College of Medicine. Tumor kinetics were measured by subcutaneous injection of 1×10^6 UACC 903 or 1205 Lu cells nucleofected with siRNA in 0.2 ml of DMEM supplemented
30 with 10% FBS above both the left and right rib cages of six, 4-6 week old nude mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN). The dimensions of developing tumors were

measured using calipers on alternate days. For mechanistic studies, 5×10^6 UACC 903 cells nucleofected with siRNA were injected into mice and tumors harvested 4 days post injection of cells in order to measure changes in cell proliferation and apoptosis, as described previously (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64: 7002-10 (2004)., Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63: 2881-90 (2003).).

EXAMPLE 14: *In Vitro* and *In Vivo* BAY 43-9006 Studies.

The BAY 43-9006 compound used for these studies was synthesized as described in ref. (Bankston D et al. *Organic Process Res Dev.* 6: 777-81 (2002).). To evaluate the inhibitory effects of BAY 43-9006 on wild type and mutant B-Raf, HEK 293T cells were transfected with HA-tagged wild type *B-RAF*, mutant ^{V599E}*B-RAF* or vector (pcDNA3) using Calcium Phosphate as described previously. (Robertson GP et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 9418-23 (1998).). Following transfection (72 hours) media was replaced with DMEM media supplemented with 10% FBS and 5 μ M BAY 43-9006 or DMSO vehicle. Two hours later, protein lysates were collected for Western blot analysis. Levels of phosphorylated Mek and Erk were quantified from 3 independent blots and fold differences under different conditions were estimated after normalizing against an Erk 2 loading control.

Effect of BAY 43-9006 on tumor development was measured by subcutaneously injecting 5×10^6 UACC 903 or 1×10^6 1205 Lu cells into nude mice. After 6 days when a small tumor (50-100 mm³) had developed, the mice received an intra peritoneal injection on alternate days consisting of 50 μ l of vehicle (DMSO), or the drug BAY 43-9006 at concentrations of 10, 50 or 100 mg/kg body weight for UACC 903 cells and 50 mg/kg body weight for 1205 Lu cells. For studies involving pretreatment with BAY 43-9006, 50 mg/kg body weight of drug was intra peritoneally injected twice (-4 and -2 days) prior to subcutaneous injection of UACC 903 or 1205 Lu cells. The mechanism by which pharmacological inhibition of mutant ^{V599E}B-Raf delays tumor development was identified by comparing tumors of the same size developing in parallel. This was achieved by subcutaneous injection of 5×10^6 UACC 903 cells followed at day 6 by intra peritoneal injection every 2 days with 50 mg/kg of BAY 43-9006. For temporal and spatial matching of control DMSO with drug treated tumors, either 1×10^6 , 2.5×10^6 or 5×10^6 million UACC 903 cells were subcutaneously injected and from day 6 treated intra peritoneally with

DMSO vehicle every 2 days. Drug or vehicle treated tumors of the same size developing in parallel were harvested at days 9, 11, 13 and 15 for comparison. At each time point, tumors from mice treated with vehicle or drug were harvested for analysis of cell proliferation, apoptosis and vascular development, as described previously (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64: 7002-10 (2004), Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63: 2881-90 (2003).).

EXAMPLE 15: Apoptosis, Cell Proliferation and Vessel Density Measurements in Tumors.

Apoptosis measurements on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor sections were undertaken using the TUNEL TMR Red Apoptosis kit from Roche (Manheim, Germany), as described previously (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64: 7002-10 (2004), Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63: 2881-90 (2003).). Cell Proliferation rates in formalin-fixed tumor sections were measured using the RPN 20 cell proliferation kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) that utilizes BrdU incorporation and immunocytochemistry. Two hours prior to sacrificing, 0.2 ml of BrdU was injected intra peritoneally into mice and tumors processed according to the proliferation kit's instructions. The number of BrdU stained cells were scored as the percentage of total cells of tumors treated with BAY 43-9006 or vehicle (DMSO). Quantification of vessels density using a purified rat anti-mouse CD31 (PECAM-1) monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, CA) has been described previously (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64: 7002-10 (2004), Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63: 2881-90 (2003).). The proportional area of the tumors occupied by the vessels over the total area was calculated using the IP Lab imaging software program. For all tumor analyses, a minimum of 6 different tumors with 4-6 fields per tumor was analyzed and results represented as the average $\pm$ SEM.

EXAMPLE 16: *In Vivo* pErk Measurements:

To quantitate changes in pErk levels in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor sections, antigen retrieval was performed with 0.01 M citrate buffer at pH 6.0 for 20 minutes in a 95°C water bath. Slides were cooled for 20 minutes, rinsed in PBS and then incubated in 3% H₂O₂ for 10 minutes to quench endogenous peroxidase activity. Next, sections were blocked with 1% BSA for 30 minutes and incubated with anti-pERK antibody at a 1:100 dilution (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) overnight at 4°C. Following rinsing in PBS, sections were incubated with biotinylated anti rabbit IgG for 1

hour, rinsed again in PBS, and incubated with peroxidase labeled streptavidine for 30 minutes. Visualization was accomplished using the AEC (aminoethyl carbazole) substrate kit for 5-10 minutes (Zymed laboratories Inc., South San Francisco, CA) and nuclei counterstained with hematoxylin prior to coverslip mounting using an aqueous mounting solution. The average percentage of cells $\pm$ SEM that stained positive for pErk was counted from a minimum of 6 different tumors with 4-6 fields counted per tumor.

EXAMPLE 17: *In Vitro* Doubling Times and *In Vivo* Tumor Latency Periods.

The *in vitro* doubling time of UACC 903 cells nucleofected with siRNA was estimated by plating 5×10^3 cells/well in 200 μ l of DMEM supplemented with 10% FBS in multiple rows of wells in five 96-well plates. Growth was measured every 24 hours over a period of 5 days by performing a colorimetric assay on one plate each day using the Sulforhodamine B (SRB) binding assay (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) and the doubling time calculated, as described previously (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63: 2881-90 (2003).). The *in vivo* tumor latency period was measured by estimating number of days required for mean tumor size to reach 10 mm³.

EXAMPLE 18: BAY 43-9006 Growth Inhibition / IC-50 of UACC 903 Melanoma Cells.

To measure the growth inhibitory effects or IC-50 of BAY 43-9006 on UACC 903 cells, 5×10^3 cells/well were plated into 96-well plates. Following 24 hours, varying concentrations of BAY 43-9006 (0, 0.02, 0.1, 0.4, 1.6, 6.3, 25, or 100 μ M) was added to duplicate 8-strip wells in the plate. After 72 hours of growth at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, media was discarded and cells were fixed in 10% trichloroacetic acid. Surviving cells at each concentrations of the drug were calculated using the SRB binding assay (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 63: 2881-90 (2003).). Western blot analysis was used to demonstrate the effects of increasing concentrations of BAY 43-9006 (5, 10, 15 or 20 μ M) on phosphorylation levels of Mek 1/2 and Erk 1/2 in UACC 903 cells following 2 hours drug exposure.

EXAMPLE 19: VEGF Expression Analysis.

To determine the amount of VEGF secreted by cells following siRNA-mediated knockdown of B-Raf protein or after treatment with BAY 43-9006, the human VEGF Quantikine kit (DVE00) was used (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). UACC 903 or

1205 Lu cells (5×10^5) nucleofected with the various siRNA were plated in 60 mm petri dishes and 24 hours later media replaced with DMEM containing 2% FBS. Following an additional 24 hours, media was again replaced and conditioned media for ELISA analysis was collected 24 and 48 hours later. For BAY 43-9006 studies, 3×10^5 UACC 903 or 1205 Lu cells were plated into 60 mm petri dishes and 24 hours later media was changed to DMEM containing 2% FBS. After an additional 24 hours, media was replaced with DMEM supplemented with 2% FBS alone or in combination with BAY 43-9006 (5, 10, 15 μ M) or DMSO vehicle. After 12 or 24 hours, conditioned media was collected for ELISA analysis. The media was cleared by centrifugation at 14,000 rpm (4°C) for 5 minutes and stored at -80°C. VEGF ELISA analysis was performed in triplicate on duplicate experiments according to the manufacturer's instructions.

EXAMPLE 20: Statistics:

For statistical analysis, the Student's t-test was used for pairwise comparisons and the One-way Analysis of Variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test was used for groupwise comparisons, followed by the appropriate post hoc tests (Dunnett's, Tukey's or Dunn's). Results were considered significant at a P-value of < 0.05.

EXPERIMENTAL RESULTS

EXAMPLE 21: SiRNA-mediated targeting of mutant ^{V599E}B-Raf inhibits melanoma tumor development.

Table 2. Growth properties of UACC 903 cells treated with siRNA against B-Raf, C-Raf or scrambled siRNA

SIRNA Treatment	Doubling time <i>in vitro</i> in days (hours)	% of proliferating cells at day 4 in tumors $\pm$ SEM	Latent period for tumor formation (days) ¹
Scrambled	1.25 (30)	10 $\pm$ 0.7	5
C-Raf	1.1 (26)	15 $\pm$ 0.6	5
B-Raf (4)	1.6 (38.4)	2 $\pm$ 0.6	14
B-Raf (A)	1.7 (40.8)	2 $\pm$ 0.4	16

¹ Latent Period for tumor formation was defined as the number of days required for mean tumor size to reach 10 mm³.

The role of mutant ^{V599B}B-Raf in melanoma tumorigenesis is currently unknown. To address this issue, we reasoned that inhibition of expression or activity of mutant ^{V599B}B-Raf protein could be used to identify the role this protein plays in melanoma tumorigenesis.

5 An siRNA-mediated approach was used to knockdown expression of mutant ^{V599B}B-Raf in UACC 903 and 1205 Lu cell lines containing mutant protein or B-Raf in the C8161 cell line lacking the T1796A mutation. The MuA or A siRNA was designed to reduce expression of wild type and mutant protein while the Com4 or 4 siRNA only lowered expression of mutant protein as described previously (Hingorani SR et al. *Cancer Res.*;63: 10 5198-202 (2003)). SiRNA for these studies was introduced into the cell lines via nucleofection resulting in transfection efficiencies of >90% (data not shown) (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64: 7002-10 (2004)). Effectiveness of siRNA for reducing the expression of B-Raf and C-Raf protein in UACC 903 (Fig. 12A), 1205 Lu (Fig. 12B) and C8161 (Fig. 12C) cells after nucleofection was measured by Western blot analysis. At 24 and 48 hours 15 after nucleofection, each siRNA reduced only expression of the protein against which it was made, thereby demonstrating the specificity and effectiveness of the siRNA knockdown in each of these cell lines. In UACC 903 and 1205 Lu cells, only siRNA to B-Raf reduced phosphorylation (activity) levels of the downstream targets Mek and Erk, whereas scrambled siRNA or siRNA to C-Raf had no effect on these proteins (Fig. 12A 20 and Fig. 12B). Maximal decrease in phosphorylation (activity) levels of Mek and Erk in UACC 903 and 1205 Lu cells were observed 48 hours after nucleofection. In contrast, reduced expression of B-Raf or C-Raf in C8161 cells had a negligible insignificant effect on levels of phosphorylated Mek and Erk (Fig. 12C). Thus, inhibition of ^{V599B}B-Raf expression in melanoma cell lines containing mutant protein leads to reduced activity of 25 Mek and Erk, while lowering expression of B-Raf protein in melanoma cells lacking the T1796A mutation does not appear to affect activity of downstream targets.

To measure the effect of reduced ^{V599B}B-Raf expression (activity) on melanoma tumor development, ^{V599B}B-Raf expression in UACC 903 and 1205 Lu cell lines was inhibited using siRNA followed by subcutaneous injection into mice using a transient 30 knockdown approach that we have reported previously (Stahl JM et al. *Cancer Res.* 64: 7002-10 (2004)). SiRNA-mediated knockdown of protein expression persisted for a

minimum of 8 days in UACC 903 (Fig. 13A) and 1205 Lu (Fig. 13B) cells. Furthermore, a corresponding decrease in pErk levels was also observed for the same period (Fig. 13B). The size of the developing tumor was measured on alternate days up to 17.5 days after nucleofection to determine the effect of B-Raf knockdown on melanoma tumorigenesis. A reduction in tumor development was observed in both UACC 903 (Fig. 13C) and 1205 Lu (Fig. 13D) cells in which mutant ^{V599B}B-Raf expression had been knocked down. In contrast, siRNA-mediated inhibition of C-Raf, a scrambled siRNA or buffer controls did not alter tumor development. Lack of an effect following knockdown of C-Raf, suggested that signaling through ^{V599B}B-Raf was specifically necessary for tumor development. Thus, siRNA-mediated reduction of ^{V599B}B-Raf expression (activity) in melanoma cells prior to injection into mice inhibited tumorigenesis.

A similar experiment was undertaken using a Raf kinase inhibitor, called BAY 43-9006 to inhibit the activity of B-Raf protein in UACC 903, 1205 Lu or C8161 cells. This compound, originally identified in a screen for Raf kinase inhibitors, has been shown to effectively inhibit the activity of wild type B-Raf protein (Lowinger TB et al. *Curr Pharm Des.* 8: 2269-78 (2002)., Lyons JF et al. *Endocr Relat Cancer.* 8: 219-25 (2001).). Initially, we determined the concentration of BAY 43-9006 that reduced UACC 903 cell survival by half, also called the IC-50, and found it to be 5-6 uM (data not shown). Therefore, a concentration of 5 uM was chosen for subsequent *in vitro* studies. Next, we demonstrated that BAY 43-9006 inhibited activity of both mutant and wild type B-Raf protein to a similar extent by expressing either HA-tagged wild type or mutant ^{V599B}B-Raf constructs in HEK 293T cells (Fig. 14A). As reported previously, we observed levels of phosphorylated (active) Erk or Mek in cells expressing ^{V599B}B-Raf to be 5-7 fold higher than in cells transfected with only wild type *B-RAF* (Davies H et al. *Nature.* 417: 949-54 (2002).). HEK 293T cells expressing either wild type or mutant ^{V599B}B-Raf protein were then exposed to 5 uM BAY 43-9006 for 2 hours to examine the effect on the activity of the signaling pathway. Exposure to BAY 43-9006 reduced levels of phosphorylated Mek and Erk in cells expressing either wild type or mutant ^{V599B}B-Raf protein by 5-6 fold and 3-4 fold, respectively (Fig. 14A). Thus, BAY 43-9006 inhibits the activity of both wild type and mutant B-Raf.

To demonstrate that BAY 43-9006 inhibited mutant ^{V399E}B-Raf protein signaling in UACC 903 cells, *in vitro* cultures were exposed for 2 hours to increasing concentrations of BAY 43-9006. BAY 43-9006 reduced the levels of phosphorylated (active) Mek and Erk in UACC 903 cells in a dose responsive manner (Fig. 14B). The inhibitory effects of BAY 43-9006 on MAP kinase signaling persisted for at least 2 to 3 days in UACC 903 and 1205 Lu cell lines (data not shown). We next evaluated the effect of pretreating animals with BAY 43-9006 prior to subcutaneous injection of UACC 903 or 1205 Lu cells. For these experiments, mice were exposed to 50 mg/kg BAY 43-9006 for 4 days prior to subcutaneous injection of 5×10^6 cells, which was followed by intra peritoneal injection of drug every 2 or 3 days up to day 22. Both UACC 903 (Fig. 14C) and 1205 Lu (not shown) tumor development was significantly inhibited (Student's t-test; $p < 0.05$), and comparison of size matched UACC 903 tumors revealed reduced proliferation and decreased vascular development in BAY 43-9006 treated tumors compared to vehicle treated controls (not shown). Furthermore, tumor size increased slowly to day 8 after which it leveled off with no statistical difference between subsequent tumor measurements (ANOVA; $P > 0.05$). Thus, pharmacological inhibition of mutant ^{V399E}B-Raf activity by pretreatment of the host animal with BAY 43-9006 significantly reduced the tumorigenic potential of melanoma cells expressing mutant ^{V399E}B-Raf.

To identify the mechanism leading to tumor inhibition in cells pretreated with siRNA to knockdown ^{V399E}B-Raf activity, rates of tumor cell proliferation and apoptosis were measured in UACC 903 tumors 4 days after subcutaneous injection. No difference in the rate of apoptosis (1-2%) was detected using the TUNEL assay (data not shown). However, UACC 903 cells treated with siRNA to B-Raf had 5 to 6-fold fewer proliferating cells compared to control cells nucleofected with buffer only, scrambled siRNA or *C-RAF* siRNA (Fig. 14D). Next, *in vitro* doubling times, *in vivo* proliferation rates and tumor latency periods of the UACC 903 cell line were compared to determine whether reduced growth could account for delayed tumor development (Table 2). UACC 903 cells nucleofected with siRNA to *C-RAF* or scrambled siRNA doubled in number *in vitro* every 1.2 days (or ~29 h), whereas cells nucleofected with siRNA against *B-RAF* doubled every 1.65 days (or ~40 h), which was a delay of ~38%. In contrast, analysis of proliferating cells in tumors showed a significant difference between control tumors nucleofected with siRNA

to C-Raf or scrambled siRNA (ANOVA; $p < 0.05$), which had 10-15% proliferating cells, compared to tumors cells nucleofected with siRNA to B-Raf that had 2-3% proliferating cells. The ~82% reduction in proliferative capacity of cells nucleofected with *B-RAF* siRNA could account for the delayed latency period of tumor development. Hence, for tumors of the same size as controls at day 5, cells nucleofected with siRNA to *B-RAF* required an additional 10 days to form tumors of the same size (Table 2). Since tumor development was delayed >200%, the reduced growth rate observed *in vitro* and *in vivo* could account for the reduced tumorigenic potential of these cells. Therefore, inhibition of mutant ^{V599B}B-Raf expression (activity) in melanoma cells prior to tumor formation significantly reduced the *in vivo* growth potential of cells, thereby delaying tumorigenesis.

EXAMPLE 22: Inhibition of melanoma tumor development by targeting mutant ^{V599B}B-Raf in preexisting tumors.

It is currently unknown whether targeting mutant ^{V599B}B-Raf in established preexisting melanoma tumors could retard tumor development, and if so, whether the mechanism is the same as that occurring when targeting ^{V599B}B-Raf in cells prior to tumor formation. Therefore, we next examined whether pharmacologically targeting B-Raf in preexisting melanoma tumors would inhibit tumor development by a similar mechanism. Five million UACC 903 cells, one million 1205 Lu cells or five million C8161 cells were subcutaneously injected into 4- to 6-week old female nude mice. On day 6, vehicle (DMSO) or BAY 43-9006 compound dissolved in vehicle (10, 50 or 100 mg/kg) was administered to mice via intra peritoneal injection every 48 hours. A 48 hour time period between drug administrations was chosen since inhibitory effects on the MAP kinase signaling pathway in UACC 903, 1205 Lu and C8161 cells persisted for at least that period (data not shown). Size of the developing tumors was measured using calipers on alternate days and the results are shown for UACC 903 cells in Fig. 4A and 1205 Lu cells in Fig. 15B. While all concentrations of the BAY 43-9006 compound slowed UACC 903 tumor development, only concentrations ≥ 50 mg/kg caused tumor development to plateau 7 days following the start of treatment (Fig. 4B). Tumor development in mice treated with BAY 43-9006 at 10 mg/kg was delayed ~1 week, but UACC 903 tumors steadily increased in size and mice had to be euthanized on day 27 when tumors reached sizes $> 2,400$ mm³. For UACC 903 cells, a small increase occurred in the size of the tumor up to day 13; however,

after a week of drug treatment, tumor sizes stabilized and there was no statistically significant increase in tumor sizes from days 13-to-31 (Fig. 15A)(ANOVA; $P>0.05$). Treatment of 1205 Lu tumors with 50 mg/kg BAY 43-9006 also reduced tumor development in a similar manner causing a plateau in tumor size from days 17-to-31 (Fig. 15B) (ANOVA; $P=0.12$). In contrast, while BAY 43-9006 inhibited pMek and pErk levels in C8161 cells, no difference was observed in the kinetics of tumor formation (data not shown). Thus, pharmacological inhibition of mutant ^{V599E}B-Raf activity retards tumor development in preexisting melanoma tumors but does not cause tumor regression. In contrast, inhibition of B-Raf in melanoma cells lacking the T1796A mutation did not appear to alter tumorigenic potential.

To confirm that the BAY 43-9006 compound affected activity of the mutant ^{V599E}B-Raf signaling pathway in tumors, the percentage of cells expressing elevated levels of phosphorylated Erk was scored in tumors from mice 9 days after start of treatment with vehicle (DMSO) or vehicle containing 50 mg/kg BAY 43-9006 (Fig. 15C). Quantification of the number of pErk positive cells showed that BAY 43-9006 treated tumors had ~3-fold fewer pErk positive cells than control vehicle treated tumors (Fig. 15D)(Student's t-test; $P<0.05$). The significantly greater number of phosphorylated Erk positive cells in vehicle treated tumors indicated that BAY 43-9006 was inhibiting the activity of the mutant ^{V599E}B-Raf signaling pathway *in vivo*. Thus, these results demonstrate that pharmacological inhibition of mutant ^{V599E}B-Raf with BAY 43-9006 reduces MAP kinase pathway signaling in tumors, thereby mediating tumor inhibition.

EXAMPLE 23: Mechanistically, BAY 43-9006 inhibits vascular development of preexisting melanoma tumors leading to increased apoptosis.

The foregoing experiments showed a consistent relationship between inhibition of mutant ^{V599E}B-Raf activity and reduced tumor development; therefore, subsequent studies focused on identifying the mechanism by which this occurred in existing melanoma tumors. For these studies, temporally and spatially matched UACC 903 tumors exposed to either vehicle or BAY 43-9006 were analyzed for vascular development as well as apoptosis and proliferation rates in order to identify the key event delaying growth of existing established tumors. Matched tumors were harvested every two days, starting at day 9 and ending at day 15; rates of apoptosis, growth and vascular development were

compared at each time point (Fig. 16). A statistically significant difference in vessel development at day 9 was observed between vehicle and BAY 43-9006 treated tumors (Fig. 5A)(Student's t-test; $P<0.05$). In contrast, no statistically significant difference was detected in number of proliferating cells (Student's t-test; $P=0.61$) or apoptotic areas (Student's t-test; $P=0.15$) in tumor masses at day 9 between control and BAY 43-9006 treated tumors (Fig. 16B and Fig. 16C). However, for all analyses from day 11 onwards, a statistically significant difference was observed between control and drug treated tumors (Student's t-test; $P<0.05$). Collectively, these data suggest that significantly reduced vascular development observed at day 9 in BAY 43-9006 treated tumors was an initiating event leading to delayed tumor growth. Apoptosis became evident in the BAY 43-9006 treated tumors at day 11 and occupied up to 25% of the tumor area by day 15 (Fig. 16B). By day 20, ~50% of the tumor area was undergoing apoptosis (data not shown). BAY 43-9006 also affected tumor cell proliferation of preexisting tumors leading to a 32-57% decrease in percentage of proliferating cells (Fig 16C). Collectively, these data led to the conclusion that inhibition of vascular development is a key event leading to growth inhibition of preexisting melanoma tumors.

Since vascular development in tumors occurs via angiogenesis, or the growth of new vessels from the surrounding vascular beds, and is triggered by angiogenic factors secreted by tumor cells (Carmeliet P, Jain RK. *Nature*. 407: 249-57 (2000).), we predicted that BAY 43-9006 and siRNA-mediated inhibition of ^{V599B}B-Raf were reducing the activity of a key angiogenic factor, thereby decreasing vascular development (Kranenburg O et al. *Biochim Biophys Acta*. 1654: 23-37 (2004)., Jain RK. *Semin Oncol*. 29: 3-9 (2002).). To examine this possibility, an ELISA assay was used to determine whether secretion of VEGF decreased following inhibition of ^{V599B}B-RAF. Initially, UACC 903 and 1205 Lu cells in which ^{V599B}B-Raf expression was inhibited using siRNA were examined and revealed significant reduction in VEGF secretion compared to controls (Fig. 17A). Next, the effects of BAY 43-9006 mediated inhibition of ^{V599B}B-Raf UACC 903 and 1205 Lu cells was examined and also found to decrease VEGF secretion in a dose dependent manner (Fig. 17B). To determine whether siRNA-mediated reduction of VEGF resulted in tumor inhibition similar to that seen following ^{V599B}B-Raf inhibition, siRNA against VEGF was nucleofected into UACC 903 or 1205 Lu cells. Decreased VEGF expression was

observed using VEGF specific siRNA (Fig. 17A), which reduced the tumorigenic potential of UACC 903 (Fig. 17C) and 1205 Lu (Fig. 17D) cells in a manner consistent with that occurring following decreased ^{V599E}B-Raf expression. Thus, reduced VEGF secretion mediated by decreased ^{V599E}B-Raf activity led to inhibition of vascular development, which consequently affected melanoma tumor development.

EXPERIMENTAL DISCUSSION FOR B-Raf

This study demonstrates that use of siRNA or pharmacological inhibition of mutant ^{V599E}B-Raf expression (activity) effectively reduces the tumorigenic potential of melanoma cells by lowering the proliferative and/or angiogenic capacity of the tumor cell. As such, melanoma cells having mutant ^{V599E}B-Raf are better suited for proliferation in the *in vivo* tumor environment. We have shown that targeted reduction of ^{V599E}B-Raf expression (activity) in melanoma cells prior to tumor development significantly reduced the growth potential of melanoma cells, thereby inhibiting tumor development. In contrast, apoptosis played no significant role in this process. Furthermore, inhibition of tumor development was only observed in cells in which mutant ^{V599E}B-Raf expression had been knocked down and not following knockdown of C-Raf or following knockdown of B-Raf in melanoma cells lacking the T1796A *B-Raf* mutation. Therefore, it is apparent that signaling through ^{V599E}B-Raf was specifically necessary for melanoma tumor development. These data are consistent with our previous study demonstrating that siRNA-mediated inhibition of ^{V599E}B-Raf in WM793 melanoma cells reduced the *in vitro* growth potential of these cells (Hingorani SR et al. *Cancer Res.*;63: 5198-202 (2003).). Similar *in vitro* studies using UACC 903 cells in this report further confirm these earlier observations. Knockdown of mutant ^{V599E}B-Raf expression (activity) also specifically reduced constitutive Erk signaling leading to reduced growth, which did not occur following knockdown of C-Raf. Thus, mutant ^{V599E}B-Raf promotes growth of melanoma cells both *in vitro* and *in vivo*; moreover, targeted inhibition prior to tumor development inhibits tumorigenesis mediated through reduced growth of tumor cells.

Targeting mutant ^{V599E}B-Raf in preexisting established tumors halted growth; however, growth inhibition played only a partial role in this process. More significantly, comparison of size and time matched tumors revealed that inhibition of vascular development played an initiating role in delaying tumor growth. As in all solid tumors,

vascular development occurs through angiogenesis in which growth of new vessels from surrounding vascular beds is driven by angiogenic factors secreted by tumor cells (Carmeliet P, Jain RK. *Nature*. 407: 249-57 (2000).). In this study, we found that inhibition of ^{V599E}B-Raf reduced VEGF secretion by UACC 903 and 1205 Lu melanoma cells. B-Raf has been reported to exert an important role in embryonic vascular development since *B-RAF* knockout mice exhibit significant endothelial cell death leading to hemorrhage and embryonic lethality (Wojnowski L et al. *Nat Genet*;16: 293-7 (1997).). However, we observed no significant endothelial cell death in preexisting tumor vessels following inhibition of ^{V599E}B-Raf using BAY 43-9006. Rather, inhibition of ^{V599E}B-Raf inhibited angiogenesis (Kranenburg O et al. *Biochim Biophys Acta*. 1654: 23-37 (2004)., Jain RK. *Semin Oncol*. 29: 3-9 (2002).) mediated through reduced VEGF secretion by the tumor cells. This observation is supported by published evidence in which decreased VEGF secretion led to reduced angiogenesis, thereby inhibiting the tumorigenic potential of cancer cells (Heidenreich R et al. *Int J Cancer*. 111: 348-57 (2004)., Inai T et al. *Am J Pathol*. 165: 35-52 (2004).). Thus, decreased VEGF secretion mediated by a reduction in mutant ^{V599E}B-Raf signaling leads to inhibition of angiogenesis, halting growth of preexisting melanoma tumors.

Our study also shows that BAY 43-9006 inhibits ^{V599E}B-Raf activity *in vitro* and *in vivo*, leading to reduced phosphorylation of downstream targets Mek and Erk, which slowed melanoma tumor development. We observed that pretreatment of animals with BAY 43-9006 reduced melanoma tumor development in manner similar to siRNA-mediated inhibition. However, BAY 43-9006 treatment only retarded development of established tumors by disrupting their vascular development. Complete regression of tumors did not occur, rather tumor size became relatively static after treatment. This observation is in agreement with preliminary data from clinical trials in which BAY 43-9006 monotherapy was relatively ineffective for treatment of advanced stage melanoma patients (Tuveson DA et al. *Cancer Cell*. 4: 95-8 (2003)., Ahmad T et al. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 23: 708 (2004).). However, in combination with traditional chemotherapy (paclitaxel and carboplatinum), a 50% response rate occurred in patients (Tuveson DA et al. *Cancer Cell*. 4: 95-8 (2003)., Flaherty K et al. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 23: 708 (2004).). Therefore, while BAY 43-9006 slows tumor development, it is likely that the

drug will need to be combined with other synergistic therapeutics to cause regression of established preexisting tumors (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).). It is also possible that the route of drug administration could alter efficacy of BAY 43-9006 in melanoma patients. While the clinical trial involved oral administration of the drug, our study administered the drug via intra peritoneal injection every 2 to 3 days. An alternative route of administration might be more effective by increasing the drug's local bioavailability (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).). Therefore, therapeutically targeting ^{V599E}B-Raf activity in combination with chemotherapeutic agents may offer an effective approach to shrink established melanoma tumors containing this mutant protein.

In conclusion, we identified mechanisms by which mutant V599E B-Raf promotes melanoma tumor development and show how this mutation provides melanoma cells with selective growth and angiogenic advantages in the tumor environment.

EXAMPLE 24: Akt3 Domain Swap Experiments, Results and Discussion

Domain switching between the Akt isoforms has identified the region of Akt3 leading to preferential activation of Akt3 and not Akt1 or Akt2 in melanoma. Activation is measured as the levels of phosphorylation of threonine 308 or serine 472 on Akt3; or by immunoprecipitation of Akt3 followed by an *in vitro* kinase assay in which Crosstide is phosphorylated by Akt3 to estimate activity. Domains of Akt3 were switched with those of Akt2 or Akt1 and constructs containing the chimeric genes were nucleofected into the melanoma cell lines WM35 or UACC 903. Myristoylated Akt3 and Akt2 served as positive control while dead Akt3 (T305A/S472A) and Akt2 (T309A/S474A) served as negative controls. Transfer of wild type Akt3 led to increased activity in contrast to wild type Akt2 that did not, which demonstrated that specificity for Akt3 activation in melanoma cells. Constructs in which the pleckstrin homology domain from Akt3 (amino acids 1-110) was connected to the catalytic-regulatory domains of Akt2 did not lead to activation. In contrast, constructs in which the pleckstrin homology domain from Akt2 (amino acids 1-110) was connected to the catalytic-regulatory domains from Akt3 (from

amino acids 111-497) were activated. This maps the critical region leading to preferential Akt3 activation in melanomas from amino acids 111-497. This is the region to which therapeutic agents may be targeted to specifically prevent Akt3 activation in melanomas.

While the present invention has been described in conjunction with the specific
5 embodiments set forth above, many alternatives, modifications and variations thereof will be apparent to those of ordinary skill in the art. All such alternatives, modifications and variations are intended to fall within the spirit and scope of the present invention. All documents (e.g., publications and patent applications) cited herein are incorporated by reference to the same extent as if each individual document was specifically and
10 individually indicated to be incorporated by reference.

REFERENCES:

- Ahmad T, Marais R, Pyle L, et al. 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.
5 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).
- 10 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 Scalable Synthesis
15 of BAY 43-9006: A Potent Raf Kinase Inhibitor for the Treatment of Cancer.
Organic Process Res Dev 2002;6:777-81.
- Bardelmeijer HA, Ourwehand 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.
- 20 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
25 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*
30 *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).
- 5 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).
- 10 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).
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62:6997-7000.
- 15 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.
- 20 Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., 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).
- 25 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).
- 30

- Cho, H., Mu, J., Kim, 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).
- 5 Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Fent, F., and Birnbaum, M.J., Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for 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.
- 10 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
- 15 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 SJ, Skolnik EY, Lemmon MA. Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell.* 6(2):373-84 (2000).
- 20 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.
- 25 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. *Bioch Pharm* 2002;64:1493-502.
- Heidenreich R, Machein M, Nicolaus A, et al. Inhibition of solid tumor growth by gene
- 30 transfer of VEGF receptor-1 mutants. *Int J Cancer* 2004;111:348-57.

- Helmbach, H., Rosemann, 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).
- 5 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 10 *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* 15 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- 20 683 (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).
- 25 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* 30 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
5 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-
10 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, Kannengiesser C, Avril MF, et al. BRAF as a melanoma susceptibility candidate
gene? *Cancer Res* 2003;63:3061-5.

15 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.

20 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).

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
25 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.

30 Mertens, F., Johansson, B., Höglund, 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.
- 5 Mitsunuchi, 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).
- 10 Niv MY, Rubin H, Cohen J, Tsirulnikov 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).
- 15 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).
- 20 Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacoba, 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).
- 25 Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20.
- Powell, D.J., Hajdúch, 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).
- 30

- 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
5 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.
- 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
10 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).
- 15 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*. Malden, 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).
- 20 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.
- 25 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 AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma, *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).
- 5 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 Akt3 activity promotes development of
malignant melanoma. *Cancer Res* 2004;64:7002-10.
- 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
15 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
20 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.,
25 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).
- 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.
- 30 van Dekken, H., 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).

- 5 Waldmann, V., Wachter, J., and Diechmann, 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).

- 10 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.

What is claimed is:

1. A method for inducing apoptosis in a melanoma tumor cell comprising:
reducing Akt3 activity.

2. The method of claim 1 wherein said reducing is by contacting a melanoma tumor cell
with an agent that reduces Akt3 activity.

3. The method of claim 2 wherein the agent is selected from the group consisting of a
siRNA molecule, an antisense molecule, an antagonist, a ribozyme, an inhibitor, a peptide,
and a small molecule.

4. The method of claim 3 wherein the agent is a siRNA molecule that comprises a
polynucleotide selected from the group having a sequence of 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', and the complements thereof.

5. The method of claim 2 wherein said contacting of said melanoma tumor cell includes
the use of: a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing nanoliposome, a
proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate nanoparticulate, a calcium
phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a nanocrystalline particulate, a
semiconductor nanoparticulate, poly(D-arginine), a nanodendrimer, a virus, calcium
phosphate nucleotide-mediated nucleotide delivery, electroporation, and microinjection.

6. The method of claim 3 wherein said agent is a peptide that acts as a pseudosubstrate for
Akt3.

7. The method of claim 6 wherein said peptide acts as a pseudosubstrate for a catalytic
domain or a regulatory domain of Akt3.

8. The method of claim 3 wherein said agent is a peptide that acts as a competitive
inhibitor for Akt3.

9. The method of claim 8 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a catalytic domain of Akt3.

5 10. The method of claim 8 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a pleckstrin homology domain of Akt3.

11. The method of claim 8 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a regulatory domain of Akt3.

10

12. The method of claim 1 wherein the method further comprises: administering a chemotherapeutic agent selected from the group consisting of alkylating agents, antimetabolites, antibiotics, natural or plant derived products, hormones and steroids, and platinum drugs.

15

13. The method of claim 12 wherein the chemotherapeutic agent is dacarbazine.

14. The method of claim 1 wherein the method further comprises administering irradiation.

20

15. A method for treating a melanoma tumor in a mammal comprising: administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent to induce apoptosis; and administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent to reduce angiogenesis and cell proliferation.

25

16. The method of claim 15 wherein said agent that induces apoptosis is an agent that reduces Akt3 activity.

30

17. The method of claim 15 wherein said agent that reduces angiogenesis and cell proliferation is an agent that reduces V599E B-Raf activity, thereby treating a melanoma tumor.

35

18. The method of claim 16 wherein said agent that reduces Akt3 activity is selected from the group consisting of a siRNA molecule, an antisense molecule, an antagonist, a ribozyme, an inhibitor, a peptide, and a small molecule.

19. The method of claim 18 wherein said agent that reduces Akt3 activity is a siRNA molecule that comprises a polynucleotide selected from the group having a sequence of 5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', 5' CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3', 5' GAAUUUACAGCUCAGACUA 3', 5' CAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

40

5'CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',

5'CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3',

5'GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3',

5'UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3',

5 5'AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', and the complements thereof.

20. The method of claim 16 wherein the agent that reduces Akt3 activity is introduced into said melanoma tumor by the use of: a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing
 10 nanoliposome, a proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate nanoparticulate, a calcium phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a nanocrystalline particulate, a semiconductor nanoparticulate, poly(D-arginine), a nanodendrimer, a virus, calcium phosphate nucleotide-mediated nucleotide delivery, electroporation, and microinjection.

15 21. The method of claim 18 wherein said agent is a peptide that acts as a pseudosubstrate for Akt3.

20 22. The method of claim 21 wherein said peptide acts as a pseudosubstrate for a catalytic domain or a regulatory domain of Akt3.

23. The method of claim 18 wherein said agent is a peptide that acts as a competitive inhibitor for Akt3.

25 24. The method of claim 23 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a catalytic domain of Akt3.

25. The method of claim 23 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a pleckstrin homology domain of Akt3.

30 26. The method of claim 23 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a regulatory domain of Akt3.

27. The method of claim 15 wherein the method further comprises administering a
 35 chemotherapeutic agent selected from the group consisting of alkylating agents, antimetabolites, antibiotics, natural or plant derived products, hormones and steroids, and platinum drugs.

28. The method of claim 15 wherein the method further comprises administering irradiation.

5 29. The method of claim 17 wherein the agent that reduces V599E B-Raf activity is selected from the group consisting of a siRNA molecule, an antisense molecule, an antagonist, a ribozyme, an inhibitor, a peptide, and a small molecule.

30. The method of claim 17 wherein the agent that reduces V599E B-Raf activity is
10 introduced into said melanoma tumor by the use of: a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing nanoliposome, a proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate nanoparticulate, a calcium phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a nanocrystalline particulate, a semiconductor nanoparticulate, poly(D-arginine), a nanodendrimer, a virus, calcium phosphate nucleotide-mediated nucleotide
15 delivery, electroporation, and microinjection.

31. The method of 29 wherein the siRNA molecule that reduces V599E B-Raf activity comprises: a polynucleotide that has a sequence of
20 5'GGUCUAGCUACAGAGAAUCUCGAU 3'.

32. The method of claim 29 wherein the siRNA molecule that reduces B-Raf activity comprises: a polynucleotide that has a sequence of 5'
GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3'

25 33. The method of claim 29 wherein the agent that reduces V599E B-Raf activity is a B-Raf inhibitor.

34. The method of claim 33 wherein the B-Raf inhibitor is BAY 43-9006.

30 35. The method of claim 15, where in said treatment comprises: administering, concurrently or sequentially, an effective amount of an agent that reduces Akt3 activity and an agent that reduces V599E B-Raf activity.

35 36. A pharmaceutical composition for treating a melanoma tumor comprising: an agent that reduces Akt3 activity; and a carrier.

37. The pharmaceutical composition of claim 36 wherein said carrier is selected from a group consisting of: a liposome, a nanoliposome, a ceramide-containing nanoliposome, a proteoliposome, a nanoparticulate, a calcium phosphor-silicate nanoparticulate, a calcium phosphate nanoparticulate, a silicon dioxide nanoparticulate, a nanocrystalline particulate, a
40 semiconductor nanoparticulate, poly(Darginine), a nanodendrimer, a virus, and calcium phosphate nucleotide-mediated nucleotide delivery.

38. The pharmaceutical composition of claim 36 wherein said agent is selected from the group consisting of: siRNA molecule, an antisense molecule, an antagonist, a ribozyme, an inhibitor, a peptide, and a small molecule.

5

39. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide
5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3' or the complement thereof.

10

40. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises:
5' CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3', or the complement thereof.

15

41. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide 5' GAAUUUACAGCUCAGACUA 3', or the complement thereof.

20

42. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: the polynucleotide 5' CAGCUCAGACUAUUACAAU 3', or the complement thereof.

25

43. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide
5' CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 3', or the complement thereof.

44. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide
5' CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3', or the complement thereof.

30

45. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide
5' GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3', or the complement thereof.

35

46. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide
5' UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3', or the complement thereof.

40

47. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide
5' AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3', or the complement thereof.

48. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide 5' AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', or the complement thereof.
- 5 49. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide 5' AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', or the complement thereof.
- 10 53. The pharmaceutical composition of claim 38 wherein said agent is a peptide that acts as a pseudosubstrate for Akt3.
54. The pharmaceutical composition of 53 wherein said peptide acts as a pseudosubstrate for a catalytic domain or a regulatory domain of Akt3.
- 15 55. The pharmaceutical composition of 38 wherein said agent is a peptide that acts as a competitive inhibitor for Akt3.
56. The pharmaceutical composition of 55 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a catalytic domain of Akt3.
- 20 57. The pharmaceutical composition of claim 55 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a pleckstrin homology domain of Akt3.
58. The pharmaceutical composition of claim 55 wherein said peptide acts as a competitive inhibitor for a regulatory domain of Akt3.
- 25 59. The pharmaceutical composition of claim 36 wherein said composition further comprises an agent that reduces B-Raf activity.
- 30 60. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein said agent is selected from the group consisting of: siRNA molecule, an antisense molecule, an antagonist, a ribozyme, an inhibitor, a peptide, and a small molecule.
- 35 61. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide 5' GGUCUAGCUACAGAGAAUUCUGAU 3', or the complement thereof.
- 40 62. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein said small interfering RNA (siRNA) molecule comprises: a polynucleotide 5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3', or the complement thereof.

65

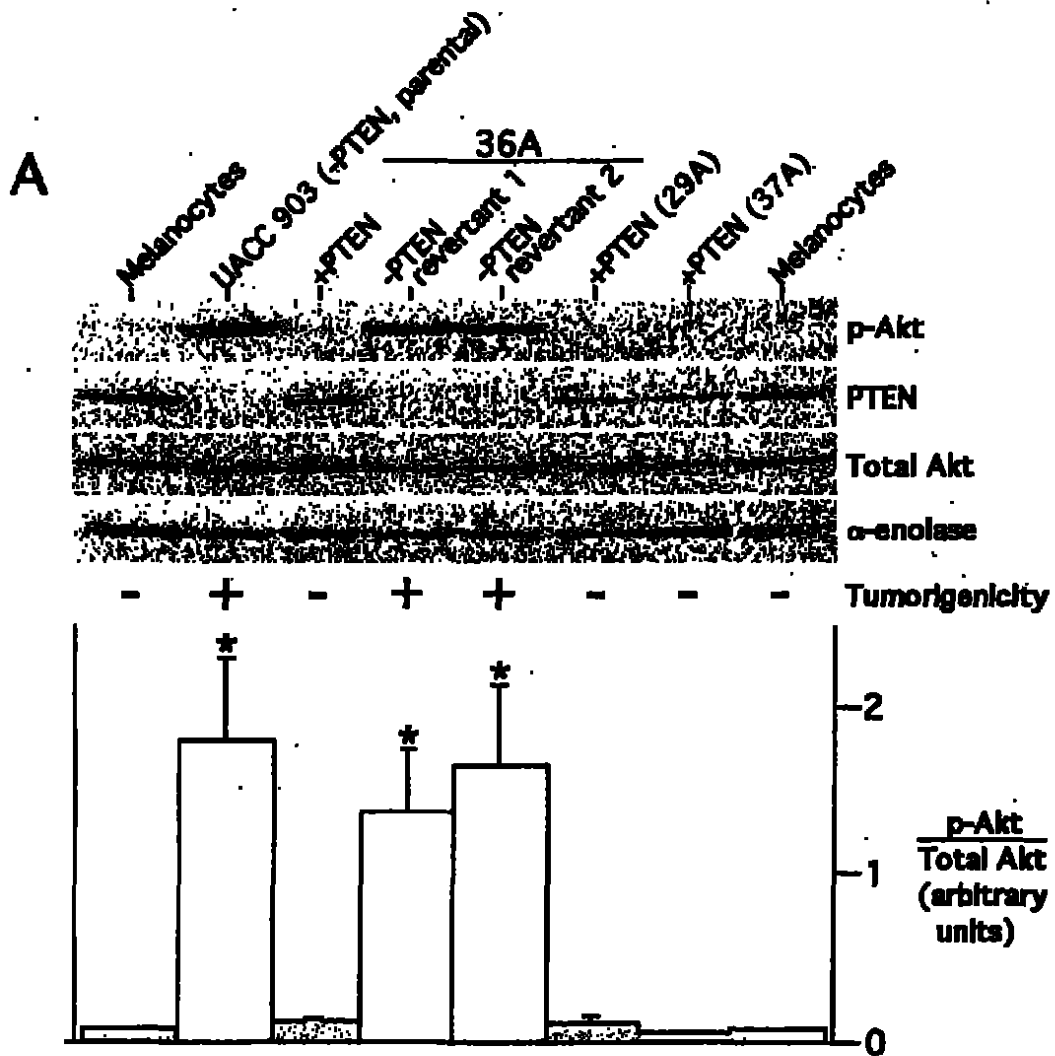


FIGURE 1A

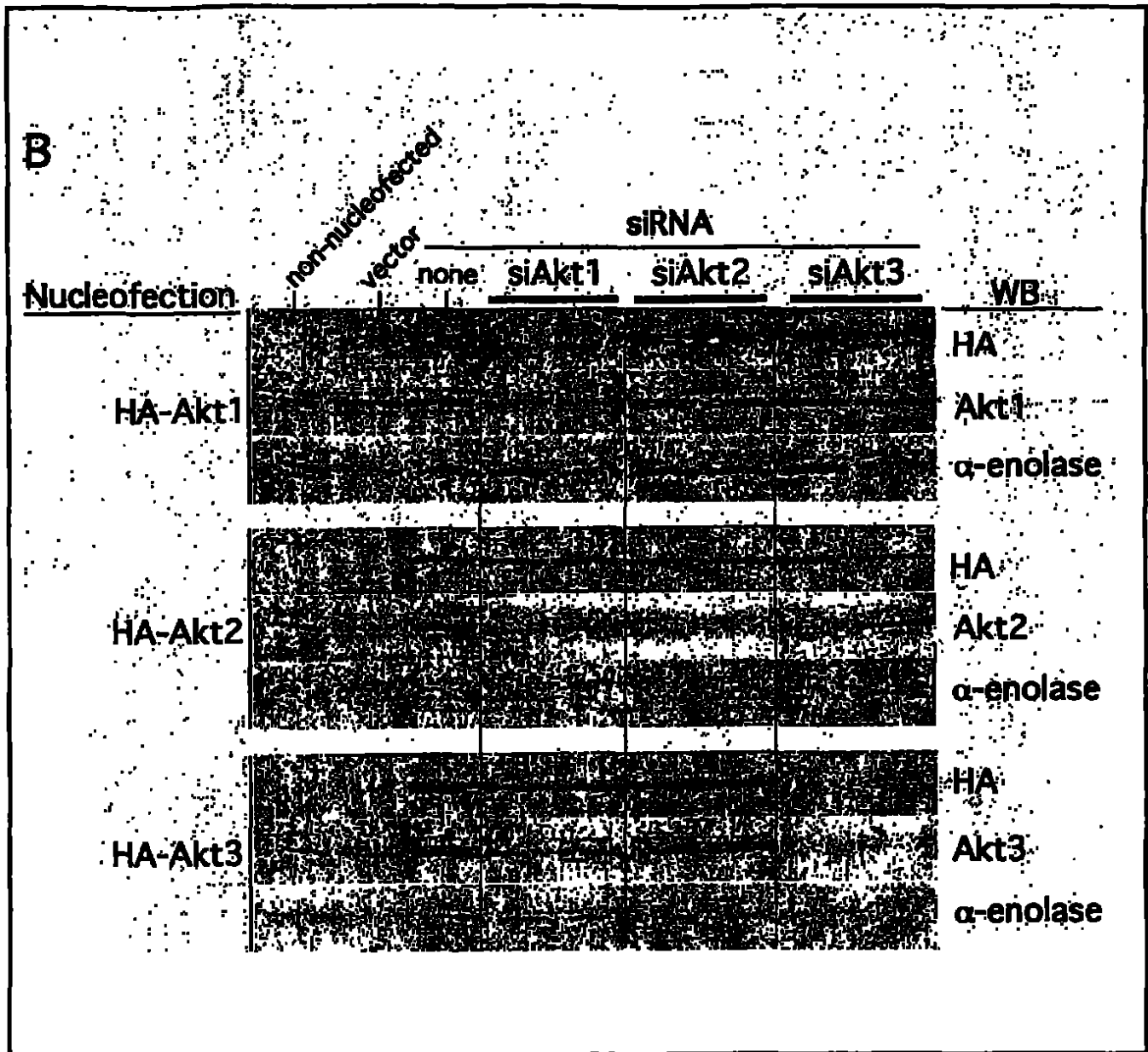


FIGURE 1B

~~67~~

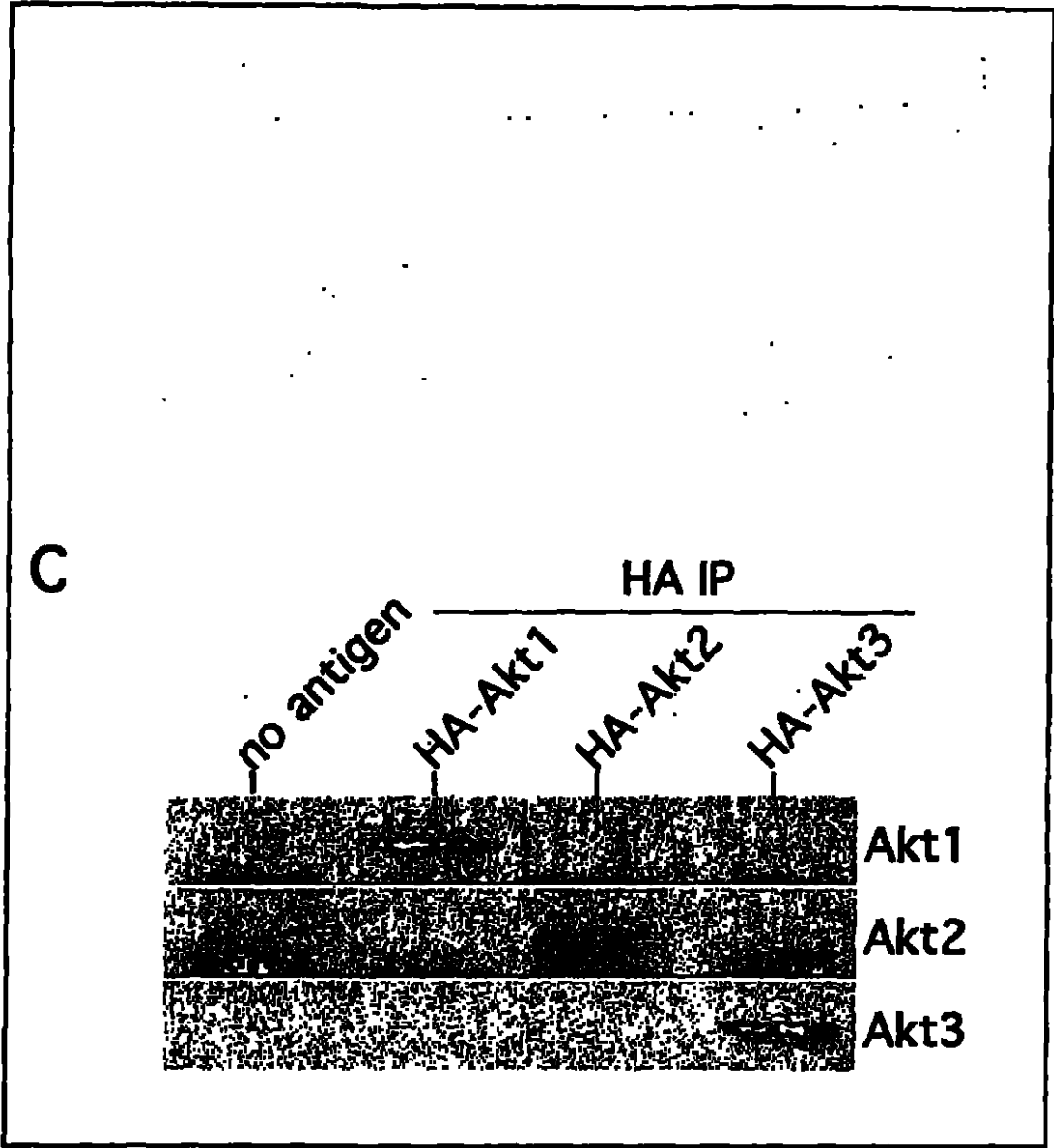


FIGURE 1C

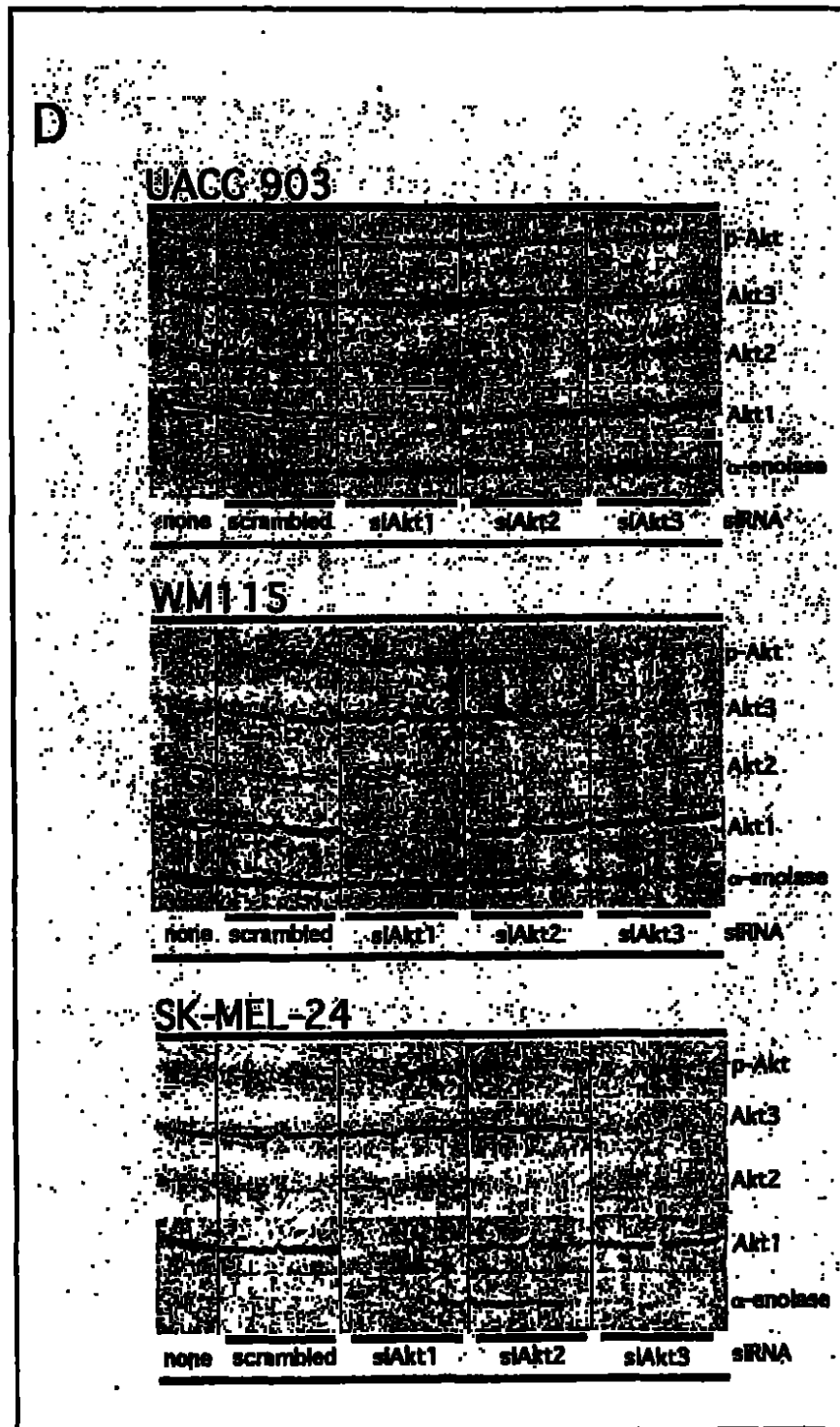


FIGURE 1D

69

Figure 2

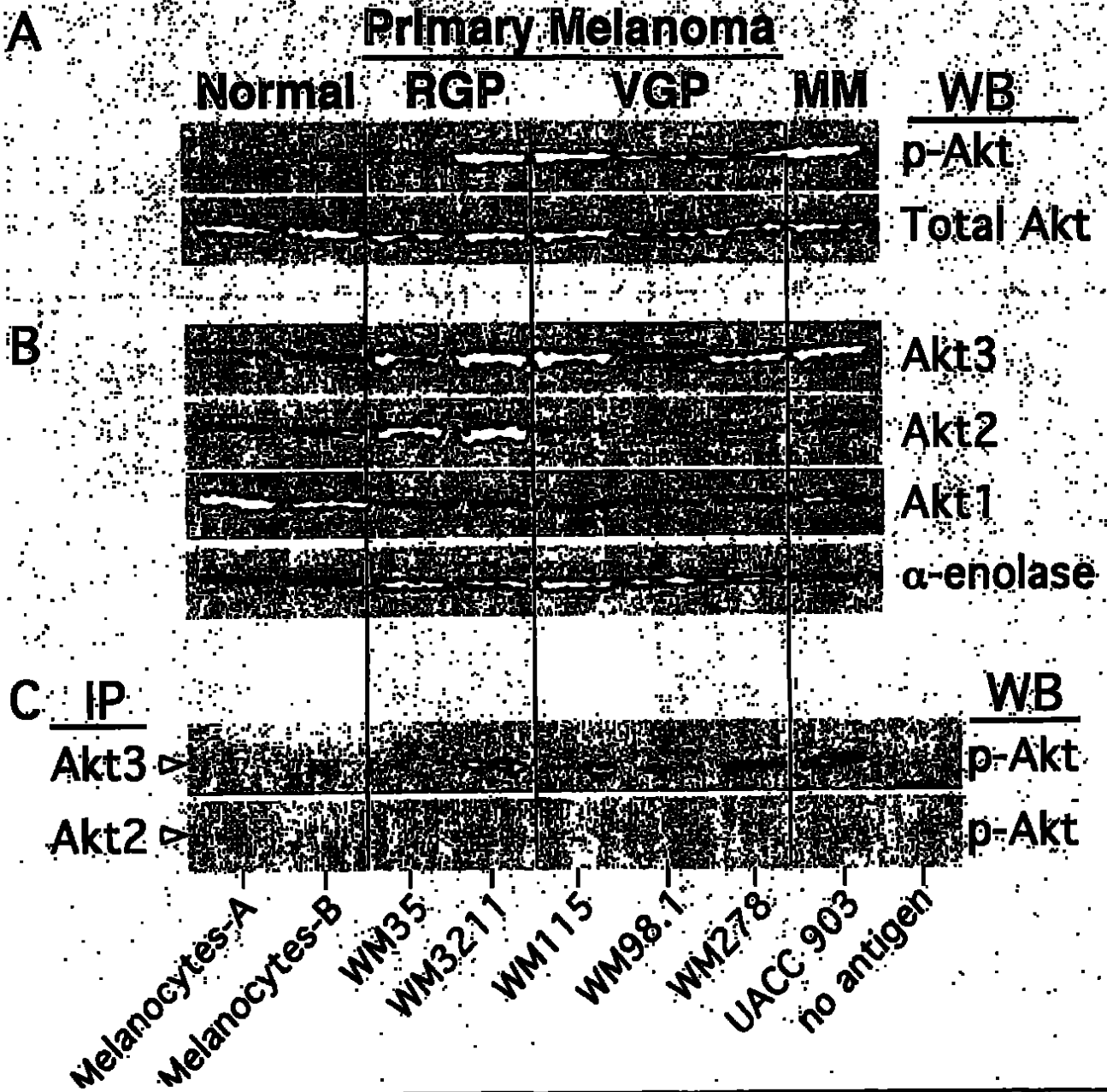


FIGURE 2

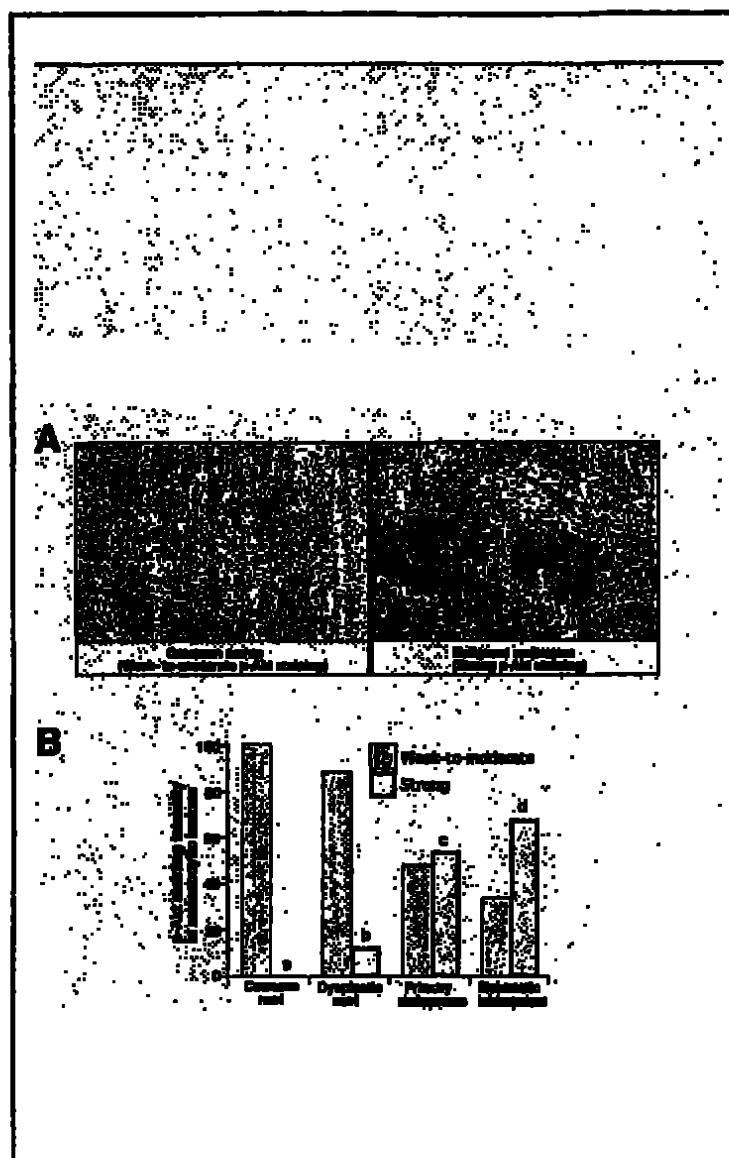
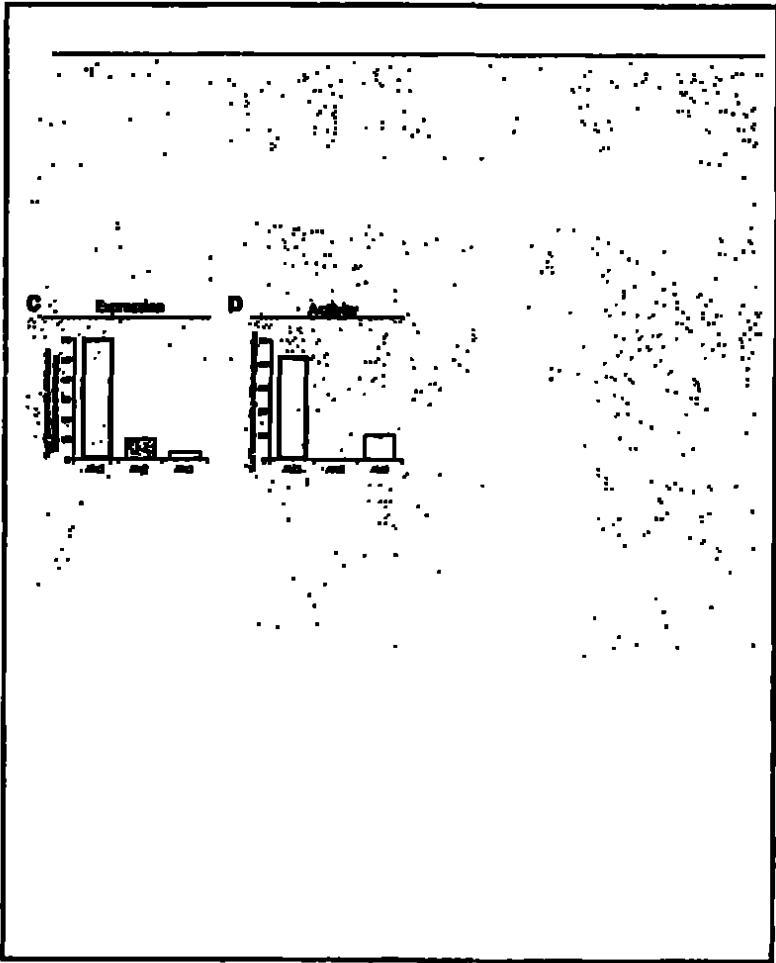


FIGURE 3A

FIGURE 3B

[Handwritten signature]



FIGURES 3C and 3D

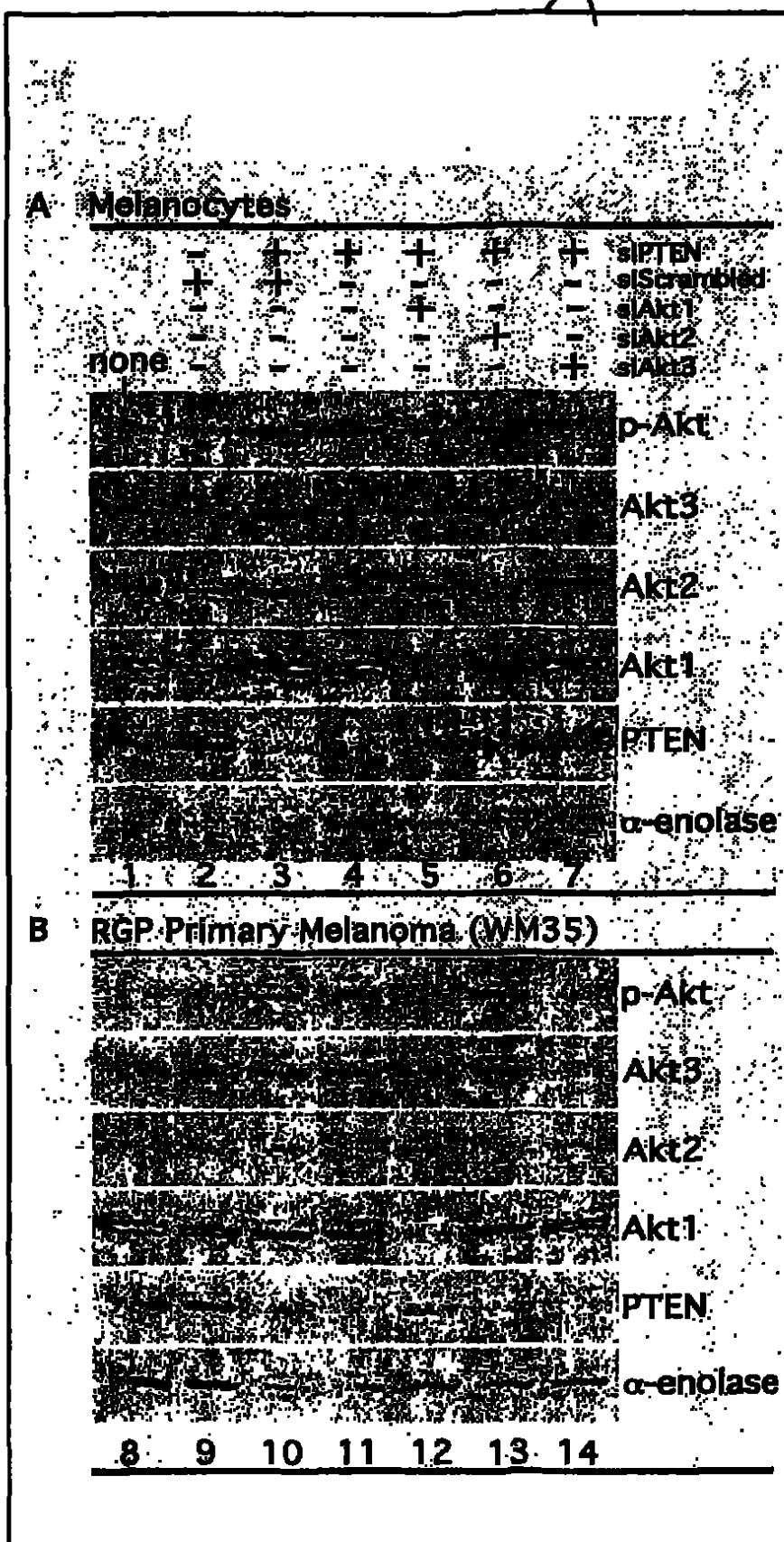


FIGURE 4A and FIGURE 4B

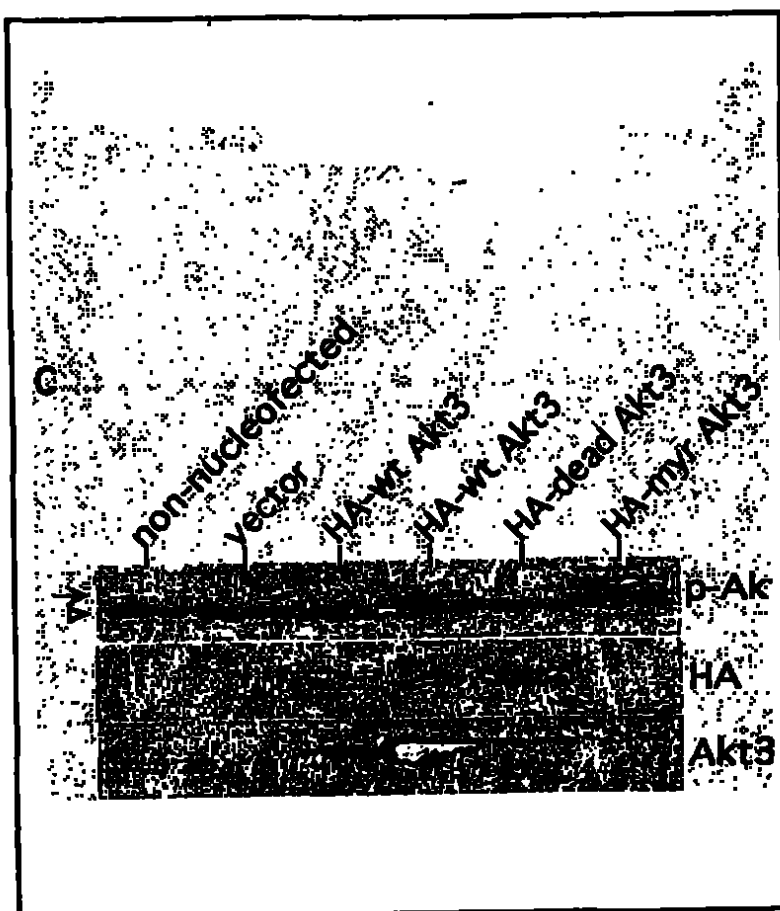


FIGURE 4C

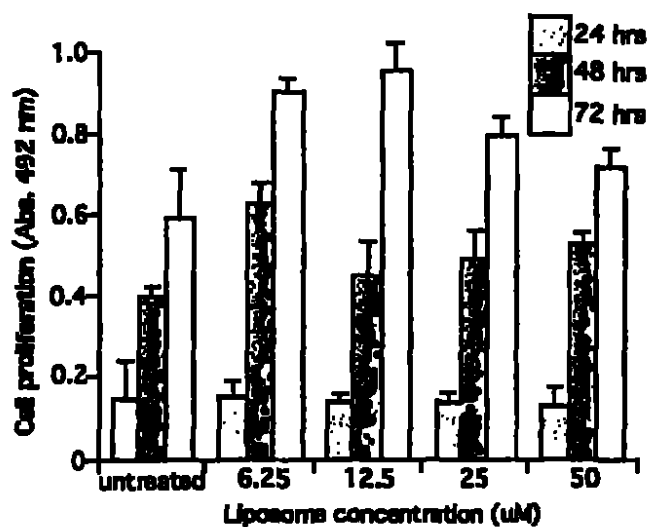


FIGURE 5

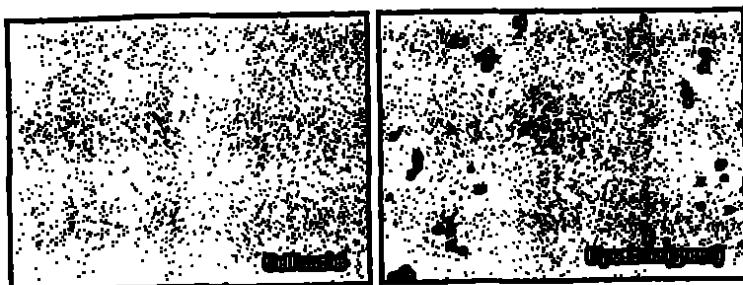


FIGURE 6

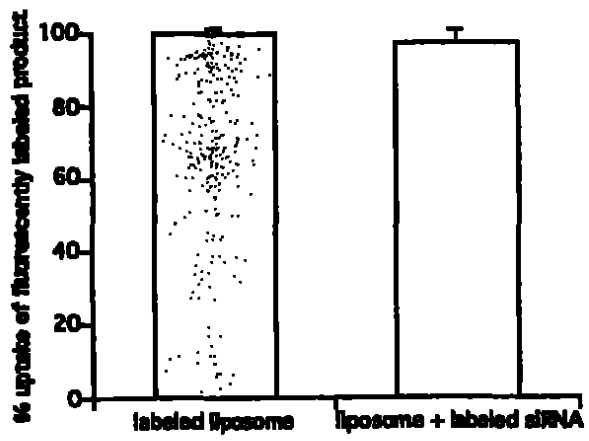


FIGURE 7

FIGURE 8

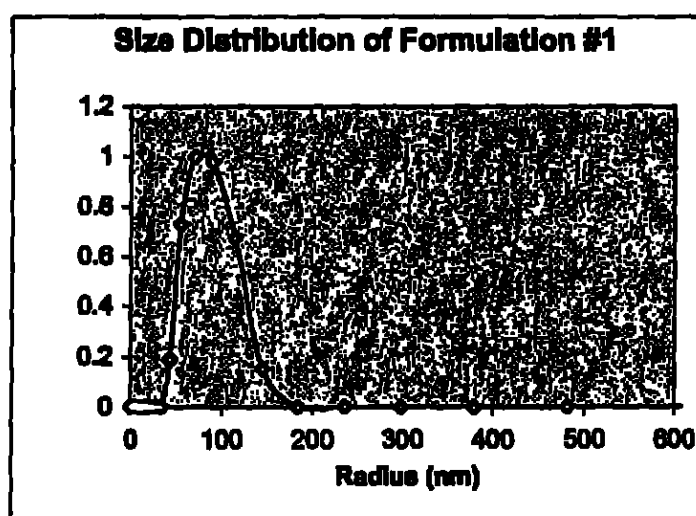
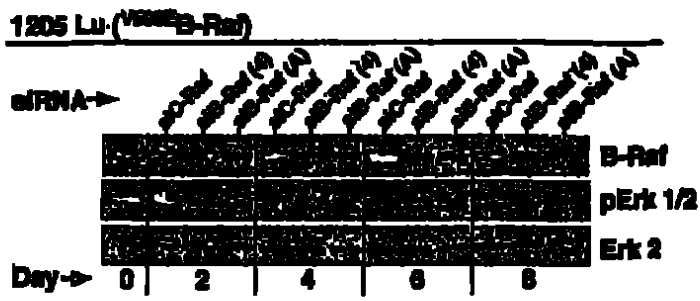


FIGURE 9

Ghost liposome (no siRNA) - control**Liposome with red and green tagged siRNA (20nM)**

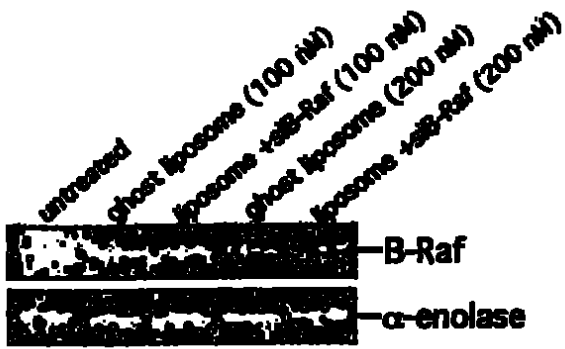
20

Figure 10



20 79

Figure 11



UACC 903 (mutant V599EB-Raf)

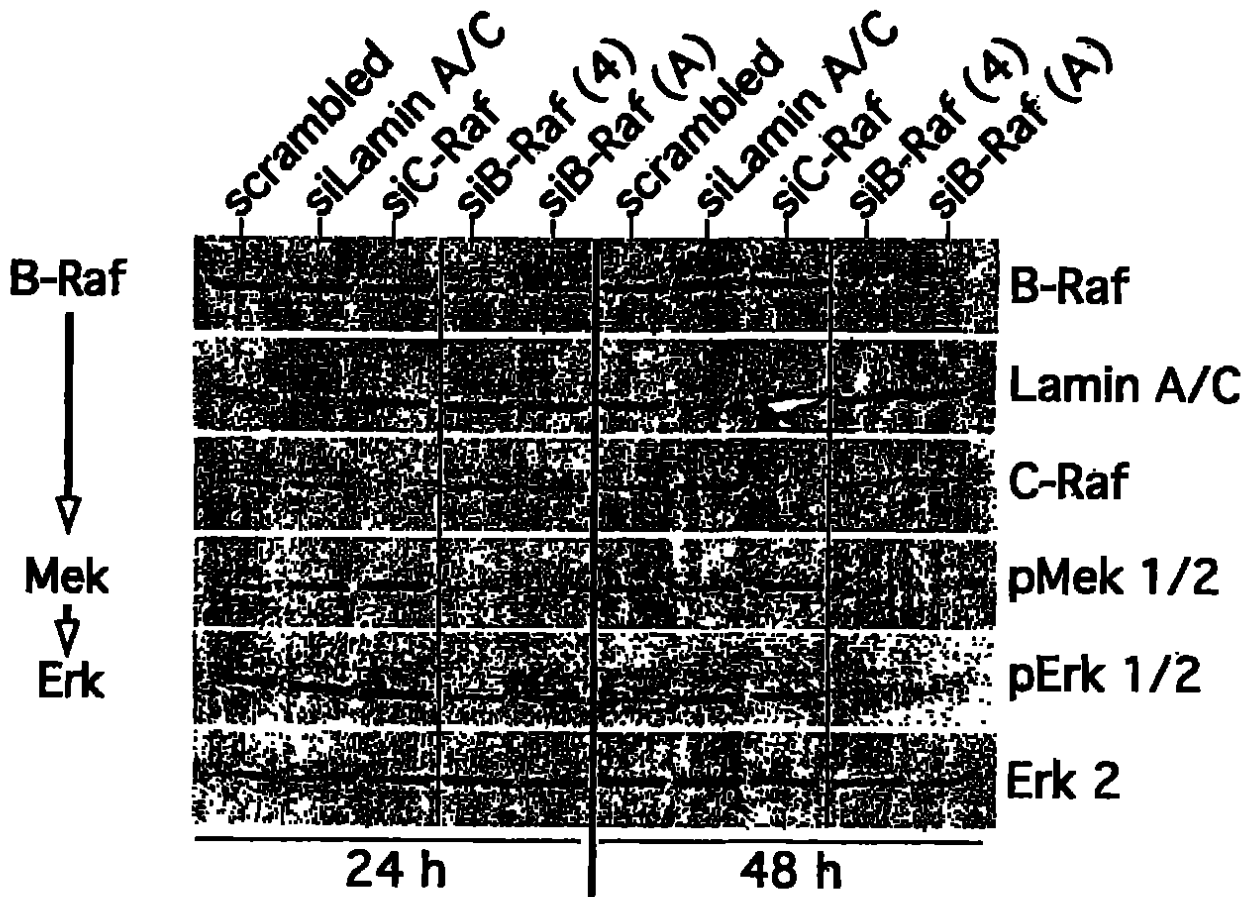


FIGURE 12A

B 1205 Lu (mutant V599E B-Raf)

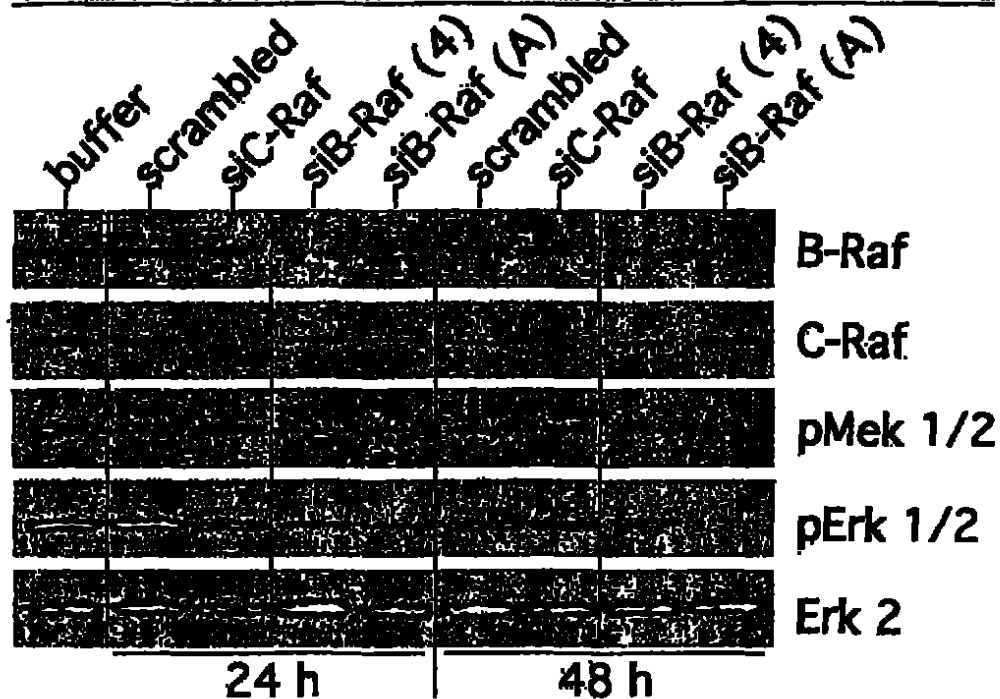


FIGURE 12B

C C8161

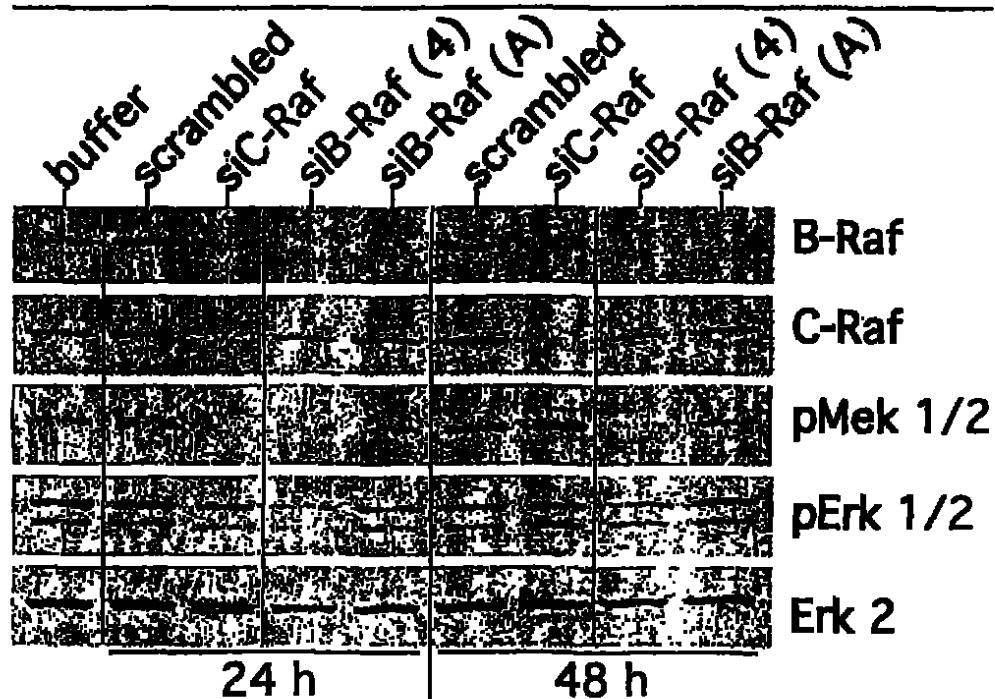


FIGURE 12C

82

83

A UACC 903 (V599E B-Raf)

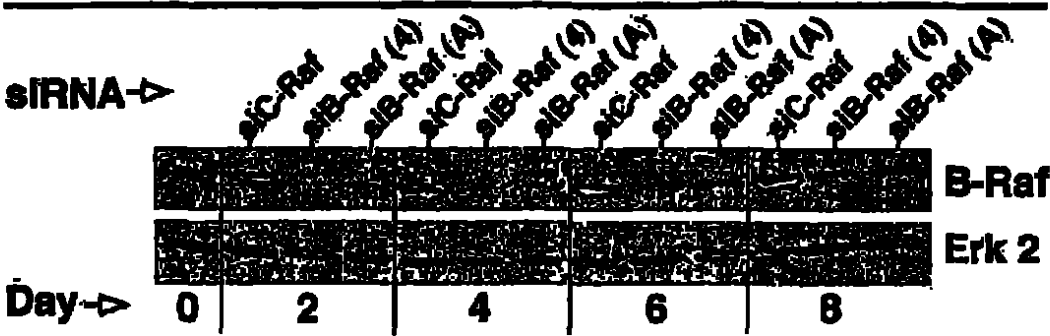


FIGURE 13A

B 1205 Lu (V599E B-Raf)

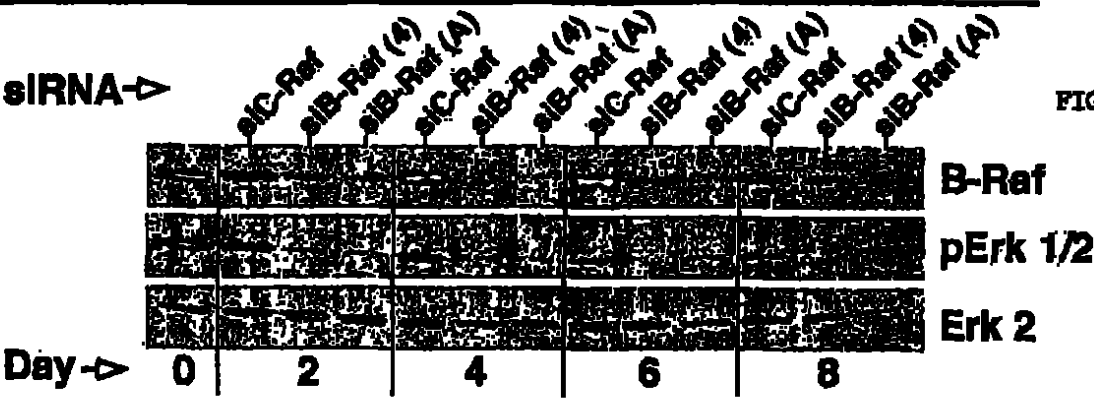


FIGURE 13B

83

84

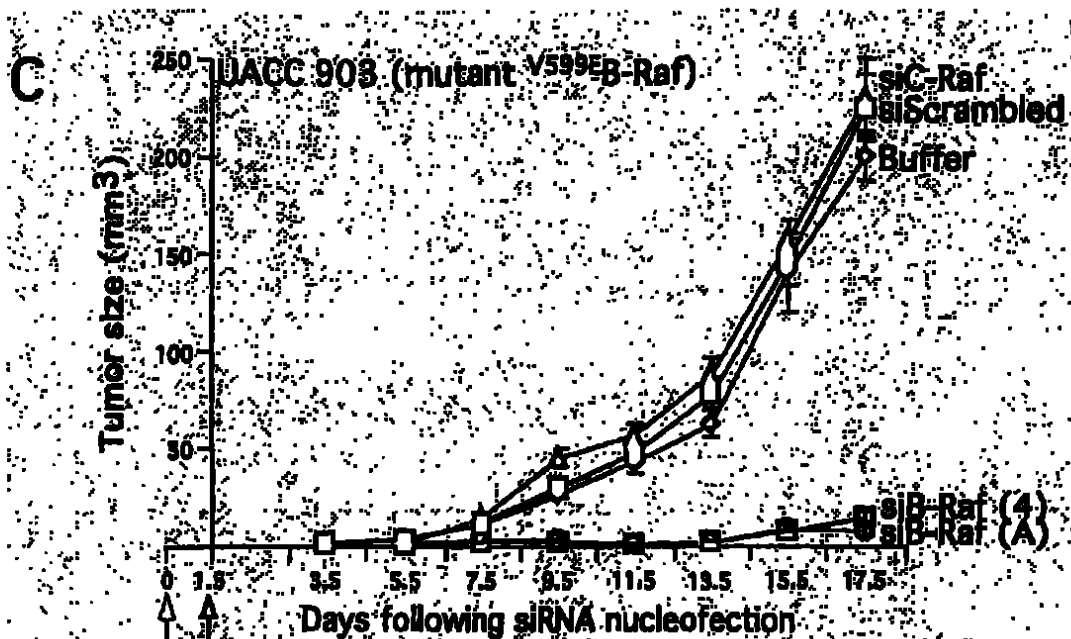


FIGURE 13C

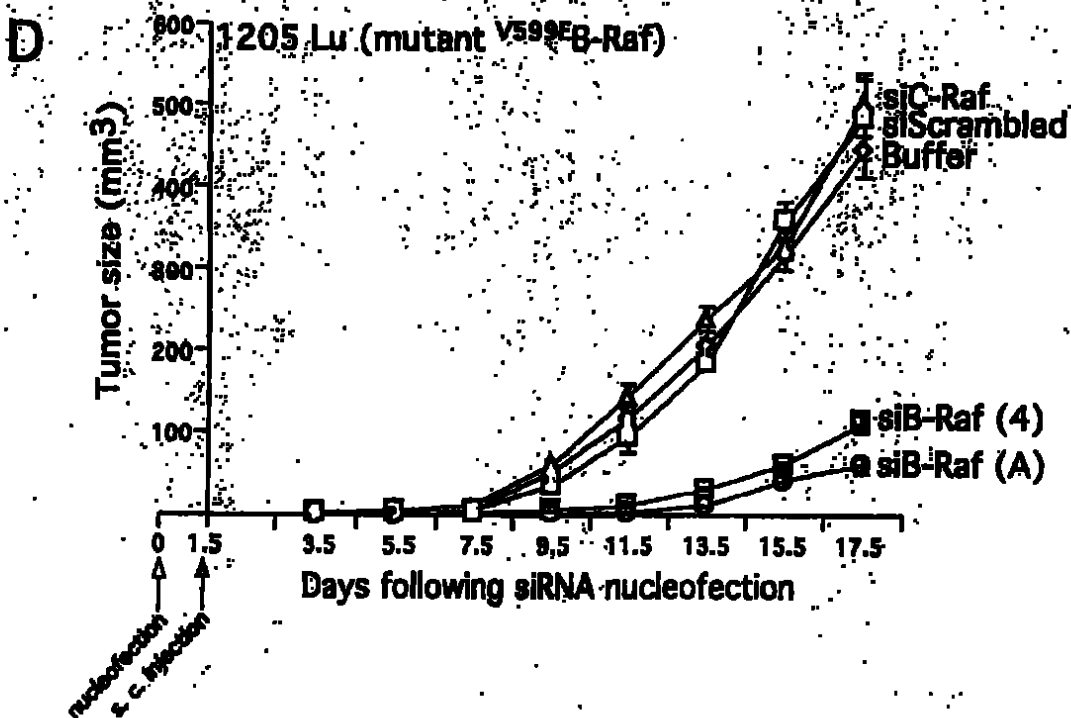


FIGURE 13D

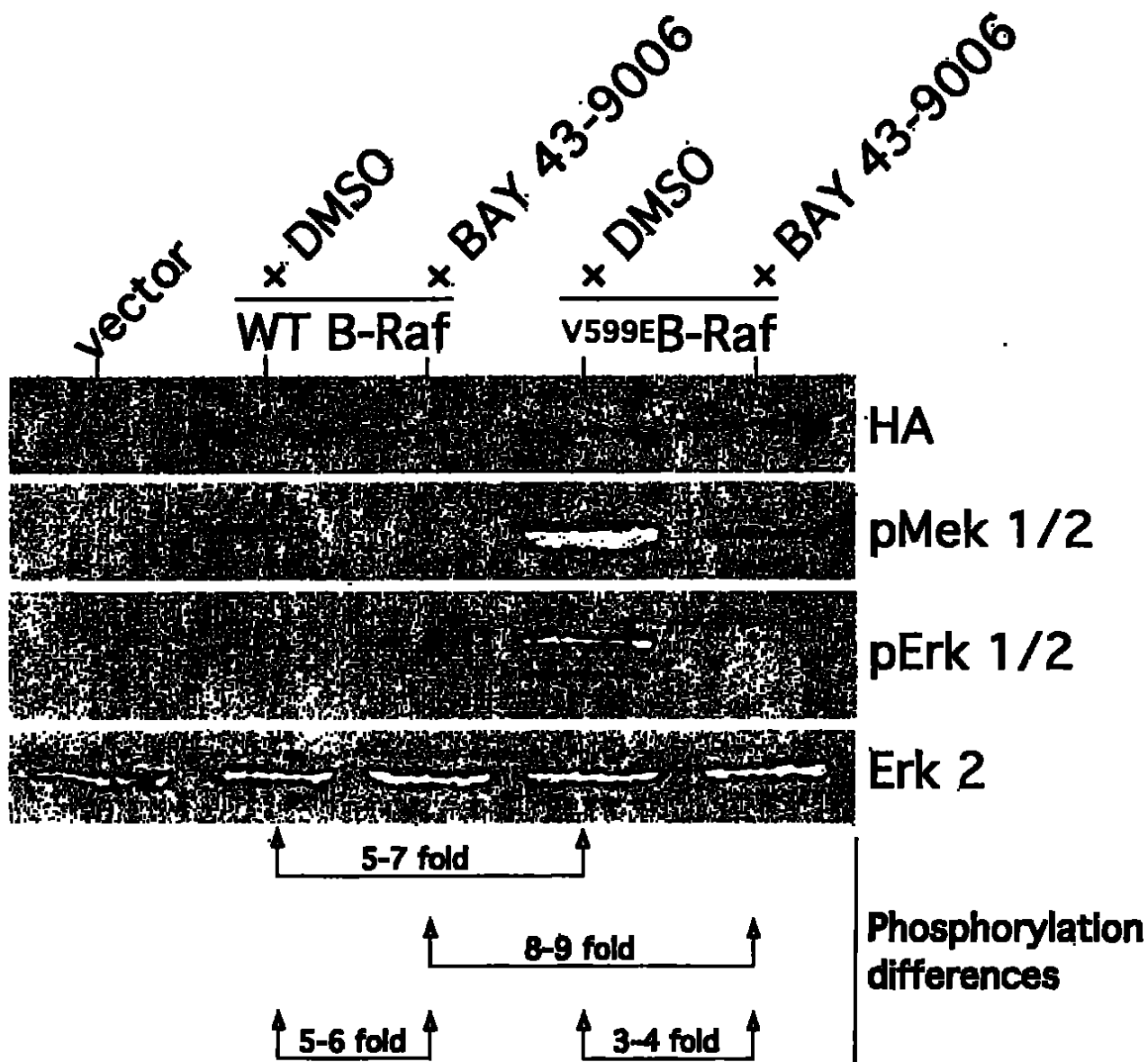


FIGURE 14A

Handwritten signature

B

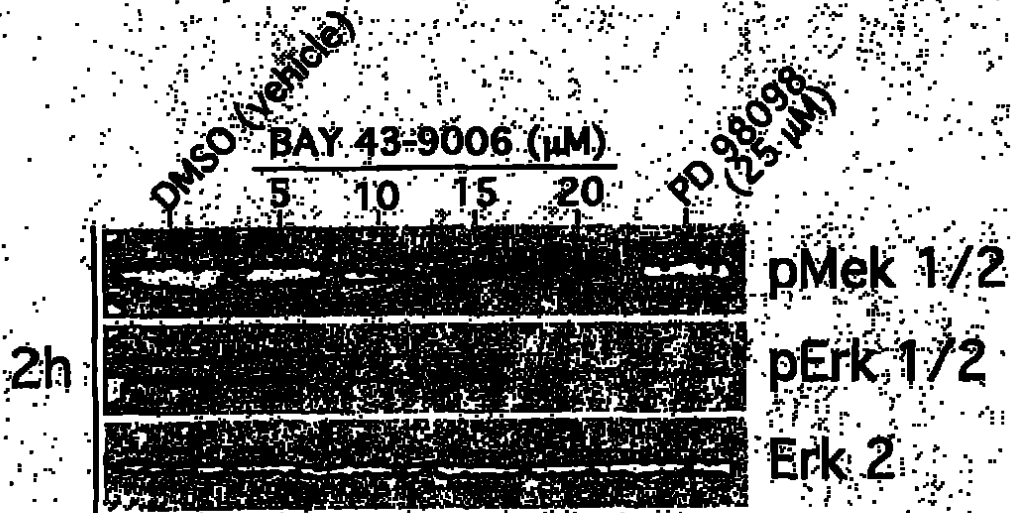


FIGURE 14B

C

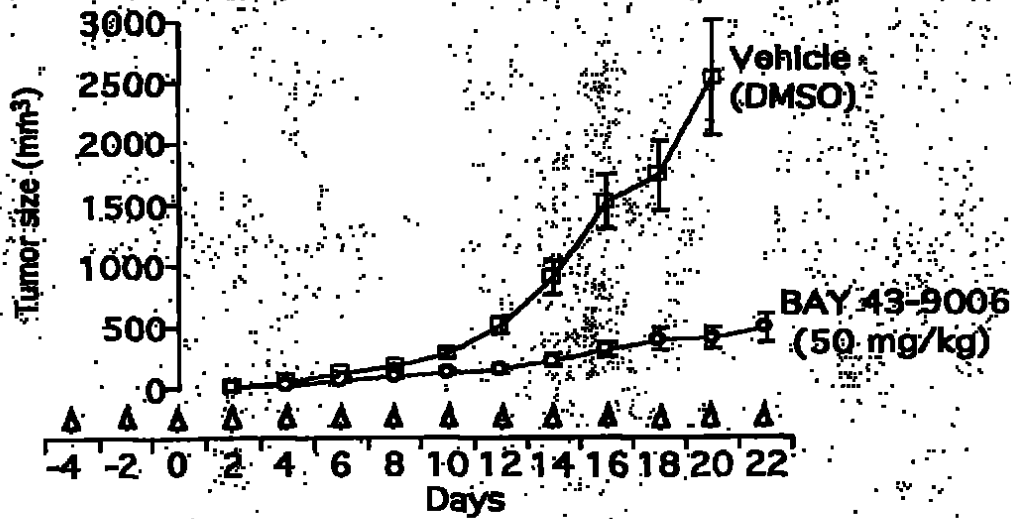


FIGURE 14C

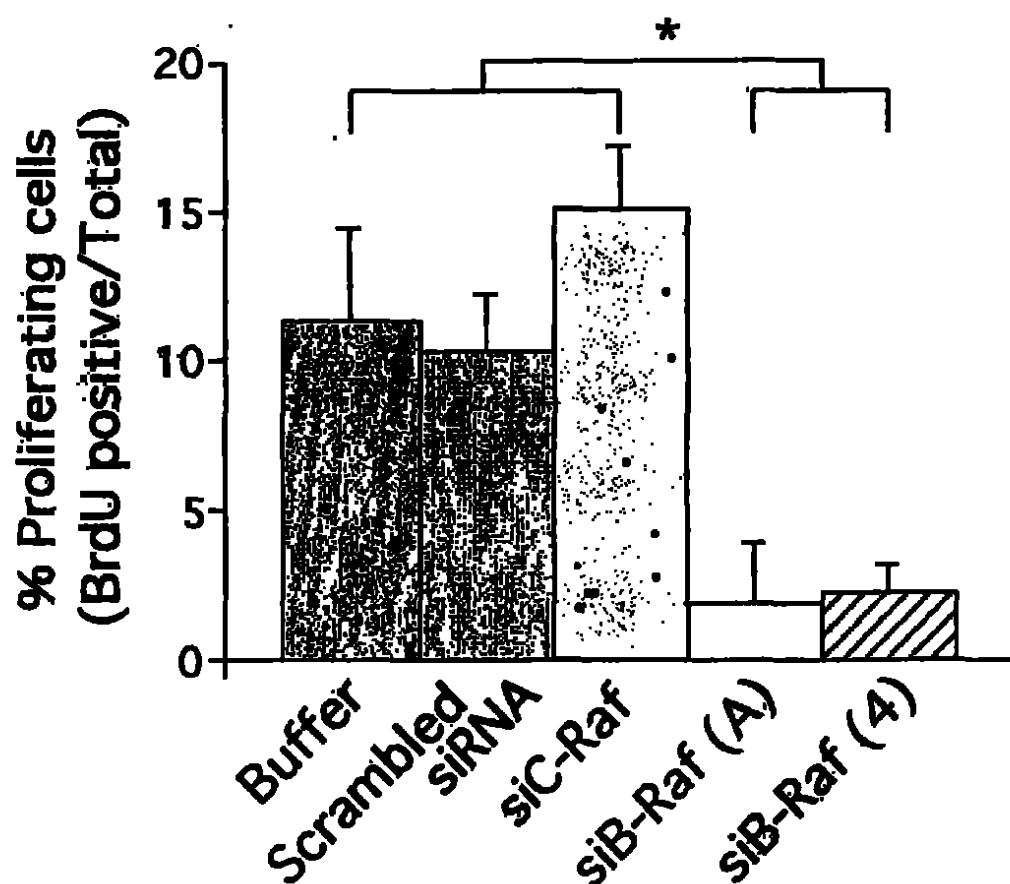
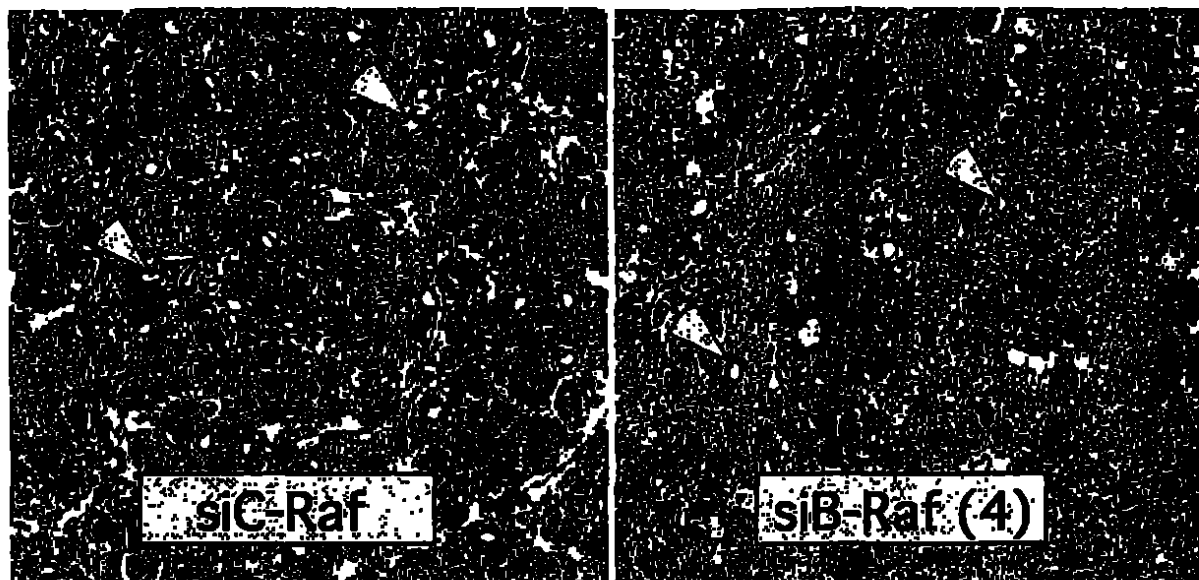


FIGURE 14D

82

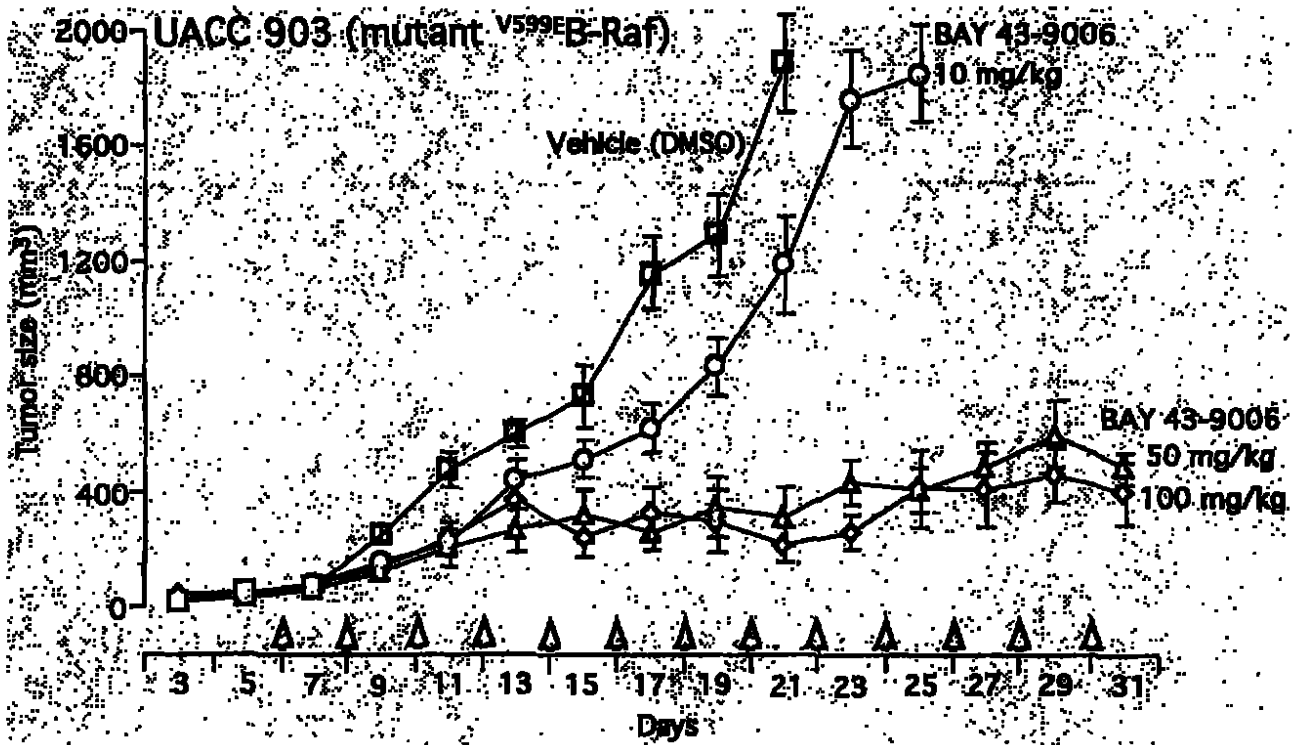


FIGURE 15A

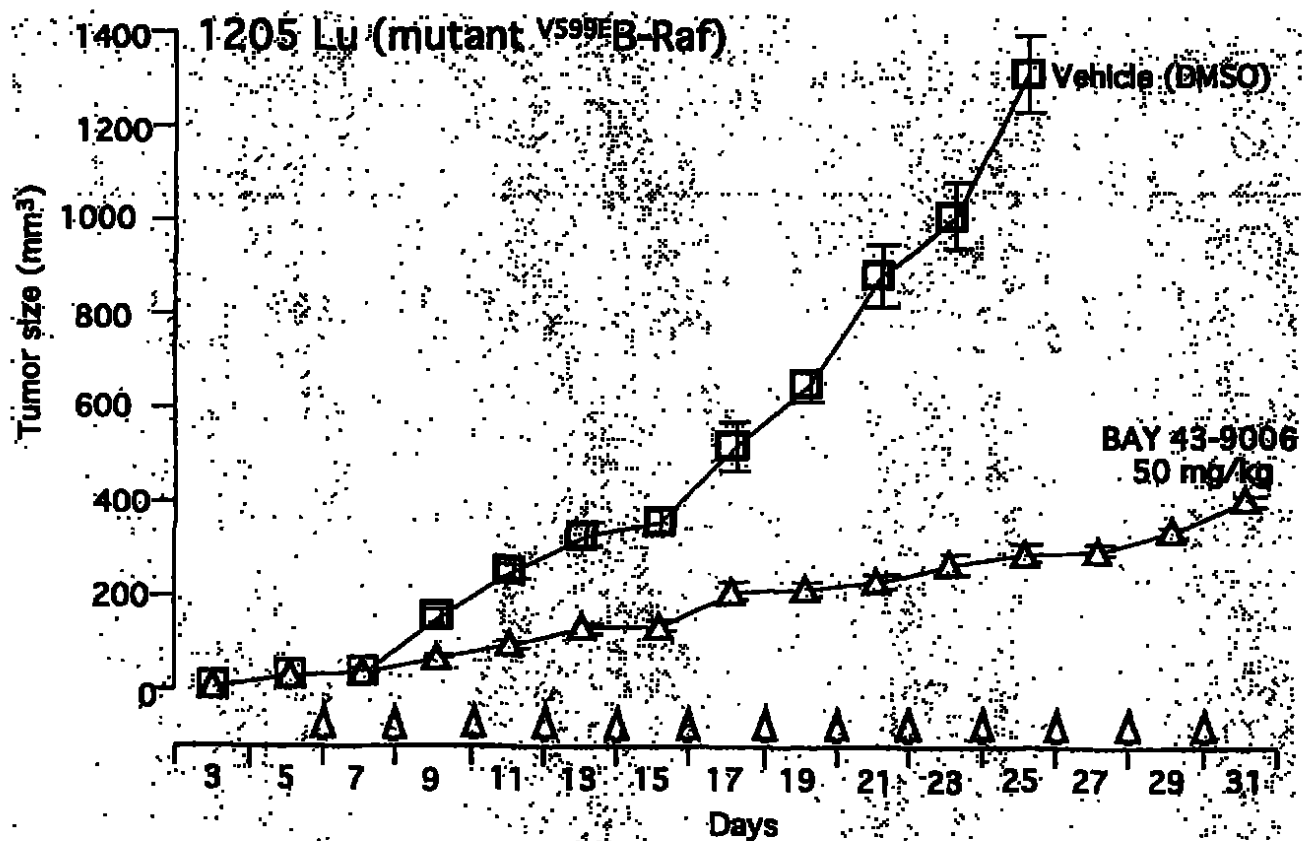


FIGURE 15B

C

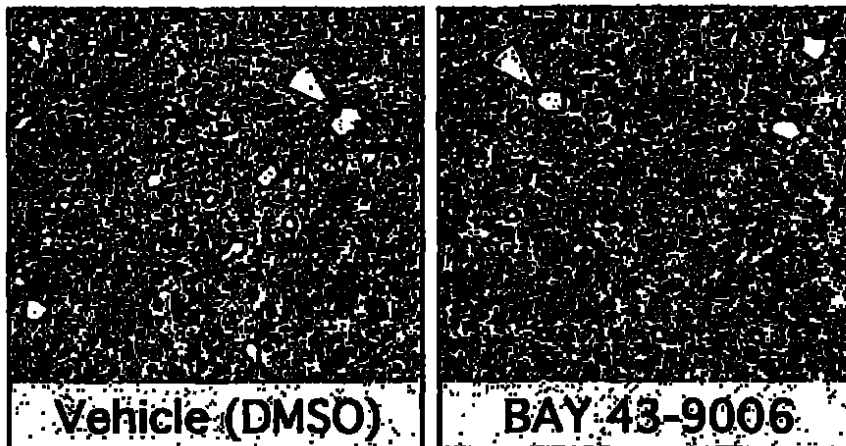


FIGURE 15C

D

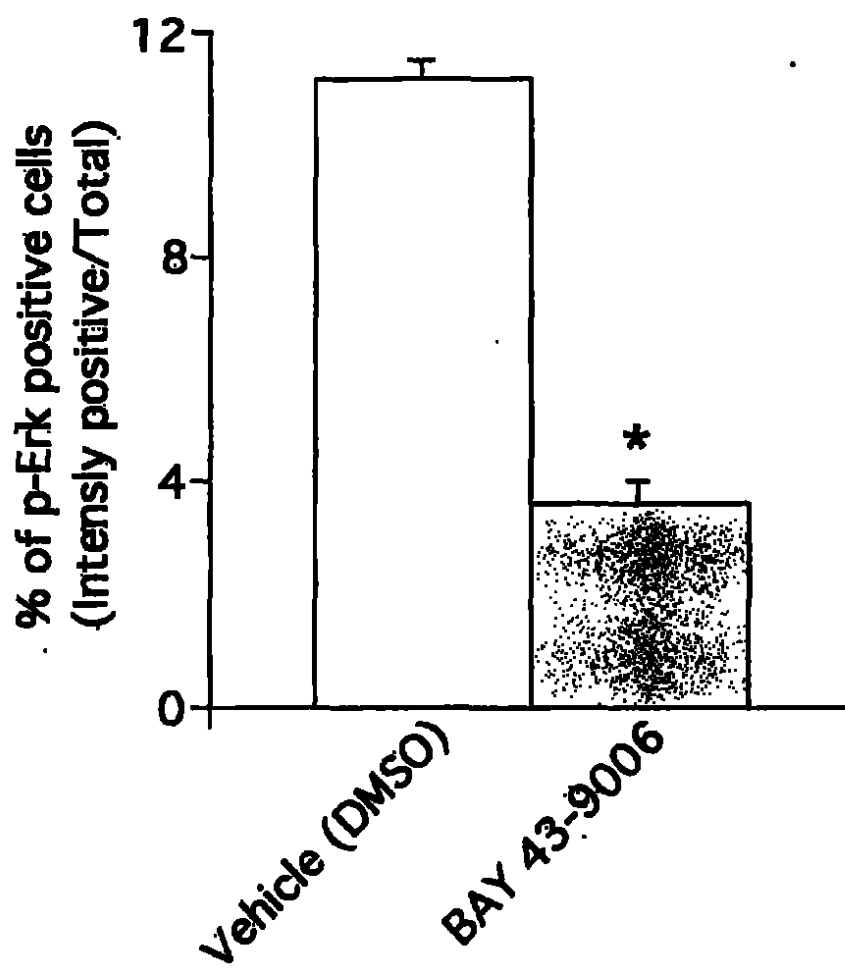


FIGURE 15D

90

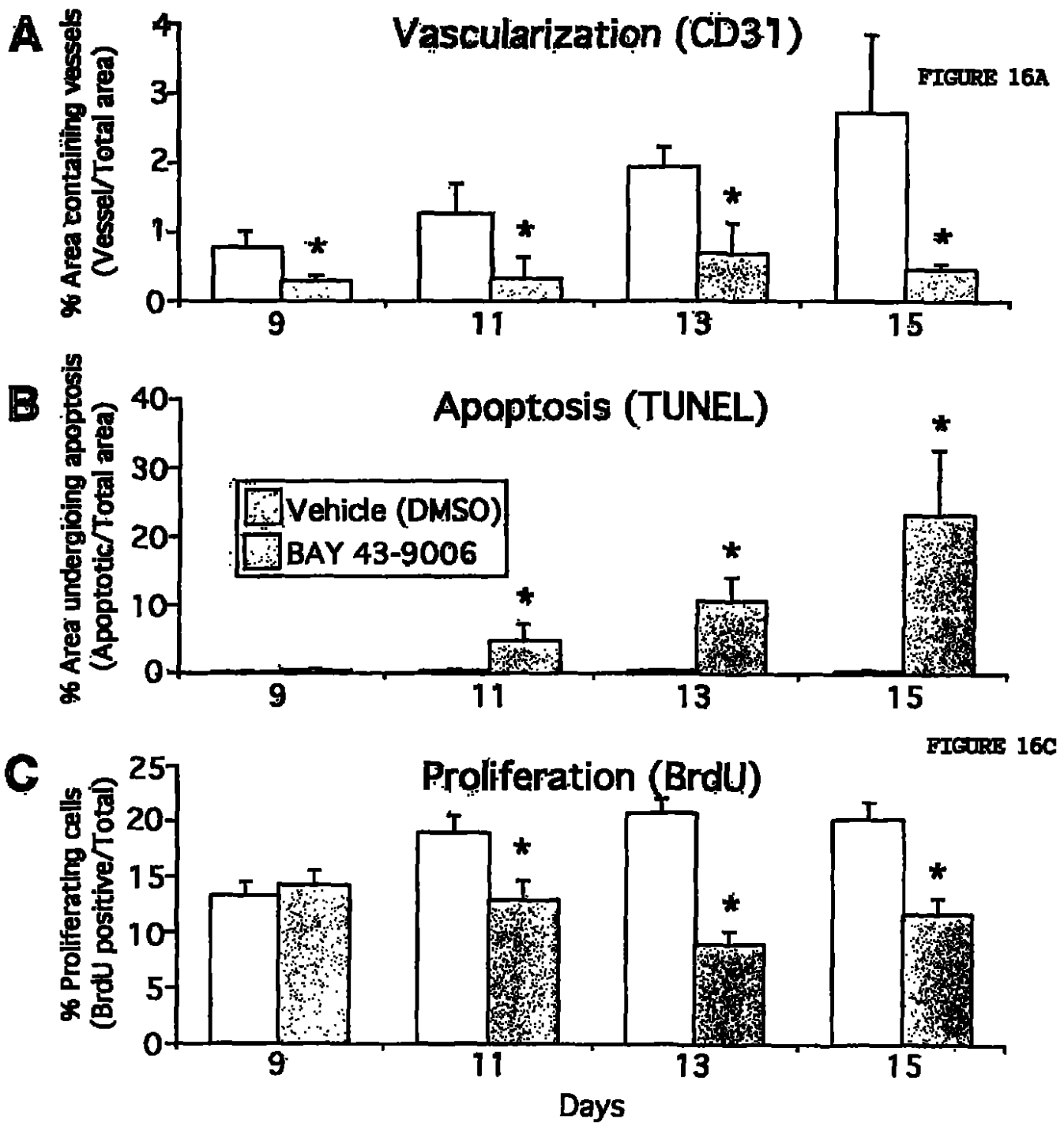


FIGURE 17A

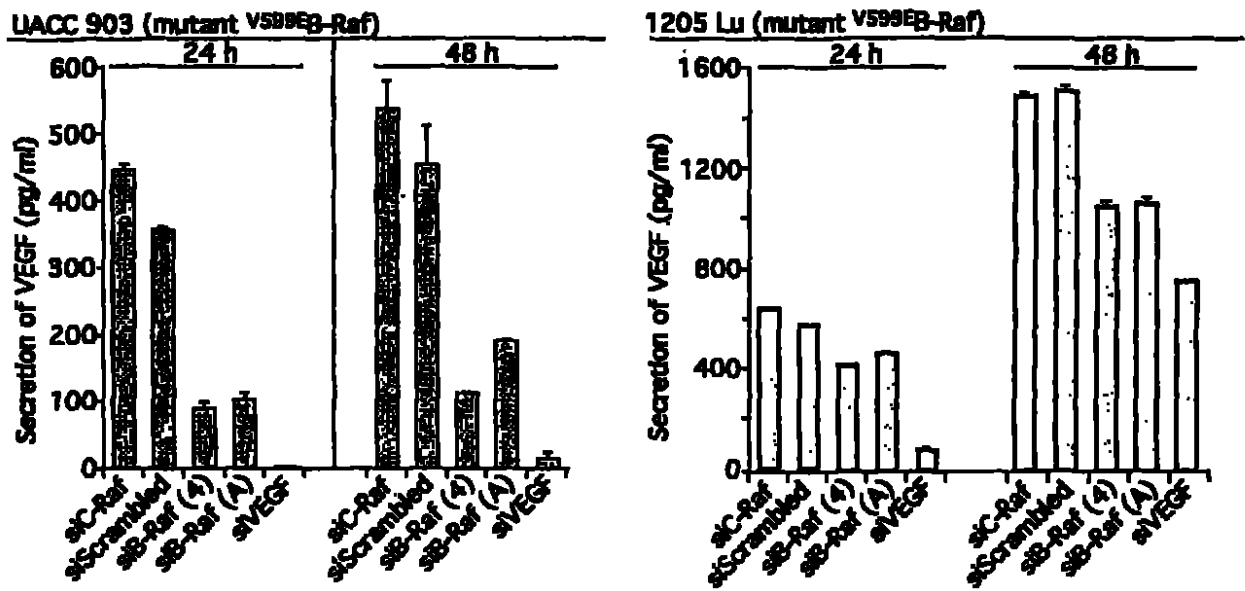
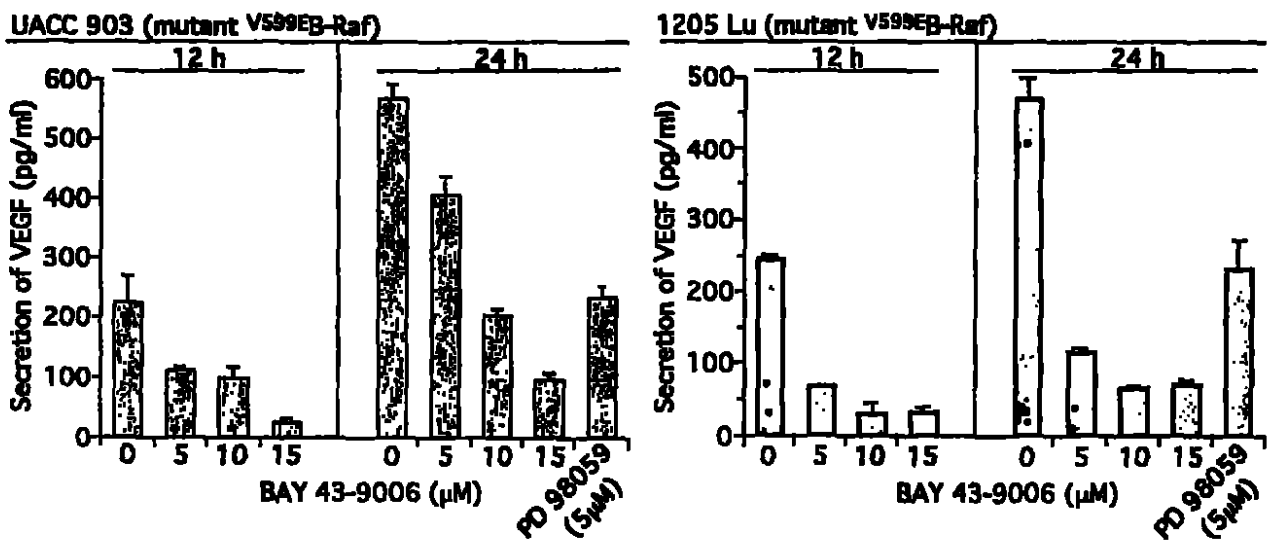


FIGURE 17B



92

FIGURE 17C

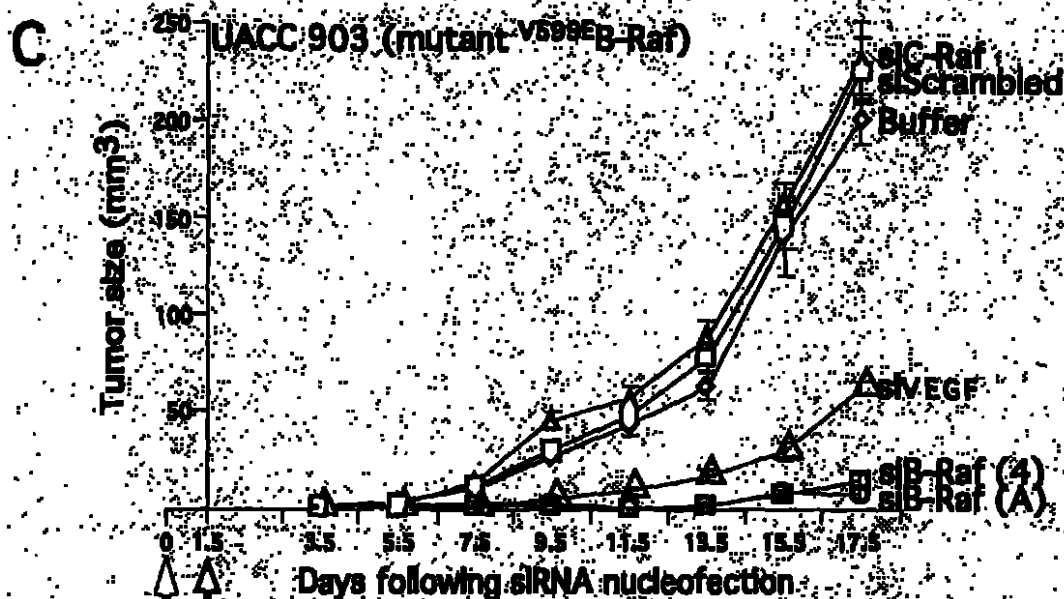
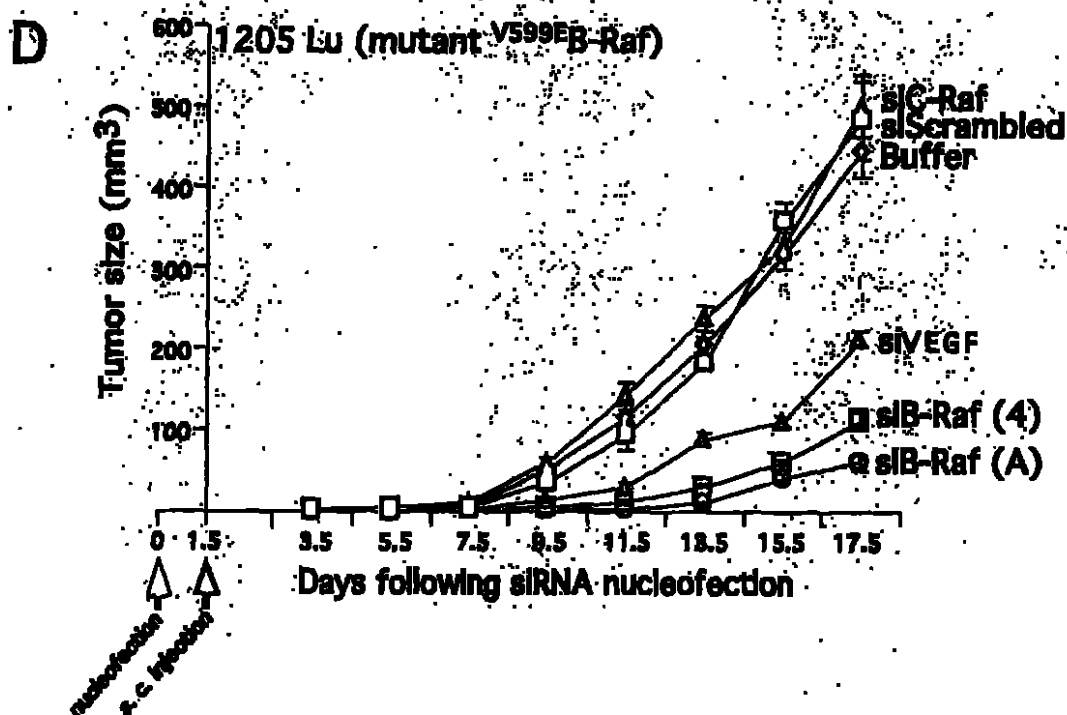


FIGURE 17D



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 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 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 15:2203-2208(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 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 59:749-752(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 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 P13K/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)).

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 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 RNA7:1509; 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 "Dícer"

104
107

segmenta el ARN bicatenario más largo en ARNip; Dícer 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 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 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 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.

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 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. Inactivación mediada por ARNip de Akt3, pero no de Akt2 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 Akt fosforilada, Akt3, 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. D. Akt3 fosforilada se reduce cuando 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* con un anticuerpo que reconoce Akt fosforilada. Los PTEN que expresan estirpes celulares 36A, 29A y 37A se derivaron de la estirpe celular parental UACC 903 que carece de la proteína PTEN. Las dos estirpes celulares revertientes oncogénicas se derivaron de la estirpe celular 36A y ya no expresan PTEN. Un control antígeno negativo se muestra junto con controles positivos y negativos para Akt3 y Akt2. Los controles para Akt3 y Akt2 fueron células HEK298T o LNCaP respectivamente, no tratados (positivos) o tratados con LY-294002 (negativos), un inhibidor de P13K. 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. D. Akt3 se sobreexpresa preferencialmente en melanomas metastásicos de pacientes humanos comparada con melanocitos. Se midió la expresión de Akt3 y Akt2 de melanomas metastásicos derivados de 31 tumores. La expresión de Akt3 y Akt2 se normalizó a la expresión de α -enolasa. El gráfico compara cuantitativamente el nivel de expresión Akt3 o Akt2 en cada tumor versus melanocitos. Las barras representan valores promedio de exploraciones densitométricas de 3 *Western blots* separados; barras, $\pm$ SEM. El valor de arriba representa el múltiplo del aumento en expresión sobre el que ocurre en melanocitos; sólo diferencias de ≥ 2 -veces se calificaron como significativas. E. La expresión y la actividad de Akt3, pero no Akt2, aumenta en tumores de pacientes con melanoma comparadas con melanocitos. La actividad se 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 el mecanismo que subyace a la actividad Akt3 desregulada en melanomas malignos. 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 que la actividad Akt3 incrementada promueve el desarrollo del tumor de melanoma reduciendo las tasas de apoptosis. 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, $\pm$ 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, $\pm$ 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, $\pm$ 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 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 AUCC 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: Izquierda: Micrografía Electrónica de Barrido que muestra un tamaño uniforme de los liposomas. Derecha: 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.

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.

Figura 13 muestra que el desarrollo del tumor de melanoma se inhibió con ^{V599E}B-Raf 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 1206 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 43-9005 inhibe el desarrollo del tumor de melanoma. A, BAY 43-9006 inhibe la actividad V599E-B-Raf natural y mutante. V599E-B-Raf natural marcada HA o mutante se expresaron en células HEK293T expuestas a 5 $\mu\text{mol/L}$ 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 V599E-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 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, $\pm\text{SED}$, 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, $\pm\text{SE}$.

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 ^{V399E}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. 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 ^{V399E}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 ^{V399E}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

le 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.

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 Amaxa 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 tumorigénico 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

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 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 el.

"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 bicatenarios, 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 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 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 afin 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 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. 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.

"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 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 un 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.

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

128 127

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 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

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 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) 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 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. Appl. 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 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

~~133~~ B2

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 un 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) o 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, 19899 Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:10915) 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

174 133

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 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

157
134

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 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.

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 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.

El término "tratar un melanoma" se refiere a prohibir, aliviar, mejorar, detener, restringir, desacelerar o reversar 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.

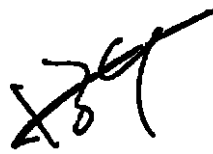
Tal como se emplea aquí, el término "angiogénesis", cuando se emplea aquí en referencia a reducir la vascularización, significa que la cantidad de formación de nuevos vasos sanguíneos, que ocurre en la presencia de un agente, disminuye por debajo de la cantidad de formación de vasos sanguíneos que ocurre 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

Numerosas aplicaciones de la presente invención involucran la clonación, síntesis, mantenimiento, mutagénesis, y otras manipulaciones de



138

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 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, 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

141

141

conocida, por ejemplo, melanoma, éstos pueden emplearse con GeneChip™ como herramienta de diagnóstico en detectar melanoma en una muestra biológica, véase, por ejemplo, Gunthand 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 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

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 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 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', traduciéndose 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, New York).

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

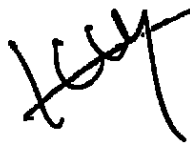
Además de la detección de genes Akt3 y/o B-Raf y la expresión de genes usando tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, pueden detectarse y/o cuantificarse niveles de Akt3 y/o B-Raf detectando o cuantificando el polipéptido. Los polipéptidos Akt3 o B-Raf se detectan y cuantifican por cualquiera 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 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



143

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

450

149

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 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,

150

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 Hinde, 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 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 pTKgptFIS (sitio de clonación EcoRI, PstI, Sall, AclI, 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

151

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 cosmido, 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 modifique y procese el producto genético 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". Mas aun, 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

farmaceuticamente aceptable) o retransplantarse homotopicamente en el sujeto por metodos estandar para la celula o tipo de tejido Se conocen metodos estandar para transplante o infusión de varias células en un sujeto

La transferencia del acido nucleico o vector a celulas puede realizarse mediante una variedad de mecanismos Como un ejemplo, la transferencia puede ser a traves 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), asi como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos estandar en el arte Adicionalmente, el acido nucleico o vector de esta invencion puede transferirse *in vivo* mediante electroporación, cuya tecnologia se puede obtener de Genetronics, Inc (San Diego, Calif) asi como mediante una maquina SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp , Tucson, Ariz)

Como un ejemplo, la transferencia del vector puede ser a traves de un sistema virico, tales como un sistema de vector retrovirico que pueden empacar un genoma recombinante (vease, por ejemplo, 62, 63) El retrovirus recombinante puede usarse luego para infectar y, asi, transferir acidos nucleicos a las células infectadas El metodo exacto de introducir el acido nucleico en celulas mamarias, naturalmente, no se limita al uso de vectores retroviricos Otras tecnicas se encuentran ampliamente disponibles para este procedimiento, incluido el uso de vectores adenoviricos, vectores viricos adeno-asociados (AAV), vectores lentiviricos, vectores retroviricos seudotipificados Pueden emplearse asimismo tecnicas de transduccion fisica, tal como transferencia de liposomas y otros mecanismos de endocitosis y mediados por receptores Esta invencion puede utilizarse en conjuncion con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia de genes usados comunmente

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 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,

150

25, 26, ó 27 de polinucleótidos de ARNip dependiendo de la longitud de la 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 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 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,

159

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 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 de 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 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 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 políA 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).

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	CUUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG
Akt3#4 Codificante	GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA
Akt3#4 No codificante	UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC
Akt3#5 Codificante	AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU
Akt3#5 No codificante	AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU

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.

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' CUAUCUACAUCCGGAAAG 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' CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 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' CUUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 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' AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAU 3', o su complemento. En una 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 silicona, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrímtero, un virus, transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico, electroporación, y microinyección. El uso de un nanoliposoma, un nanoparticulado, un nanodendrímtero para la transferencia de 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.

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 alternativamente, 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 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 (muteínas), por ejemplo, cribando con respecto a la capacidad de inhibir la actividad Akt3. Métodos de elaborar muteínas son bien conocidos por los expertos (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos No. 5,486,463, 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 seudosustrato o un inhibidor competitivo, inhibiendo en esa forma la actividad Akt3. En otra incorporación, el péptido actúa como un seudosustrato 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

122 171

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. 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 doxorrubicina (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, hidroxiurea, 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

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.

178

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 silicona, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrímtero, un virus, transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico, electroporación, y microinyección. El uso de un nanoliposoma, un nanoparticulado, un nanodendrímtero 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, 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 proteoliposoma, 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 nanodendrímtero, un virus, transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico, electroporación, y microinyección. El uso de un nanoliposoma, un nanoparticulado, un nanodendrímtero 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 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.

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.

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.

Dirigir Akt3 junto con ^{V599E} 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.

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

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, 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. Éstas 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 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.

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 inmunoradiométricos, 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, moléculas pequeñas y otros agentes que interactúan con Akt3 o B-Raf, así como vías activadas por Akt3 o B-Raf mediante cualquiera de 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.

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 silicona, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrímico, 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 seudosustrato para Akt3. En 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 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 μ g) con 2 μ g de anticuerpo Akt2 o 5 μ l de Akt3 de un día para otro a 4°C con mezclado constante. Seguidamente se agregaron 15 μ l 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 μ l de glóbulos de sefarosa Gamma Bind G equilibrada se lavaron con 200 μ l de tampón de lisis, luego se incubaron con 2 μ g de anticuerpo Akt2 o 5 μ l de Akt3 en un volumen de 400 μ l a 4°C con mezclado constante durante ≥ 2 horas. Se agregó microcistina (1 μ M) de MPBiomedicals al tampón de lisis para garantizar la completa inactivación de las fosfatasa PP1 y PP2 celulares. El complejo anticuerpo/sefarosa se lavó dos veces con 750 μ l de tampón de lisis, luego se incubó con 100 μ g de proteína en un volumen de 400 μ l durante ≥ 1.5

192

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 MgCl₂, 0.25 µCi/µl-³²P-ATP, y 90 µM de Crosstide de sustrato específico de Akt de Ulpstate 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 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:

raf

p4

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 tiñeron a una intensidad similar a la de pericitos adyacentes a los vasos sanguíneos en la sección del tumor.

²Las células tumorales se tiñeron 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 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

19F 195

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 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 confirma 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 (-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*

197

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 tumorigénico.

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 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 extirpe 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 2C). 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.

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* 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 (Figura 2D). 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 (Figura 2D). 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 $62 \pm 0.02\%$ (SE) de las muestras (Figura 2E). 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 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 3A y Figura 3B 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 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 3C). 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 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. Figura 4A muestra que células 36A que tenían 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 tumorigénico 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, mostrada en Figura 4B, desaceleró significativamente el desarrollo del tumor en comparación con las células nucleofectadas con tampón únicamente, ARNip mezclado o ARNip contra 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 (Figuras 4D, 4F) ($P < 0.05$). 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.

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 tumorigénico 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 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 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 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 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 tumorigénico 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 (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 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*-
GGUCA AUGUGCGAAAUGGAAUGAGC; *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 Lamin A/C de Biomedica 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 ó205 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

211

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, ^{1399F}B-RAF mutante o vector (pcDNA3) usando 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 ^{V599F}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 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 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 5×10^3 células/pocillo en 200 μ l de DMEM suplementado con 10% FBS en múltiples hileras de pocillos en placas de 96 pocillos. Se midió el

24

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 humano (DVE00) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Células UACC 903 o 1205 Lu (5X10⁵) 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, 15uM) 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.

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

24

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 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 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.* 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 hospedero con BAY 43-9006 redujo significativamente el potencial tumorigénico 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

220

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 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 tumorigénico 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 calibres en días alternos, y los resultados se muestran para células UACC 903 en Fig. 4A y células 1205 Lu en Fig. 15B. Aunque todas las concentraciones del compuesto BAY 43-9006 desaceleraron el desarrollo del tumor UACC 903, únicamente concentraciones ≥ 50 mg/kg hicieron que el desarrollo del tumor se nivelara 7 días después del inicio del tratamiento (Fig. 4B). 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 ^{V599L} 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 tumorigénico.

Para confirmar que el compuesto BAY 43-9006 afectaba la actividad de la vía de señalización del ^{V599L} B-Raf mutante en tumores, el porcentaje de células que expresan niveles elevados de Erk fosforilada se registró en

222

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 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 V^{599E} B-Raf mutante *in vivo*. Por consiguiente, estos resultados demuestran que la inhibición farmacológica de V^{599E} 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 V^{599E} 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. 5A) (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;

223

$P=0.61$) 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 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 ^{V599E}-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 ^{V599E}B-RAF. Inicialmente, células UACC 903 y 1205 Lu, en las cuales se inhibió la expresión de ^{V599E}B-Raf usando ARNip, se examinaron y revelaron una reducción significativa en la secreción de VEGF, comparada con controles (Fig. 17A). Seguidamente, los efectos de

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.

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 Crosstide 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 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.
- 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).
- 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 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.

- 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).
- 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, Kannengiesser 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).
- 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.

234

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, Tsirulnikov 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).

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. hi 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.
- 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 adenocarcinoma, *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).
- 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).
- 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., Wachter, 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;121:1 160-2.

238

Lo que se reivindica es:

1. Un método para inducir apoptosis en una célula tumoral de melanoma, que comprende:

reducir la actividad Akt3.

2. El método de la reivindicación 1 en donde dicha reducción se realiza contactando una célula tumoral de melanoma con un agente que reduce la actividad Akt3.

3. El método de la reivindicación 2 en donde el agente se selecciona de un grupo conformado por una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña.

4. El método de la reivindicación 3 en donde el agente es una molécula de ARNip que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que tiene una secuencia de

5'GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3',

5'CUAUCUACAUCCGGAAAG 3',

5'GAAUUUACAGCUCAGACUA 3',

5'CAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'CUUGGACUAUCUACAUCCGGAAAG 3',

5'CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3',

5'GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3',

5'UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3',

5'AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', y sus complementos.

5. El método de la reivindicación 2 en donde dicha acción de contactar dicha célula tumoral de melanoma incluye el uso de: un liposoma, un nanoliposoma, un nanoliposoma que contenga ceramidas, un

239 239

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.

6. El método de la reivindicación 3 en donde dicho agente es un péptido que actúa como un seudosustrato para Akt3.

7. El método de la reivindicación 6 en donde dicho péptido actúa como un seudosustrato para un dominio catalítico o un dominio regulador de Akt3.

8. El método de la reivindicación 3 en donde dicho agente es un péptido que actúa como un inhibidor competitivo para Akt3.

9. El método de la reivindicación 8 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio catalítico de Akt3.

10. El método de la reivindicación 8 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio de homología pleckstrin de Akt3.

11. El método de la reivindicación 8 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio regulador de Akt3.

12. El método de la reivindicación 1 en donde el método comprende además: administrar un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo conformado por agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, productos vegetales naturales o derivados, hormonas y esteroides, y fármacos de platino.

240

240

13. El método de la reivindicación 12 en donde el agente quimioterapéutico es dacarbazina.

14. El método de la reivindicación 1 en donde el método comprende además administrar irradiación.

15. 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.

16. El método de la reivindicación 15 en donde dicho agente que induce apoptosis es un agente que reduce la actividad Akt3.

17. El método de la reivindicación 15 en donde dicho agente que reduce angiogénesis y proliferación celular es un agente que reduce la actividad de V599E B-Raf, tratando así un tumor de melanoma.

18. El método de la reivindicación 16 en donde dicho agente que reduce la actividad Akt3 se selecciona del grupo conformado por una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña.

19. El método de la reivindicación 18 en donde dicho agente que reduce la actividad Akt3 es una molécula de ARNip que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que tiene una secuencia de

5'GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3',

5'CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',

5'GAAUUUACAGCUCAGACUA 3',

5'CAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',

5'CUUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3',
5'GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3',
5'UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3',
5'AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3',
5'AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', y sus complementos.

20. El método de la reivindicación 16 en donde el agente que reduce la actividad Akt3 se introduce en dicho tumor de melanoma mediante el uso de: 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.

21. El método de la reivindicación 18 en donde dicho agente es un péptido que actúa como un pseudosustrato para Akt3.

22. El método de la reivindicación 21 en donde dicho péptido actúa como un pseudosustrato para un dominio catalítico o un dominio regulador de Akt3.

23. El método de la reivindicación 18 en donde dicho agente es un péptido que actúa como un inhibidor competitivo para Akt3.

24. El método de la reivindicación 23 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio catalítico de Akt3.

25. El método de la reivindicación 23 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio de homología pleckstrin de Akt3.

26. El método de la reivindicación 23 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio regulador de Akt3.
27. El método de la reivindicación 15 en donde el método comprende además administrar un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo conformado por agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, productos vegetales naturales o derivados, hormonas y esteroides, y fármacos de platino.
28. El método de la reivindicación 15 en donde el método comprende además administrar irradiación.
29. El método de la reivindicación 17 en donde el agente que reduce la actividad de V599E B-Raf se selecciona del grupo conformado por una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña.
30. El método de la reivindicación 17 en donde el agente que reduce la actividad de V599E B-Raf se introduce en dicho tumor de melanoma mediante el uso de: 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 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.
31. El método de la reivindicación 29 en donde la molécula de ARNip que reduce la actividad de V599E B-Raf comprende: un polinucleótido que tiene una secuencia de
5'GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3'.

32. El método de la reivindicación 29 en donde la molécula de ARNip que reduce la actividad de B-Raf comprende: un polinucleótido que tiene una secuencia de

5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3'

33. El método de la reivindicación 29 en donde el agente que reduce la actividad de V599E B-Raf es un inhibidor de B-Raf.

34. El método de la reivindicación 33 en donde el inhibidor de B-Raf es BAY 43-9006.

35. El método de la reivindicación 15, en donde dicho tratamiento comprende: administrar, concurrente o secuencialmente, una cantidad efectiva de un agente que reduce la actividad Akt3 y un agente que reduce la actividad de V599E B-Raf.

36. Una composición farmacéutica para tratar un tumor de melanoma que comprende: un agente que reduce la actividad Akt3; y un vehículo.

37. La composición farmacéutica de la reivindicación 36 en donde dicho vehículo se selecciona de un grupo conformado por: 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 silicona, un particulado nanocristalino, un nanoparticulado semiconductor, poli(D-arginina), un nanodendrímico, un virus, transferencia de nucleótido mediado por nucleótido de fosfato cálcico.

38. La composición farmacéutica de la reivindicación 36 en donde dicho agente se selecciona del grupo conformado por: una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña.

39. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5'GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', o sus complementos.

40. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende:

5' CUAUCUACAUAUCCGGAAAG 3', o sus complementos.

41. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido 5'GAAUUUACAGCUCAGACUA 3', o su complemento.

42. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: el polinucleótido 5' CAGCUCAGACUAUUACAAU 3', o su complemento.

43. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' CUUGGACUAUCUACAUAUCCGGAAAG 3', o su complemento.

44. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' CUUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3', o su complemento.

45. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3', o su complemento.

46. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' UAGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3', o su complemento.

47. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3', o su complemento.

48. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', o su complemento.

49. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', o su complemento.

53. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicho agente es un péptido que actúa como un seudosustrato para Akt3.

54. La composición farmacéutica de la reivindicación 53 en donde dicho péptido actúa como un seudosustrato para un dominio catalítico o un dominio regulador de Akt3.

55. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 en donde dicho agente es un péptido que actúa como un inhibidor competitivo para Akt3.

56. La composición farmacéutica de la reivindicación 55 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio catalítico de Akt3.

57. La composición farmacéutica de la reivindicación 55 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio de homología pleckstrin de Akt3.

58. La composición farmacéutica de la reivindicación 55 en donde dicho péptido actúa como un inhibidor competitivo para un dominio regulador de Akt3.

59. La composición farmacéutica de la reivindicación 36 en donde dicha composición comprende además un agente que reduce la actividad de B-Raf.

60. La composición farmacéutica de la reivindicación 60 en donde dicho agente se selecciona del grupo conformado por: una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña.

61. La composición farmacéutica de la reivindicación 60 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3', o su complemento.

62. La composición farmacéutica de la reivindicación 60 en donde dicha molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) comprende: un polinucleótido

5' GGACAAAGAAUUGGAUCUGGAUCAU 3', o su complemento.

1730 ~~247~~

247

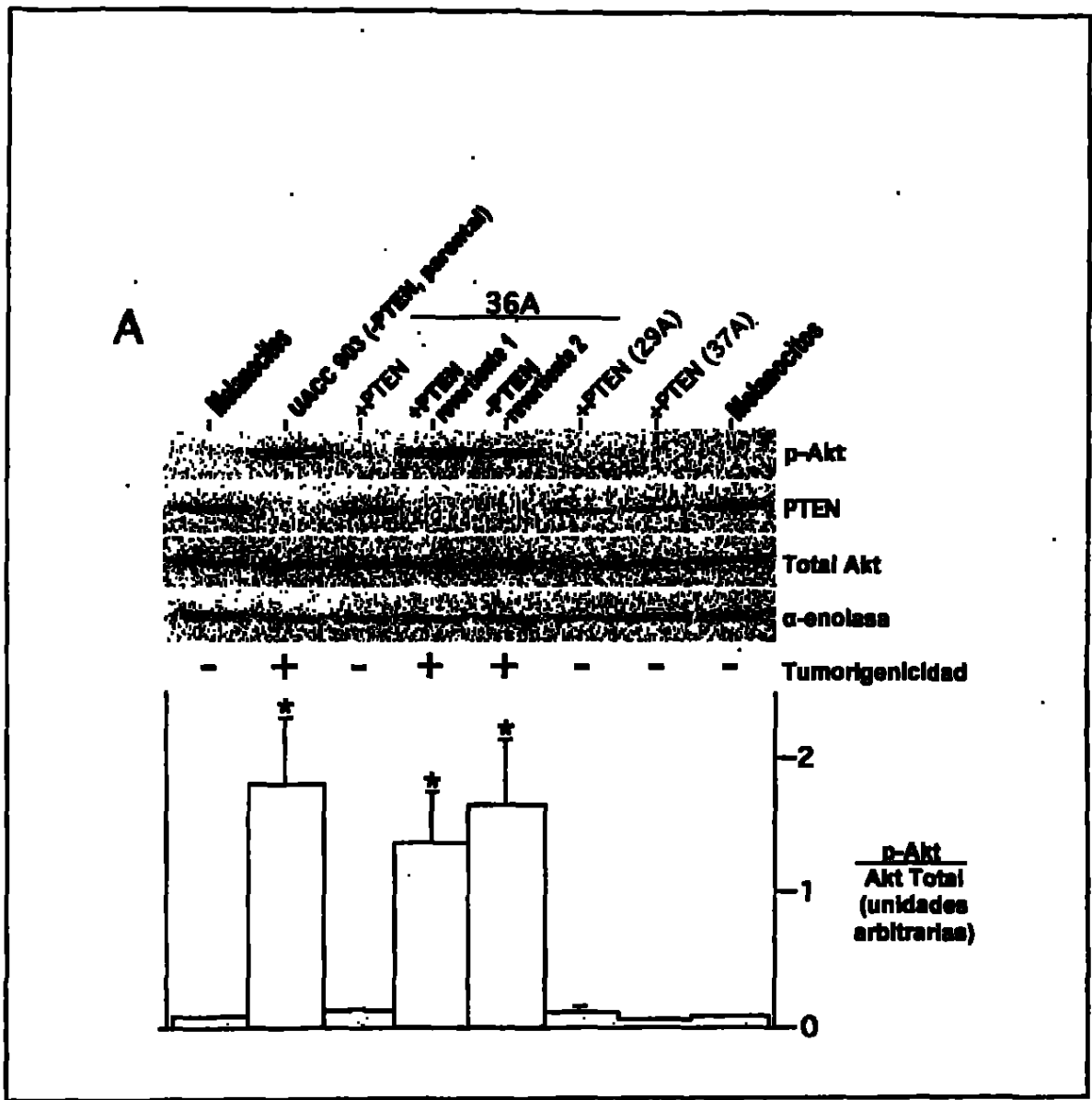


FIGURA 1A

248

248

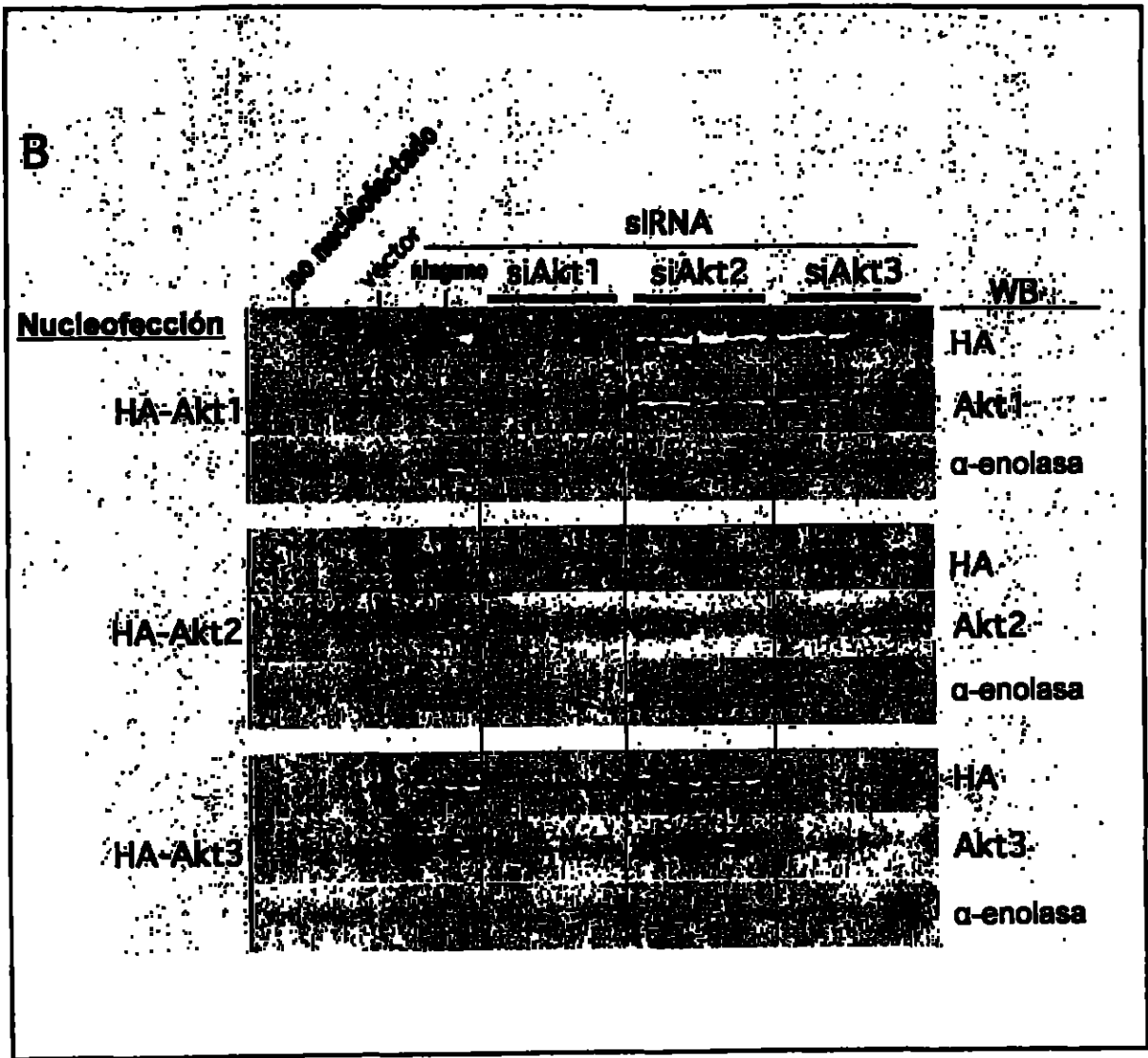


FIGURA 1B

244

249

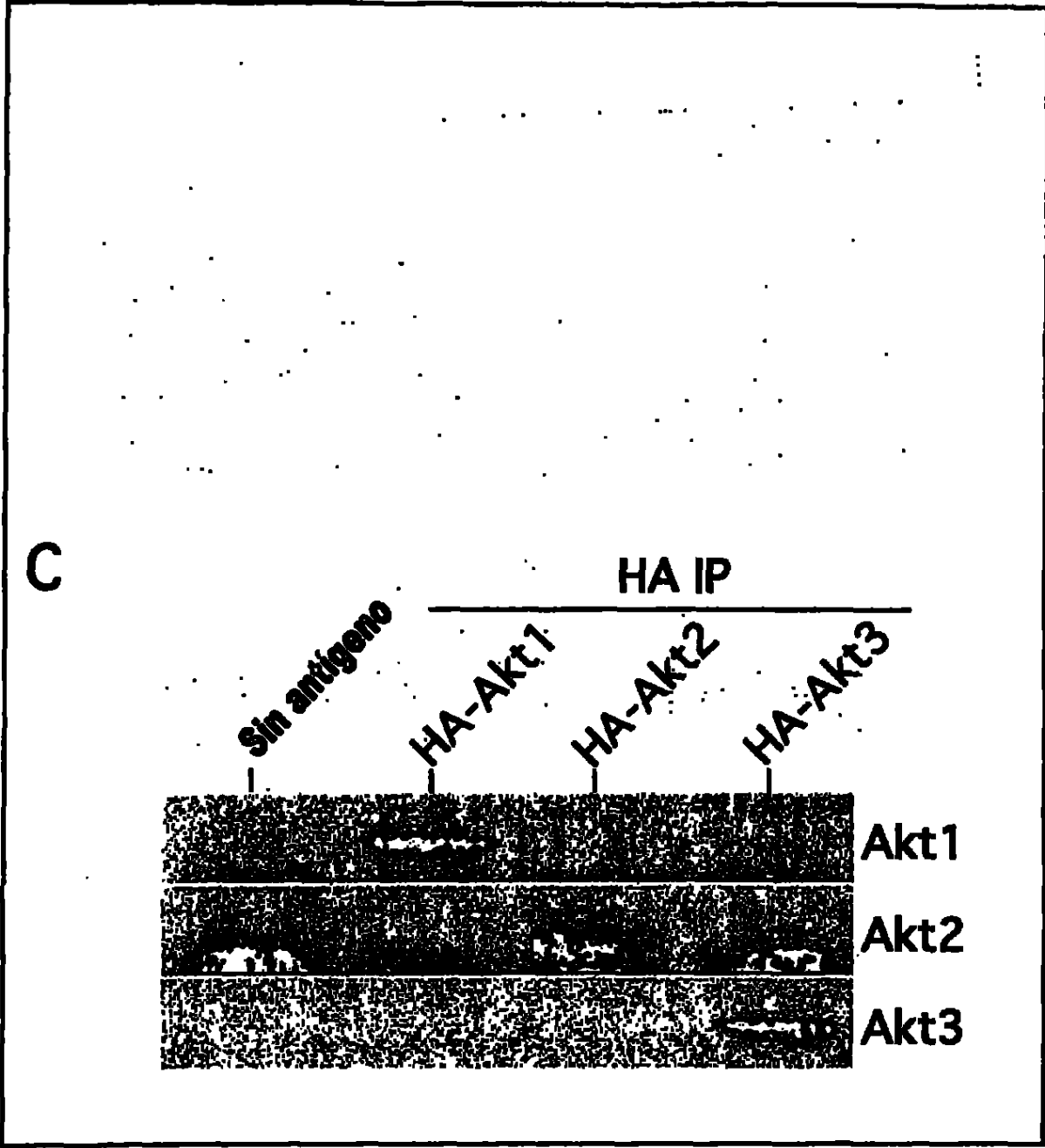


FIGURA 1C

Handwritten signature/initials

Handwritten number 250

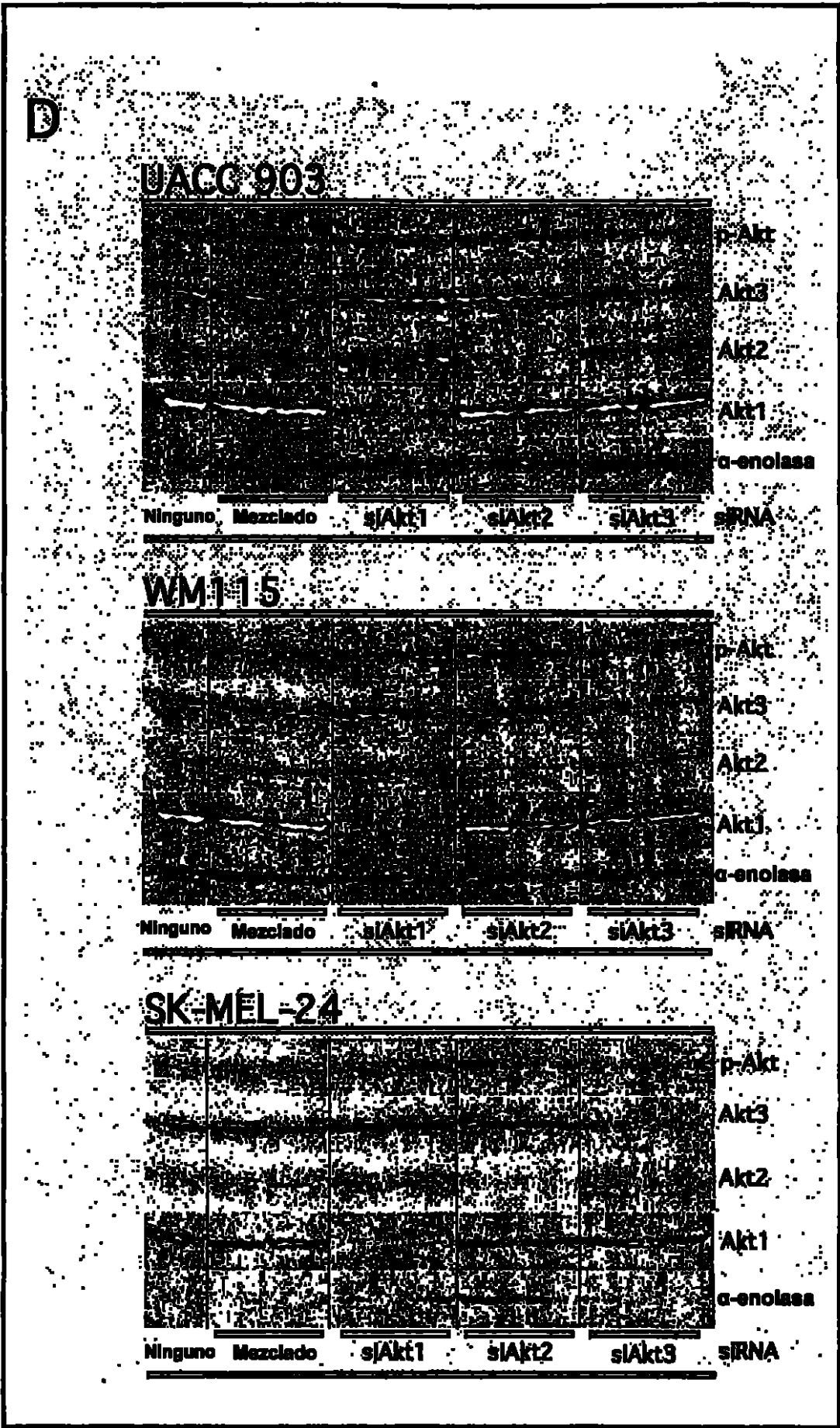


FIGURA 1D

251

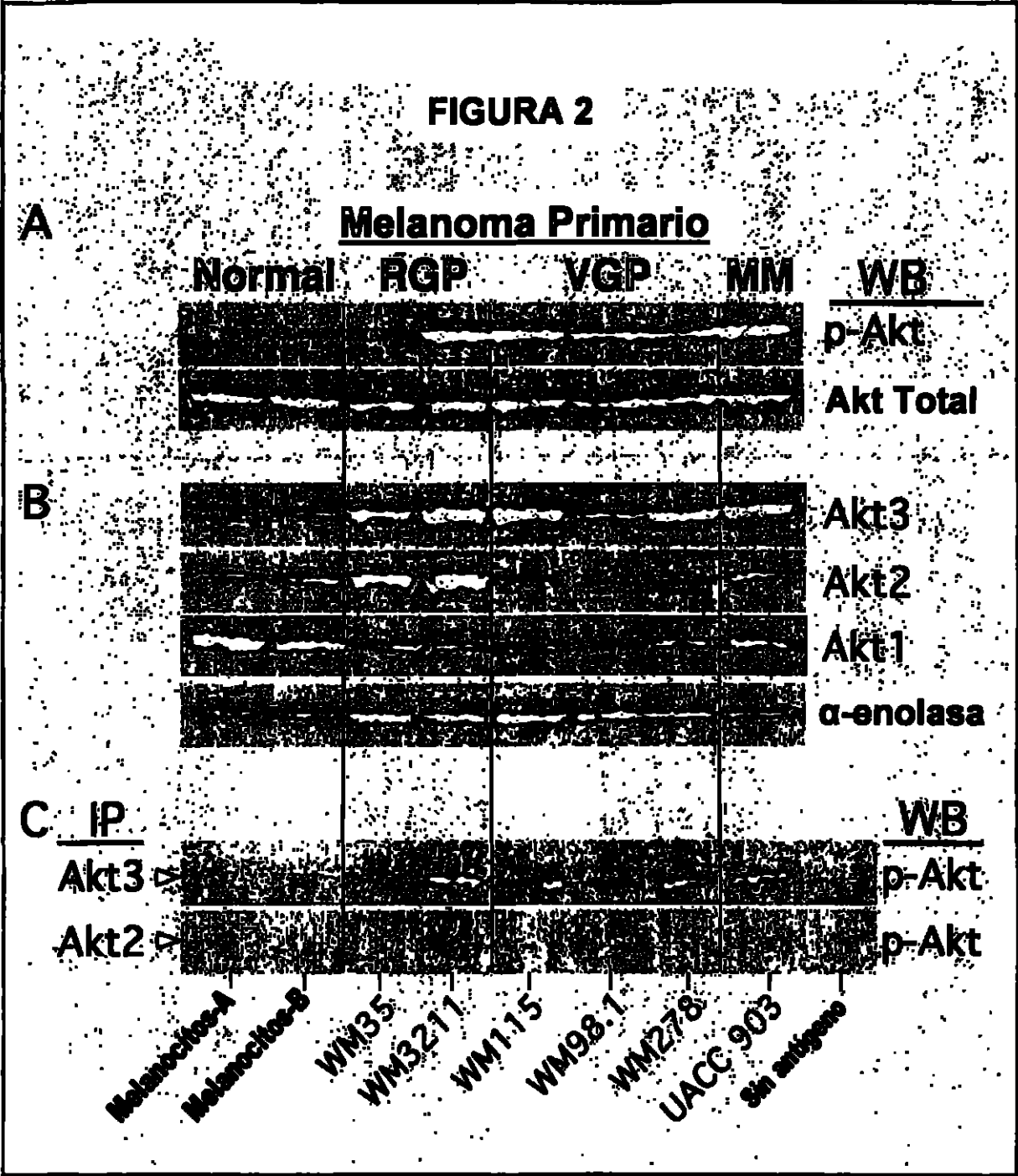


FIGURA 2

[Handwritten signature] *252*

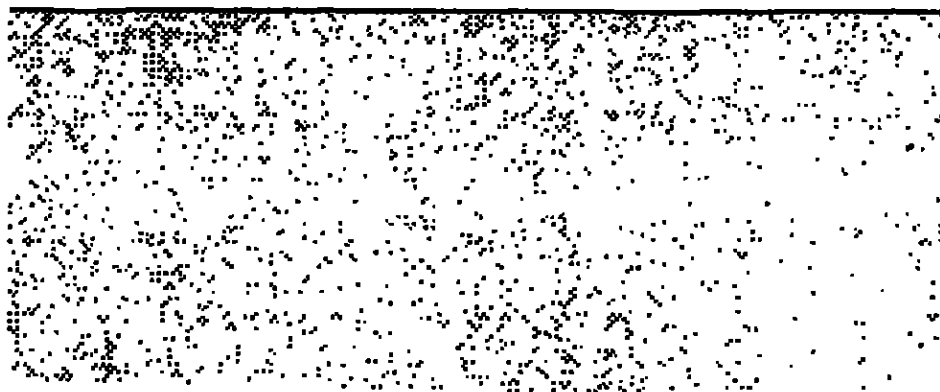


FIGURA 3A

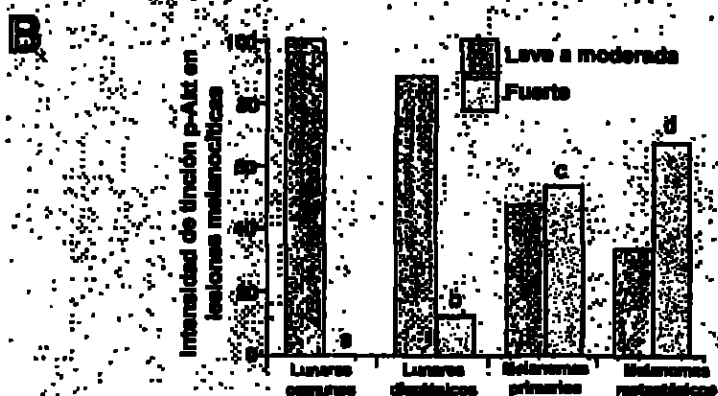
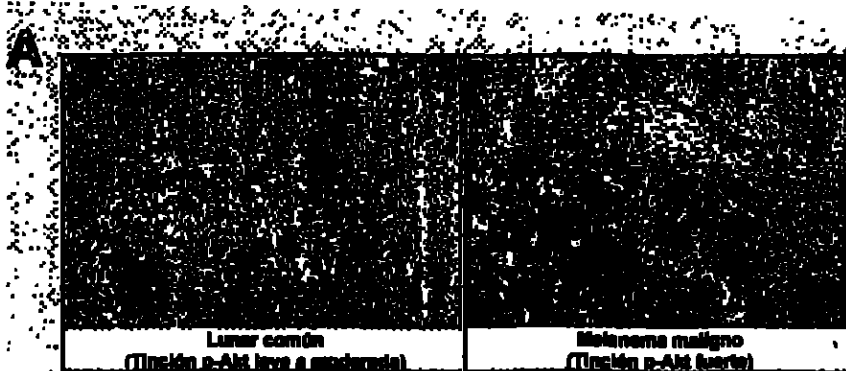


FIGURA 3B

157

253

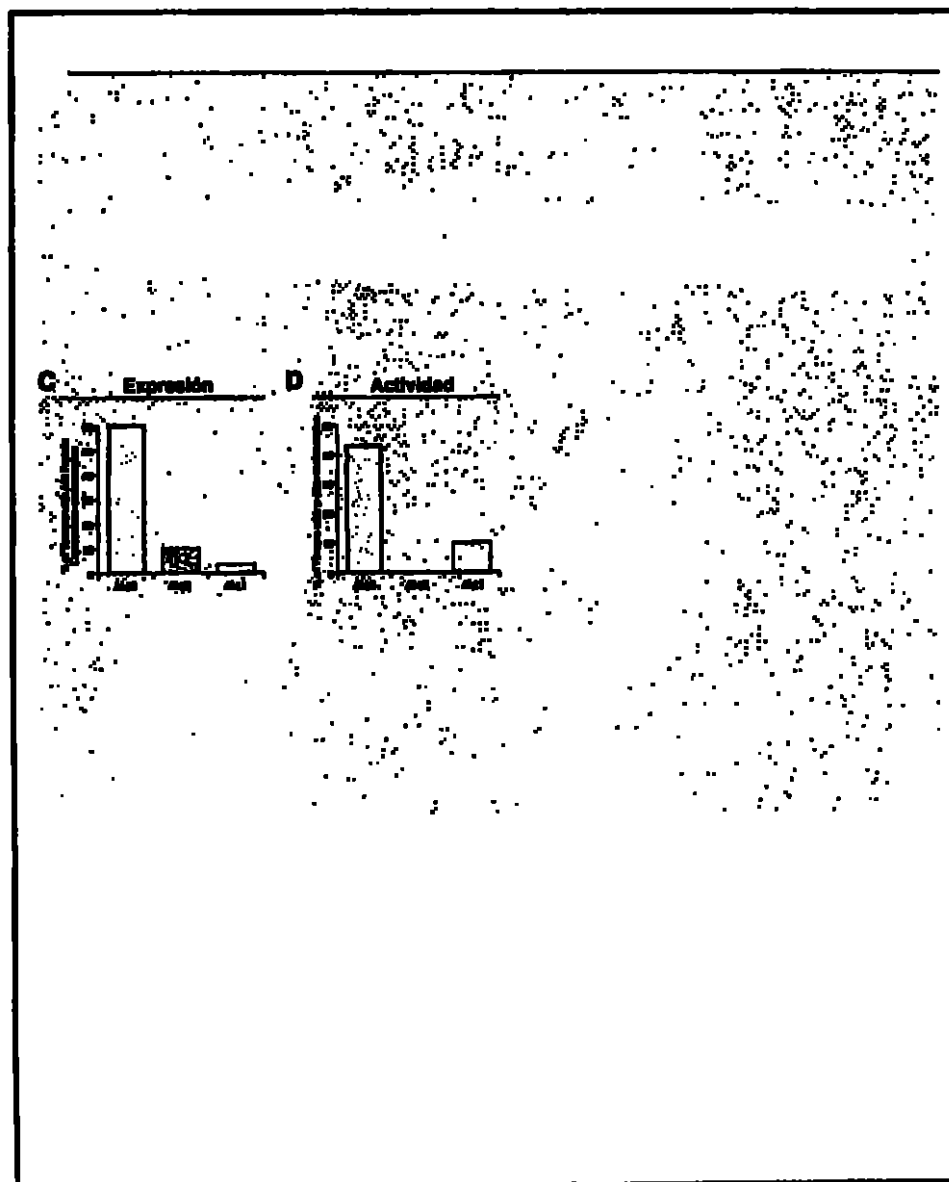


FIGURA 3C y 3D

254

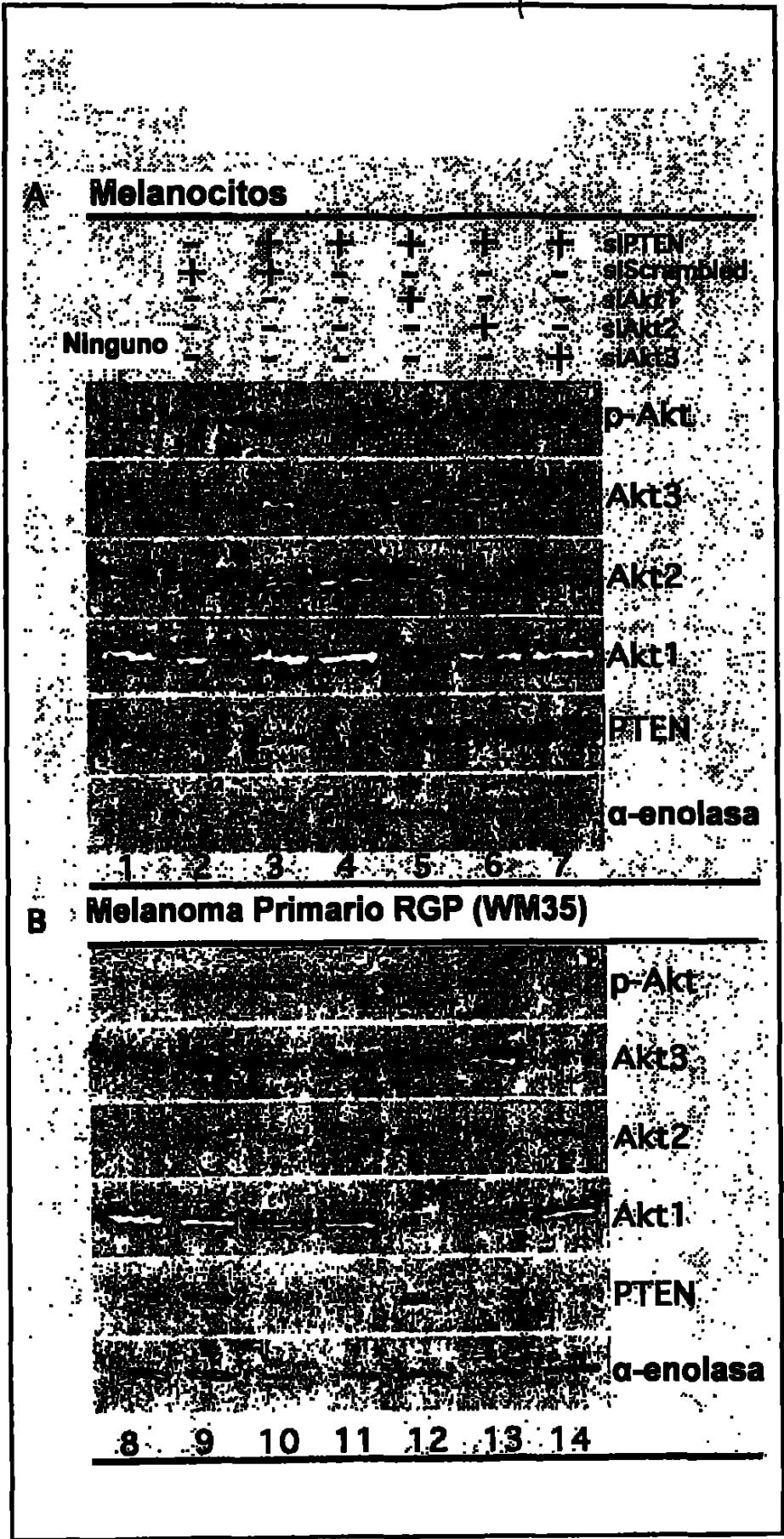


FIGURA 4A y FIGURA 4B

257

255

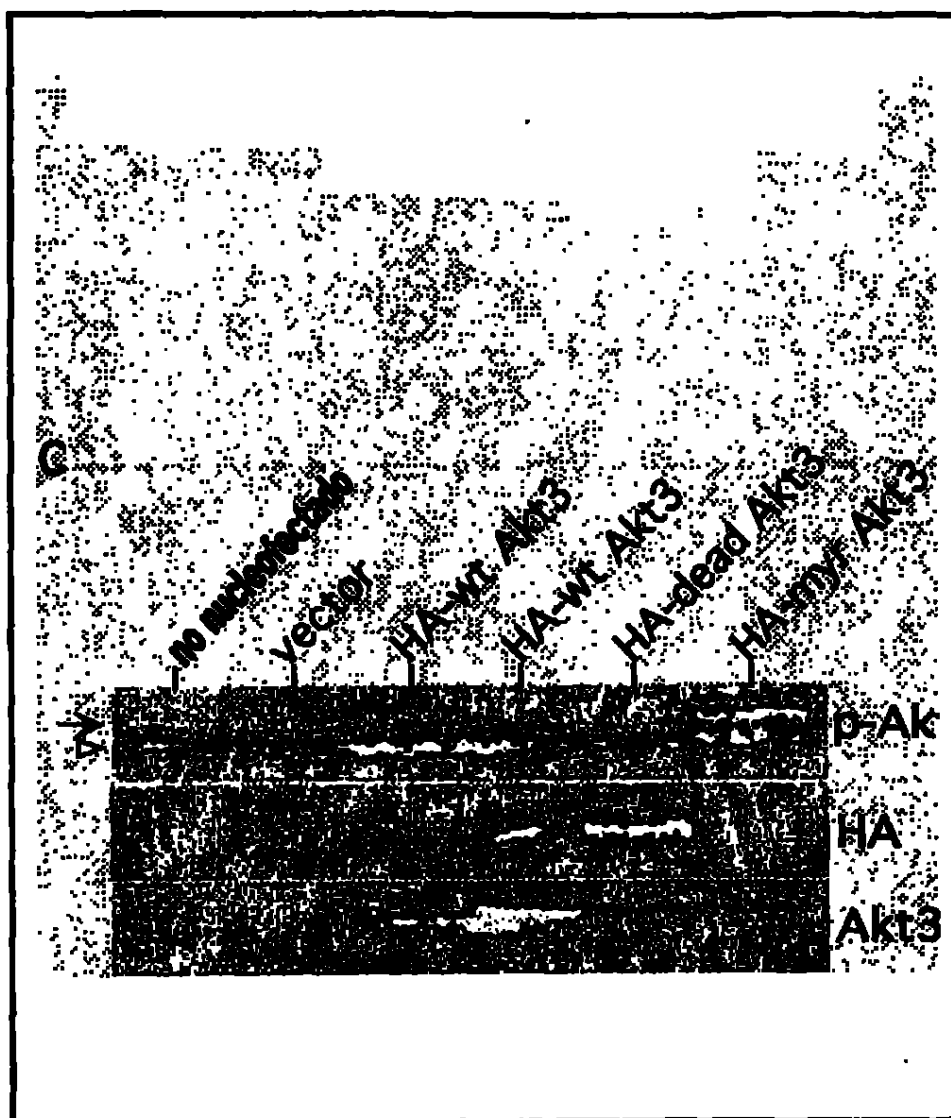


FIGURA 4C

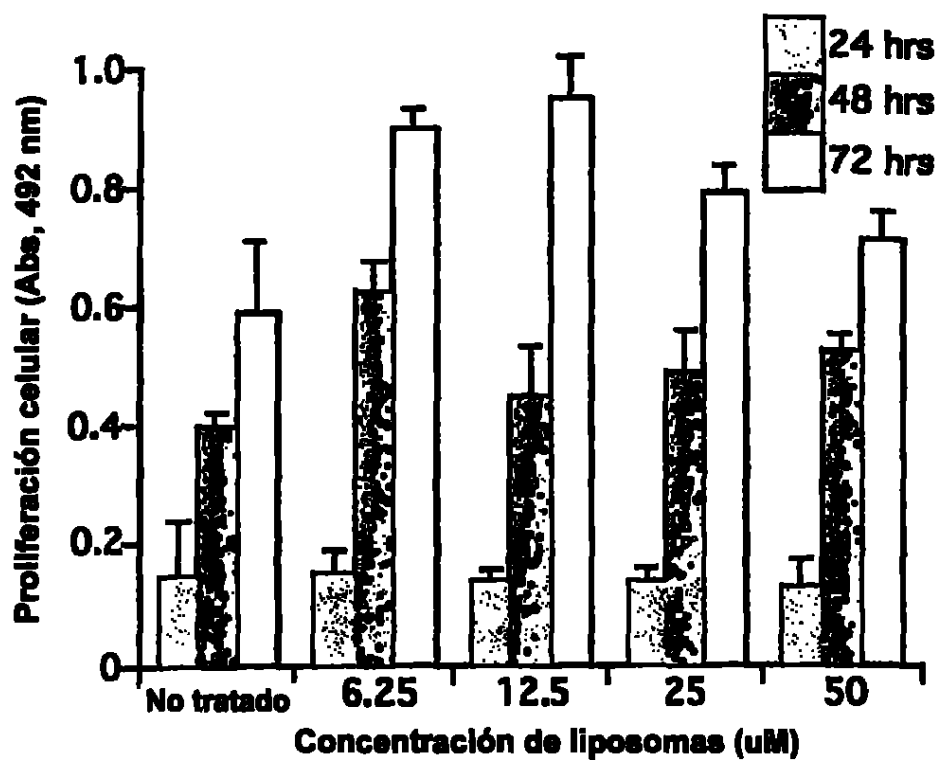


FIGURA 5

~~22~~ 257

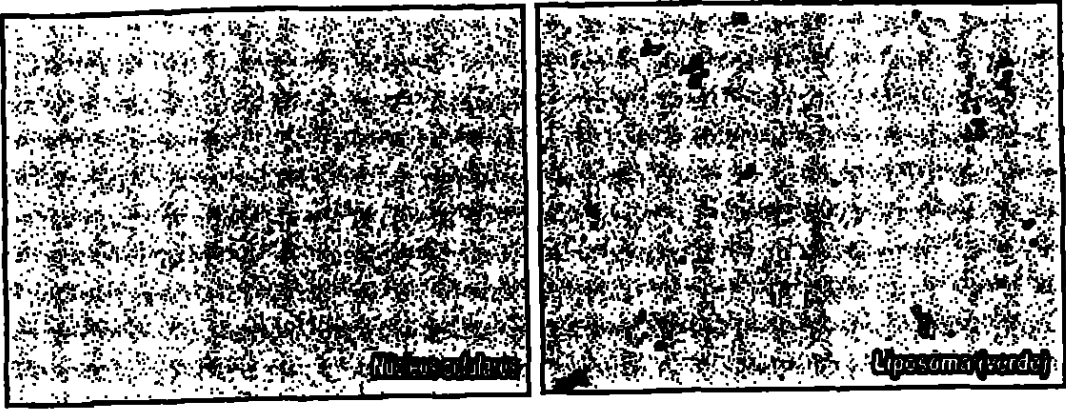


FIGURA 6

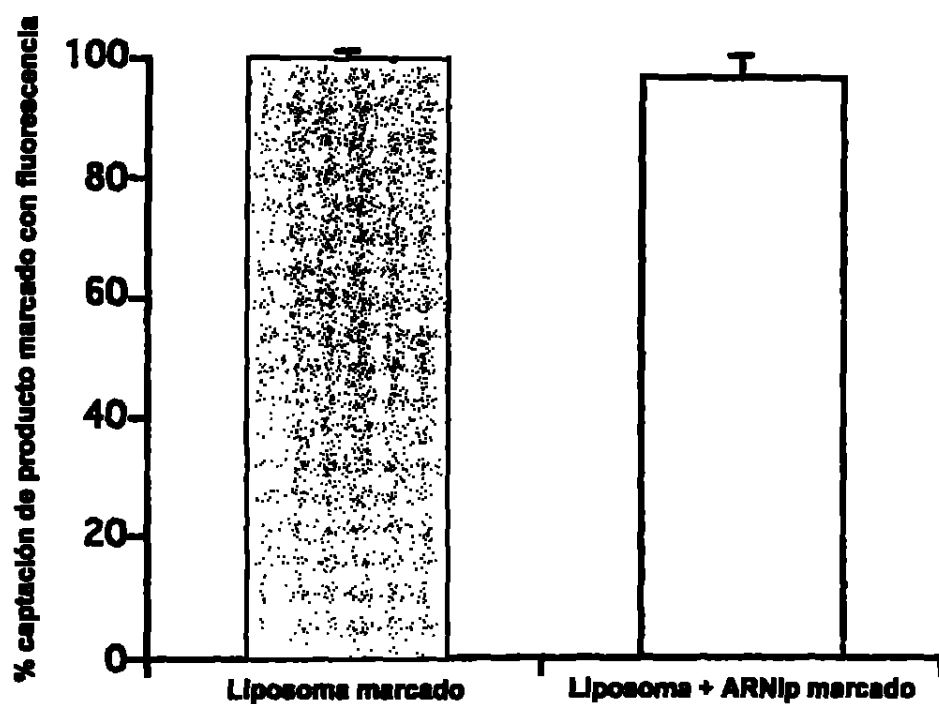
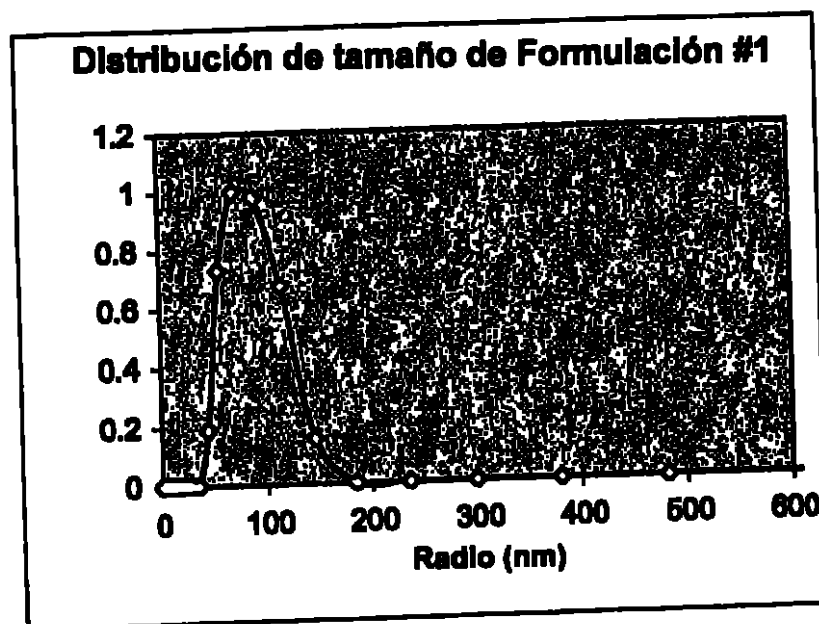
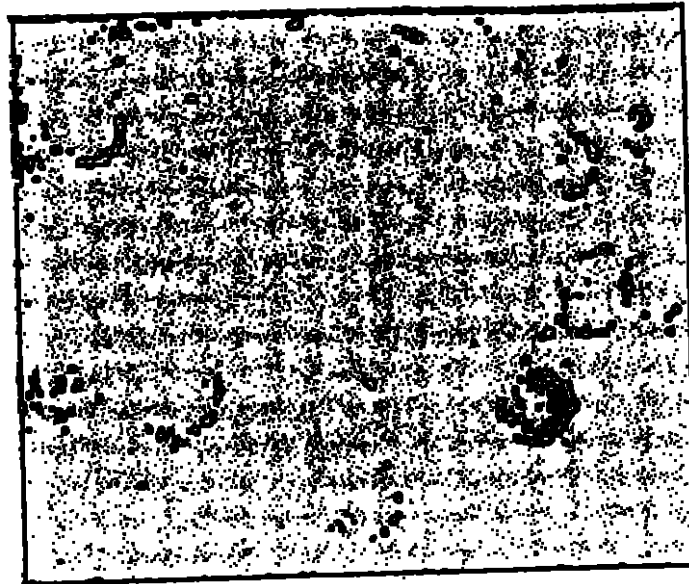


FIGURA 7

254

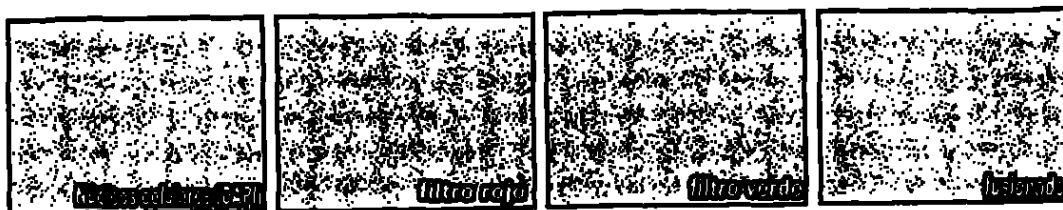
259

FIGURA 8



260

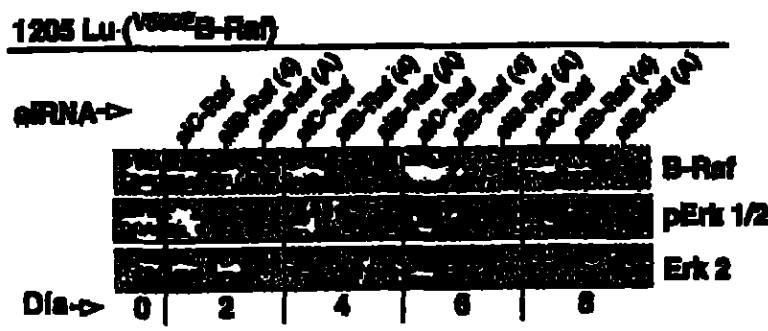
FIGURA 9

Liposoma fantasma (sin ARNip) – control**Liposoma con ARNip marcado con rojo y verde (20nM)**

261

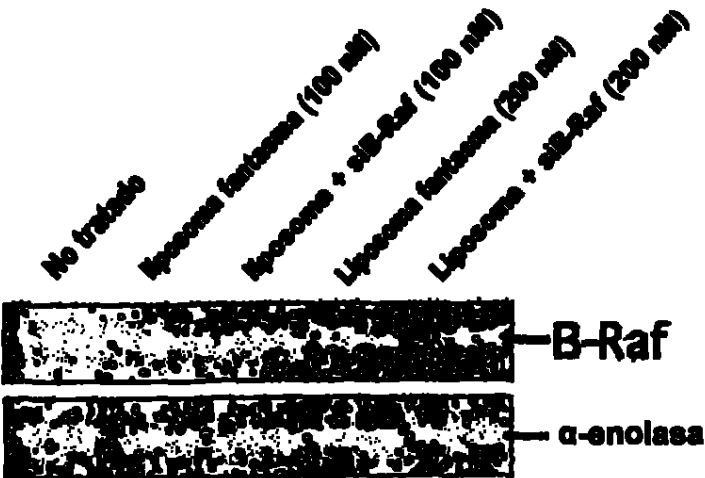
[Handwritten signature]

Figura 10



262

Figura 11



Handwritten signatures and marks:
267
263

UACC 903 (V899E B-Raf mutante)

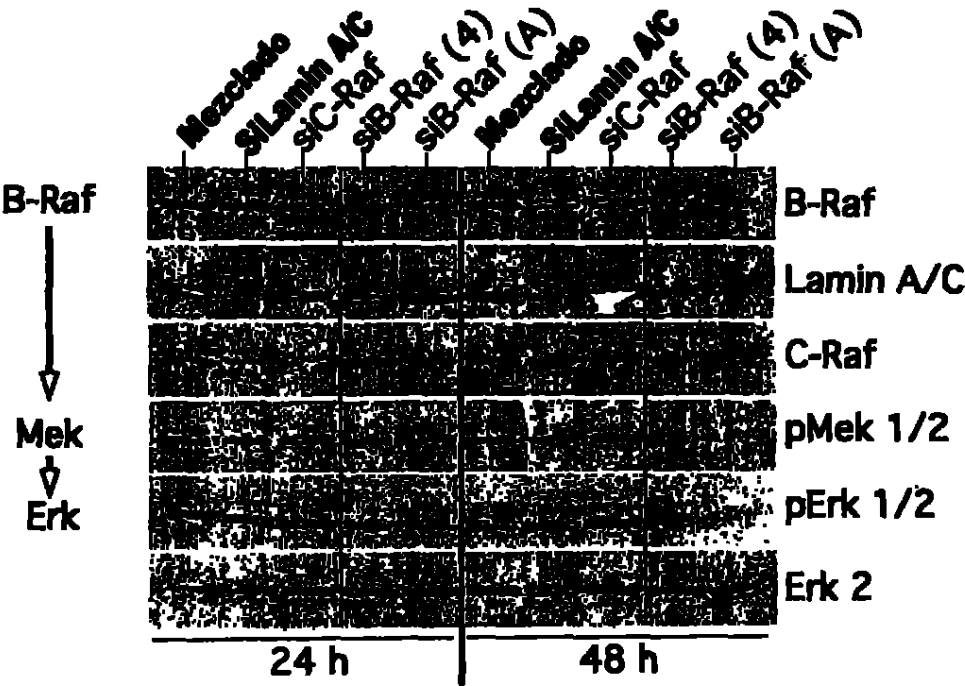


FIGURA 12A

B 1205 Lu (^{V589E}B-Raf mutante)

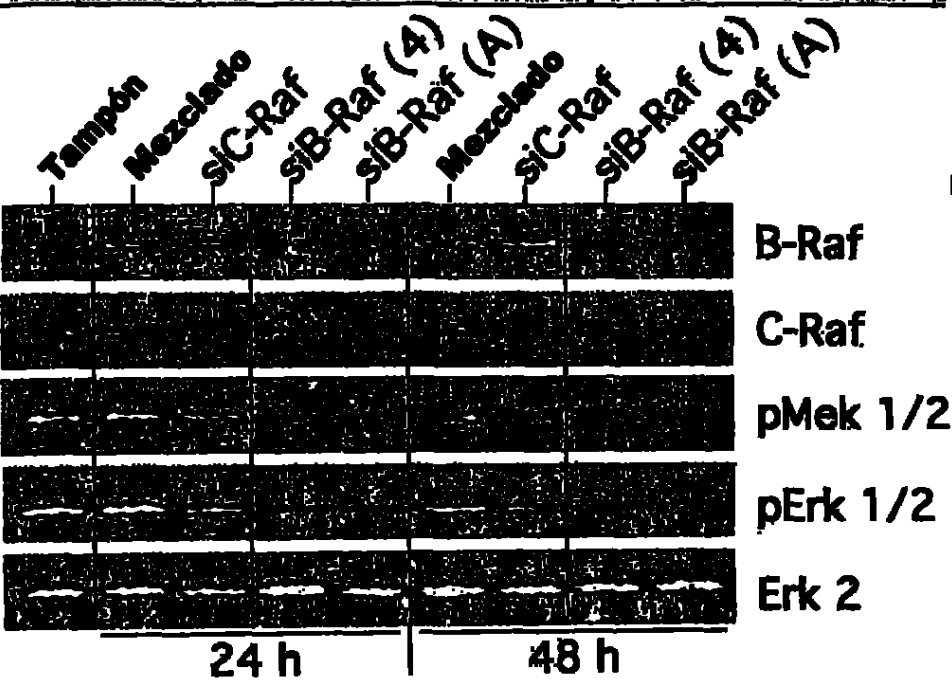


FIGURA 12B

C C8161

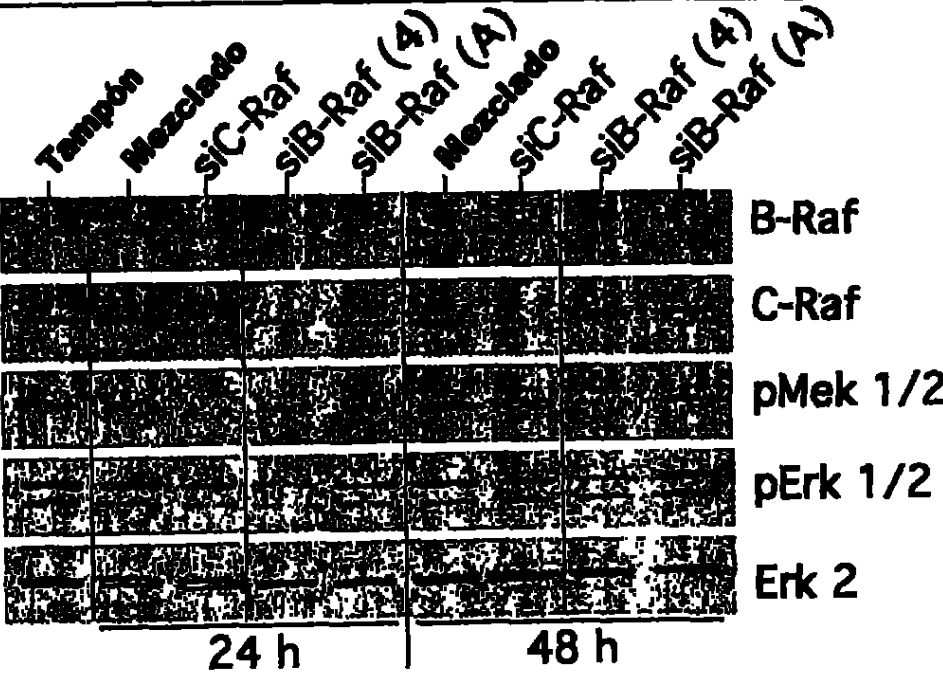


FIGURA 12C

[Handwritten signature] 265

A UACC 903 (V599E B-Raf)



FIGURA 13A

B 1205 Lu (V599E B-Raf)

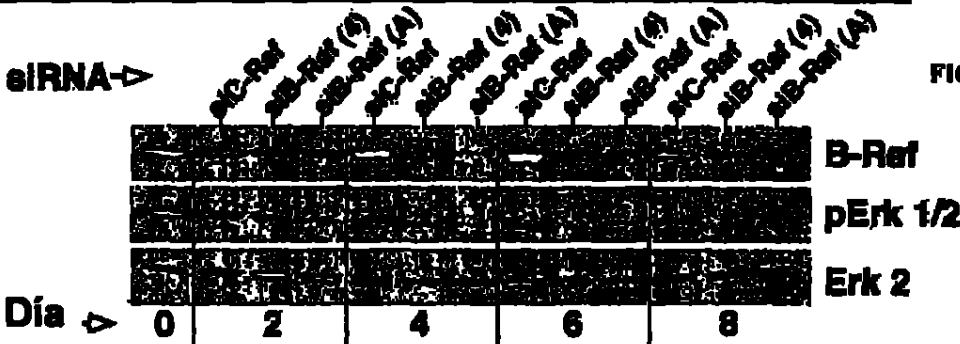


FIGURA 13B

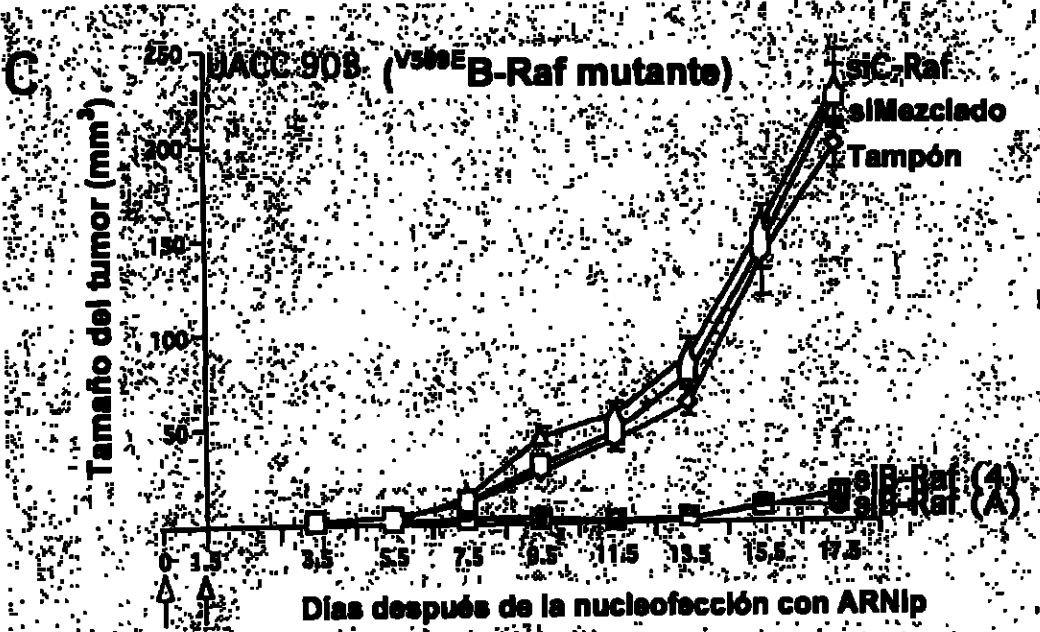


FIGURA 13C

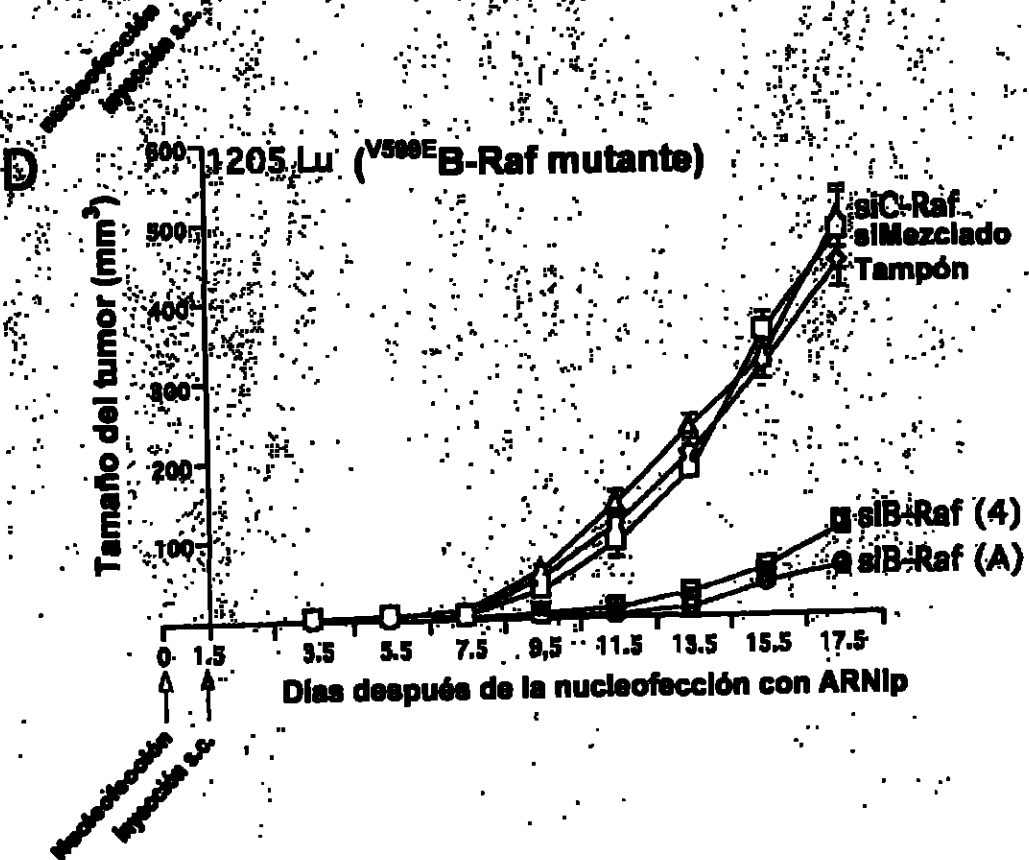


FIGURA 13D

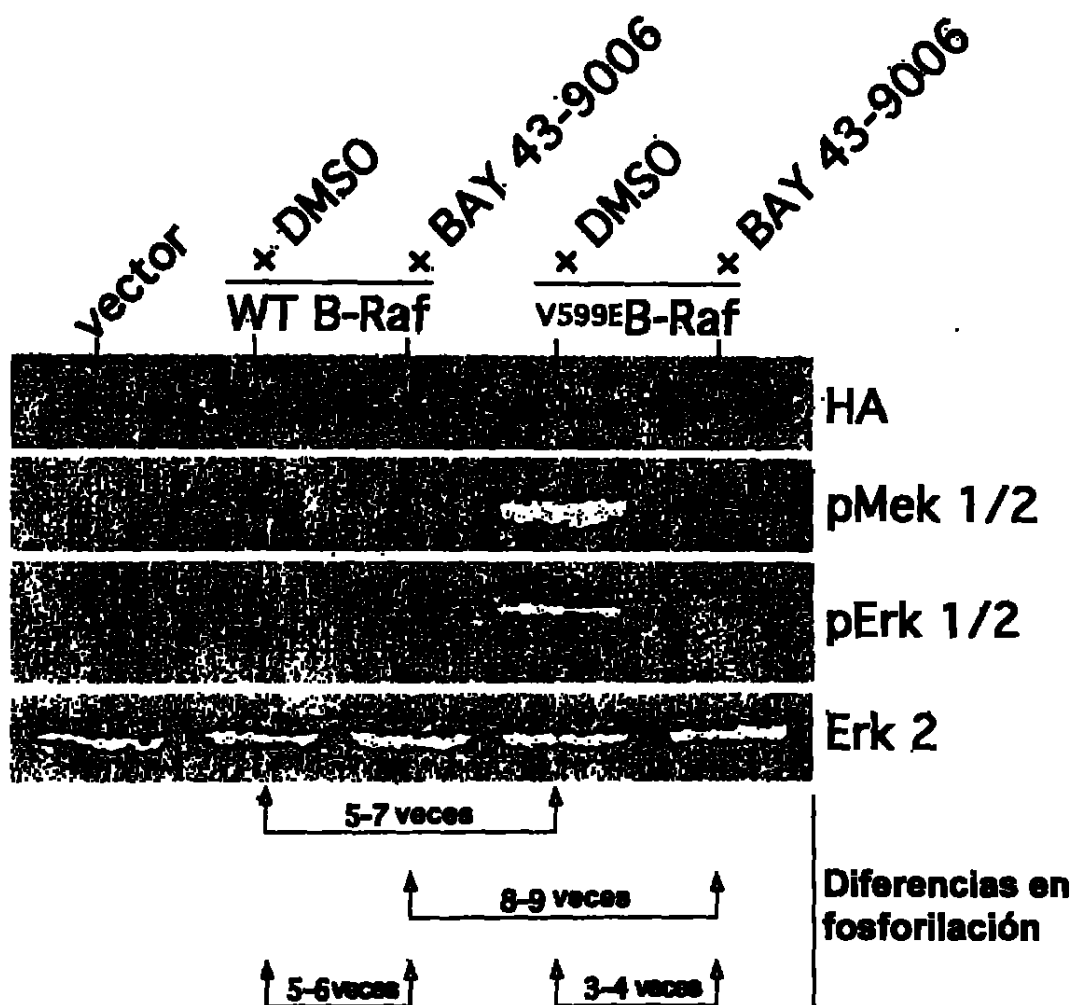


FIGURA 14A

268

268

B

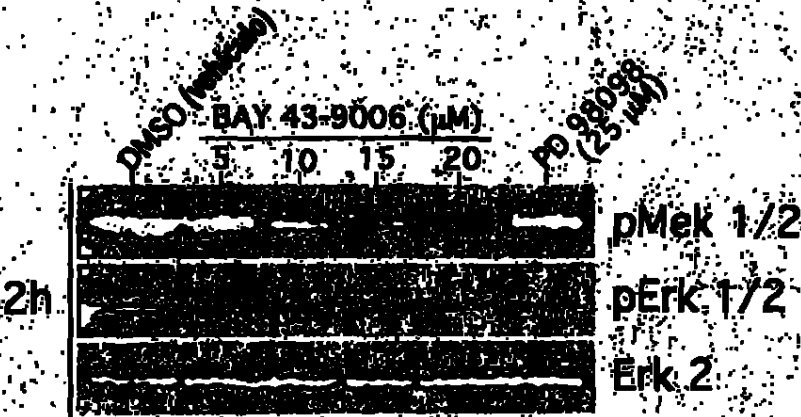


FIGURA 14B

C

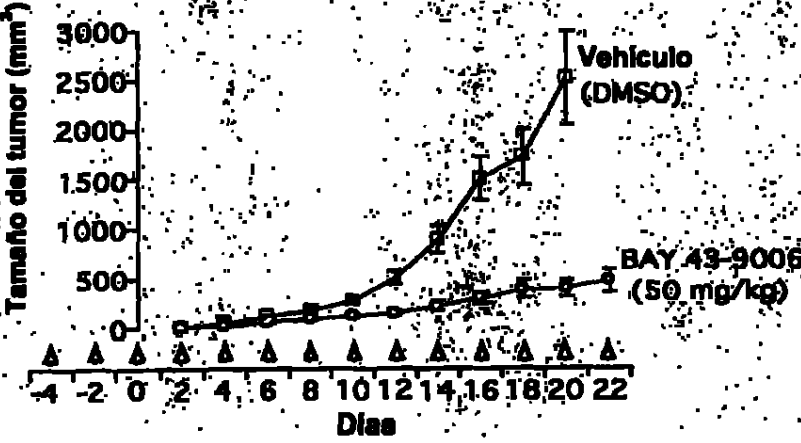


FIGURA 14C

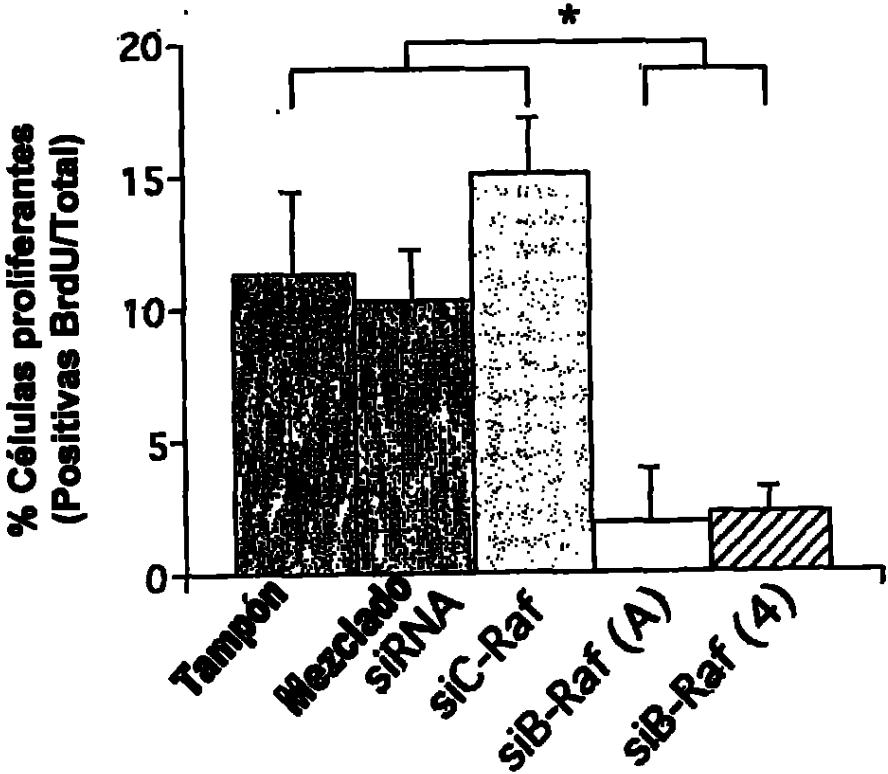
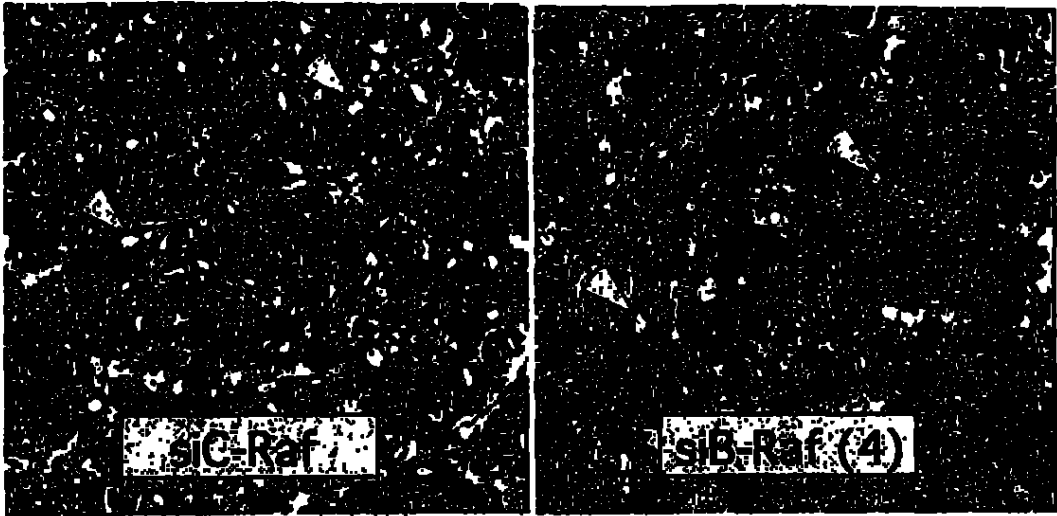


FIGURA 14D

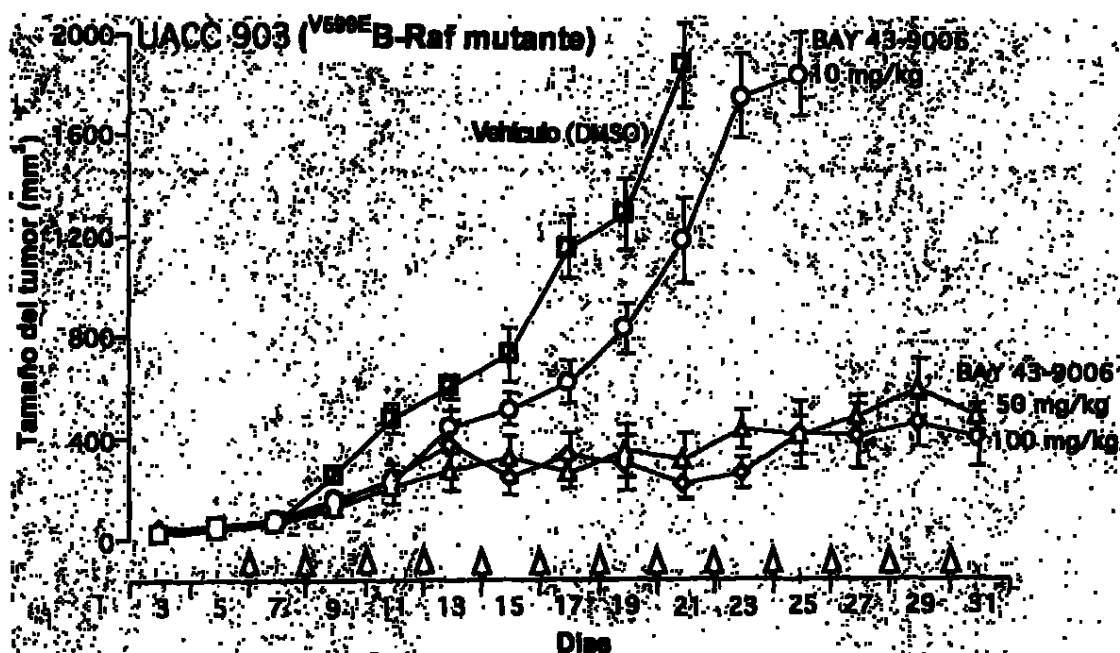


FIGURA 15A

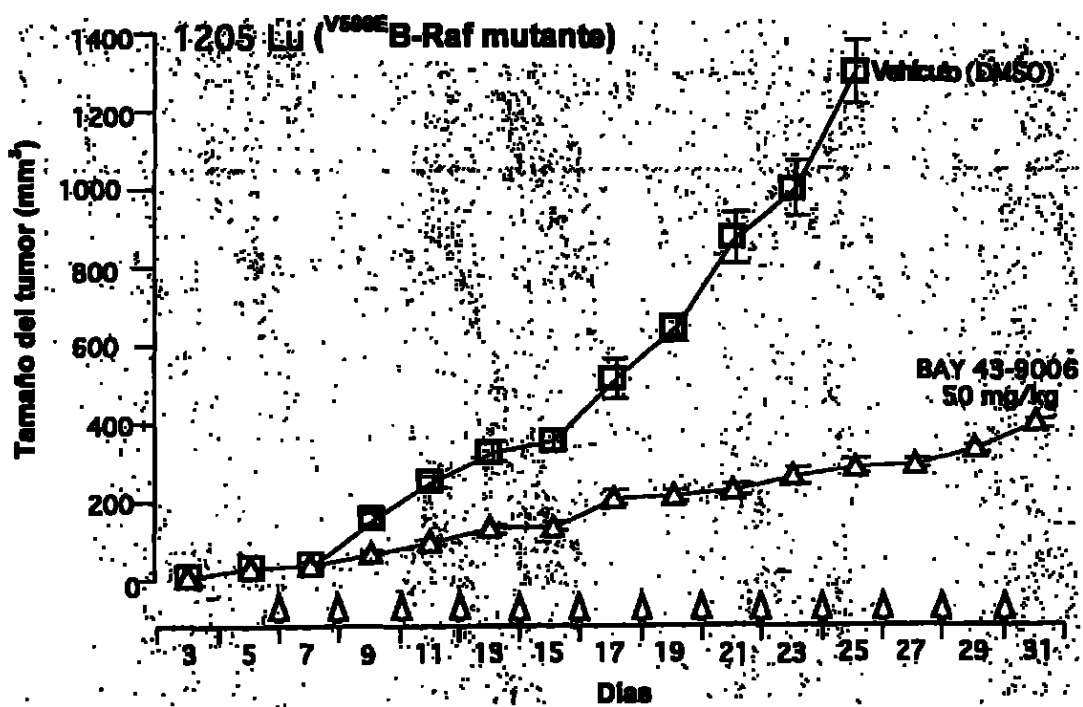


FIGURA 15B

272

272

C

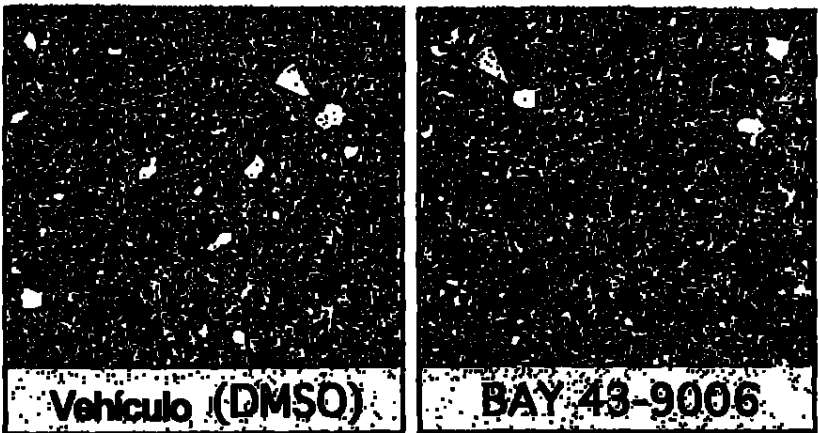


FIGURA 15C

D

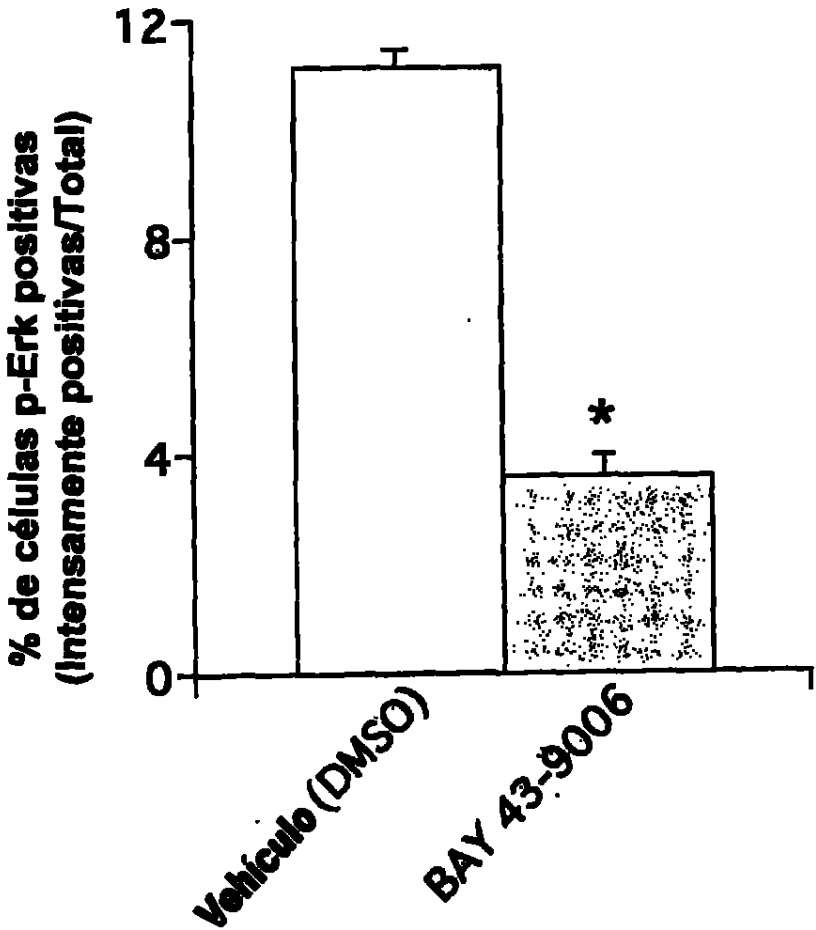


FIGURA 15D

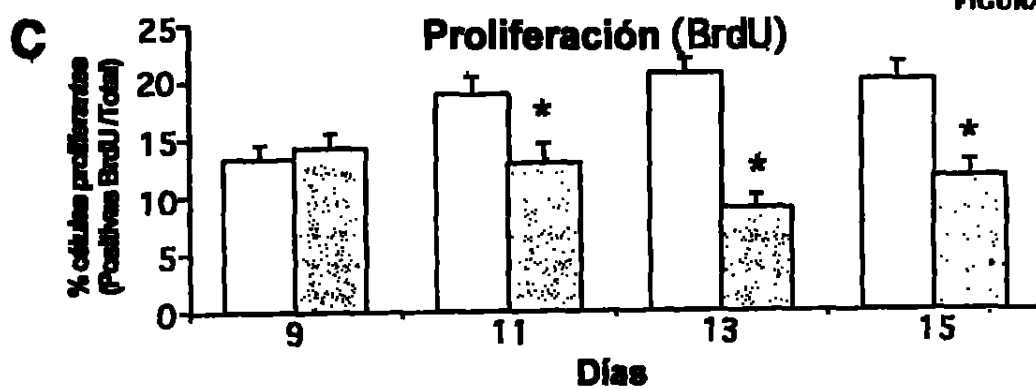
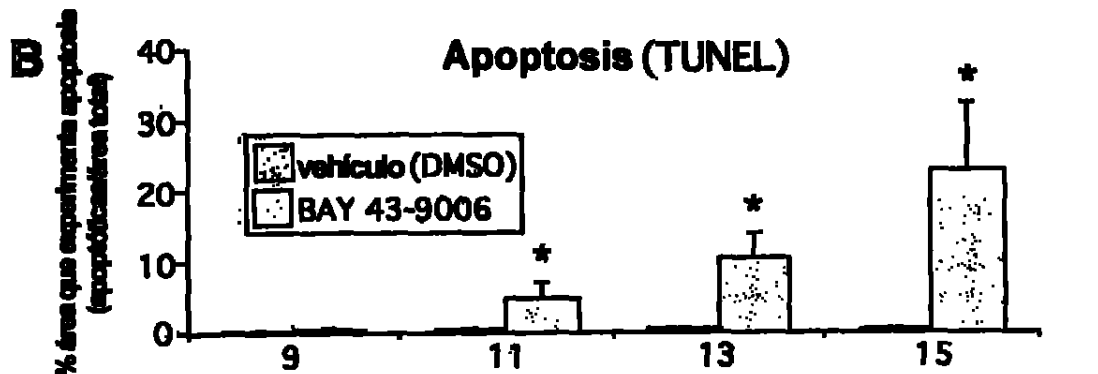
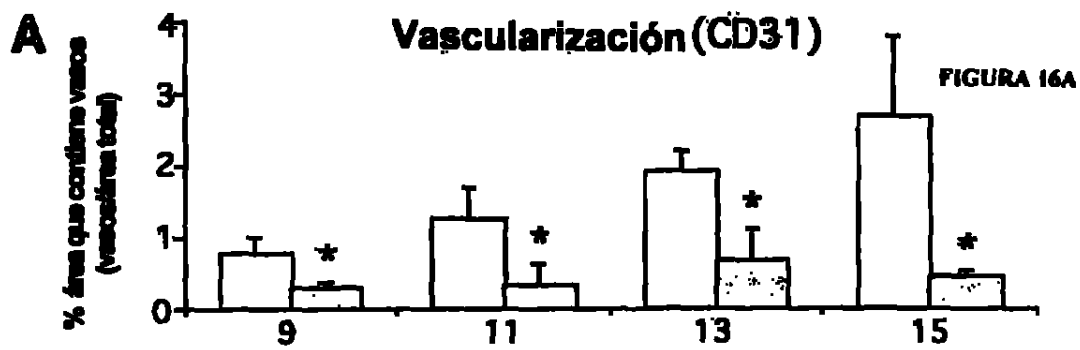


FIGURA 17A

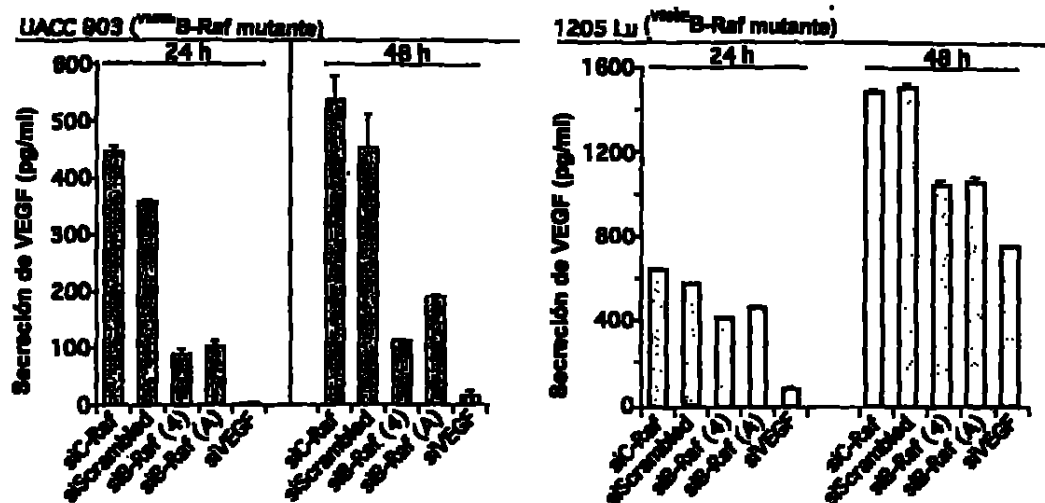


FIGURA 17B

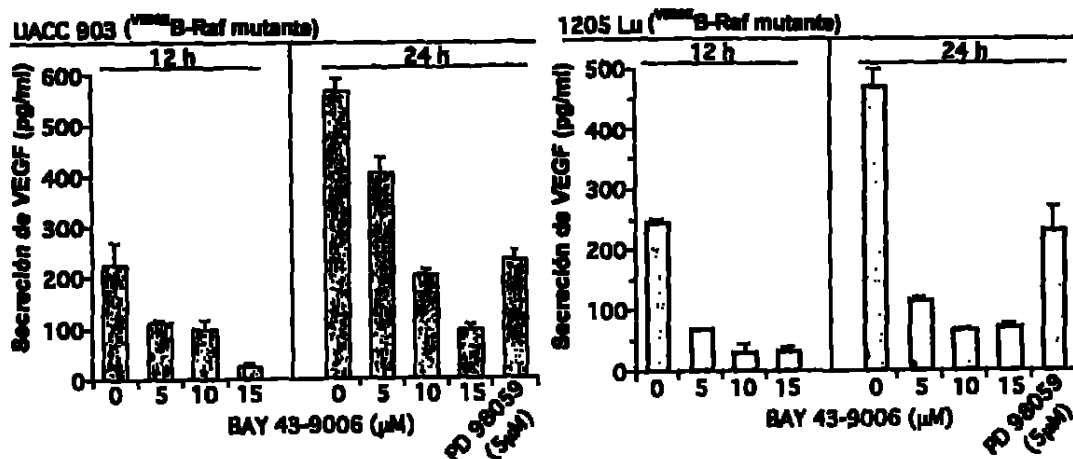


FIGURA 17C

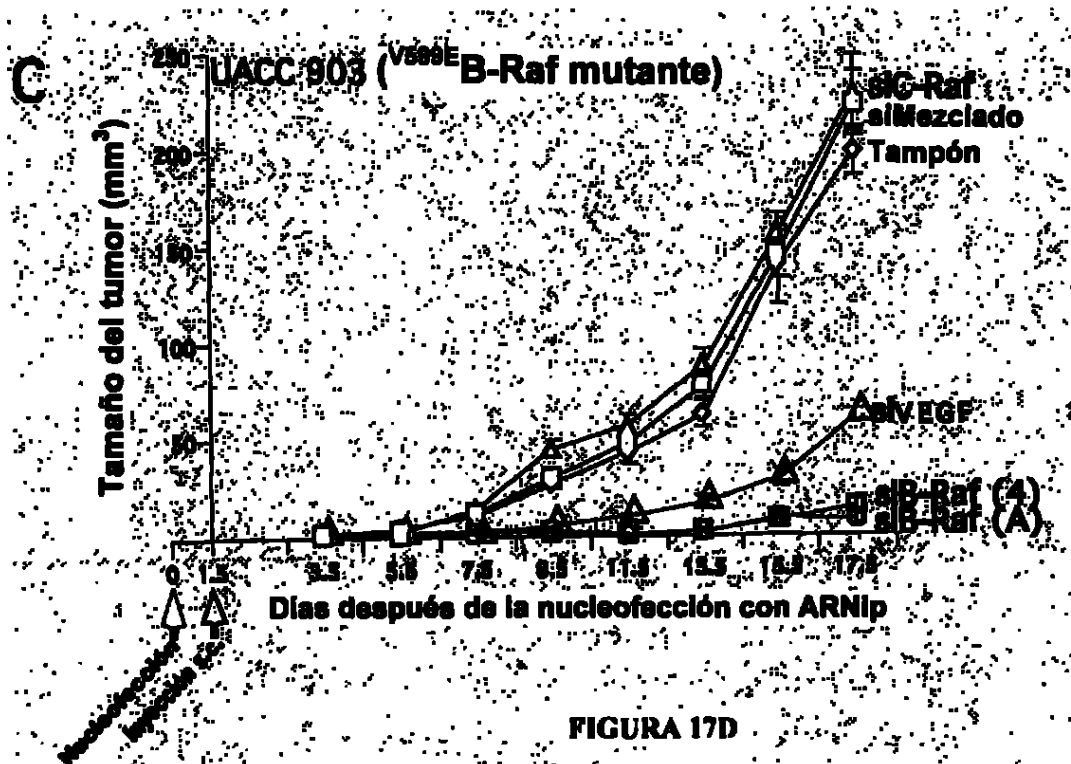
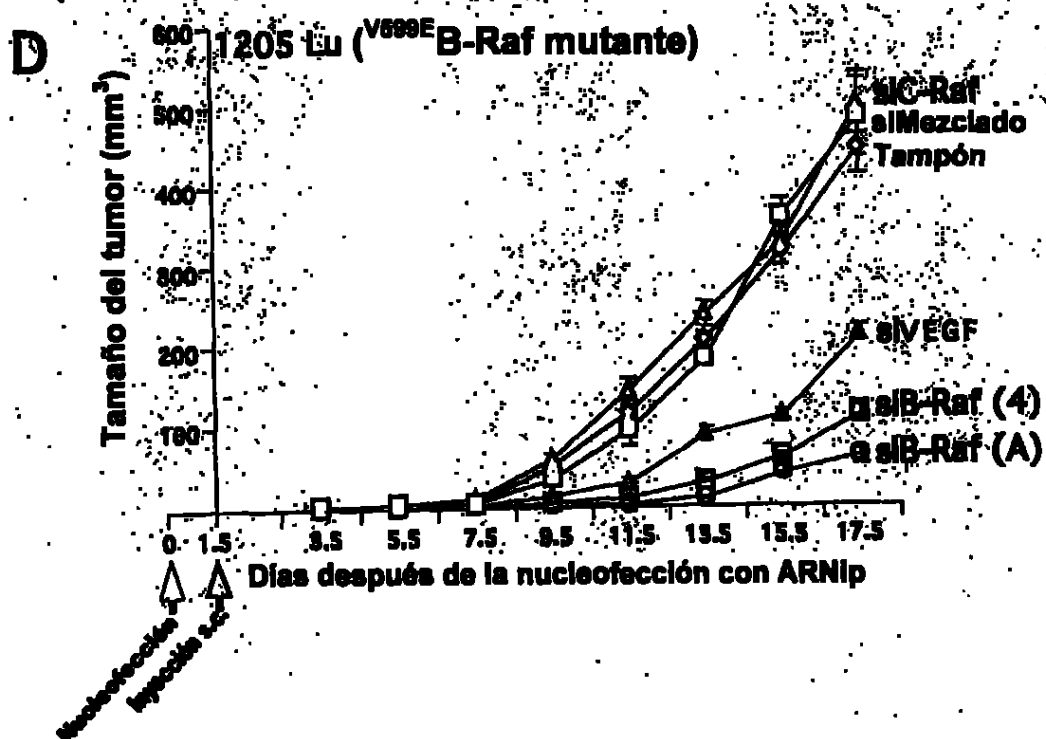
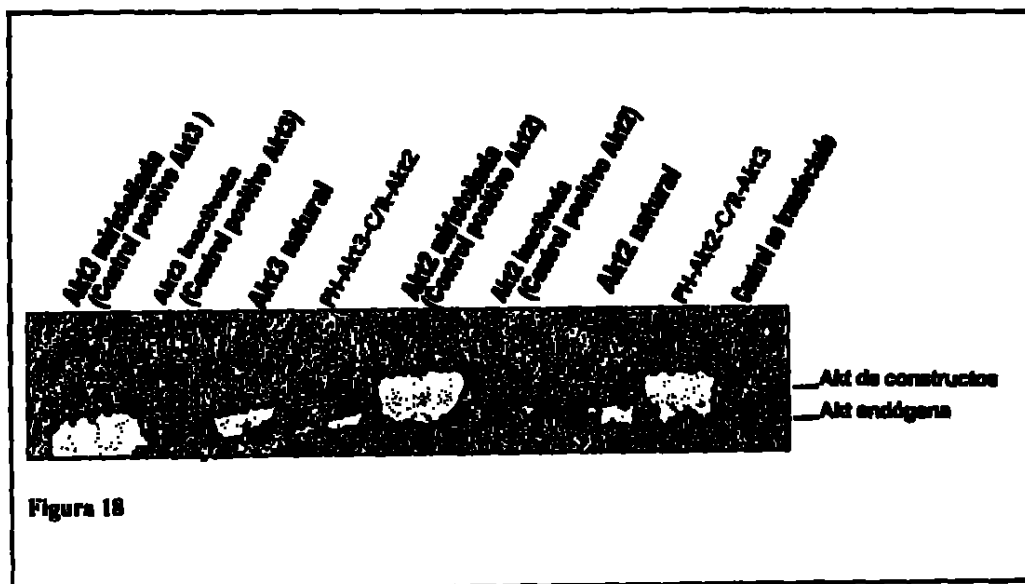


FIGURA 17D



276



277

<110> Pennsylvania State Research Foundation
<120> Combinatorial Methods and Compositions for Treatment of Melanoma
<130> P06710W00
<140> PCT/US 05/08950
<141> 2005-03-18
<150> US 60/554,509
<151> 2004-03-19
<160> 16
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo Sapiens
<400> 1
cuauucuacau uccggaaag 19

<210> 2
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo Sapiens
<400> 2
gaauuuacag cucagacua 19

<210> 3
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo Sapiens
<400> 3
cagcucagac uauuacaau 19

<210> 4
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens
<400> 4
cuuggacuau cuacauuccg gaaag 25

<210> 5
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens
<400> 5
cuuuccggaa uguagauagu ccaag 25

<210> 6
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 6
gaugaagaau uuacagcuca gacua

25

<210> 7
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 7
uagucugagc uguaaaaucu ucauc

25

<210> 8
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 8
aaauuacagc ucagacuauu acaau

25

<210> 9
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 9
auuguaauag ucugagcugu aaauu

25

<210> 10
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 10
ggucuagcua cagagaaauc ucgau

25

<210> 11
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 11
ggacaaagaa uuggaucugg aucau

25

<210> 12
<211> 6
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 12
cuugga

6

[Handwritten signature]

279

<210> 13
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 13
aaUUUacagc ucagacuauu acaau 25

<210> 14
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 14
ggucaaugug cgaaauggaa ugagc 25

<210> 15
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 15
gaggaacugg acuuccagaa gaaca 25

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 16
gcacatagga gagatgagct tccta 25

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

**JANAE LEHMAN BELL
MCKEE, VOORHEES & SEASE, PLC
801 GRAND AVENUE, SUITE 3200
DES MOINES, IOWA 50309**

**INVITATION TO FURNISH NUCLEOTIDE AND/OR
AMINO ACID SEQUENCE LISTING AND/OR TABLES
RELATED THERETO COMPLYING WITH STANDARD
AND/OR TECHNICAL REQUIREMENTS**

(PCT Rule 13~~ter~~.1(a) and (c) and Administrative Instructions,
Sections 208 and 802 and Annexes C and C-bis)

Date of mailing
(day/month/year)

04 Oct 2005

Applicant's or agent's file reference

P6710 554509

REPLY DUE

within months/days from
the above date of mailing

International application No.

PCT/US2005/008950

International filing date
(day/month/year)

18 Mar 2005

Applicant

THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION

1. The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to furnish to this Authority:



a nucleotide and/or amino acid sequence listing in written form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.



a statement to the effect that the sequence listing in written form, already furnished to this Authority, does not go beyond the disclosure in the international application as filed.



a nucleotide and/or amino acid sequence listing and/or tables related thereto in computer readable form complying with the standard and/or technical requirements provided for in Annex C and/or Annex C-bis of the Administrative Instructions, accompanied by a statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing and/or tables related thereto.



a statement that the information recorded in computer readable form (that computer readable form having already been furnished to this Authority) is identical to the written sequence listing and/or tables related thereto.

2. Failure to comply with this invitation may result in this Authority not carrying out the international search to the extent that no meaningful search can be carried out.

3. Further observations (if necessary):

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Authorized officer

Larry Hammond

Telephone No. 703-308-9290 EX 101

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2005/008950

AS: 101956

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

LEHMAN BELL, Janae
McKee, Voorhes & sease, PLC
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, IA 50309
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

201

Date of mailing (day/month/year)
29 September 2005 (29.09.2005)Applicant's or agent's file reference
P6710 554509

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/008950International filing date (day/month/year)
18 March 2005 (18.03.2005)Priority date (day/month/year)
19 March 2004 (19.03.2004)

Applicant

THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

copy of the international application as published by the International Bureau on 29 September 2005 (29.09.2005) under
No. WO 2005/089443copy of international application as republished by the International Bureau on under
No. WOFor an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)
or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Philippe Becamel

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Form PCT/IB/311 (January 2004)

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

To:

LEHMAN BELL, Janae
McKee, Voorhes & sease, PLC
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, IA 50309
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 23 June 2005 (23.06.2005)	
Applicant's or agent's file reference P6710 554509	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/008950	International filing date (day/month/year) 18 March 2005 (18.03.2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 19 March 2004 (19.03.2004)
Applicant THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
19 March 2004 (19.03.2004)	60/554,509	US	09 May 2005 (09.05.2005)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Olivia TEFY (fax 338-7090)
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. (41-22) 338.70.90
Form PCT/IB/304 (January 2004)	Telephone No. +41 22 338 8516

CHOMPUB1

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE (RO/US)

APPLICANT: THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
INT'L APPL. NO: PCT/US2005/008950
INT'L FILING DATE: 18 MARCH 2005
TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS
FOR TREATMENT OF MELANOMA

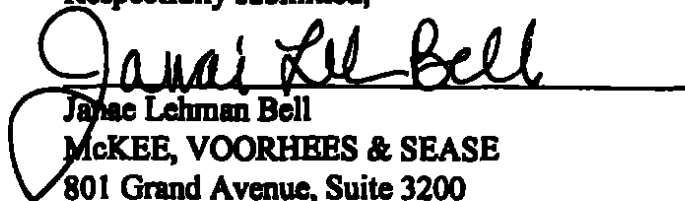
RESPONSE TO INVITATION TO FURNISH NUCLEOTIDE AND/OR AMINO ACID
SEQUENCE LISTING COMPLYING WITH STANDARD

Commissioner for Patents
Attn: Larry Hammond
Mail Stop PCT
Washington, D.C. 20231

Dear Mr. Hammond:

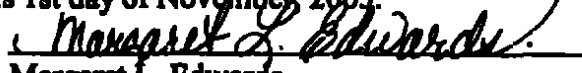
In response to the Invitation to Furnish Nucleotide Amino Acid Sequence Listing (Form PCT/ISA/225) from the United States Patent Office dated 4 October 2005, enclosed is the required sequence listing in computer readable and written form with accompanying statement. Let me know if you require anything further and thank you for your assistance on this matter.

Respectfully submitted,


Janae Lehman Bell
McKEE, VOORHEES & SEASE
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, Iowa 50309-2721
1 November 2005

CERTIFICATE OF MAILING

This is to certify that the foregoing Invitation to Correct was mailed to the Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231 by depositing it as Express mail, postage prepaid, on this 1st day of November, 2005.


Margaret L. Edwards

EV480032337US

204 284

IN THE UNITED STATES PATENT OFFICE (ISA)

APPLICANT: THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR
TREATMENT OF MELANOMA

STATEMENT TO SUPPORT FILINGS AND SUBMISSIONS IN ACCORDANCE
WITH WIPO STANDARD ST.25

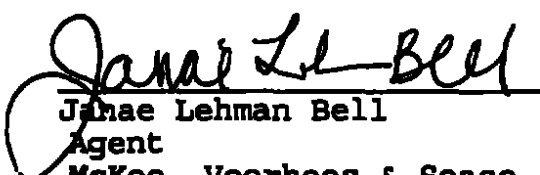
Dear Sirs:

I, Janae Lehman Bell, hereby declare and state the following:

1. I am the attorney of record in the above-identified case.
2. The content of the paper and computer readable copies of the sequence listing, submitted in accordance with WIPO Standard ST.25 are the same, and do not represent new matter.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under §1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application of any patent issued thereon.

Dated 1 November, 2005


Janae Lehman Bell
Agent
McKee, Voorhees & Sease
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, Iowa 50309-2721 US

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

24/ 205
PCT

To:

**JANAE LEHMAN BELL
MCKEE, VOORHEES & SEASE, PLC
801 GRAND AVENUE, SUITE 3200
DES MOINES, IOWA 50309**

**INVITATION TO FURNISH NUCLEOTIDE AND/OR
AMINO ACID SEQUENCE LISTING AND/OR TABLES
RELATED THERETO COMPLYING WITH STANDARD
AND/OR TECHNICAL REQUIREMENTS**

(PCT Rule 13ter.1(a) and (c) and Administrative Instructions,
Sections 208 and 802 and Annexes C and C-bis) ✓ 05

Date of mailing
(day/month/year)

04 Oct 2005 11-1

Applicant's or agent's file reference

P6710 554509

REPLY DUE

within months/days from
the above date of mailing

International application No.

PCT/US2005/008950

International filing date
(day/month/year)

18 Mar 2005

Applicant

THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION

1. The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to furnish to this Authority:



a nucleotide and/or amino acid sequence listing in written form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.



a statement to the effect that the sequence listing in written form, already furnished to this Authority, does not go beyond the disclosure in the international application as filed.



a nucleotide and/or amino acid sequence listing and/or tables related thereto in computer readable form complying with the standard and/or technical requirements provided for in Annex C and/or Annex C-bis of the Administrative Instructions, accompanied by a statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing and/or tables related thereto.



a statement that the information recorded in computer readable form (that computer readable form having already been furnished to this Authority) is identical to the written sequence listing and/or tables related thereto.

2. Failure to comply with this invitation may result in this Authority not carrying out the international search to the extent that no meaningful search can be carried out.

3. Further observations (if necessary):

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Authorized officer

Larry Hammond

Telephone No. 703-308-9290 EX 101

SEQUENCE LISTING

286 *236*

<110> Pennsylvania State Research Foundation

<120> Combinatorial Methods and Compositions for Treatment of Melanoma

<130> P06710W00

<140> PCT/US 05/08950

<141> 2005-03-18

<150> US 60/554,509

<151> 2004-03-19

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1
cuaucuaacau uccggaaag 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2
gaauuuacag cucagacua 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo Sapiens

<400> 3
cagcucagac uauuacaau 19

<210> 4

<211> 25

<212> RNA

<213> Homo Sapiens

<400> 4
cuuggacuau cuacauuccg gaaag 25

<210> 5

<211> 25

<212> RNA

<213> Homo Sapiens

<400> 5

cuuuccggaa uguagauagu ccaag

25

<210> 6
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 6
gaugaagaau uuacagcuca gacua

25

<210> 7
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 7
uagucugagc uguaaaauuc ucauc

25

<210> 8
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 8
aauuuacagc ucagacuauu acaau

25

<210> 9
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 9
auuguaauag ucugagcugu aaauu

25

<210> 10
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 10
ggucuagcua cagagaaauc ucgau

25

<210> 11
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 11
ggacaaagaa uuggaucugg aucau

25

<210> 12
<211> 6
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 12
cuugga

6

<210> 13
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 13
aauuuacagc ucagacuauu acaau

25

<210> 14
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 14
ggucaaugug cgaaauggaa ugagc

25

<210> 15
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo Sapiens

<400> 15
gaggaacugg acuuccagaa gaaca

25

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 16
gcacatagga gagatgagct tccta

25

Handwritten signature

288

289

IN THE UNITED STATES PATENT OFFICE (RO/US)

APPLICANT: THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
INTL APPL. NO: PCT/US2005/008950
INTL FILING DATE: 18 MARCH 2005
TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR
TREATMENT OF MELANOMA

REQUEST FOR RECORDING OF A CHANGE UNDER RULE 92*bis*

Commissioner for Patents
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Dear Sirs:

Regarding the above-identified application and under PCT Rule 92 *bis*, we hereby request to add an inventor, Arati Sharma, 304 Old Main, University Park, PA 16802-1504, US nationality and residence. We have enclosed a new copy of Page 3 of the PCT Request Form reflecting these changes and will forward same to the International Bureau as well. Please have these changes recorded for all future correspondence and let me know if you require anything further. Thank you for your assistance on this matter.

Respectfully submitted,

Heidi S. Nebel
Heidi S. Nebel

McKEE, VOORHEES & SEASE
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, Iowa 50309 US
28 July 2006

CERTIFICATE OF MAILING

This is to certify that the foregoing Invitation to Correct was mailed to the Commissioner of Patents, Alexandria, Virginia, 22313-1450 by depositing it as Express mail, postage prepaid, on this 28th day of July, 2006.

Margaret L. Edwards
Margaret L. Edwards

EV298922316US

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SHARMA, Arati

304 Old Main

University Park, PA 16802-1504 US

State (that is, country) of nationality: US

State (that is, country) of residence: US

This person is applicant for the purpose of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

The United States of America only

☐

The States indicated in the Supplemental Box

This person is:

☐

applicant only

☐

applicant and inventor

☒

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐

applicant only

☒

applicant and inventor.

☐

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purpose of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

The United States of America only

☐

The States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐

applicant only

☒

applicant and inventor

☐

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purpose of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

The United States of America only

☐

The States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐

applicant only

☒

applicant and inventor

☐

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purpose of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

The United States of America only

☐

The States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

28 July, 2006

EXP.MAIL #EV298922316US

AGENT #P8710 554509

APPLICANT: PENN STATE RESEARCH FOUNDATION

APPL. NO: PCT/US2005/008950

FILING DATE: 18 MARCH 2005

TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS
FOR TREATMENT OF MELANOMA

Please acknowledge receipt of the following:

Request for a Change Under 92bis with

Certificate of Mailing

mle

291
20X

PCT

LIST OF DOCUMENTS FILED WITH THE
INTERNATIONAL BUREAU
AS RECEIVING OFFICE

To:

The International Bureau of WIPO
PCT Receiving Office Section
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Switzerland

Applicant's or agent's file reference

P6710 554509

Facsimile No. (41-22) 910 06 10

International application No.

(if known)

PCT/US05/08950

International filing date (day/month/year)

(if known)

18 March 2005

(Earliest) Priority date

(day/month/year)

19 March 2004

Applicant

The Penn State Research Foundation

Title of invention

Combinatorial Methods and Compositions for
Treatment of Melanoma

The applicant hereby requests the International Bureau to acknowledge to the following person (include full name, address, facsimile No. and telephone No.):

Heidi S. Nebel
McKee, Voorhees & Sease, PLC
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, Iowa 50309 US
PH: 515-288-3667
FX: 515-288-1338

the receipt by the following means:

☐

mail (surface, air mail, registered)

☒

delivery service

☒

facsimile transmission

☐

hand delivery

of the documents/elements listed below:

☐

PCT request (pages)

☐

description (pages)

☐

claims (pages)

☐

abstract (pages)

☐

drawings (pages)

☐

fee calculation sheet

☐

separate authorization to charge deposit account

☐

cheque (indicate currency and amount)

☐

cash (in person only) (indicate amount)

☐

power of attorney (general power, copy of general power, separate power) (indicate kind and number)

☐

statement explaining lack of signature (if more than one, indicate number)

☐

priority document (if more than one, indicate number)

☐

separate indications relating to deposited micro-organism (pages)

☐

nucleotide and/or amino acid sequence listing on diskette (if more than one diskette, indicate number)

☐

statement accompanying diskette containing sequence listing

☐

accompanying letter

☒

other (specify): Request for Recording of a Change Under Rule 92bis

293 293
IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO (RO/IB)

APPLICANT: THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
INT'L APPL. NO: PCT/US2005/008950
INT'L FILING DATE: 18 MARCH 2005
TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR
TREATMENT OF MELANOMA

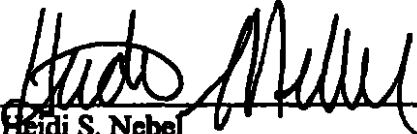
REQUEST FOR RECORDING OF A CHANGE UNDER RULE 92*bis*

The International Bureau of WIPO
34, Chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Dear Sirs:

Regarding the above-identified application and under PCT Rule 92 *bis*, we hereby request to add an inventor Arati Sharma, 304 Old Main, University Park, PA 16802-1504, US nationality and residence. We have enclosed a new copy of Page 3 of the PCT Request Form reflecting these changes. Please have these changes recorded for all future correspondence and let me know if you require anything further. Thank you for your assistance on this matter.

Respectfully submitted,


Heidi S. Nebel
McKEE, VOORHEES & SEASE
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, Iowa 50309 US
28 July 2006

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SHARMA, Arati

304 Old Main

University Park, PA 16802-1504 US

This person is:

☐ applicant only☐ applicant and inventor☒ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: US

State (that is, country) of residence: US

This person is applicant for the purpose of:



all designated States



all designated States except the United States of America



The United States of America only



The States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor.☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purpose of:



all designated States



all designated States except the United States of America



The United States of America only



The States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purpose of:



all designated States



all designated States except the United States of America



The United States of America only



The States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purpose of:



all designated States



all designated States except the United States of America



The United States of America only



The States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

PCT

ACKNOWLEDGEMENT OF RECEIPT OF
DOCUMENTS FILED WITH THE
INTERNATIONAL BUREAU
AS RECEIVING OFFICE

To: Heidi S. Nebel
McKee, Voorhees & Sease PLC
801 Grand Avenue, Suite 3200
Des Moines, Iowa 50309 US
PH: 515-288-3667
FX: 515-288-1338

Date of mailing (day/month/year)	Facsimile No.:
Applicant's or agent's file reference P6710 554509	IMPORTANT COMMUNICATION
International application No. PCT/US2005/008950	Date of receipt/International filing date (day/month/year) 18 March 2005
Applicant The Penn State Research Foundation	
Title of invention Combinatorial Methods and Compositions for Treatment of Melanoma	

1. The International Bureau has received the documents/elements listed below on: _____
by the following means:

☐ mail (surface, air mail, registered) ☒ delivery service ☒ facsimile transmission ☐ hand delivery

- ☐ PCT request (pages)
☐ description (excluding sequence listing part) (pages)
☐ claims (pages)
☐ abstract (pages)
☐ drawings (pages)
☐ sequence listing part of description
☐ fee calculation sheet
☐ separate authorization to charge deposit account
☐ cheque
☐ cash (in person only)
☐ power of attorney (general power, copy of general power, separate power) (indicate kind and number)
☐ statement explaining lack of signature (if more than one, indicate number)
☐ priority document (if more than one, indicate number)
☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material (pages)
☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing on diskette (if more than one diskette, indicate number)
☐ statement accompanying diskette containing sequence listing (if more than one, indicate number)
☐ accompanying letter
☐ form PCT/RO198 (RO/IB)

☒ other (specify): Request for Recoding of a Change Under Rule 92bis

The applicant's attention is drawn to the fact that these papers have not yet been checked by this receiving Office in respect of their compliance with the requirements of Article 11(1), that is, whether these papers meet the requirements necessary for the recording of an international filing date. As soon as these papers have been checked, the applicant will be informed accordingly.

2. Additional observations (if necessary):

Name and mailing address of the receiving Office: International Bureau of WIPO PCT Receiving Office Section 34, chemin des Colombettes, 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 910 06 10	Authorized officer Telephone No. (41-22) 338 91 11
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

296

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:

JANAE LEHMAN BELL
MCKEE, VOORHEES & SEASE, PLC
801 GRAND AVENUE, SUITE 3200
DES MOINES, IOWA 50309

NOTIFICATION CONCERNING PAYMENT OF PRESCRIBED FEES

(PCT Rules 14, 15 and 16 and Administrative
Instructions, Sections 102bis(c), 304,
323(b), 707(b) and 803)

Date of mailing (day/month/year) 02 May 2005		
Applicant's or agent's file reference PB710 554509	PAYMENT DUE see item 3 for time limits	
International application No. PCT/US2005/008950	International filing date/Date of receipt (day/month/year) 18 Mar 2005	Priority date (day/month/year) 19 Mar 2004
Applicant THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION		

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has received:

- ☒ the payment of all the prescribed fees, and ☐ an overpayment, which will be refunded in due course.
- ☐ no or insufficient payment of the prescribed fees and the applicant is hereby invited to pay the balance due, as summarized under item 2, within the time limit(s) indicated under item 3.

2. Fees and payment calculation:

4,030.00	4,030.00	0.00
Total fees payable	Amount paid	Balance

- ☐ The details of the calculation are given in the Annex.

3. Time limit(s) for payment and amount(s) payable (Rules 14.1, 15.4 and 16.1(f)):

- ☐ within ONE MONTH from the date of receipt of the international application (for the transmittal fee (if any), the search fee and the international filing fee). The amount payable for each fee is the amount applicable on the date of receipt of the international application.
- ☐ within 16 MONTHS from the priority date (only for the fee for priority document). The applicant's attention is drawn to the fact that the request made by the applicant under Rule 17.1(b) will be considered not to have been made unless the fee is paid within that time limit.

4. Additional observations (if necessary):

- ☐ The search copy will not be transmitted to the International Searching Authority until the search fee is paid (therefore the start of the international search will be delayed) (Rule 23.1(a) and (b)).

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-305-3230	Authorized officer Larry Hammond Telephone No. 703-308-9290 EX 101
---	--

ANNEX TO FORM PCT/RO/102
CALCULATION OF THE PRESCRIBED FEES

International Application No. **297**
PCT/US2005/008950

T Transmittal Fee

Prescribed amount: 300.00 **T**
Amount paid: 300.00
Balance: 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

S Search Fee

Prescribed amount: 1,000.00 **S**
Amount paid: 1,000.00
Balance: 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

I International Filing Fee

Fixed amount for first 30 sheets: 1,124.00 **i1**
122 x 13.00 = 1,588.00 **i2**
Number of sheets Fee per sheet
in excess of 30
Additional
component: . . . 400 x 0.00 = 0.00 **i3**
Fee per sheet

Reduction where the international application is filed
(See PCT Applicant's Guide, Volume I, General Part,
for details on the availability of this reduction):

using the PCT-EASY software: 0.00 **r**

or

in electronic form where the text of the
description, claims and abstract is not in
character coded format: 0.00 **r**

or

in electronic form where the text of the
description, claims and abstract is in character
coded format: 0.00 **r**

Sub-total: 2,710.00 **i1+i2+i3-r**

Prescribed total amount (The amount to be entered at I is the sub-total
entered at (i1+i2+i3-r), except where the applicant is for all applicants
are) entitled to a reduction of 75%, in which case the amount to be
entered at I is 25% of the sub-total (i1+i2+i3-r); certain applicants from
certain States are entitled to a reduction of 75% of the international
filing fee; see Notes to the Fee Calculation Sheet as annexed to the
Request Form, PCT/RO/101, for details): 2,710.00 **T**

Amount paid: 2,710.00
Balance: 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

P Fee for Priority Document

Prescribed amount: 20.00 **P**
Amount paid: 20.00
Balance: 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
JANAE LEHMAN BELL
MCKEE, VOORHEES & SEASE, PLC
801 GRAND AVENUE, SUITE 3200
DES MOINES, IOWA 50309

PCT

**NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION NUMBER AND OF THE
INTERNATIONAL FILING DATE**

(PCT Rule 20.5(c))

Applicant's or agent's file reference P8710 554509		Date of mailing (day/month/year) 02 May 2005	
IMPORTANT NOTIFICATION			
International application No. PCT/US2005/008950	International filing date (day/month/year) 18 Mar 2005	Priority date (day/month/year) 19 Mar 2004	
Applicant THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION			
Title of the invention COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF MELANOMA			

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:

- ☒ was transmitted to the International Bureau on **02 May 2005**
- ☐ has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:
- ☐ because the necessary national security clearance has not yet been obtained.
- ☐ because (reason to be specified):

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION Completed by: **LH**

☐ Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.

☐ License for foreign transmittal not required. 37 CFR 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(h).

☒ Foreign transmittal license granted. 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on **27 Apr 2005** (date):

☐ 37 CFR 5.15(a) ☒ 37 CFR 5.15(b)

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-308-3230	Authorized officer Larry Hammond Telephone No. 703-308-8290 EX 101
--	--

Form PCT/RO/105 (July 1992)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF SEARCH COPY

(PCT Rule 25.1)

To: JANAE LEHMAN BELL MCKEE, VOORHEES & SEASE, PLC 801 GRAND AVENUE, SUITE 3200 DES MOINES, IOWA 50309		Date of mailing (day/month/year) 02 May 2005	
Applicant's or agent's file reference P8710 554508		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/US2005/008950	International filing date (day/month/year) 18 Mar 2005	Priority date (day/month/year) 18 Mar 2004	
Applicant THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION			
1. Where the International Searching Authority and the receiving Office are not the same Office: The applicant is hereby notified that the search copy of the international application was received by this International Searching Authority on the date indicated below. Where the International Searching Authority and the receiving Office are the same Office: The applicant is hereby notified that the search copy of the international application was received on the date indicated below. <u>02 May 2005</u> (date of receipt). 2. ☐ The search copy was accompanied by a nucleotide and/or amino acid sequence listing or tables related thereto in computer readable form. 3. Time limit for establishment of international search report and written opinion of the International Searching Authority The applicant is informed that the time limit for establishing the international search report and the written opinion of the International Searching Authority is three months from the date of receipt indicated above or nine months from the priority date, whichever time limit expires later (Rules 42.1 and 43bis.1(a)). 4. A copy of this notification has been sent to the International Bureau and, where the first sentence of paragraph 1 applies, to the receiving Office.			
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-305-3230		Authorized officer Larry Hammond Telephone No. 703-308-9290 EX 101	



300
UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231

JULY 27, 2005

PTAS

500041891A

500041891A

MCKEE, VOORHEES & SEASE, PLC
801 GRAND AVENUE
SUITE 3200
DES MOINES, IA 50309-2721

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES DIVISION, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 07/27/2005

REEL/FRAME: 016314/0776

NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

ROBERTSON, GAVIN P.

DOC DATE: 06/21/2005

ASSIGNOR:

SANDIRASEGARANE, LAKSHMAN

DOC DATE: 06/21/2005

ASSIGNOR:

KESTER, MARK

DOC DATE: 06/24/2005

ASSIGNOR:

SHARMA, ARATI

DOC DATE: 06/21/2005

ASSIGNEE:

THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
304 OLD MAIN STREET
UNIVERSITY PARK, PENNSYLVANIA 16802

306

016314/0776 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 11083583

FILING DATE: 03/18/2005

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF MELANOMA

ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

07/27/2005
500041891

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table border="1"><thead><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>Gavin P. Robertson</td><td>08/21/2005</td></tr><tr><td>Lakshman Sandrasegarane</td><td>08/21/2005</td></tr><tr><td>Mark Keeler</td><td>08/24/2005</td></tr><tr><td>Amit Sharma</td><td>08/21/2005</td></tr></tbody></table>		Name	Execution Date	Gavin P. Robertson	08/21/2005	Lakshman Sandrasegarane	08/21/2005	Mark Keeler	08/24/2005	Amit Sharma	08/21/2005
Name	Execution Date										
Gavin P. Robertson	08/21/2005										
Lakshman Sandrasegarane	08/21/2005										
Mark Keeler	08/24/2005										
Amit Sharma	08/21/2005										
RECEIVING PARTY DATA											
<table border="1"><tr><td>Name:</td><td>The Penn State Research Foundation</td></tr><tr><td>Street Address:</td><td>304 Old Main Street</td></tr><tr><td>City:</td><td>University Park</td></tr><tr><td>State/Country:</td><td>PENNSYLVANIA</td></tr><tr><td>Postal Code:</td><td>16802</td></tr></table>		Name:	The Penn State Research Foundation	Street Address:	304 Old Main Street	City:	University Park	State/Country:	PENNSYLVANIA	Postal Code:	16802
Name:	The Penn State Research Foundation										
Street Address:	304 Old Main Street										
City:	University Park										
State/Country:	PENNSYLVANIA										
Postal Code:	16802										
PROPERTY NUMBERS Total: 1											
<table border="1"><thead><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr></thead><tbody><tr><td>Application Number:</td><td>11083583</td></tr></tbody></table>		Property Type	Number	Application Number:	11083583						
Property Type	Number										
Application Number:	11083583										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number: (515)288-1338 <i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>											
Phone: 515-288-3887											
Email: patatt@pmva.com											
Correspondent Name: McKee, Voorhees & Sasse, PLC											
Address Line 1: 801 Grand Avenue											
Address Line 2: Suite 3200											
Address Line 4: Des Moines, IOWA 50309-2721											
NAME OF SUBMITTER:	Heidi S. Nebel										
Total Attachments: 2 source=robertson Assign to E-file 7-27-05#page1.tif source=robertson Assign to E-file 7-27-05#page2.tif											

Facsimile Transmission

*This company uses RightFAX® fax
server software from RightFAX, Inc.*

From: **Name:** USPTO ASSIGNMENT DIVISION
 Fax Number:
 Voice Phone: 703-308-9723

To: **Name:** SUBMITTER
 Company: Faxed to Submitter's Fax Number
 Fax Number: 15152881338
 Voice Phone:

Fax Notes:

Pg# **Description**

1 Cover Page

2 411.TXT

4 Document 1, Batch 502652

PTAS FAX PROCESSING

Date and time of transmission: Wednesday, July 27, 2005 4:09:18 PM
Number of pages including this cover sheet: 04

A RightFAX® Communicated Document



United States Patent and Trademark Office

Home | Site Index | Search | Guides | Contacts | eBusiness | eBiz alerts | News | Help



Electronic Patent Assignment System

Confirmation Receipt

Your assignment has been received by the USPTO.
The coversheet of the assignment is displayed below:

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1

Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table border="1"><thead><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>Gavin P. Robertson</td><td>06/21/2005</td></tr><tr><td>Lakshman Sandirasegarane</td><td>06/21/2005</td></tr><tr><td>Mark Kester</td><td>06/24/2005</td></tr><tr><td>Arati Sharma</td><td>06/21/2005</td></tr></tbody></table>	Name	Execution Date	Gavin P. Robertson	06/21/2005	Lakshman Sandirasegarane	06/21/2005	Mark Kester	06/24/2005	Arati Sharma	06/21/2005	
Name	Execution Date										
Gavin P. Robertson	06/21/2005										
Lakshman Sandirasegarane	06/21/2005										
Mark Kester	06/24/2005										
Arati Sharma	06/21/2005										
RECEIVING PARTY DATA											
<table border="1"><tr><td>Name:</td><td>The Penn State Research Foundation</td></tr><tr><td>Street Address:</td><td>304 Old Main Street</td></tr><tr><td>City:</td><td>University Park</td></tr><tr><td>State/Country:</td><td>PENNSYLVANIA</td></tr><tr><td>Postal Code:</td><td>16802</td></tr></table>	Name:	The Penn State Research Foundation	Street Address:	304 Old Main Street	City:	University Park	State/Country:	PENNSYLVANIA	Postal Code:	16802	
Name:	The Penn State Research Foundation										
Street Address:	304 Old Main Street										
City:	University Park										
State/Country:	PENNSYLVANIA										
Postal Code:	16802										
PROPERTY NUMBERS Total: 1											
<table border="1"><thead><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr></thead><tbody><tr><td>Application Number:</td><td>11083583</td></tr></tbody></table>	Property Type	Number	Application Number:	11083583							
Property Type	Number										
Application Number:	11083583										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number: (515)288-1338											
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.											
Phone: 515-288-3667											

Email: pstatty@ipmva.com
Correspondent Name: McKee, Voorhes & Sease, PLC
Address Line 1: 801 Grand Avenue
Address Line 2: Suite 3300
Address Line 4: Des Moines, IOWA 50309-2721

NAME OF SUBMITTER:

Heidi S. Nebel

Signature:

/Heidi S. Nebel/

Date:

07/27/2005

Total Attachments: 2

source=robertson Assign to E-file 7-27-05#page1.tif
source=robertson Assign to E-file 7-27-05#page2.tif

RECEIPT INFORMATION

EPAS ID: PAT44766
Receipt Date: 07/27/2005
Fee Amount: \$40

[Return to home page](#)

[| HOME](#) | [INDEX](#) | [SEARCH](#) | [eBUSINESS](#) | [CONTACT US](#) | [PRIVACY STATEMENT](#)

ASSIGNMENT

FOR VALUE RECEIVED, WE, GAVIN P. ROBERTSON, LAKSHMAN SANDIRASEGARANE, MARK KESTER, and ARATI SHARMA

hereby sell, assign and transfer unto THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION, 304 Old Main, University Park, PA 16802

as assignee, and its successors, assigns and legal representatives, the entire right, title and interest in and to all subject matter invented by us and disclosed and claimed in an application for Letters Patent of the United States of America, entitled:

**"COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS
FOR TREATMENT OF MELANOMA"**

signed by us on the date set forth below; and in and to any and all divisions, reissues, continuations and extensions thereof; and in and to all corresponding applications for Letters Patent and all Convention and Treaty Rights of any kind, in all countries throughout the world, for all such subject matter.

We request that any and all patents for said inventions be issued to said assignee, its successors, assigns and legal representatives, or to such nominees as it may designate.

We agree that, when requested, we will, without charge to said assignee but at its expense, sign all papers, take all rightful oaths, and do all acts which may be necessary, desirable or convenient for securing and maintaining patents for said inventions in any and all countries and for vesting title thereto in said assignee, its successors, assigns and legal representatives or nominees.

We authorize and empower the said assignee, its successors, assigns and legal representatives or nominees, to invoke and claim for any application for patent or other form of protection for said inventions filed by it or them, the benefit of the right of priority provided by the International Convention for the Protection of Industrial Property, as amended, or by any convention which may henceforth be substituted for it, and to invoke and claim such right of priority without further written or oral authorization from us.

We hereby consent that a copy of this assignment shall be deemed a full legal and formal equivalent of any assignment, consent to file or like document which may be required in any country for any purpose and more particularly in proof of the right of the said assignee or nominee to claim the aforesaid benefit of the right of priority provided by the International Convention for the Protection of Industrial Property, as amended, or by any convention which may henceforth be substituted for it.

We covenant with said assignee, its successors, assigns and legal representatives, that the rights and property herein conveyed are free and clear of any encumbrance, and that we have full right to convey the same as herein expressed.

Signed at Hershey, Pennsylvania, this 21st day of June, 2005

Witness: [Signature] [Signature]
Gavin P. Robertson

Signed at Hershey, Pennsylvania, this 21st day of June, 2005

Witness: [Signature] [Signature]
Lakshman Sandirasegarane

Signed at Hershey, Pennsylvania,

30X 307
this 24th day of June, 2005

Witness:

[Signature]

Mark Kester

Signed at Hershey, Pennsylvania,

this 21st day of June, 2005

Witness:

[Signature]

Arati Sharma



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
 United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1480
 Alexandria, Virginia 22313-1480
 www.uspto.gov

APPL NO.	FILING OR 371 (c) DATE	ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY. DOCKET NO	DRAWINGS	TOT CLMS	IND CLMS
11/083,583	03/18/2005	1636	1665	P06710US01	30	59	3

CONFIRMATION NO. 4383

27407

MCKEE, VOORHEES & SEASE, P.L.C.
 ATTN: PENNSYLVANIA STATE UNIVERSITY
 801 GRAND AVENUE, SUITE 3200
 DES MOINES, IA 50309-2721

UPDATED FILING RECEIPT



OC000000016855603

Date Mailed: 08/24/2005

Receipt is acknowledged of this regular Patent Application. It will be considered in its order and you will be notified as to the results of the examination. Be sure to provide the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION when inquiring about this application. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. If an error is noted on this Filing Receipt, please mail to the Commissioner for Patents P.O. Box 1480 Alexandria Va 22313-1480. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections (if appropriate).

Applicant(s)

Gavin P. Robertson, Harrisburg, PA;
 Lakshman Sandrasegarane, Hershey, PA;
 Mark Kester, Harrisburg, PA;
 Arati Sharma, Hummelstown, PA;

Assignment For Published Patent Application

The Penn State Research Foundation, University Park, PA

Power of Attorney: The patent practitioners associated with Customer Number 27407.

Domestic Priority data as claimed by applicant

This appin claims benefit of 60/554,509 03/19/2004

Foreign Applications

If Required, Foreign Filing License Granted: 05/24/2005

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is **US11/083,583**

Projected Publication Date: 12/01/2005

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

**** SMALL ENTITY ****

Title

Combinatorial methods and compositions for treatment of melanoma

Preliminary Class

435

PROTECTING YOUR INVENTION OUTSIDE THE UNITED STATES

Since the rights granted by a U.S. patent extend only throughout the territory of the United States and have no effect in a foreign country, an inventor who wishes patent protection in another country must apply for a patent in a specific country or in regional patent offices. Applicants may wish to consider the filing of an international application under the Patent Cooperation Treaty (PCT). An international (PCT) application generally has the same effect as a regular national patent application in each PCT-member country. The PCT process simplifies the filing of patent applications on the same invention in member countries, but does not result in a grant of "an international patent" and does not eliminate the need of applicants to file additional documents and fees in countries where patent protection is desired.

Almost every country has its own patent law, and a person desiring a patent in a particular country must make an application for patent in that country in accordance with its particular laws. Since the laws of many countries differ in various respects from the patent law of the United States, applicants are advised to seek guidance from specific foreign countries to ensure that patent rights are not lost prematurely.

Applicants also are advised that in the case of inventions made in the United States, the Director of the USPTO must issue a license before applicants can apply for a patent in a foreign country. The filing of a U.S. patent application serves as a request for a foreign filing license. The application's filing receipt contains further information and guidance as to the status of applicant's license for foreign filing.

Applicants may wish to consult the USPTO booklet, "General Information Concerning Patents" (specifically, the section entitled "Treaties and Foreign Patents") for more information on timeframes and deadlines for filing foreign patent applications. The guide is available either by contacting the USPTO Contact Center at 800-786-9199, or it can be viewed on the USPTO website at <http://www.uspto.gov/web/offices/pac/doc/general/index.html>.

For information on preventing theft of your intellectual property (patents, trademarks and copyrights), you may wish to consult the U.S. Government website, <http://www.stopfakes.gov>. Part of a Department of Commerce initiative, this website includes self-help "toolkits" giving innovators guidance on how to protect intellectual property in specific countries such as China, Korea and Mexico. For questions regarding patent enforcement issues, applicants may call the U.S. Government hotline at 1-888-999-HALT (1-888-999-4158).

**LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER
Title 35, United States Code, Section 184
Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15**

GRANTED

The applicant has been granted a license under 35 U.S.C. 184, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier

310
License has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license, unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s) filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies, particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)); the Office of Export Administration, Department of Commerce (15 CFR 370.10 (i)); the Office of Foreign Assets Control, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

NOT GRANTED

No license under 35 U.S.C. 184 has been granted at this time, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form. Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12, if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has lapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U.S.C. 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).

311

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/ROH101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.169)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P6710 554509
I	Title of invention	COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF MELANOMA
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
II-5	Address	304 Old Main University Park, PA 16802-1504 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	814-863-7385
II-9	Facsimile No.	814-865-6277
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	ROBERTSON, Gavin P.,
III-1-5	Address	304 Old Main University Park, PA 16802-1504 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	KESTER, Mark,
III-2-5	Address	304 Old Main University Park, PA 16802-1504 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	SANDIRASEGARANE, Lakshman,
III-3-5	Address	304 Old Main University Park, PA 16802-1504 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	LEHMAN BELL, Janae,
IV-1-2	Address	McKee, Voorhees & Sease, PLC 801 Grand Avenue, Suite 3200 Des Moines, IA 50309 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	515-288-3667
IV-1-4	Facsimile No.	515-288-1338
IV-1-6	Agent's registration No.	55,370
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.8(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	

313

PCT REQUEST

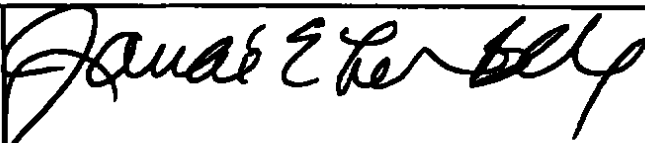
Original (for SUBMISSION)

VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	19 March 2004 (19.03.2004)	
VI-1-2	Number	60/554,509	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request		
	The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VII	Declarations	Number of declarations	
VII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	111	-
IX-3	Claims	6	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	30	-
IX-7	TOTAL	152	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	

314

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1-1	Name (LAST, First)	LEEMAN BELL, Janae,
X-1-2	Name of signatory	
X-1-3	Capacity	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	Date stamp of the receiving Office	
0-4	Form PCT/ROH101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.169)
0-9	Applicant's or agent's file reference	P6710 554509
2	Applicant	THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier Total amounts (USD)
12-1	Transmittal fee T	⇒ 300
12-2-1	Search fee S	⇒ 1000
12-2-2	International search to be carried out by	US
12-3	International filing fee (first 30 sheets) H	1211
12-4	Remaining sheets	122
12-5	Additional amount (A)	13
12-6	Total additional amount I2	1586
12-7	I1 + I2 = I	2797
12-12	EASY Filing reduction R	-87
12-13	Total international filing fee (I-R) I	⇒ 2710
12-14	Fee for priority document Number of priority documents requested	1
12-15	Fee per document (X)	20
12-16	Total priority document fee: P	⇒ 20
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+H+P)	⇒ 4030
12-18	Mode of payment	cheque
12-20	Deposit account instructions The receiving Office	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above	✓
12-21	Deposit account No.	26-0084
12-22	Date	18 March 2005 (18.03.2005)
12-23	Name and signature	LEHMAN BELL, Janae, <i>Janae LeF Bell</i>

316

13-2-7	Validation messages Contents	Yellow! The power of attorney or a copy of the general power of attorney will need to be furnished unless all applicants sign the request form.
	Validation messages Contents	Yellow The abstract shall be as concise as the disclosure permits (preferably 50 to 150 words if it is in English or when translated into English).

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

The present invention provides a rational basis for combining targeted therapies together with selected chemotherapeutics, which does not currently exist for the treatment of melanoma. The present invention is based on the present inventors' discovery that Akt3 regulates apoptosis and V599E B-Raf regulates growth and vascular development in melanoma. Inventors are the first to recognize an effective combined targeted therapeutic for treating melanoma. In one embodiment, the invention provides a method for inducing apoptosis in a melanoma tumor cell by reducing Akt3 activity. In yet another embodiment, the invention provides a method for inducing apoptosis in a melanoma tumor cell comprising contacting a melanoma tumor cell with an agent that reduces Akt3 activity. Consequently, the method provided restores normal apoptotic sensitivity to a melanoma tumor cell, thereby allowing the administration of a lower concentration of chemotherapeutic agents resulting in decreased toxicity to a patient.

The present inventors' contemplate a method for treating a melanoma tumor in a mammal comprising: administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent to induce apoptosis; and administering to a melanoma tumor an effective amount of an agent to reduce angiogenesis and cell proliferation. Also disclosed herein is a method for treating a melanoma in a mammal comprising: administering to a melanoma tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces Akt3 activity; administering to a melanoma tumor in a mammal an effective amount of an agent that reduces V599E B-Raf activity, thereby treating a melanoma tumor

In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition for treating a melanoma tumor comprising: an agent that reduces Akt3 activity; and a carrier.

318

318

CERTIFICATE OF EXPRESS MAILING

I hereby certify that the enclosed PCT application of the THE PENN STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, and check for \$4,030.00 and associated documents have been mailed by the U.S. Postal Service's Express Mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box: 1450, Mail Stop PCT, Alexandria, Virginia 22313-1450, prior to 5:00 p.m. on March 18, 2005.


Margaret Edwards
Express Mail # EV480032266US

319

319

18 March, 2005 Exp. Mail # Ev480032266US

AGENT REF# P6710 554509

APPLICANT: THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION

TITLE: COMBINATORIAL METHODS AND COMPOSITIONS FOR
TREATMENT OF MELANOMA

BASED ON USSN 60/554,509 FILED 19 MARCH 2004

Please acknowledge receipt of the following:

PCT Request Form PCT/RO/101 - 4 sheets

PCT Fee Calculation Sheet PCT/RO/101(Annex)

111 pgs Description; 6 pgs Claims, 1 pg Abstract;

30 Sheets of Drawings

PCT-SAFE on disk

Express Mail Certificate (in duplicate)

Check for \$4,030.00

MLE

McKEE, VOOHHEES & SEASE P.L.C.
ATTORNEYS AT LAW
601 GRAND AVE., SUITE 3200
DES MOINES, IA 50319-2725
(515) 281-2222
FAX (515) 281-2223
E-MAIL: info@mckeevoohhees.com
DATE: 3/18/2005
AMOUNT: \$4,030.00
Four Thousand Thirty and No/100 Dollars
R: Commissioner of Patents & Trademark
Washington, DC 20231
⑆07300⑆2⑆⑆073000⑆76⑆0⑆0⑆3009⑆48⑆⑆
P067105509

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◇ Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◇ Descripción de la invención ☒
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◇ Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

Fecha **19 SET. 2008**

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.cowww.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

PETITORIO

AS: 101.954

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 05-094108- -00000-0000
Fee: 2008-09-19 16:19:45 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eve: 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 319

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

19/10/06

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: THE PENN STATE RESEARCH
FOUNDATION

Dirección: 304 Old Main, University Park, PA 16802-
1504, 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. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Gavin P. Robertson, Mark Kester, Lakshman Sandi-Rasegarane

Dirección: 304 Old Main, University Park, PA 16802-1504, US; 304 Old Main, University Park,
PA 16802-1504, US; 304 Old Main, University Park, PA 16802-1504, US (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/008950 Fecha 18-03-2005

Publicación Internacional No. WO 2005/089443 A2 Fecha 29-09-2005

Título (54): METODOS COMBINATORIOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE
MELANOMA

7 Clasificación Internacional (51) A61P 35/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

19-03-2004

(31) Número de Solicitud

60/554,509

9 Comprobante de pago No. 08-525713 Fecha 18-09-2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

238

Lo que se reivindica es:

1. Un método para inducir apoptosis en una célula tumoral de melanoma, que comprende:

reducir la actividad Akt3.

2. El método de la reivindicación 1 en donde dicha reducción se realiza contactando una célula tumoral de melanoma con un agente que reduce la actividad Akt3.

3. El método de la reivindicación 2 en donde el agente se selecciona de un grupo conformado por una molécula de ARNip, una molécula complementaria, un antagonista, una ribozima, un inhibidor, un péptido, y una molécula pequeña.

4. El método de la reivindicación 3 en donde el agente es una molécula de ARNip que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que tiene una secuencia de

5'GGUCUAGCUACAGAGAAAUCUCGAU 3',

5'CUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',

5'GAAUUUACAGCUCAGACUA 3',

5'CAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'CUUGGACUAUCUACAUUCCGGAAAG 3',

5'CUUCCGGAAUGUAGAUAGUCCAAG 3',

5'GAUGAAGAAUUUACAGCUCAGACUA 3',

5'AGUCUGAGCUGUAAAUUCUUCAUC 3',

5'AAUUUACAGCUCAGACUAUUACAAU 3',

5'AUUGUAAUAGUCUGAGCUGUAAAUU 3', y sus complementos.

5. El método de la reivindicación 2 en donde dicha acción de contactar la célula tumoral de melanoma incluye el uso de: un liposoma, un moliposoma, un nanoliposoma que contenga ceramidas, un

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

REFERENCIA	Radicación No.	6 94108
	Solicitud internacional	PCT/US2005/008950
	Fecha inicio fase nacional	19/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	13577

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. Debe aclarar el número de reivindicaciones, por cuanto la publicación internacional y la publicación presentada en fase nacional presentan inconsistencias en la numeración.
3. Debe aclarar el nombre de los inventores por cuanto difieren en la publicación internacional y en el documento de cesión aportado con la solicitud. De acuerdo con lo anterior presentar la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486/00.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

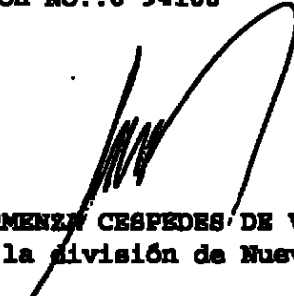
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

324 ~~94~~

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 6 94108



ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 24 NOV. 2006
alvarado